

**DOĞAL EKŞİ HAMURLARDAN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI
İLE BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN
SAPTANMASI**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID
BACTERIA FROM NATURAL SOURDOUGHS AND
DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC
CHARACTERISTICS**

GİZEM KEZER

PROF. DR. SAİT AYKUT AYTAÇ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2019

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

20 / 12 / 2019



GİZEM KEZER

YAYIMLAMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

20 / 12 / 2019

GİZEM KEZER

ÖZET

DOĞAL EKŞİ HAMURLARDAN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI İLE BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI

Gizem KEZER

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

Aralık 2019, 84 sayfa

Ekmek yapımında starter kullanımı gerekli ve önemli bir aşamadır. Bu amaçla kullanılan ticari starterler zaman tasarrufu sağlamakla birlikte ekmekler alışlagelmiş özelliklerden farklı olabilmektedir. Son zamanlarda katkı maddelerinde GDO bulunması özellikle tüketicilerde ciddi kaygılara neden olmuş ve bu durum ekmek üreticilerini de etkilemiştir. Sunulan tez kapsamında ülkemizin değişik bölgelerindeki fırınlardan alınan 7 farklı ekşi hamur örneğinden ve hem yurt içi hem de yurt dışından olmak üzere farklı değirmenlerden temin edilen 18 adet un örneğiyle "Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin ve Mayaların İzolasyonu ve Ekmek Kalitesi üzerine Etkilerinin Belirlenmesi" projesi kapsamında hazırlanan ekşi hamurlardan laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu amaçlanmıştır. Toplanan ekşi hamur örneklerinden 10, hazırlanan hamur örneklerinden izole edilen 143 adet olası LAB izolatının MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile ön tanımlaması yapılmıştır. Analiz sonucunda toplanan 7 hamur örneğinden elde edilen verilere göre mikroflorada *Lactobacillus sanfranciscensis* gibi türlerin tespit edilmesi hamurda ticari kültür kullanılmış olduğu olasılığını arttırmıştır. Bu sebeple hamur örnekleri yerine farklı bölgelerden toplanan un örneklerinden

hazırlanan ekşi hamurlar üzerinden çalışmaya devam edilmiştir. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile izolatların 106 tanesi tanımlanabilmiştir. Ön tanımlaması yapılan izolatların içinden ekşi hamurlarda en yaygın olarak bulunan ve daha iyi teknolojik özellikler gösteren *Lactobacillus plantarum* (57 adet) ve *Lactobacillus brevis* (20 adet) türleri seçilmiştir. Örnek/mikroorganizma çeşidi şeklinde gruplandırma yapılarak içlerinden 10 adet *Lactobacillus plantarum* ve 7 adet *Lactobacillus brevis* türü olan izolat ileri analizlerde kullanılmıştır. 17 izolatın Gerçek-Zamanlı PZR ile moleküler doğrulaması ve ardından 16S rRNA dizi analizi ile moleküler düzeyde tanımlaması yapılmıştır. PZR sonuçları ile 16S rRNA dizi analizi sonuçları birbiriyle % 100 uyum göstermiştir. Ayrıca izolatların bazı probiyotik özellikleri (asit toleransı ve safra toleransı) incelenmiştir. 17 adet izolat asit ve safra toleransı bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar göstermiştir ($p<0.01$). İzolatlar içinde Wz3 kodlu *Lactobacillus plantarum* türü olan izolat asit uygulamasına karşı en dayanıklı, Ç4 kodlu *Lactobacillus plantarum* türü olan izolat ise en dayanıksız izolat olarak tespit edilmiştir. Safra toleransı bakımından A1 kodlu *Lactobacillus brevis* türü olan izolat en dayanıklı, TB6/4 kodlu *Lactobacillus plantarum* türü olan izolat ise en dayanıksız izolat olarak tespit edilmiştir. Buna ek olarak izolatların tümü hem safra hem de asit uygulamasına karşı direnç göstermiş ve canlı kalmışlardır. Bu izolatların toplanan unlardan hazırlanan hamurlardan elde edilmesi sebebiyle ticari kültür olma olasılıklarının zayıf olduğu ve bu nedenle ticari preparatlara göre probiyotik özellikler bakımından daha üstün özelliklere sahip oldukları düşünülmektedir. Yapılan analizler ışığında 17 izolatın ekşi hamur eldesinde starter olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu ve ayrıca probiyotik olan bakterilere benzer özellikler gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma ile elde edilen 17 adet suşun ileri aşamalarda teknolojik özelliklerinin araştırılması ile ekmekçilikte alternatif kültür olarak değerlendirilmesi hususunda yapılacak çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ekşi Hamur, Laktik Asit Bakterileri, Starter Kültür, GDO, MALDI-TOF Kütle Spektrometresi, Gerçek-Zamanlı PZR.

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM NATURAL SOURDOUGHS AND DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC CHARACTERISTICS

Gizem KEZER

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

December 2019, 84 pages

The use of starters in bread making is an essential and important step. Commercial starters used for this purpose provide saving of time and breads have different properties as compared to conventional breads. Recently, presence of GMOs in additives has caused serious concerns especially in consumers and this situation has also affected bread producers. The aim of this thesis was to isolate lactic acid bacteria (LAB) from 7 different sourdough samples provided from bakeries located in various regions of our country and sourdoughs prepared within the scope of the project called “Isolation of Lactic Acid Bacteria and Yeasts from Natural Sourdoughs and Determination of Their Effects on Bread Making Quality” using 18 flour samples obtained from different mills both domestic and abroad. Firstly, 10 possible LAB isolates from collected sourdough samples and also 143 possible LAB isolates from the prepared sourdough samples were pre-identified by MALDI-TOF Mass Spectrometer. According to the data obtained from 7 dough samples collected, the identification of the species such as *Lactobacillus sanfranciscensis* in microflora increased the possibility that commercial culture was used in the dough. Therefore, instead of dough samples, sourdoughs prepared from the flour samples collected from different regions continued to work. 106 of the isolates

could be identified by MALDI-TOF Mass Spectrometer. Among the pre-identified isolates, *Lactobacillus plantarum* (57) and *Lactobacillus brevis* (20) strains, which are the most commonly found in the sourdoughs and show better technological properties, were selected. 10 *Lactobacillus plantarum* and 7 *Lactobacillus brevis* isolates were selected by grouping as sample/microorganisms types. Molecular confirmation and then molecular identification of 17 isolates was made by Real-Time PCR and 16S rRNA sequence analysis, respectively. PCR results and 16S rRNA sequence analysis showed 100% harmony with each other. In addition, some probiotic properties (acid tolerance and bile tolerance) of the isolates were researched. 17 isolates showed statistically significant differences in terms of acid and bile tolerance ($p < 0.01$). Among the isolates, *Lactobacillus plantarum* isolate coded as Wz3 was found to be the most resistant to acid application, while Ç4-coded *Lactobacillus plantarum* was determined as the most vulnerable isolate. In terms of bile tolerance, the A1-coded *Lactobacillus brevis* isolate was the most resistant, while the TB6 / 4-coded *Lactobacillus plantarum* was identified as the most susceptible isolate. In addition, all isolates showed resistance to both bile and acid applications and they were able to survive. Since these isolates are obtained from the doughs prepared from the collected flours, it can be concluded that they are less likely to be commercial cultures and have superior probiotic properties as compared to the commercial preparates. In the light of analyzes, it was determined that 17 isolates had the potential to be used as starter in sourdough and also showed similar properties to probiotic bacteria in terms of resistant to the bile and acids. It is expected that 17 strains obtained from this study will be based on the studies that will be carried out in order to evaluate their breadmaking quality as an alternative culture in bakery.

Keywords: Sourdough, Lactic Acid Bacteria, Starter Culture, GMO, MALDI-TOF Mass Spectrometer, Real Time PCR.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sadece bilimsel anlamda değil sahip olduğu eşsiz bilgisiyle hayatıma yön veren, desteğini benden esirgemeyerek her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ’a,

Bu tezin tamamlanmasında FHD-2017-15455 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne,

Tez çalışmalarım boyunca değerli katkı ve yönlendirmelerinden dolayı Tez İzleme Komitesi Üyeleri değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Dilek SİVRİ ÖZAY ve Sayın Prof. Dr. Nuray YAZIHAN’a,

MALDI-TOF MS çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. İpek MUMCUOĞLU’na, un ve hamur örneklerinin temininde emeklerinden dolayı Sayın Eren ÖZAY’a,

Doktora eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’ndeki saygıdeğer yöneticilerime ve hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili Gizem YALGIN, Ece KONURALP ve Şilan TÜLLÜK’e, ayrıca doktora eğitimim süresince desteklerini hep hissettiğim Dr. Öğretim Üyesi Meltem BAYRAKTAR ve Dr. Aslı AKILLI’ya,

Hayatım boyunca her koşulda bana destek veren, sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim annem-babam-kız kardeşim; Sevilay-Metin-Begüm Sinem KEZER’e,

Sonsuz Teşekkürler...

Gizem KEZER

Aralık 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Ekşi Hamur Tarihçesi.....	9
2.2. Ekşi Hamurun Genel Kompozisyonu.....	11
2.2.1. Ekşi Hamur Tipleri.....	11
2.2.1.1. Tip I.....	19
2.2.1.2. Tip II.....	13
2.2.1.3. Tip III	13
2.3. Ekşi Hamur Florası.....	14
2.4. Laktik Asit Bakterileri.....	95
2.5. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi.....	28
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	31
2.6.1. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	33
3. MATERYAL VE METOT.....	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Hamur Örnekleri	35
3.1.2. Un Örnekleri.....	35
3.1.3. Besiyeri ve Kimyasallar	36
3.1.3.1. Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	36

3.1.3.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanması	36
3.1.3.1.2. Serum Fizyolojik Hazırlanması	37
3.1.3.2. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlaması.....	37
3.1.3.2.1. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Ön Tanımlaması	37
3.1.3.2.2. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Gerçek-Zamanlı PZR ile Doğrulaması	37
3.1.3.2.2.1. Lambda Tamponu Hazırlanması.....	38
3.1.3.2.2.2. Lizozim (10mg/mL) Hazırlanması	38
3.1.3.2.2.3. Proteinaz K Solüsyonu (20mg/mL) Hazırlanması.....	38
3.1.3.2.2.4. Oligonükleotidler	38
3.1.3.2.2.5. Master Mix Hazırlanması	39
3.1.3.3. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	40
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	40
3.1.4.1. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Tanımlaması	40
3.1.4.2. DNA İzolasyonu ve Saflaştırma İşlemi Deney Düzenegi.....	42
3.1.4.3. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Gerçek-Zamanlı PZR ile Doğrulaması.....	42
3.2. Metot	43
3.2.1. Hamur Örnekleri	43
3.2.2. Unlardan Elde Edilen Ekşi Hamur Örnekleri	43
3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Stok Kültür Hazırlanması.....	43
3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlaması ve Doğrulaması.....	44
3.2.4.1. Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Tanımlaması	44
3.2.4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Gerçek Zamanlı PZR ile Doğrulaması	46
3.2.4.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin DNA İzolasyonu	46
3.2.4.2.2. Hedef DNA'nın Eklenmesi.....	48
3.2.4.3. 16S rRNA Dizi Analizi.....	48
3.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	49
3.2.5.1. Asit Toleransı.....	49

3.2.5.2. Safra Toleransı	49
3.2.6. İstatistiksel Analizler.....	49
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	50
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	50
4.1.1. Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	50
4.1.2. Un Örneklerinden Hazırlanan Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	50
4.2. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Sonuçları	51
4.2.1. Hamurlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Sonuçları	51
4.2.2. Un Örneklerinden Hazırlanan Hamurlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Sonuçları	51
4.3. Gerçek-Zamanlı PZR Sonuçları	58
4.4. 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları.....	59
4.5. Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özellikleri	61
5. YORUM.....	66
6. KAYNAKLAR.....	67
EKLER	74
EK 1 – Tanımlanan <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri	75
EK 2 – Tanımlanan <i>Lactobacillus brevis</i> suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri	79
EK 3 – Tezden Türetilmiş Bildiriler	82
EK 4 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	83
ÖZGEÇMİŞ	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Piyasadaki Ekşi Hamur Ürün Çeşitleri ve Hamur Asitlendiricileri.....	12
Çizelge 2.2. Sıklıkla İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerine Ait Gelişme ve Biyokimyasal Özellikler.....	14
Çizelge 2.3. Ekşi Hamur Fermantasyonu ile İlişkili ya da Fermente Ekşi Hamurda Bulunan <i>Lactobacillus</i> Türleri.....	26
Çizelge 2.4. Farklı Orjinli Ekşi Hamurlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri.	27
Çizelge 2.5. İn Vitro Koşullarda PZR Yöntemini Uygulayabilmek İçin Gereken Karışımın İçeriği.....	32
Çizelge 3.1. Alınan Hamur Örneklerinin Bölgelere Göre Dağılımı.	35
Çizelge 3.2. Alınan Un Örneklerinin Bölgelere Göre Dağılımı.	36
Çizelge 3.3. İzolasyon Amacıyla Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar.	36
Çizelge 3.4. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Ön Tanımlamada Kullanılan Kimyasallar.....	37
Çizelge 3.5. DNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı PZR ile Tanımlamada Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler.....	37
Çizelge 3.6. Çalışmada Belirlenen Gen Bölgesinin Özellikleri.....	38
Çizelge 3.7. Primerlerin ve Probların Özellikleri.	39
Çizelge 3.8. Master Mix Karışımı Standart Kit Protokolü.	39
Çizelge 3.9. Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri.....	40
Çizelge 3.10. Tanımlamada Belirlenen Programın Basamakları.....	48
Çizelge 4.1. Hamurlardan İzole Edilen Olası Laktik Asit Bakterilerine Ait Bilgiler ...	50
Çizelge 4.2. Un Örneklerinden Hazırlanan Hamurlardan İzole Edilen Olası Laktik Asit Bakterilerine Ait Bilgiler	50
Çizelge 4.3. Hamur Örneği İzolatlarının MALDI-TOF MS Sonucu.....	51
Çizelge 4.4. Un Örneği İzolatlarının MALDI-TOF MS Sonucu.....	52
Çizelge 4.5. Gerçek-Zamanlı PZR ile <i>Lactobacillus plantarum</i> Olarak Tanımlanan İzolatlar.....	58

Çizelge 4.6. Gerçek-Zamanlı PZR ile <i>Lactobacillus brevis</i> Olarak Tanımlanan İzolatlar	59
Çizelge 4.7. İzolatların 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları	60
Çizelge 4.8. İzole Edilen Mikroorganizmaların Asitlik (pH 2.5) ve Safra Tuzuna (% 0.3 Ovgall) Toleransı ile İlgili İki Yönlü Varyans Analiz Sonuçları.....	62
Çizelge 4.9. İzole Edilen Mikroorganizmaların Asitlik (pH 2.5) ve Safra Tuzuna (% 0.3 Ovgall) Toleransı	62
Çizelge 4.10.İzole Edilen Mikroorganizmaların Asitlik (pH 2.5) ve Safra Tuzu (% 0.3 Ovgall) Uygulamalarından Canlı Kalma Oranı (%) ile İlgili İki Yönlü Varyans Analiz Sonuçları	63
Çizelge 4.11.İzole Edilen Mikroorganizmaların Asitlik (pH 2.5) ve Safra Tuzu (% 0.3 Ovgall) Uygulamalarından Canlı Kalma Oranı (%)	64
Çizelge 4.12.Kontrol Grubu ile Asitlik ve Safra Uygulama Karşılaştırması.	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Analiz Basamakları	29
Şekil 2.2. 5 Farklı Bakteri Türüne Ait Spektral Parmak İzleri	30
Şekil 2.3. PZR Yöntemi Basamakları	32
Şekil 2.4. Gerçek-Zamanlı PZR Amplifikasyon Eğrisi	34
Şekil 3.1. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Plak Görüntüsü	41
Şekil 3.2. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Cihazı.....	41
Şekil 3.3. Hettich Mikro 200 Santrifüj	42
Şekil 3.4. Lightcycler 1.5.....	42
Şekil 3.5. 7500 Real-Time PCR System.....	43
Şekil 3.6. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlama ve Doğrulama Aşamaları	44
Şekil 3.7. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlama İşlemi Basamakları	45
Şekil 3.8. Bakterilerden DNA İzolasyonu ve Saflaştırılması	47
Şekil 4.1. İzolatların Tür Düzeyinde Dağılım Oranları	54
Şekil 4.2. Un Örneklerinden İzole Edilen Farklı Türdeki Mikroorganizmaların Sayısı. 55	
Şekil 4.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> ve <i>Lactobacillus brevis</i> 'in Lokasyonlara Göre Dağılımı.....	55
Şekil 4.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> ve <i>Lactobacillus brevis</i> Türü Mikroorganizmaların 18 Farklı Un Örneğinden İzole Edilme Oranları.....	56
Şekil 4.5. Un Çeşidine Göre <i>Lactobacillus plantarum</i> ve <i>Lactobacillus brevis</i> Türü Mikroorganizmaların Bulunma Düzeyi	56
Şekil 4.6. <i>Lactobacillus plantarum</i> ve <i>Lactobacillus brevis</i> Türü Mikroorganizmaların Un Çeşitlerinde Dağılımı	57
Şekil 4.7. Tam Buğday Çeşidi Unlardan Hazırlanan Ekşi Hamurlardan <i>Lactobacillus plantarum</i> ve <i>Lactobacillus brevis</i> Türü Mikroorganizmaların İzole Edilme Oranları.....	57
Şekil 4.8. <i>Lactobacillus plantarum</i> İzolatlarının Gerçek-Zamanlı PZR ile Tanımlama Görüntüsü	58
Şekil 4.9. <i>Lactobacillus brevis</i> İzolatlarının Gerçek-Zamanlı PZR ile Tanımlama Görüntüsü	59

Şekil 4.10. İzolatların DNA'larının Amplifikasyonu Sonucunda Elde Edilen Bantlar ...	60
Şekil 4.11. 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçlarına Göre Oluşturulan Dendrogram.....	61



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C _t	Eşik Döngüsü
g	Gram
kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
kg	Kilogram
mL	Mililitre
M	Molar
rpm	Dakikada Devir Sayısı
%	Yüzde

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
rRNA	Ribosomal Ribo Nükleik Asit
G	Guanin
C	Sitozin
A	Adenin
T	Timin
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
LAB	Laktik Asit Bakterisi
MALDI-TOF MS	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
MÖ	Milattan Önce

MRS	de Man Rogosa and Sharpe
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribosomal Ribonükleik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
HoPS	Homopolisakkarit
HePS	Heteropolisakkarit
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilir
A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
FN	Düşme Sayısı
CO ₂	Karbondioksit
yy	Yüzyıl
NaCl	Sodyum Klorür
HCl	Hidroklorür
RAPPD-PZR	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA - Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1. GİRİŞ

Ekmek, geçmişten günümüze kadar süregelen beslenme kültürümüzde hem temel bir gıda maddesi olması hem de iyi bir enerji kaynağı olması sebebi ile üzerinde sürekli araştırmalar yapılmaktadır (Menteş ve ark., 2004). İnsanlığın ekmeği tanınmasının ve pişirmesinin temeli oldukça eski dönemlere dayanmaktadır. Eskilerde buğdayın ezilip su ile karıştırılması, ardından kızgın taşlarda haşlanıp pişirilmesi ile üretimi yapılan ekmek, günümüzde gelişen teknoloji ile ileri tekniklerden yararlanılarak üretimi yapılan önemli bir gıda ürünü haline gelmiştir. Yapılan araştırmalar ışığında ekmek üretiminin tarihini anlatan eserlerin 7800 yıllık bir geçmişinin olduğu tespit edilmiştir. Asya kıtasının farklı bölgelerinde ve Çatalhöyük'te M.Ö. 5900-5700 yılları arasında taş ve topraktan inşa edilmiş bazı fırınlara ait kalıntılar bulunmuştur. Mısırlıların ise M.Ö. 3000-2700 tarihleri arasında ekmekçilik noktasında oldukça mesafe katettiği ve ayrıca M.Ö. 2000'li yıllarda birbirinden farklı 16 çeşit ekmek ürettikleri ortaya çıkmıştır (Çiftçi, 2017).

Endüstriyel olarak ekmek üretimi yapılırken meydana gelen duyuşsal özelliklerin kaybedilmesi, bununla ilişkili olarak tüketici tercihlerinin değişmesi, bayatlama ve mikrobiyolojik bozulmalardan kaynaklı ekonomik kayıpların artması gibi mevzuların önlenmesi önem kazanmıştır. Ayrıca günümüzde geleneksel ürünlere karşı artan talep, tüketicilerin koruyucu içermeyen, uzun raf ömrüne sahip, daha besleyici ve daha lezzetli ürün çeşitleri istemesi ile ilişkili olarak ekşi hamur ekmeklerine olan ilgi de artmıştır (Lotong ve ark., 2000). Daha iyi teknolojik özelliklere sahip, duyuşsal özellikler ve besin kalitesi açısından daha iyi ürün üretiminin sağlanması ve doğal üretim teknolojilerini tercih eden tüketicilerin memnun edilmesi amacıyla araştırmalar ekşi hamur üretimi üzerine yoğunlaşmıştır (Decock ve Cappelle, 2005).

Türkiye'de tahıla dayalı beslenme önemini korurken, özellikle beslenmede ilk sırayı ekmek almaktadır. Farklı bölge, yaş ve gelir gruplarına göre değişen ekmek tüketimi ülkemizde günde 100-800 gram arasında olup, ortalama 400 gramdır (Anonim a, 2019).

Kaliteli ve taze olan ekmekler genel olarak toplum tarafından sevilerek tüketilmektedir. Ekmeğin kabuk rengi, ekmek içi tekstürü ve yumuşaklığı tüketiciler tarafından ekmeğin

değerlendirilmesinde kabul edilebilirlik kriterleri olarak bilinmektedir. Hafif nemli, süngerimsi yapıya sahip olan bir ekmek, üretim sonrası yavaş da olsa bozulmakta ve bu bozulmaya bayatlama adı verilmektedir. Ekmek sahip olduğu karmaşık ve değişken yapıya bağlı olarak dayanıklılığı oldukça az olup, çabuk bayatlama eğiliminde olan bir gıdadır. Genel olarak ekmeğin bayatlaması fırından çıktıktan sonra ekmekte meydana gelen tüm değişiklikler olarak tanımlanabilir (Akgün, 2007).

Ekmeğin bayatlaması sonucu ekmek bileşimi ve besin değerleri açısından herhangi bir değişiklik görülmez ancak duyuusal özellikler bakımından tüketiciler tarafından değerlendirme dışı bırakılmakta ve buna bağlı olarak ekmek ziyan edilmektedir. Ülke geneli göz önüne alındığında büyük boyutlara varabilecek ziyanı/israfı önleyebilmek ancak kaliteli ve standart özelliklere sahip buğday eldesine bağlıdır. Her zaman kaliteli ekmek üretimine imkan veren buğday temini mümkün olmadığında; ekmeğin fizikokimyasal özelliklerini iyileştirmek, raf ömrünü uzatmak ve kaliteli ürün üretebilmek amacıyla çeşitli katkı maddeleri (malt unu, mikrobiyel enzimler, soya unu, emülgatörler, katı yağlar, süt ürünleri, patates unu) kullanılmaktadır. Hamurun asitliğini arttırmak, bayatlamayı geciktirmek, ekmek hatalarını ve hastalıklarını düzeltmek, hacim artışı sağlamak gibi amaçlarla kullanılan katkı maddeleri ise tüketicilerde bazı çekincelere neden olmaktadır.

Günümüzde tüketiciler doğal, koruyucu içermeyen, uzun raf ömrüne sahip, daha besleyici ve lezzetli özellikleri olan ürün çeşitlerini talep etmektedirler. Mayalanmamış hamurdan yapılan ekmeklere kıyasla mayalanmış hamurdan yapılan ekmekler tat, lezzet ve aroma bakımından daha zengindir. Ayrıca yüksek randımanlı kepekli undan yapılan ekmeklerin, kepeği artırılmış olan beyaz undan yapılan ekmeklere göre mineral madde ve vitamin yönünden daha zengin olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bunlara ek olarak hamurun fermantasyonu sırasında ekmekçilik mayası olan *Saccharomyces cerevisiae* kullanmak yerine ekşi mayanın kullanılması durumunda ekmek kalitesinde ve teknolojik değerinde daha üstün özelliklerin olduğu gözlenmiştir (Aksoy, 2009). Ekşi hamurdan hazırlanan ekmeklerin daha fazla hacim artışı, daha güçlü aroma, daha iyi ekmek içi yapısı ve uzun raf ömrü gibi pek çok üstünlüğünün bulunduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Bircan ve ark., 2017).

Her geçen gün tüketicilerin tercihlerinin doğal ve geleneksel ürünlere doğru kayması sebebiyle ekşi hamur kullanılarak elde edilen ekmeklere olan ilgi de artmaktadır. Bu taleplere bağlı olarak üreticiler endüstriyel olarak ekmek üretiminde ekmeğin kalitesini geliştirmek ve yeni özellikler kazandırabilmek amacıyla farklı teknolojilerle birlikte çeşitli ekşi hamur prosesleri uygulamaktadırlar.

Ekşi hamur; buğday veya avdar unu ve su karışımının laktik asit bakterileri (LAB) ve mayalarla fermente edilmesi sonucu elde edilmektedir (Randazzo ve ark., 2005). Bakteriler ve mayalar ekşi hamur mayasında beraber çalışarak doğal florayı oluşturmaktadırlar. Ekşi hamur mayasında bulunan laktik asit bakterilerinin meydana getirdiği asidifikasyon (nişastanın mikrobiyel hidrolizi ve proteolitik aktivite), ekmeğin depolanması sırasında oluşan fizikokimyasal değişiklikleri meydana getirmektedir. Ekşi hamurda bulunan mayaların laktik asit bakterilerine oranı 1:100'dr (De Vuyst ve Neysens, 2005).

Ekmek yapımında ekşi hamur kullanılması ekmeğin hacmini, yapısını ve duyuşal kalitesini geliştirir. Ayrıca ekmeğin sertleşme ve bayatlama süresinin gecikmesi üzerine pozitif etki yaparak hem fiziksel hem de mikrobiyolojik olarak raf ömrünü uzatır.

Ekşi hamur prosesi tahıl ürünlerinin mayalanmasında en eski biyoteknolojik proseslerden biridir (Galli ark., 2018). Ekşi hamur yöntemi yaklaşık olarak 5000 yıllık bir geçmişe dayanmaktadır. Yıllık 3 milyon tondan fazla miktarda ürünün üretilmesinde kullanımıyla ilişkili olarak endüstriyel önemini hala korumaktadır (Vogel ve ark., 2011). Ekşi hamurda mayalar ve bakteriler beraber faaliyet göstermektedir. Doğal floraya sahip olan ekşi hamur ekmeğinin; uygun hacim, güçlü aroma, iyi bir ekmek içi yapısı ve uzun raf ömrüne sahip olması nedeniyle tercih nedeni olduğu bildirilmektedir (Göçmen, 2001).

Ekşi hamurun florasında doğal olarak bulunan laktik asit bakterilerinin önemli bir kısmı probiyotik özellikte olduğu için ekşi hamurdan hazırlanan ekmek probiyotik bir ürün haline gelmektedir. Ayrıca ekşi hamurdan hazırlanan ekmeklerin glisemik indeksinin oldukça düşük olması, beta glukanın korunmuş olması, oluşan asitler nedeniyle fitat içeriğinin azaltılarak biyolojik yararlılığın arttırılması gibi sebeplerle de tercih nedenidirler (Bircan ve ark., 2017).

Ekmeğin bayatlamasına bağlı olarak kokusunda ve lezzetinde bazı önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalara bağlı olarak ekmekte lezzet ve aroma veren maddelerin bayatlama ile orantılı olarak azaldığı bildirilmektedir. Örneğin taze ekmeğin uçucu madde oranı 179-275 mikroekivalan iken, 24 saat sonrasında bu oran 40 kat azalarak 4.4-6.8 mikroekivalana düşmektedir. Ekşi maya kullanılarak hazırlanan ekşi hamurlardan hazırlanan ekmeklerin daha geç bayatladığı tespit edilmiştir, bunun sebebi olarak da kültürü oluşturan laktik asit bakterileri ve mayaların faaliyetleri sonucu oluşan laktik asit, asetik asit, diğer uçucu olan ve olmayan bileşiklerin varlığı gösterilmektedir. En önemli aroma maddesinin oluşumu pişirme sırasında meydana gelmekte olup buna örnek olarak buğday ekmeğinin kızarması sırasında oluşan ve ekmeğin iç kısmında tipik bir kokunun oluşumunu sağlayan bir aroma olan 2-acetyl-1-pyrroline maddesi gösterilebilir. Ekşi hamur fermantasyonunun yapılması ile hazırlanan ekmeklerde elde edilen kalite ile kimyasal olarak asitlendirilen ekmeklerin kalitesi arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır (Aksoy, 2009).

Son zamanlarda starter kültür çalışmalarında tanımlanan metabolik özellikler ile ekmeklerin sağlık açısından faydalarını arttırmak hedeflenmektedir. Ekşi hamur fermantasyonunun sadece mayalanmış ürünlerin kalitesini arttırmakla yetinmediği ayrıca insan sağlığı üzerine de olumlu etkileri bulunduğu bildirilmiştir (Galli ark., 2018).

Çoğu fırınlarda normal ekmek üretiminde, insan sağlığına zararlı mikotoksinlerin oluşmaması için ekmeğe fungal etkiyi durdurucu maddeler ilave edilmektedir. Yapılan çalışmalarda ekşi hamur kullanılarak hazırlanan ekmeklerde laktik asit bakterilerinin doğal olarak ürettiği laktik ve asetik asit, karbondioksit, di-asetil, hidrojen peroksit, kaproik asit, 3-hidroksi yağ asitleri, fenil laktik asit, siklin dipeptitler, röterin ve fungisinler gibi antifungal bileşiklerin ekmekte mikotoksin oluşumunu önlediği görülmüştür (Aksoy, 2009).

Tüketim alışkanlığı bakımından toplumumuz için vazgeçilmez bir ürün olan ekmek, ekşi hamur kullanılarak üretildiği takdirde yüksek kaliteli uzun raf ömürlü olacaktır, buna bağlı olarak da israfın önüne geçilecektir.

Ekşi hamurdan üretilen ekmeklerin son yıllarda daha fazla tercih edilmesine bağlı olarak ekşi hamur ekmeğinin geleneksel üretimden endüstriyel üretime geçişi hızlanmıştır (Küçükçuban, 2012). Ekşi hamurun hakim florasını maya ve laktik asit bakterilerinin oluşturması sebebiyle, fermantasyonun kontrol edilebilmesi ve güvence altına alınabilmesi için, saf laktik asit bakterilerinden oluşan starter kültür kullanımına gidilmiştir (Hansen ve ark., 1989).

Laktik asit bakterileri yoğurt, peynir, turşu, ekşi hamur gibi fermente gıdaların üretiminde kullanılmakta olup bu bakterilerin ürettikleri laktik asit ve asetik asit ekşi hamurdaki mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkiye sahiptir (Messens ve De Vuyst, 2002). Ayrıca laktik asit bakterilerinin insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde normal flora olumlu katkılarına olduğu, patojen mikroorganizmalara karşı ise savaşçı etkiler gösterebildiği bilinmektedir (Klaenhammer ve ark., 2002).

Ekşi hamur florası üzerine yapılan çalışmalarda *Lactobacillus* cinsi bakteriler ile *Saccharomyces* ve *Candida* cinsi mayaların daha baskın olduğu bildirilmiştir (Di Cagno ve ark., 2007). Tipik bir ekşi hamurdan sıklıkla *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum* ve *L. brevis* türü laktik asit bakterileri izole edilmektedir. Bunların dışında ise; *Carnobacterium divergens*, *L. amylophilus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici* ve *Tetragenococcus halophilus* türü laktik asit bakterilerinin de izole edildiği bildirilmiştir (Ur-Rehman ve ark., 2006).

Laktik asit bakterilerinin sahip olduğu metabolik özelliklerden olan organik asit üretimi, proteolitik aktivite, uçucu bileşenlerin sentezi ve antifungal özellikler ekmekte bayatlamayı geciktirici ve aromayı geliştirici etkilere sahiptir. Ayrıca daha güvenli ekmek üretimine de katkıda bulunmaktadır (Küçükçuban, 2012).

Bunun yanı sıra laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitelerine bağlı olarak glutenin hidrolizi ve bununla ilişkili olarak da yoğurma süresinin kısaldığı, hidrokoloidal yapıdaki mikrobiyel ekzopolisakkarit üretimiyle su kaldırma kapasitesinin arttığı ve düşük pH ile viskozitenin azaldığı saptanmıştır. Ekşi maya hamurlarından hazırlanan ekmeklerde ise ekmek içinin daha yumuşak olduğu, gaz tutma kapasitesinin gelişmesiyle ekmek hacminin arttığı ve mikrobiyel ekzopolisakkaritlerin yardımıyla

nişasta retrogradasyonunun engellendiği dolayısıyla bayatlamamanın geciktiği görülmüştür (Gül, 2005).

Yapılan çalışmalar sonucunda ekşi maya fermentasyonunun ilk iki gününde hızlı bir şekilde üretilen organik asidin patojen mikroorganizmaların gelişmelerini önlediği, ayrıca florada bulunan laktik asit bakterilerinin ısıya ve aside karşı dayanıklı antimikrobiyel bakteriyosin ile küf gelişimini engelleyen fenil laktik asit ürettikleri ve sünme etmeni *Bacillus subtilis* türü mikroorganizmaların gelişimini zayıflattıkları, bunun sonucunda da ekşi maya hamuru ile hazırlanan ürünlerin mikrobiyel kalitesinin iyileştiği tespit edilmiştir (Ekmekçi, 2014).

Bir araştırma sonucuna bağlı olarak *Lactobacillus plantarum* suşunun buğday ekmeğindeki *Fusarium* spp. gelişimini engellediği, bunun sebebi olarak da oluşturdukları laktik ve fenil laktik asit bileşiklerinin olduğu bildirilmiştir. Bunların dışında farklı ekşi hamurlardan izole edilen LAB' nin ürettiği organik asit dışında bavaricin.A ve plantaricin ST31 bakteriyosinleri ile BLIS C57 adlı bakteriyosin. benzeri inhibitör maddeler ve reutericyclin adlı antibiyotiğin antibakteriyel olarak varlığı ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda *L. sanfranciscensis*, *L. bavaricus* ve *L. plantarum*'un bakteriyosin sentezlediği ispat edilmiştir (Yağmur, 2013).

Gıda patojeni olan *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakterilerin ekmekte laktik asit bakterilerinin (LAB) ürettiği bakteriyosinler tarafından gelişmesinin engellendiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bakteriyosin benzeri inhibitör maddenin laktisin 3147 olduğu ve ekşi hamur fermentasyonu esnasında LAB tarafından üretildiği belirtilmiştir. Ayrıca bakteriyosinlerin gıda endüstrisinde kimyasal koruyucular yerine kullanılabileceği de ifade edilmiştir (Aksoy, 2009).

Ekzopolisakkaritler (EPS) değişik fonksiyonlara sahip olup, toksik veya zorlu çevre koşulları, rakip organizmalar, antibiyotikler ve faj saldırıları gibi etmenlere karşı koruyucu olarak biyofilm oluşturabilme yeteneğindedirler. Tüketicilerin düşük maliyetli ürünlerin yanı sıra doğal, katkısız ve fonksiyonel gıdaları tüketme eğiliminde olmalarına bağlı olarak güvenilir kabul edilen (GRAS) laktik asit bakterilerinin ekşi hamurda kullanımıyla katkı ilavesine gerek kalmadan LAB'lerinin oluşturduğu EPS'ler ile

koruyuculuk sağlanabilir. LAB tarafından oluşturulan EPS'ler, homopolisakkarit (HoPS) ve heteropolisakkarit (HePS) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Kaditzky ve ark., 2007).

Leuconostoc mesenteroides'ten elde edilen dekstran ve *Xanthomonas campestris*'ten üretilen ksantan endüstriyel olarak mikrobiyel EPS üretimine en iyi örnektir. Hidrokolloid olmasıyla ilişkili olarak yüksek miktarda suyu bağlayabilmektedir ayrıca yüksek hamur veriminde son ürünün tazeliğini de daha uzun süre korumaktadır. Bunların yanı sıra dekstranlar, hamur stabilitesini ve glutenin gaz tutma özelliğini geliştirmektedirler. Ayrıca *L. sanfranciscensis* LTH2590 tarafından üretilen levan prebiyotik özelliklere sahip bir HoPS'tir. EPS'lerin gastrointestinal sistemde daha uzun süre kalarak probiyotik bakterilerin kolonizasyonunu arttırmaları sebebiyle sağlık açısından faydalı oldukları, antitümör ve bağışıklık sistemini uyarıcı etkilere sahip oldukları ve kandaki kolesterolü düşürdükleri de ifade edilmektedir. Bu sebeple LAB tarafından üretilen EPS'ler, ekmek yapısını iyileştirmek amacıyla daha pahalı hidrokolloidlerin yerine ikame olarak kullanılabilir (Kaditzky ve ark., 2007).

Sonuç olarak ekmek üretiminde laktik starter kullanımı sonucu aşağıdaki faydalar sağlanmaktadır (Göçmen, 2001):

- İstenen kalite ve miktarda ürün eldesi,
- Üretim zamanından, yerden ve işçilikten tasarruf sağlanması,
- Farklı partilerde gerçekleştirilen ürünler arasında tekdüzelik sağlanması,
- Yeni ürün gelişimi,
- Daha güçlü aroma oluşumu,
- Ekmek içi yapısının iyileştirilmesi,
- Ekmek hacminin arttırılması,
- Raf ömrünün uzaması,
- Bozucu mikroorganizmaların etkisini ortadan kaldırarak üretim güvencesi sağlanması.

Bu tez çalışmasında, farklı bölgelerden temin edilen ekşi hamur örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve matriks yardımlı lazer iyonizasyon kütle spektrometresi (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF)) ile ön tanımlaması yapılmıştır. Ön tanımlaması yapılan suşların moleküler yöntemlerle (PZR gibi) doğrulanması yapılmış olup bazı probiyotik özellikleri (asit

dirençliliği, safra toleransı gibi) incelenmiştir. Farklı bölgelerden elde edilen yabancı türdeki laktik asit bakterilerinin benzerlikleri ve farklılıkları üzerinde durularak, teknolojik açıdan en uygun niteliklere sahip laktik asit bakterisi suşları belirlenmeye çalışılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ekşi Hamur Tarihçesi

Günümüzde dünya genelinde birçok farklı tipte ekmek üretimi gerçekleştirilmektedir. Ekmeğin formülasyonu ve üretiminde kullanılan teknolojiler hem ülkeler arasında hem de ülke genelinde farklılık göstermektedir. Bunun sebebi olarak geleneksel ve teknolojik farklılıklar gösterilebilir. Bu farklılıkların temeli olarak;

- 1) Ülkede hangi tür geleneksel tahılların yetiştirildiği ve bu tahılların ekmek üretimine uygunluğu
- 2) Geleneksel beslenmede ekmeğin yeri ve önemi
- 3) Yaşam tarzındaki değişiklikler ve yaşam standartları
- 4) Beslenme alışkanlıklarındaki küreselleşme
- 5) Yeni tür ekmek yapım ekipmanlarına yatırım yapmak için gerekli ekonomik imkanların durumu gösterilebilir.

Temel olarak çoğu ekmeğin üretiminde hammadde olarak un, su, tuz ve maya kullanılmaktadır. Bu temel karışıma tüketici tercihlerine bağlı olarak diğer tahıl unları ve şeker, yağ, malt unu, süt ve süt ürünleri, emülgatör ve gluten gibi katkı maddeleri eklenebilir (Narvhus ve Sorhaug, 2012).

Ekşi hamur, binlerce yıldır ekmek üretiminde hamurun özelliklerini, duysal karakterini, besin değerini ve ekmeğin raf ömrünü geliştirmek, iyileştirmek amacıyla kullanılan geleneksel bir üründür (Paramithiotis ve ark., 2007).

Ekşi hamur teknolojisi ekmek yapımından kek yapımına kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır. Buğday ekşi hamuru İtalyan ekmekçilik ürünlerinde % 30'dan daha fazla oranda kullanılmaktadır. Almanya, Polonya, Rusya ve İskandinavya ülkelerinde ise ekmek üretiminde çavdar unundan yapılan ekşi maya kullanılmaktadır (Corsetti and Settanni 2007).

Avusturya, Fransa, Almanya ve İsviçre'de ekşi hamurun ne olduğuna dair kısmen yasal niteliği olan birtakım resmi tanımlamalar yapılmıştır. Bu ulusal düzenlemeler farklı pazarlar için ekşi hamur ürünleri geliştirilirken dikkate alınmalıdır. Tüm bu tanımlamaların ortak özelliği göz önüne alındığında ekşi hamur, hamurun laktik asit bakterileri ve/veya mayalar tarafından fermente edilmesi ile meydana gelmektedir.

Almanya’da toplam asitlik üzerine etkisi olan kimyasal maddelerin kullanımına izin verilmemektedir. Buna ek olarak eğer ekşi hamurdan hamur asitlendirici ajanların ayrılması gerçekleştirilebilirse, ekşi hamura un ve su ilave edilerek yeni bir ekşi hamur fermentasyonu başlatılabilir. Buna karşın Fransa’da ekşi hamurun mayalama ajanı olarak fonksiyon gösterdiği belirtilmiştir. Avusturya ise ekşi hamur starter kültürleri için farklı tanımlamaların olduğu, ekşi hamur varlığının korunduğu tek ülkedir (Brandt, 2007).

Ekşi hamur ekmek üretiminde 5000 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Geleneksel ekşi hamur bir önceki üretimdeki hamurdan küçük bir parçanın alınarak un, tuz ve su ile karıştırılması yolu ile üretilmektedir. Alınan hamur parçasının saklanması sırasında unda bulunan laktik asit bakterileri tarafından laktik asit fermentasyonu gerçekleştirilmektedir. Buna ek olarak undan mayaların da geçmesi ile laktik asit bakterileri ve mayalar CO₂ üretimine bağlı olarak ekmeğin mayalanma kapasitesinde rol oynarlar. Mayalanmış ekşi hamur ekmeklerinin M.Ö. 3000’li yılların başlarında Mısır’da yapıldığı bilinmektedir. İbraniler Mısır’da iken ekmek yapmayı öğrenmişlerdir, ancak Mısır’dan giderken yanlarında fırınları götüremedikleri için kaçışları sırasında düz, mayasız ekmek yemek zorunda kalmışlardır. Yunanlılar geleneksel ekşi hamur ekmeği üretimini bilmiyorlardı. Yunan tarihçi Herodot mevcut durumu, Mısırlıların ekşi hamurlarını çürüyene dek bir kenara koyarak gerçekleşen süreci memnuniyetle izlediği, diğer insanların ise kalan son yiyeceklerinin çürümesinden korktukları şeklinde açıklamıştır. Pliny the Elder mayalı ekşi hamur ekmeği üretiminin M.Ö. 168 yılında Roma’da gelişmeye başladığını ifade etmiştir. Roma İmparatorluğu tarafından ekşi hamur ekmeği üretimi geleneğinin diğer Avrupa ülkelerine yayıldığı bilinmektedir. Company kelimesi (com panis = ekmek ile) o dönemlerde ekmeğini/yemeğini paylaşmak durumunda olan bir grup askere verilen addır. Ekşi hamur ilavesi ile gerçekleştirilen ekmek üretimi geleneği halen daha Akdeniz ve Orta Doğu ülkeleri ile A.B.D.’de San Fransisco körfezinde yaygın olarak devam etmektedir (Hansen ve Schieberle, 2005).

20. yy’ın başlarında ekmekçilik mayasının tanınmaya başlamasıyla ekşi hamurun maya olarak kullanımında azalmalar meydana gelmiştir. Bunun sebebi olarak da ekmekçilik mayasının ekmek üretiminde daha hızlı mayalanmaya olanak sağlaması gösterilebilir (Carnevali ve ark., 2007).

Avrupa’da kiři bařına dūřen yıllık fırıncılık ūrūnleri tūketim miktarı 50-85 kg olup bunun % 20’si buğday ya da çavdar unlarıyla yapılan ekři hamur fermentasyonu ūrūnlerini kapsamaktadır (Vogel ve ark., 2011).

Çavdar ekři hamurları, daha çok çavdarın yoğunlukla yetiştiğı Kuzey, Orta ve Doğı Avrupa ūlkelerinde kullanılmaktadır (Hansen ve Schieberle, 2005).

Ekři hamurda beklentilere bazen ūlkeden ūlkeye bazen de ūlke içinde değıřiklik gūsterebilmektedir. Orta, Kuzey ve Doğı Avrupa’da çavdar ekmeğı ūretiminde yūksek asitlikteki ekři hamurlar tercih edilirken, buğday ekmeğı tūketimi daha çok olan Gūney Avrupa’da dūřūk asitlikteki ekři hamurlar tercih edilir (Brandt, 2007).

Uygun fiyatlı lūks ve geleneksel ūrūnlere olan talebin artması sebebiyle buğday ekři maya ekmeğıne olan ilgi A.B.D.’de de her geçen gūn artmaktadır. Tūketiciler koruyucu ilavesi olmaksızın uzun raf ūmūrlū, yoğun bir tada sahip ve besleyici değeri yūksek çeřitli gıdaların ūretimini talep etmektedirler (Lotong ve ark., 2000). Kuřkusuz ki bu sebeple modern ekři maya ekmeğinde karakteristik aromanın iyileřtirilmesi ve raf ūmrūnūn uzatılması en ūnemli hedefler olarak karřımıza çıkmaktadır (Hansen ve Schieberle., 2005).

Wu ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada Kuzey Çin stili olan buharla pişmiş ekmeklerde ekři hamur fermentasyonunun etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonunda ekři hamur starteri ilavesi ile ekmek hacminin ve içi yumuşaklığının arttığını, hamurun su absorpsiyonunun ve gelişme sūresinin azaldığını tespit etmişlerdir.

Tahılların fermentasyonunda laktik asit bakterilerinin ilk keřfinden itibaren (Henneberg 1904), çok çeřitli çalıřmalar yūrūtūlmūřtūr. Yūrūtūlen çalıřmalara gūre 40’tan fazla LAB, 20’den fazla maya tūrū tespit edilmiřtir. Laktik asit bakterilerinden en çok *Lactobacillus* tūrlerinin, mayalardan da *Saccharomyces* ve *Candida* tūrū mayaların baskın tūrler olduğı tespit edilmiřtir (Cagno ve ark., 2007).

2.2. Ekşi Hamurun Genel Kompozisyonu

2.2.1. Ekşi Hamur Tipleri

Ekşi hamurlar, uygulanan teknolojiye bağılı olarak 3 gruba ayrılmaktadır.

- Tip I : Bir önceki fermentasyondan bir parça alınıp kullanılarak hazırlanan ekşi hamurdur.
- Tip II : Genellikle yarı akışkan formdaki hamur ekşiticilerdir.
- Tip III : Kurutulmuş ekşi hamur

Tip I hamurların aksine Tip II ve Tip III hamurlar için mayalama ajanı olarak fırıncılık mayasının (*S. cerevisiae*) ilavesi gerekmektedir (Rollan ve ark., 2010).

Farklı ülke veya bölgelerin üretim imkanlarına ve tat-aroma tercihlerine bağlı olarak oldukça çeşitli ekşi hamur ürünleri geliştirilmiştir. Çizelge 2.1.'de piyasadaki ekşi hamur ürün çeşitleri ve hamur asitlendiricileri gösterilmektedir (Brandt, 2007).

Çizelge 2.1. Piyasadaki Ekşi Hamur Ürün Çeşitleri ve Hamur Asitlendiricileri

Ürünler	Hammaddeler	Toplam asitlik (mL)	Una ilave edilme oranı (%)
Kurutulmuş ekşi hamurlar	Çavdar, buğday, durum, yulaf, karabuğday, malt unu vb.	40-220	1-6
Macun kıvamlı ekşi hamurlar	Çavdar, buğday, malt unu, hidrokolloidler vb.	25-100	3-30
Sıvı ekşi hamurlar	Çavdar, buğday, durum, yulaf unu vb.	30-150	1-10
Toz hamur asitlendiriciler	Prejelatinize unlar, organik asitler, bazen kurutulmuş ekşi hamur	<1000	0.5-1.5
Sıvı/macun kıvamlı hamur asitlendiriciler	Çavdar veya buğday unu, organik asitler, hidrokolloidler, bazen ekşi hamur	<400	0.5-3

2.2.1.1. Tip I

Geleneksel olarak elde edilen hamurlar olup oda sıcaklığı koşullarında (20-30 °C) aralıksız olarak yayılım gösterirler (Messen ve Vuyst, 2002). Proses genellikle 30°C'nin altındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Bu yöntemle hazırlanan ekmeklere örnek olarak San Francisco ekşi mayalı Fransız ekmeği, panetton ve üç aşamalı ekşi hamur çavdar ekmeği gösterilebilir. Çavdar ekmeklerinin endüstriyel anlamda üretilmesine bağlı olarak Tip II ekşi hamurları gelişmeye başlamıştır (Meroth ve ark., 2003a). Genel olarak baskın olan mikroorganizmalar *L. brevis*, *L. paralimentarius*, *L. plantarum*, *L. Rossiae*

ve *L. Sanfranciscensis* olup bu mikroorganizmalar düşük sıcaklıklarda inkübe olabilme ve sürekli çoğalabilme özellikleri ile karakterize edilirler (Minervini ve ark., 2011).

2.2.1.2. Tip II

Endüstriyel Tip II ekşi hamurlar, Tip I ekşi hamurlara göre daha yüksek sıcaklık, daha uzun fermantasyon süresi ve daha yüksek su içeriğiyle karakterize edilirler (Minervini ve ark., 2011). Çavdar ekmeği üretimi endüstrisinde ve hızlı, daha etkin, kontrol edilebilir, geniş çaplı ekşi hamur fermantasyonu prosesi için endüstriyel talepler doğrultusunda yarı akışkan formdaki Tip II ekşi hamur üretimi gerçekleştirilmektedir (De Vuyst ve Neysens, 2005). Temelde hamur asitlendirici olarak kullanılırlar. Genellikle 30 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda uzun süren periyotlarda (5 güne kadar) fermente edilirler. Ayrıca yüksek hamur verimi hamurun kolay bir şekilde pompalanmasına izin verir (Meroth ve ark., 2003a).

Tip II hamurlar genellikle endüstriyel proseslerde kullanılır. Çoğu zaman fermantasyon sıvısı hamur ekşitici katkısı ve aroma taşıyıcı olarak kullanılır. Bu tip hamurlarda baskın mikroorganizmalar *L. panis*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. sanfranciscensis*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. amylovorus* ve *L. frumentii*'dir (Vuyst ve ark., 2002). Cinslere bağlı olarak *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Weissella* cinslerine ait türler daha az sıklıkta izole edilmektedir (Minervini ve ark., 2011).

2.2.1.3. Tip III

Tip III ekşi hamur mayaları kurutulmuş olan toz formundaki hamurlardır ve asitlendirici katkıları, aroma vericiler olarak kullanılırlar. Tip II ekşi hamurlarında olduğu gibi Tip III ekşi hamurlarından da ekmek üretimi yapılırken mayalama ajanı olarak ekmekçilik mayası takviyesi kullanımı gerekmektedir (Meroth ve ark., 2003a).

Tip III ekşi hamurları geleneksel yöntemlerle hazırlanan hamurların dondurularak kurutulması ya da akışkan yataklı reaktörde kurutulması yolu ile elde edilirler (Messens ve Vuyst, 2002).

Bu gruptaki ekşi maya hamurlarında genellikle kurutmaya dayanıklı olabilen ve toz formda yaşayabilen laktik asit bakterileri bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak heterofermentatif *Lactobacillus brevis*, fakültatif heterofermantatif *Pediococcus*

pentosaceus ve *Lactobacillus plantarum* türü mikroorganizmalar gösterilebilir (De Vuyst and Neysens, 2005).

2.3. Ekşi Hamur Florası

Ekşi hamura has tat ve aromanın oluşmasında heterofermentatif laktik asit bakterilerinin ürettiği asetik asit ve laktik asit oldukça etkilidir (De Vuyst ve Neysens, 2005).

Ekşi hamur fermentasyonu sırasında laktik asit üretimi yapan *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türü mikroorganizmalar çeşitli çalışmalar sonucunda araştırmacılar tarafından izole edilmiş ve bu mikroorganizmalar ile liyofilize formdaki ticari kültür preparatları hazırlanarak farklı türde ekmekçilik ürünleri eldesi gerçekleştirilmiştir. Sıklıkla izole edilen *L. delbrueckii*, *L. brevis* ve *L. plantarum* starter kültürlerine ilişkin bazı özellikler Çizelge 2.2.'de verilmiştir (Çiftçi, 2017).

Çizelge 2.2. Sıklıkla İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerine Ait Gelişme ve Biyokimyasal Özellikler

Kültür	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. delbrueckii</i>
Gelişme			
Min. Sıc.	10 °C	10 °C	10 °C
Opt. Sıc.	37 °C	37 °C	37 °C
Maks. Sıc.	45 °C	45 °C	45 °C
pH aralığı	3.6-7	3.6-7	3.6-7
Tuz			
% 2.5	Hafif inhibisyon	Hafif inhibisyon	Hafif inhibisyon
% 5	Güçlü inhibisyon	Güçlü inhibisyon	Güçlü inhibisyon
Genel			
Glikoz	Heterofermentatif	Homofermentatif	Homofermentatif
Fruktoz	+	+	+
Maltoz	+	+	+
Laktoz	+	-	+
Sakkaroz	-	-	+
Nişasta	-	-	+
Ana dönüşüm ürünleri	DL-laktik asit, asetik asit, etanol, CO ₂	L(+)-laktik asit	DL-laktik asit

L. brevis ekmekçilik sektöründe kullanılan heterofermentatif bir mikroorganizma türü olup laktik asit, asetik asit, etanol ve diğer bazı aromatik bileşikler oluşturmaktadır. Oluşturdukları asetik asit bu tür mikroorganizmalara koruyucu özellik vermekte olup

kültürlerinde asetik asit:laktik asit oranı yaklaşık olarak 1:4'tür. *L. plantarum* ise hafif ekşimsi tada sahip, yumuşak formdaki ekmek çeşitleri için uygun olup hızlı asit üretme yetenekleri ile hafif ekşimsi tada sahip ekmeklerin üretimi için kullanılmaktadır. Bu türdeki kültür ile yapılan çalışmalar sonucunda Türk tipi ekmeği üretiminde istenilen tat ve aromayı sağladığı tespit edilmiştir. *L. delbruecki* ise ekmek üretiminde yumuşak ve hoş bir aroma oluşturmalarının yanı sıra beslenme açısından değerli olan L(+)-laktik asit oluşturmaktadır. Ayrıca buna ek olarak düşük FN'nin (düşme sayısı) değerli çavdar unlarında asitlendirme için uygun olduğu tespit edilmiştir (Çiftçi, 2017).

Tahıl unları mikrobiyolojik açıdan steril değildirler. 10^4 - 10^6 kob/g oranında bakteri, maya ve küf içermektedirler. Mikroflora ekşi hamur fermantasyonu sırasında değişmektedir. Laktik asit bakterilerinin önemli bir özelliği de sadece anabolik ve katabolik yollarla değil, aynı zamanda çevresel değişimlere bağlı olarak da değişiklik göstermesidir. Bunun yanı sıra ekşi hamurlarda laktik asit bakterilerinin varlığı ekşi hamur üretimi sırasında kullanılan teknolojiye de bağlıdır. Mikrobiyel etkileşimler, unun tipi, besin maddelerinin düşüklüğü ve değişkenliği, proses sırasındaki çevresel stresler ve teknolojiye bağlı değişimler laktik asit bakterilerinin biyokimyasal ve fizyolojik tepkilerini etkileyen başlıca faktörlerdir ve hamurdaki mikrobiyel topluluğun dayanıklılığını belirler. Ekşi hamurda mayalar laktik asit bakterileri ile etkileşim içindedirler ve genel olarak mayaların laktik asit bakterilerine oranları 1:100'dür (Rollan ve ark., 2010). Olgunlaşmış ekşi hamurda LAB oranı 1×10^9 - 3×10^9 kob/g arasında mayalar ise 1×10^6 - 5×10^7 kob/g arasında değişmektedir (Arendt ve ark., 2007).

Hem LAB'leri ile ilgili temel araştırmalarda hem de onların endüstriyel gıda fermantasyonu uygulamalarında laktik asit bakterilerinin tanımlanması için güvenilir ve basit metodlar gerekmektedir. Çünkü çoğu laktik asit bakterisi benzer beslenme ve büyüme gerekliliğine sahip olduğu için onların klasik metodlarla tanımlanması oldukça zordur (Klijn ve ark., 1991). 16S ribozomal RNA (rRNA) sekanslaması, rastgele güçlendirilmiş polimorfik DNA (RAPD) analizi ve diğer PZR temelli teknikleri içeren moleküler teknikler karmaşık ekosistemlerin taksonomik açıdan araştırılması için gereklidir. Bu tarz polifazik yaklaşımlar *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis* ve *Lactobacillus frumenti* gibi yeni türlerin tanımlanmasına izin vermiştir (Vuyst ve ark., 2002).

Ekşi hamur fermentasyonunun mikrobiyel ekolojisi bazı ekolojik faktörler tarafından belirlenmektedir. İçsel faktörler hamurun kimyasal ve mikrobiyolojik bileşenleri yolu ile, dışsal faktörler ise sıcaklık ve atmosfer yolu ile belirlenir. Mikroflora hamur verimi, miktarı ve starterin bileşimi ile çoğaltım aşamalarının sayısı ve fermentasyon süresi gibi proses parametreleri tarafından güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Devamlı gerçekleşen ekşi hamur üretimi sırasında bu parametrelerin etkileri laktik asit bakterileri ve mayalardan oluşan karakteristik mikrofloranın dağılımı üzerinde etkilidir (Meroth ve ark, 2003).

Güçlü bir asidifikasyon tarafından karakterize edilen ekşi hamurlarda daha çok *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella* ve *Lactococcus lactis* gibi asite dayanıklı türler mikrofloraya hakimdirler (Catzeddu ve ark., 2006).

Spontan ekşi hamur fermentasyonlarında ortamda baskın mikrofloraya sahip olan laktik asit bakterileri ve mayalar dışında fermentasyona önemli katkıda bulunan, düşük sayıda yaşamlarını sürdüren ikincil bir mikroflora bulunmaktadır. Bu ikincil mikroflora *L. alimentarius*, *L. acidophilus*, *L. fructivorans*, *L. fermentum*, *L. reuteri* ve *L. pontis* gibi LAB türlerini ve *S. exiguus*, *C. krusei* ve *C. milleri* gibi maya türlerini içermektedir. İkincil mikrofloradaki türler direkt ya da dolaylı olarak baskın mikroflora üzerinde bir etkiye sahiptirler. Yapılan çalışmalar ışığında çalışılan tüm ekşi hamurlarda *S. cerevisiae*, *L. sanfranciscensis* ve *L. brevis* stabil bir oluşum göstermişlerdir. Bunun yanı sıra *Pichia membranifaciens* ve *Yarrowia lipolytica* gibi maya türleri ile *L. paralimentarius*, *Weissella cibaria*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Enterococcus faecium* gibi laktik asit bakteri türleri düşük sayıda izole edilmiş olup ikincil mikroflora olarak tanımlanmışlardır (Paramithiotis ve ark., 2006).

Almanya, Avusturya, Rusya, Finlandiya, İsveç'te hazırlanan çavdar ekşi hamurlarından laktik asit bakterileri izole edilip karakterize edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar zorunlu homofermentatif türlerden *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* ve *L. farciminis*, fakültatif heterofermentatif türlerden *L. alimentarius*, *L. casei spp. casei*, *L. casei spp. Rhamnosus* ve *L. plantarum*, zorunlu heterofermentatif türlerden *L. brevis*, *L. viridescens*, *L. fructivorans*, *L. fermentum*, *L. buchneri* ve *L. sanfrancisco*'dur. En sık izole edilen türler ise *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum* ve *L. brevis*'tir (Rosenquist ve Hansen, 2000).

İtalyan buğday ve çavdar ekşi hamurlarında baskın mikroorganizma türü *L. plantarum* ve *L. alimentarius* ile ilişkili olan *L. sanfranciscensis*'tir, Altamura ekmeği, Portekiz ekşi hamurları ve pizza hamurlarında bulunmasına rağmen *L. paracasei* oldukça nadir görülen bir türdür. *L. sanfranciscensis* ve *L. brevis* ise Alman çavdar ekşi hamurlarında sıklıkla en çok izole edilen türlerdir. Rus çavdar ekşi hamurlarında *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. fermentum* baskın rol oynarken Finlandiya çavdar ekşi hamurlarında *L. acidophilus* ve *L. plantarum* en sık izole edilen türlerdir. İsveç çavdar ekşi hamurlarında ise *L. fermentum* sıklıkla izole edilmektedir. Bazen ekşi hamurlarda değişik türlerin bir arada bulunduğu oldukça kompleks bir yapı ile karşılaşılabilir. Örneğin İtalyan Pugliese ekşi hamurları *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum* ve *L. fructivorans* türü mikroorganizmaları, Foggia ekşi hamuru ise *L. brevis*, *L. sanfranciscensis*, *Leuconostoc citreum* ve *W. confusa* türü mikroorganizmaları içermektedir. Buğday veya çavdar unu olması, diğer bileşenler ve uygulanan proseste kullanılan teknolojiye değişiklikler ekşi hamurların mikrobiyel kompozisyonunda farklılıklara sebebiyet verir. Ayrıca son üründe karakteristik özelliklerin oluşumuna neden olur (Vuyst ve ark., 2002).

Genel olarak, gıda fermentasyonlarında maya/laktik asit bakterilerinin birlikteliğinin stabilitesi için gerekli karbon kaynağı açısından yarışmacı olmayan bir ortam başlıca ön koşullardan biridir. Ekşi hamurda spesifik mikrobiyel birlikteliğin stabilitesi bu mikroorganizmaların undaki mono ve disakkaritleri fermente edebilmesine bağlıdır (Paramithiotis ve ark, 2007). Yapılan çalışmalara bağlı olarak heterofermantatif laktik asit bakterilerinin karbon kaynağı olarak glikoz, maltoz ve früktozu, elektron alıcısı olarak ise oksijen ve fruktozu kullandıkları ayrıca bu sayede de homofermantatif laktik asit bakterilerine karşı üstünlük sağladıkları tespit edilmiştir (Ganzle ve ark., 2007).

Ekşi hamur florasında en sık rastlanan mikroorganizma türleri *Lactobacillus* türü mikroorganizmalar olup bunların dışında ayrıca *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* türü mikroorganizmalar da tespit edilmektedir. Ekşi hamur florası üzerine yapılan bazı başka çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Hamad ve ark. (1997), Sudan sorgum unu ve sorgum ekşi hamurunun bakteriyel florasının karakterizasyonu üzerine yürüttükleri bir çalışmada Sudan ev halkının Sudan sorgum unundan sürekli tekrarlayan şekillerde ürettiği spontan fermente ekşi

hamurunun ve uzun vadeli ekşi hamurun mikroflorasını araştırmışlardır. Sorgumunun baskın mikroorganizmalarının; sayısı yaklaşık olarak 10^5 kob/g olan Gram-negatif, katalaz-pozitif ve çomak şeklindeki bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir. Spontan olarak hazırlanan ekşi hamurlar Gram-negatif ve katalaz-pozitiften *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus reuteri*'ye kadar mikrobiyel bir dizilim göstermektedir. Çalışmanın 42. saatinde toplam bakteri sayısı 10^{10} kob/g'a ulaşırken, pH seviyesi ise 6.4'ten 3.35'e düşmüştür. Bu fazda geriye 1:1 oranında olacak şekilde sadece 2 tür (*L. fermentum* ve *L. reuteri*) baskın olarak kalmıştır. Uzun vadeli mayalanan Sudan ekşi hamurundan ise baskın florayı tanımlar şekilde 7 *Lactobacillus* türü izole edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar 16S rRNA gen sekanslarına göre sınıflandırılmış olup 5'i *L. vaginalis*, 2'si *L. helveticus* olarak tespit edilmiştir.

Corsetti ve ark. (1998) yürüttükleri bir çalışmada ekşi hamurda bulunan laktik asit bakterilerinin ekmeğin gevreklik ve bayatlama özellikleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. *L. sanfrancisco* CB1, *L. fructivorans* DD10, *L. plantarum* DC400, *L. farciminis* A80, *S. cerevisiae* 141, ve *S. exiguus* M14 türü mikroorganizmalar farklı kombinasyonlar şeklinde ekşi hamur örneklerine ilave edilmiştir. Başlangıçta mayaların ve laktik asit bakterilerinin konsantrasyonları sırasıyla $10^6 - 10^8$ kob/g iken ekşi hamur fermentasyonunun sonunda bu oranlar azalarak sırasıyla $1-5.3 \times 10^5$ kob/g, $4.5- 8.1 \times 10^7$ kob/g seviyesine gelmiştir. Ekşi hamura laktik asit bakterilerinin ilave edilmesi sonucu oluşan ekşime, proteoliz ve amiloliz tepkimelerinin gevreklik ve bayatlama süresini uzattığını, sadece maya ile hazırlanan ekmeklere oranla daha iyi depolama özelliklerine sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Gobbetti (1998), ekşi hamurdan sıklıkla izole edilen laktik asit bakterilerinin *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum* ve *L. brevis* olduğunu, ayrıca başlıca bulunan maya türünün *Saccharomyces cerevisiae* olduğunu bildirmiştir. Buna ek olarak; *S. exiguguus*, *C. krusei*, *Pichia norvegensis* ve *Hansenula anomala* türü mayaların varlığının tespit edildiğini belirtmiştir.

Rosenquist ve Hansen (2000), geleneksel ve organik olarak yetiştirilen çavdarlarla yapılan 2 ekşi hamur örneğinin mikrobiyel dayanıklılığını inceledikleri çalışmada ekşi hamurun laktik asit bakteri sayısını $8.43-9.14 \log_{10}$ kob/g, mayaların sayısını ise 6.00-

8.04 log₁₀ kob/g olarak tespit etmişlerdir. Fermantasyon süresi uzadıkça mayaların sayısının azaldığını, laktik asit bakterilerinin sayılarının ise arttığını belirtmişlerdir.

Meignen ve ark. (2001) yaptıkları bir çalışmada ekmek mayası ve *L. brevis*'i kullanarak ekşi hamur fermantasyonunu optimize etmişlerdir. *L. brevis* ve ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) içeren ticari kültürleri karışım ya da sade olarak hamur fermantasyonunda kullanmışlardır. Starterler karıştırıldığında hamurda maya gelişimi ve etanol üretimi azalırken, normale göre daha çok gliserol (% 80) ve asetik asit (% 55) oluşmuş, laktik asit miktarı ise sabit kalmıştır. Ayrıca karışık kültür kullanıldığında daha çok aroma bileşeninin üretildiği bildirilmiştir. Önce sade sonrasında karışık kültür kullanılıp fermantasyon süreci % 25 arttırıldığında tipik ekşi hamur aromasının sade veya karışık şekilde kullanılarak yapılan hamurlara göre daha gelişmiş olduğunu kaydetmişlerdir. Sade kültür kullanıldığında 20 saatlik inkübasyon sonucunda *L. brevis* sayısının 1x10⁷'den 92x10⁷'ye, maya sayısının ise 1x10⁶'dan 30x10⁶'ya çıkarken karışık kültür kullanıldığında 20 saatlik inkübasyon sonucunda *L. brevis* sayısının 1x10⁷'den 93x10⁷'ye, maya sayısının ise 1x10⁶'dan 5x10⁶'ya çıktığını tespit etmişlerdir.

Bello ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada in vitro koşullarda *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 suşunun antimikrobiyel aktivitesini görüntülemişler ve gıdaların küflenmesine karşı etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 suşunun ekmeklerde bozulma etmeni olan *Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum*'un gelişimini geciktirdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 suşunun ekmeğin raf ömrünü iyileştirici özelliklerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Ventimiglia ve ark. (2015), yürüttükleri çalışmada Batı Sicilya'da hazırlanan 15 adet ekşi hamurun fizikokimyasal özelliklerini ve LAB düzeylerini araştırmışlardır. 33 adet LAB suşu tespit etmişlerdir. Bunlar *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* ve *Lactobacillus graminis*'tir. İzole edilen suşlardan en yüksek asitlik üretenin *L. plantarum* PON100148 olduğunu bildirmişlerdir. İçlerinde *L. plantarum* PON100148 suşunun da bulunduğu 11 adet suşun ekstraselüler proteaz aktivitesinin pozitif olduğunu, farklı suşlar için bakteriyosin benzeri inhibitör bileşiklerin üretimi ve küf oluşumunu önleyici aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ancak en iyi ekşi hamur özelliği gösteren son ürün eldesinin *L. plantarum* PON100148 suşunun varlığında elde edildiğini bildirmişlerdir.

Todorov ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada ekşi hamurdan izole ettikleri *Lactobacillus plantarum* ST 31 suşu tarafından hazırlanan yeni geliştirilen antibakteriyel bileşenlerin tespitini ve karakterizasyonunu incelemişlerdir. Bu suşun ürettiği antimikrobiyel bileşenin *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* ve bazı gıda kaynaklı patojenlerin gelişimini engellediğini tespit etmişlerdir.

Corsetti ve ark. (2003), genotipik yöntemler ile ekşi hamurdaki laktik asit bakterilerinin karakterizasyonunu tespit edebilmek amacıyla yürüttükleri çalışmalarında İtalya'nın orta bölgeleri ve güney bölgelerinden topladıkları 45 ekşi hamur örneğinden öncelikli olarak 150 adet laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. Bunların 57 tanesinin *L. sanfranciscensis*, 3 tanesinin *L. fermentum*, 28 tanesinin *L. brevis*, 24 tanesinin *L. alimentarius*, 9 tanesinin *L. farciminis*, 17 tanesinin *L. plantarum*, 6 tanesinin *L. fructivorans* ve 4 adedinin *W. confusa* olduğunu tespit etmişlerdir.

Meroth ve ark. (2003a), değişik laktik asit bakterisi türlerini içeren 3 farklı ticari ekşi hamur starteri ve ekmek mayasını kullanarak 4 farklı ekşi hamur (A, B, C, D) üretmişler ve bu çalışma kapsamında ekşi hamur fermantasyonu prosesindeki bakteri popülasyonu dinamiğini PZR-DGGE tekniğiyle izlemişlerdir. Geleneksel yöntemlerle çavdar unundan yapılan A ekşi hamurunda *L. sanfranciscensis* ve yeni bir tür olan *L. mindensis* tespit edilmiştir. Yine çavdar unundan yapılan ancak proses sıcaklığında farklılıklar olan B ekşi hamurunda *L. crispatus* ve *L. pontis*, C ekşi hamurunda ise *L. crispatus*, *L. panis* ve *L. frumenti* baskın tür olarak tespit edilmiştir. D ekşi hamuru ise çavdar kepeğinden üretilmiş olup *L. johnsonii* ve *L. reuteri* türü mikroorganizmalarca zengin olarak tespit edilmiştir. İzolatlardan *L. sanfranciscensis* ve *L. fermentum* türü mikroorganizmaların RAPD-PZR analizi sonucuna bağlı olarak ticari kültür ve ekmek mayası orjinli olduğu bildirilmiştir.

Meroth ve ark. (2003b), ekşi hamur fermantasyon sürecinde mayaların PZR-DGGE tekniğiyle tanımlanması üzerine yaptıkları bir çalışmada 3 adet ticari ekşi hamur starteri ve ekmek mayası ile 4 farklı hamur üretmişlerdir. Geleneksel yöntem kullanılarak çavdar unundan hazırlanan A ekşi hamurunda *C. humilis* baskın mikroorganizma olarak tespit edilmiştir. Çavdar unundan yapılan ve sırasıyla 30 °C ve 40 °C'de fermente edilmiş olan B ve C ekşi hamurlarında baskın floranın *S. cerevisae* olduğu tespit edilmiştir. Çavdar kepeğinden hazırlanan D ekşi hamurunda ise *C. krusei* baskın

mikroflora olarak bulunmuştur. Ayrıca A, B ve C ekşi hamurlarında *Saccharomyces servazii*, *S. uvarum*, *Dekkera bruxellensis* ve *Epicoccum nigrum* türü mikroorganizmaların varlığını da tespit etmişlerdir.

Wick ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada çeşitli proses parametrelerinin (starter kültür, ekşi hamur tazeleme, hamur verimi, içerikteki maddeler) ekşi hamur fermantasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma pH ve gaz basıncının sürekli olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İlk olarak ekşi hamuru 30°C sıcaklıkta 8 saatlik periyotlarla un ve su ile tazelemişler, tazelemenin asidifikasyon ve gaz basıncına olan etkilerini değerlendirmiş olup her iki parametrenin de arttığını tespit etmişlerdir. % 2 oranında NaCl ilavesinin mayaları inhibe ederek daha düşük gaz oluşturma gücüne neden olduğunu bildirmişlerdir.

Menteş ve ark. (2004), Ankara, Bursa ve Trabzon'dan topladıkları 20 farklı ekşi hamur örneğinden *Lactobacillus* türü mikroorganizmaları izole etmişler ve bu mikroorganizmaları tanımlayarak temel endüstriyel özelliklerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda izole ettikleri 150 adet laktik asit bakterisinin en baskın gelenlerini *L. alimentarius* (31 adet) ve *L. plantarum* (21 adet), en az rastlanılan türlerini ise *L. amylovorus* (1 adet) ve *L. agilis* (1 adet) olarak tespit etmişlerdir. Bu mikroorganizmaların 37 °C'de 24 saat süre sonunda oluşturduğu pH düzeyinin 3.56-4.11 arasında değiştiğini, ayrıca 63 adetinin ise yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Pepe ve ark. (2004), doğal yollarla fermente edilen ekşi hamurlardan *L. plantarum* suşlarını izole etmişler ve bu mikroorganizmaların teknolojik ve moleküler farklılıklarını incelemişlerdir. Çalışma kapsamında Güney İtalya'dan 14 ekşi hamur örneği toplamışlar ve bu örneklerden 30 adet *L. plantarum* suşu izole etmişlerdir. Hamurlarda laktik asit bakteri sayısının 3-8.7 log kob/g, maya sayısının ise 5.2-8 log kob/g olduğunu bulmuşlardır 16S rRNA sekanslama ve amilaz, proteaz, fitaz ile antirope aktivitesi gibi teknolojik özelliklerdeki farklılıklara dayanarak tanımlamışlardır. Çalışma sonucunda *L. plantarum* türü mikroorganizmanın suşlarının farklı olmasına bağlı olarak hamurun kalitesinin etkilendiğini bildirmişlerdir.

Pulvirenti ve ark. (2004), geleneksel yöntemle hazırlanmış ekşi hamurlardaki baskın maya türlerini tanımlamak amacıyla Sicilya'nın farklı bölgelerinden 35 ekşi hamur

örneği toplamışlardır. PZR yöntemi ile izole edilen mikroorganizmaları tanımlamışlar ve fenotipik testlerle verileri doğrulamışlardır. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre maya türünden baskın mikrofloranın *S. cerevisiae*, onu takiben ise *C. milleri*, *C. humilis*, *S. exiguus* ve *Issatchenkia orientalis* olduğunu bildirmişlerdir.

Vernocchi ve ark. (2004), coğrafi işarete sahip tipik bir İtalyan ekmeği olan Ferrara ekmeğinin üretimindeki maya popülasyonunun karakterizasyonunu belirleme üzerine bir çalışma yürütmüşler ve ürettikleri ekşi hamur örneğinden izole ettikleri mayaları RAPD-PZR tekniği kullanarak tanımlamışlardır. Heterofermentatif laktik asit bakterilerinin varlığı sebebiyle ekşi hamurdaki yüksek asetik asit içeriğine (3 g/kg) bağlı olarak çoğu laktik asit bakterisi ve maya ekşi hamurda varlığını sürdürmezken *C. milleri*'nin dayanıklı olmasını maya türünün Ferrara ekmeği üretiminde esas maya olduğu anlamına geldiği yönünde açıklamışlardır. Ekşi hamurlarda LAB/maya oranı normal şartlarda 1:1000 ile 1:10 arasında değişirken, çalışmada ana hamurda bu oranın 1:1 çıkmasının sebebi olarak üretimi sırasındaki düşük fermantasyon sıcaklığını (18°C) göstermişlerdir.

Gül ve ark. (2005), Isparta'daki farklı fırınlardan 14 adet ekşi hamur örneği toplamışlar, ardından izole ettikleri laktobasiller ve *S. cerevisiae* ile ekşi hamur ekmeği üretimi gerçekleştirmişlerdir. Laktik asit bakterisi olarak *L. divergens* (% 6.1), *L. brevis* (% 15.1), *L. amylophilus* (% 6.1), *L. sake* (% 6.1), *L. acetotolerans* (% 6.1), *L. plantarum* (% 3), *P. pentosaceus* (% 6.1), *P. acidilactici* (% 6.1) ve *P. halophilus* (% 3) türlerini, maya olarak ise *S. cerevisiae* (% 27), *S. delbrueckii* (% 2.7), *T. holmii* (% 10.8) ve *T. unisporus* (% 2.7) türlerini izole etmişlerdir. İzole ettikleri laktik asit bakterilerini ve mayaları farklı kombinasyonlarda kullanarak ekşi hamur ekmeği yapmışlardır. En iyi reolojik özellikleri % 1.5 *L. amylophilus* ve % 1.5 *S. cerevisiae* ilave edilen ekmeklerde elde ederlerken, % 1.5 laktik asit bakterisi karışımı ve % 1.5 *S. cerevisiae* ilavesi ile hazırlanan ekmeklerin en kötü özelliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Randazzo ve ark. (2005), yaptıkları çalışma kapsamında Sicilya'nın farklı bölgelerinde geleneksel yöntemlerle hazırlanan ekşi hamur örneklerinden 45 adet laktik asit bakterisi izole edip fenotipik ve moleküler yöntemlerle tanımlamışlardır. 45 adet LAB izolatının tanımlama sonucunu 17 tanesi *L. sanfranciscensis*, 14 tanesi *L. pentosus*, 5 tanesi *L. plantarum*, 4 tanesi *L. kimchii* / *L. alimentarius* ve 3 tanesi de *L. casei* olarak bildirmişlerdir. İzole ettikleri mikroorganizmalar arasında sıklıkla Avrupa ekşi

hamurlarından izole edilen *L. fermentum*, *L. brevis* ve *L. paralimentarius* türü mikroorganizmalara rastlayamadıklarını belirtmişlerdir.

Ricciardi ve ark. (2005), Güney İtalya'da bulunan Apulia'da hazırlanan geleneksel durum buğday ekmeği olan Altamura ekmeği hamuru, farklı üreticilerden olmak üzere toplam 7 adet örnek temin etmişlerdir. Ekşi hamur örneklerinin tümünde laktik asit bakterilerinin sayısının 10^7 - 10^8 kob/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. İzole edilen mikroorganizmaların % 88'inin fakültatif heterofermentatif laktik asit bakterisi (*L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei*), %12'sinin ise heterofermantatif laktik asit bakterisi (*L. brevis*, *Leu. mesenteroides*) olduğunu tespit etmişlerdir.

Catzeddu ve ark. (2006), Sardinya'dan (İtalya) topladıkları 25 farklı ekşi hamurdan olası 210 adet laktik asit bakterisi izole etmişler ve RAPD-PZR tekniğini kullanarak moleküler tanımlamalarını yapmışlardır. Tanımlama sonucuna bağlı olarak 12 farklı türe ayrılan izolatlardan en sık elde edilenleri *L. pentosus* (% 38.3), *L. plantarum* (% 10), *L. brevis* (% 10), *W. confusa* (% 12) *L. sanfranciscensis* (% 11) ' dir. Diğerleri ise *L. casei*, *L. zaeae*, *P. pentosaceus*, *L. sakei*, *L. alimentarius*, *L. farciminis* ve *Leu. citreum* 'dur.

Paramithiotis ve ark. (2006), yaptıkları bir çalışmada ekşi hamurda laktik asit bakterileri ve *S. cerevisiae*'nin birbirleriyle olan etkileşimlerini incelemişlerdir. Starter olarak *S. cerevisiae*, *L. sanfranciscensis*, *L. brevis*, *W. cibaria*, *L. paralimentarius*, *P. pentosaceus* ve *E. faecium* türü mikroorganizmaları kullanmışlardır. Laktik asit bakterilerini hem tek olarak, hem de maya ile kombine ederek buğday unundan ekşi hamur üretmişlerdir. HPLC analizi ile ekşi hamurlardaki metabolik ürünler tespit edilmiştir. Ortamda laktik asitin varlığı *S. cerevisiae*'nin finalde hücre verimini etkilememiş ancak maksimum spesifik gelişme oranını ve etanol üretimini negatif yönde etkilemiştir.

Şimşek ve ark. (2006), ekşi hamur prosesleri için laktik starter kültürleri izole ederek antimikrobiyel aktivitelerini incelemişlerdir. Bu amaçla Uşak'taki farklı fırınlardan 60 adet ekşi hamur örneği toplamışlardır. Hamurların kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerini incelemişlerdir. Antimikrobiyel aktiviteye sahip laktik asit bakterisi suşlarını izole edip tanımlamışlardır. Seçilen suşların metabolik özelliklerini (toplam asitlik, organik asit, diasetil üretimi, proteolitik ve amilolitik enzim aktivitesi özellikleri)

tespit etmişlerdir. Ekşi hamur starteri olarak en iyi özelliklere sahip olan suşları *L. brevis* ssp. *lindneri* 2103, *L. viridescens* 241, 242, *Pediococcus* sp. E5 ve *L. delbrueckii* F5 olarak tespit etmişlerdir.

Corsetti ve ark. (2007), İtalya'nın Abruzzo bölgesinden topladıkları 6 ekşi hamurdan olası 21 adet laktik asit bakterisini izole edip fenotipik ve genotipik karakterizasyonunu incelemişlerdir. Çalışma sonucunda *E. faecium* ve *P. pentosaceus* türü mikroorganizmaların baskın flora olduğunu ve bu suşların hamurlarda hızlı bir asidifikasyon gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir.

Scheirlinck ve ark. (2008), Belçika'nın farklı yerlerinden topladıkları 39 geleneksel ekşi hamurlardan izole ettikleri bakterilerin taksonomik yapısını ve dayanıklılıklarını incelemişlerdir. Analizler sonucunda geleneksel Belçika ekşi hamurlarında *L. sanfranciscensis*, *L. paralimentarius*, *L. plantarum* ve *L. pontis* türü mikroorganizmaların baskın mikroflora olduğunu ifade etmişlerdir.

Robert ve ark. (2009), Fransız buğday ekşi hamurlarındaki laktik asit bakterilerinin biyoçeşitliliğini moleküler yöntemlerle tespit etmek amacıyla yürüttükleri bir çalışmada Güneybatı Fransa'dan 9 farklı buğday ekşi hamuru temin ederek 290 adet laktik asit bakterisi izole etmişler ve PZR ile tanımlamışlardır. Çalışma sonucunda 6 cins bakteri tespit edilmiştir. Bunlar; *Lactobacillus* (% 39, 8 tür), *Pediococcus* (% 38, 1 tür), *Leuconostoc* (% 17, 2 tür), *Weisella* (% 4, 2 tür), *Lactococcus* (% 1, 1 tür) ve *Enterococcus* (<% 1, 1 tür)'dur. Tanımlaması yapılan 15 tür ise; *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. paracasei*, *L. sanfranciscensis*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum*, *L. sakei*, *L. brevis*, *P. pentosaceus*, *L. mesenteroides*, *L. citreum*, *W. cibaria*, *W. confusa*, *L. lactis* ve *E. hirae*' dir.

Hütner ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada yulaf ekşi hamurundan izole ettikleri laktik asit bakterilerini tanımlayarak onların yulaf ekmeği kalitesini iyileştirme potansiyellerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda yulaf ekmeğinde baskın mikroflorayı oluşturan mikroorganizmaları *Leu. argentinum*, *P. pentosaceus*, *W. cibaria* ve *L. coryniformis*'in türleri olarak bildirmişlerdir. Yulaf ekşi hamurlarından izole edilen laktik asit bakterilerinin buğday ve çavdar ekşi hamurlarından izole edilenlere göre farklı olduklarını belirtmişler, heterofermentatif laktik asit bakterileri ile gaz üretimi konusunda kombinasyon yapılması durumunda hamurun yumuşaklığı ve

nişastanın yapışma özelliklerinde değişikliklere yol açarak farklılık yaratacağını bildirmişlerdir.

Minervini ve ark. (2011), geleneksel İtalyan ekmeklerinin üretiminde kullanılan ekşi hamurlardaki laktik asit bakterisi ve mayaların mikrobiyel çeşitliliğinin hamurun bileşenleriyle olan etkileşimini inceledikleri bir çalışmada 19 adet ekşi hamur örneği toplamışlardır. Örneklerden bakterileri izole ederek toplamda 20 adet laktik asit bakterisi, 4 adet de maya tanımlamışlardır. Oran olarak laktik asit bakterileri içinde en sık izole edilen tür *L. sanfranciscensis* (% 28) olup onu *L. plantarum* (% 16) ve *L. paralimentarius* (% 14) izlemiştir. Bunlardan farklı olarak *W. cibaria*, *W. confusa*, *Leu. citreum*, *L. sakei*, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *P. pentosaceus*, *L. gallinarum*, *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *P. inopinatus*, *L. casei*, *L. brevis*, *P. argentinicus*, *L. rossie*, *W. paramesenteroides*, *L. spicheri*, *L. namurensis* ve *E. durans* türü laktik asit bakterilerini de izole etmişlerdir. 19 örneğin 16'sında *Saccharomyces cerevisiae* gözlenirken, onun dışında *Candida humilis*, *Kazachstania barnettii* ve *Kazachstania exigua* türü mayalar da tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda bileşenler, kullanılan unun çeşidi, mikrobiyel topluluk ve ekşi hamurun biyokimyasal özellikleri arasında bir korelasyonun olduğunu bildirmişlerdir.

2.4. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri Gram-pozitif, katalaz-negatif, spor oluşturmeyen, uzunlukları 1.5-5 µm arasında değişen, çubuk şekilli bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Çoğu laktobasil mezofilik olmasına rağmen az da olsa psikotropik, termodurik ya da termofilik türü bakteriler de içermektedir. Optimum gelişebilme sıcaklıkları 30-45 °C arasında değişmekte olup bazı türleri tuz, ozmotik basınç ve düşük su aktivitesine karşı oldukça yüksek tolerans göstermektedir. Aside dayanıklılık tüm laktobasiller için ortak bir özellik olup pH 4.4'ün altında gelişebilme yeteneğine sahiptirler. Ancak gelişebilmeleri için optimum pH 5.5-6.5'tir. Bazı türleri etanol ve safra toleranslıdır. Çoğu türler oksijene toleranslı iken bir kısmı ise mutlak anaerobik şartlara ihtiyaç duymaktadır (Gerekova ve ark., 2011).

Laktik asit bakterileri, laktik asit fermentasyonunun gerekli olduğu süt ürünleri (yoğurt ve peynir), fermente sebzeler (zeytin, turşu), fermente etler (salam) ve ekşi hamur ekmeği gibi gıdaların üretiminde oldukça önemli bir role sahiptirler (Tannock, 2004).

Laktobasiller fermentatif bakteriler olup şekeri fermente etme yeteneklerine göre homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere temelde 2 farklı gruba ayrılmaktadır. Bazı türler ise hem fizyolojik hem de fizyolojik kapasite açısından şekerleri her iki şekilde de fermente edebilme yeteneğine sahiptir ve bu türler fakültatif heterofermentatif bakteriler olarak sınıflandırılırlar (Gerekova ve ark., 2011).

Ekşi hamur fermantasyonu ile ilişkili ya da fermente ekşi hamurda bulunan *Lactobacillus* türleri Çizelge 2.3.'te verilmiştir (Corsetti ve Settanni, 2007).

Çizelge 2.3. Ekşi Hamur Fermantasyonu ile İlişkili ya da Fermente Ekşi Hamurda Bulunan *Lactobacillus* Türleri

Zorunlu Heterofermentatif	Fakültatif Heterofermentatif	Zorunlu Homofermentatif
<i>L. acidifarinae</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. amylovorus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. delbruecki</i> ssp. <i>delbrueckii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>L. paralimentarius</i>	<i>L. farciminis</i>
<i>L. fructivorans</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. mindensis</i>
<i>L. frumenti</i>		<i>L. crispatus</i>
<i>L. hilgardii</i>		<i>L. johnsonii</i>
<i>L. panis</i>		<i>L. amylolyticus</i>
<i>L. pontis</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rossiae</i>		
<i>L. sanfranciscensis</i>		
<i>L. siliginis</i>		
<i>L. spicheri</i>		
<i>L. zymae</i>		

Laktik asit bakterilerinin gelişimi sırasında gerçekleşen asidifikasyon ve enzimatik prosesler, fermente gıdaların çeşitliliği için gerekli aroma, tekstür ve koruyucu özelliklerinin temelini oluşturur. Laktik asit bakterilerinin endüstriyel uygulamaları temelde yararlı ve patojen olmayan 6 farklı tür ile gerçekleştirilmektedir. Bunlar *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus oeni* ve *Streptococcus thermophilus*'tur. Laktik asit bakterilerinin diğer üyeleri, özellikle laktobasiller, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerindeki önemli boşlukları doldurduğu ve gösterdiği probiyotik özelliğinden dolayı genel sağlığa önemli etkileri olduğu bildirilmiştir. Normal mikroflora üzerindeki etkileri, patojenlerle yarışarak

onları dışarıda bırakmaları ve mukozal bağışıklığın uyarılması gibi etkileri bu bakterilerin faydalarını göstermektedir. Ayrıca laktik asit bakterileri endüstriyel kimyasalların ve biyolojik ürünler olan biyopolimerler (*Leuconostoc spp.*), enzimler (*Lactobacillus brevis*), etanol ve laktik asitlerin (*Lactobacillus casei*, *lactis*, *delbrueckii*, *brevis*) üretiminde kullanılmaktadır (Klaenhammer ve ark., 2002).

L. sanfranciscensis (*L. brevis* spp. *lindneri*), *L. plantarum* ve *L. brevis* ekşi hamurlardan sıklıkla izole edilen laktobasillerdir (Gobbetti, 1998). Bunların dışında ekşi hamurlarda *Carnobacterium divergens* (*L. divergens*), *L. amylophilus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici* ve *Tetragenococcus halophilus* (*P. halophilus*) türü mikroorganizmalara da rastlanılmaktadır (Rehman ve ark., 2006).

Ekşi hamur üretiminde kullanılan tahıl çeşidi ve uygulanan fermantasyon koşullarına bağlı olarak laktik asit bakterileri türlerinde büyük bir çeşitlilik ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalara bağlı olarak farklı orjinli ekşi hamurlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin biyoçeşitliliği Çizelge 2.4.'te verilmiştir (De Vuyst ve Neysens, 2005).

Çizelge 2.4. Farklı Orjinli Ekşi Hamurlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri

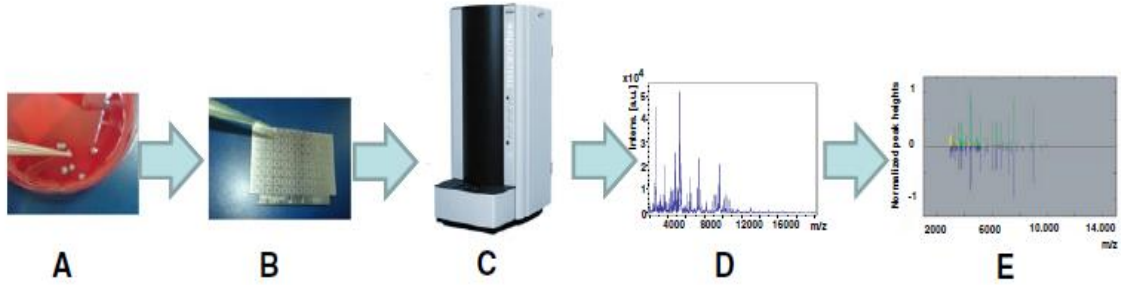
Ülke	Ürün	Laktik Asit Bakteri Türü
Belçika	Buğday/çavdar ekşi hamuru	<i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. <i>a</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. helveticus</i>
Danimarka	Çavdar ekşi hamuru	<i>L. reuteri</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. amylovorus</i>
Finlandiya	Çavdar ekşi hamuru	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>
Fransa	Buğday ekmeği	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. curvatus</i>
Almanya	Buğday ekşi hamuru	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. brevis</i>
	Çavdar ekmeği	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. buchneri</i>
	Çavdar ekşi hamuru	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>Pediococcus</i> spp., <i>L. amylovorus</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. reuteri</i>
	Buğday ekşi hamuru (panettone, buğday ekmeği)	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. hilgardii</i> (spontaneous); <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>W. viridescens</i> (masa madre)
	Çavdar kepeği	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. mindensis</i> (type I rye sourdough); <i>L. crispatus</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. panis</i> , <i>L.</i>

Yunanistan	Buğday ekşi hamuru	<i>fermentum</i> , <i>L. frumenti</i> (type II rye sourdough); <i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i> (type II rye bran sourdough) <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. a, <i>L. paralimentarius</i> , <i>W. cibaria</i>
İtalya	Panettone	<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> spp.
	Umbrian ekşi hamuru	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farciminis</i>
	Pizza	<i>L. sakei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. gelidum</i> , <i>Leuc. Mesenteroides</i>
	Verona ekşi hamuru	<i>L. sanfranciscensis</i>
	Lombardian ana hamuru	<i>L. sanfranciscensis</i>
	Apulian buğday ekşi hamuru	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>W. confusa</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
İran	Sangak	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>P. cerevisiae</i>
Meksika	Pozol	<i>L. lactis</i> , <i>S. suis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. delbrueckii</i>
Fas	Geleneksel ekşi hamur starteri	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> sp
	Cıvık buğday hamuru	<i>L. plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Portekiz	Broa	<i>Leuconostoc</i> spp., <i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. equinus</i>
Rusya	Çavdar ekşi hamuru	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i>
İspanya	Buğday ekşi hamuru	<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>Leuc. Mesenteroides</i>
Sudan	Kisra	<i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. helveticus</i>
İsveç	Çavdar/Buğday	<i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>W. viridescens</i>
Amerika	Çavdar ekşi hamuru	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>P. pentosaceus</i>
	San Francisco ekşi hamuru Fransız ekmeği	<i>L. sanfranciscensis</i>

2.5. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi

MALDI-TOF Kütle Spektrometresi koloni halinde Petri kutularında gelişmiş halde bulunan bakteri ve mayaları dakikalar içinde tanımlayabilmektedir. Bu metodun güvenilirliği ve doğruluğu yapılan sayısız çalışma ile ispatlanmıştır. Prensibi kristalleşmiş örnek materyalinin kısa lazer darbeleri ile iyonizasyonuna dayanmaktadır. İyonlar hızlandırılır ve vakumlu uçuş türü içinde uçuş süreleri ölçülür. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi proteinlerin ve peptidlerin kütlelerinin tespiti ve buna ek olarak

ayrıca daha önce tanımlanmamış proteinlerin tanımlanması konusunda yapılan çalışmalarda başarılı bir yöntemdir. Şekil 2.1.'de MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analiz basamakları şematik olarak gösterilmiştir (Wieser ve ark., 2012).



Şekil 2.1. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Analiz Basamakları

A Kültür kolonilerinden alınıp target üzerine yayılır.

B Örnekler matrix solüsyonu ile kaplanır ve hava akımı ile kurutulur.

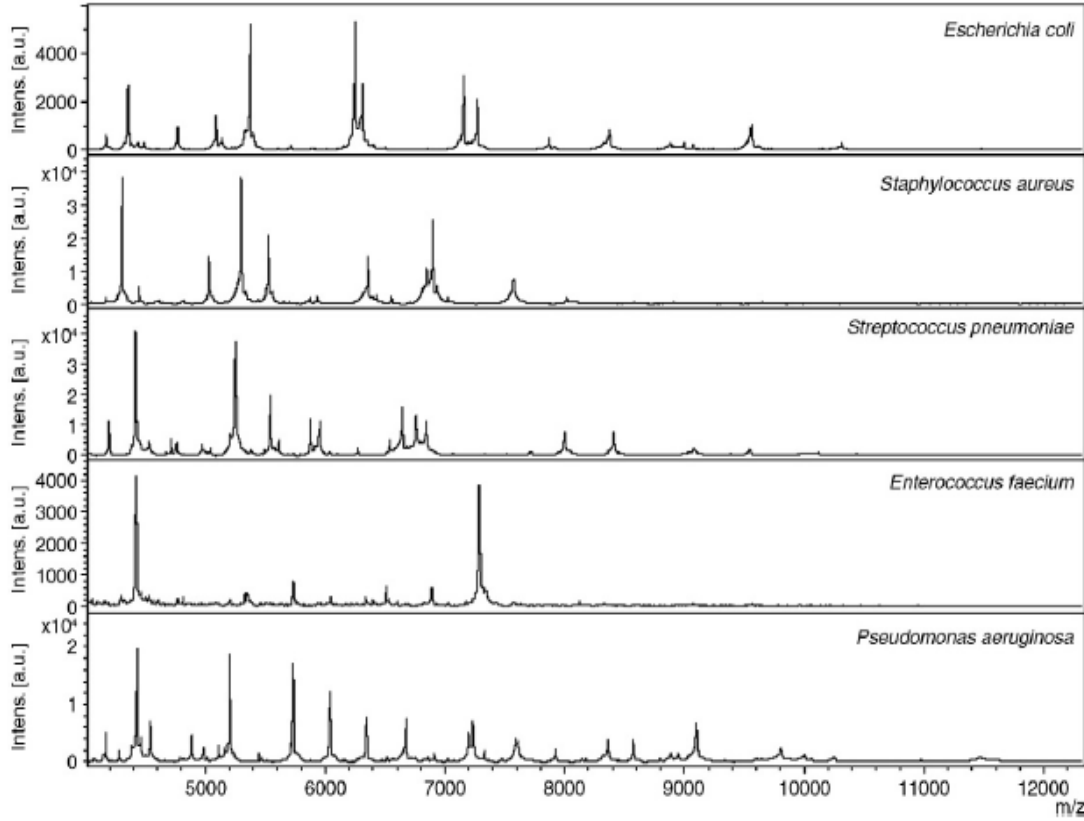
C MALDI-TOF Kütle Spektrometresi cihazına yüklenir

D Analiz edilen örneğe özgü bir kütle spektrumu elde edilir.

E Veritabanında bulunan spektrumlarla analiz sonucu elde edilen spektrum eşleştirilerek tanımlama yapılmış olur.

MALDI-TOF Kütle Spektrometresi klinik uygulamalarda bazı uygun patojenleri de içeren mikroorganizmaların tanımlanması ve karakterize edilmesi amacıyla geliştirilmiş sistemlerdir. Çoğu parametre (örneğin hazırlanması, kültürün şartları, iyonların kütle aralığı vb.) kütle spektrumunun tekrarlanabilirliğini etkilemektedir. Cihazın kütüphane verilerinin geliştirilmesi amacıyla oldukça farklı tür içeren 1000'lerce değişik spektrum kaydedilmektedir (Angeletti, 2017).

Şekil 2.2.'de 5 farklı bakteri türüne ait spektral parmak izleri gösterilmektedir (Carbonnelle ve ark., 2011).



Şekil 2.2. 5 Farklı Bakteri Türüne Ait Spektral Parmak İzleri

Günümüzde ticari olarak 4 tip MALDI-TOF sistemi kullanılmaktadır. Bunlar MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya), Saramis (AnagnosTec, Potsdam, Almanya), Andromas (Andromas, Paris, Fransa) ve Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa). Spektrum analizlerinin yapılabilmesi amacıyla cihazlara ilave olarak bir bilgisayar programı gerekmektedir (Angeletti, 2017).

Barreau ve ark. (2013) klinik mikrobiyolojide MALDI-TOF Kütle Spektrometresi yöntemiyle anaerobik mikroorganizmaların tanımlanmasının iyileştirilip iyileştirilemeyeceğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 1325 adet anaerobik mikroorganizma MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile analiz etmişlerdir. % 92.5'i tür düzeyinde doğru tanımlanmıştır. Ayrıca çoğu tanımlanamayan ya da nadir rastlanan türler tespit edilmiştir. Sonuçlara bağlı olarak bu tekniğin rutin olarak klinik anaerobik mikroorganizmaların tanımlanmasında başarılı bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir.

Duskova ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada gıdalardan izole edilen laktobasilleri PZR analizi, çoğaltılmış rDNA geni Restriksiyon Analizi (16S-ARDRA) ve MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analizi olmak üzere 3 farklı metod ile tanımlamışlardır.

Tanımlama sırasında bu 3 metodu birbirleriyle kıyaslamışlardır. Tür düzeyinde tanımlama başarı oranını PZR analizi için % 77, MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analizi için ise % 93 olarak tespit etmişlerdir. Birbirleriyle yakın ilişkili *Lactobacillus* türleri arasındaki farkı tespit ederken daha doğru sonuçlar elde edebilmek için MALDI-TOF Kütle Spektrometresi yönteminin genotipik yöntemlerle birlikte kullanılmasının daha iyi sonuçlar vereceğini bildirmişlerdir.

Doan ve ark. (2012), Kuzey Vietnam'daki bazı geleneksel fermente gıdalardan izole ettikleri 119 adet laktik asit bakterisi suşunun MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile hızlı sınıflandırma ve tanımlanmasını doğrulamak amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda MALDI-TOF Kütle Spektrometresinin güçlü, hızlı, güvenilir ve maliyetli bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1971 yılında H. Gobind Khorana 2 primerin kullanılmasıyla DNA molekülünün belli bir bölgesinin çoğaltılabileceği prensibini bulmasına rağmen bunu uygulamaya aktaramamıştır. Kary B. Mullis ise 1983 yılında termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan termostabil DNA polimeraz (Taq DNA polimeraz) izole etmiştir. Sonrasında ise günümüzdeki adıyla PZR yöntemi olarak bilinen Khorana'nın prensibinde elde ettiği termostabil DNA polimerazı kullanarak DNA molekülünün tek zinciri boyunca belli bölgelerde polimeraz aktivitesini başlatıp sonlandırabilmiştir. Böylelikle moleküler tanımlama alanında oldukça büyük bir gelişme sağlamıştır (Taban, 2007).

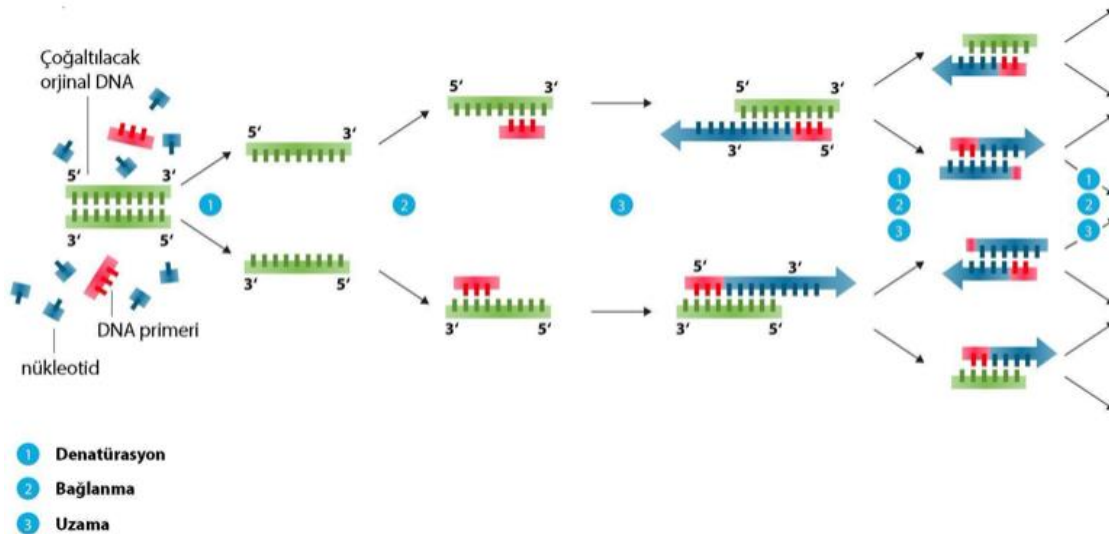
PZR yöntemi in vitro koşullarda bir DNA zinciri üstünde tespit edilen ilgili hedef nükleik asit dizisinin çoğaltılması esasına dayanan moleküler bir tekniktir. Hassas, spesifik ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi sebebiyle tercih edilmektedir (Saiki ve ark.,1988).

PZR yönteminin temeli DNA replikasyonuna dayanmakta olup in vitro koşullarda uygulanabilmesi için gerekli karışımın içeriği Çizelge 2.5.'te verilmiştir (Aslan, 2016).

Çizelge 2.5. İn Vitro Koşullarda PZR Yöntemini Uygulayabilmek İçin Gereken Karışımın İçeriği

Bileşen	Özellik
Kalıp DNA	Çoğaltılmak istenen DNA bölgesini içerir
2 adet primer (oligonükleotid)	Çoğaltılmak istenen bölgenin başlangıç ve bitiş noktalarına bağlanır
DNA polimeraz enzimi	Polimerizasyon ile çoğaltılmak istenen bölgeyi kopyalar, ısıya dayanıklıdır
Deoksिनुकлеотид trifosfat (dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Kalıp DNA'dan yeni zinciri sentezlemek için gereken bazları içerir
Tampon çözelti	
Mg ⁺² iyonu	Polimeraz enzimi için kofaktör görevi görerek bazların polimeraz enzimi tarafından tanınmasını sağlar

PZR yöntemi ile PZR tüpü içindeki reaksiyon karışımında bulunan spesifik DNA dizisinin çoğaltılması işlemi farklı sıcaklık şartlarında çalışan 3 basamaklı bir aşamanın döngü halinde tekrarlanmasıyla gerçekleşmektedir. PZR yönteminin basamakları Şekil 2.3.'te gösterilmektedir (Anonim b, 2019).



Şekil 2.3. PZR Yöntemi Basamakları

Şekil 2.3.'te görüldüğü üzere her bir PZR döngü aşaması denatürasyon, bağlanma (annealing) ve uzama (sentez) olmak üzere 3 basamaktan oluşmaktadır. İlk basamak olan DNA'nın denatürasyon aşamasında sıcaklık 93-96 °C'ye kadar çıkartılarak çift zincirli sarmal bir yapıya sahip olan DNA'yı bir arada tutan bazlar arasındaki zayıf hidrojen bağları parçalanır. Böylelikle sarmal yapı bozulmuş ve 2 adet tek zincirli DNA elde edilmiş olur. İkinci basamak olan bağlanma aşamasında sıcaklık 55-65 °C'lere kadar düşürülür ve tek zincir haline getirilen DNA'nın hedef bölgelerindeki 3' uçlarına

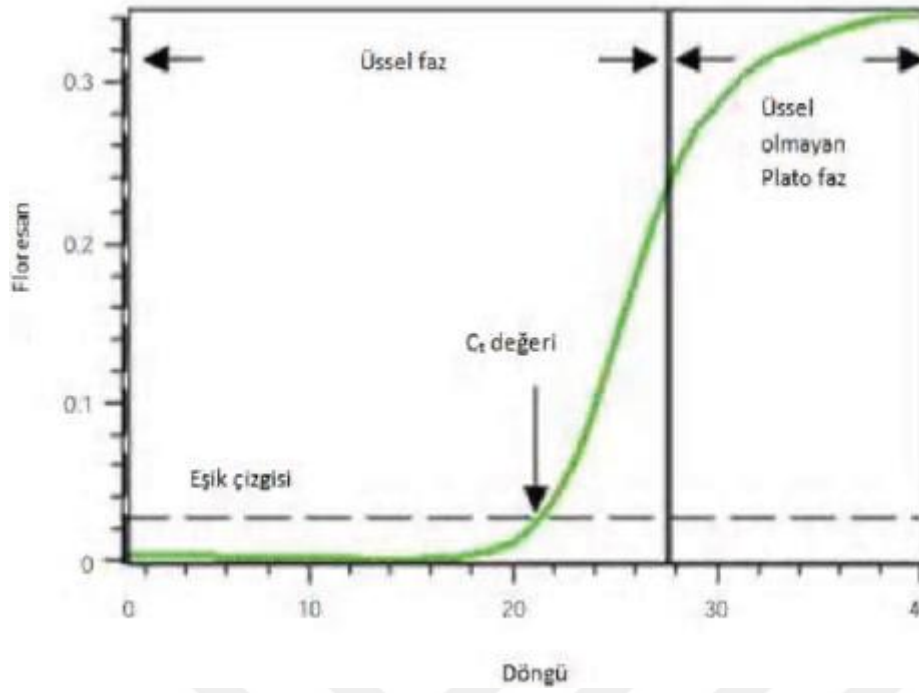
özgün primerlerin bağlanması sağlanır. Bu işlem sırasında uygulanan sıcaklık primerlerin bağlanma sıcaklığı olarak adlandırılır, ayrıca analizde kullanılan primerlerin baz içeriğine göre değişir. Bu bağlanma sıcaklığının primerlerin erime sıcaklığının (T_m) yaklaşık olarak 5 °C altında olması gerekmektedir. Primerler kendilerine özgü bölgelere ne kadar iyi bağlanırsa kalıp DNA ve primer arasındaki bağ o derece güçlü olur. Üçüncü basamak olan uzama aşamasında kalıp DNA'ya bağlanan primerlerin nükleotidlerin eklenmesiyle uzatılmasını sağlayan ısıya dayanıklı *Thermus aquaticus* (Taq) polimeraz enziminin DNA'ya tutunmasını gerçekleştirir ve böylelikle son basamak da tamamlanmış olur. Son basamakta Taq polimeraz enziminin çalışma sıcaklığı 72 °C olduğu için ortam sıcaklığının bu dereceye ayarlanmış olması gerekmektedir (Giasuddin, 1995).

1980'li yıllardan günümüze kadar gelişen teknolojiye bağlı olarak pek çok PZR tekniği ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında en yaygın kullanılanları Gerçek-Zamanlı PZR, Kantitatif PZR, Ters Transkriptaz PZR, Nested PZR ve Multiplex PZR'dır (Çarhan ve ark., 2016).

2.6.1. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı PZR yöntemi kontaminasyon riskinin en aza indirgenmesi, analiz sonuçlarının daha hızlı ve spesifik olarak elde edilmesi, kantitatif analiz yapılmasının mümkün olduğu çok sayıda örnekle çalışmaya imkan tanır (Zhou ve ark., 2013).

Analiz sırasında oluşan ürün miktarına bağlı olarak floresan sinyal ölçüm sonucu artış göstermektedir. Bu ölçüm sonucu analizle eş zamanlı olarak bilgisayar ekranından takip edilebilmektedir. Ayrıca sinyali sayısal verilere dönüştürerek kantitatif sonuçlar elde etmeye de imkan tanımaktadır. Amplifikasyon sırasında cihaz tarafından tespit edilen floresan ışınımının eşik değerini aştığı döngü sayısı eşik döngü değeridir (C_t). C_t değeri amplifikasyon ürünündeki ilk anlamlı artışın olduğu döngü sayısını gösterir (Navarro, 2015). Şekil 2.4.'te Gerçek-Zamanlı PZR amplifikasyon eğrisi gösterilmektedir (Anonim d, 2019).



Şekil 2.4. Gerçek-Zamanlı PZR Amplifikasyon Eğrisi

Döngü sayısı 40 olan bir PZR analizinde $C_t < 29$ ise örnekteki hedef nükleik asit çoktur. $30 \leq C_t \leq 37$ ise örnekteki hedef nükleik asit normal seviyededir. $38 \leq C_t \leq 40$ ise örnekteki hedef nükleikasit minimum düzeydedir ya da bir kontaminasyon riski vardır (Aslan, 2016).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hamur Örnekleri

Çalışma kapsamında Kaynaşlı, Bolu, Ereğli, Akçakoca, Bolu Dağı, Doğanpınar ve Edincik bölgesi lokal fırınlarından toplanan 7 farklı hamur örneği uygun şartlarda Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü mikrobiyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Ekşi hamur örneklerinde izolasyon çalışmaları devam ederken, örnekler izolasyon işlemi sonuna kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir. Toplanan hamur örneklerine ait bilgiler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Alınan Hamur Örneklerinin Bölgelere Göre Dağılımı

Alındığı Yer	Kodu	Temin Tarihi
Kaynaşlı	K	29/03/2016
Bolu	Bo	29/03/2016
Ereğli	Er	29/03/2016
Akçakoca	Ak	29/03/2016
Bolu Dağı	Bd	29/03/2016
Doğanpınar	Do	29/03/2016
Edincik	Ed	29/03/2016

3.1.2. Un Örnekleri

Çalışma kapsamında yurt içi ve yurt dışından toplanan 18 farklı un örneğinden laboratuvar koşullarında ekşi hamur üretilmiştir. Hazırlanan ekşi hamur örnekleri uygun şartlarda mikrobiyolojik analizlerin gerçekleştirileceği Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü mikrobiyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Ekşi hamur örneklerinin izolasyon çalışmalarına başlanmış, örnekler izolasyon işlemi sonlanıncaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir. Toplanan un örneklerine ait bilgiler Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Alınan Un Örneklerinin Bölgelere Göre Dağılımı

Alındığı Yer	Kodu	Çeşidi	Temin Tarihi
Çankırı	Ç	Tam buğday	30/12/2016
Etlik	E	Tam buğday	02/01/2017
Maykat	M	Tam buğday	30/12/2016
TARM*	A	Arpa	17/01/2017
TARM*	B	Tam buğday	17/01/2017
TARM*	Çd	Çavdar	17/01/2017
Buğday unu	By1	Buğday	16/02/2017
Çavdar unu	Çd1	Çavdar	16/02/2017
Tam buğday unu	Tb5	Tam buğday	16/02/2017
Kastamonu	S1	Siyez (kepek)	17/02/2017
Kastamonu	S2	Siyez (tam buğday)	17/02/2017
Kalecik	Tb6	Tam buğday	16/02/2017
Gacemer	Gc	Buğday	06/06/2017
Çin	Çn	Buğday	06/06/2017
Hatap	Hp	Buğday	06/06/2017
Weizen	Wz	Buğday	02/10/2017
Biodinkel	Bk	Buğday	02/10/2017
İzmir	İz	Buğday	02/10/2017
Toplam Örnek Sayısı	18		

*TARM: T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

3.1.3. Besiyeri ve Kimyasallar

3.1.3.1. Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Ekşi hamurlardan laktik asit bakterilerinin izolasyonunda kullanılan besiyeri ve kimyasallar Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. İzolasyon Amacıyla Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Kullanılan Besiyeri/Kimyasal/Malzeme Adı	Kullanım Amacı
MRS Broth (De Man Rogosa and Sharpe Broth, Merck-Millipore, 1.10661.0500)	<i>Lactobacillus</i> spp. izolasyonu
MRS Agar (De Man Rogosa and Sharpe Agar, Merck-Millipore, 11.0660.0500)	<i>Lactobacillus</i> spp. izolasyonu
Serum Fizyolojik (% 0.85 tuz)	Dilüsyon Hazırlama
Microbiology Anaerocult A (Merck-Millipore, 1.13829.0001)	Anaerobik inkübasyon koşullarının sağlanması

3.1.3.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

Laktobasillerin izolasyonu ve tanımlaması öncesinde analizlerde kullanılacak besiyerleri, hazırlanma protokollerine uygun olacak ölçülerde tartılarak saf su içerisinde

çözündürülür, ardından belirtilen sıcaklıkta (121 °C’de 15 dak) otoklavda sterilize edilir.

3.1.3.1.2. Serum Fizyolojik Hazırlanması

Saf suyun içinde oranı % 0.85 olacak şekilde tuz ilave edilip karıştırılır. Örnek sayısına bağlı olarak tüplere 9’ar mL ve şişelere de 225’er mL dağıtılır.

3.1.3.2. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlaması

3.1.3.2.1. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Ön Tanımlaması

Ekşi hamurlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI-TOF kütle spektrometresi ile ön tanımlamasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.4.’te verilmiştir.

Çizelge 3.4. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Ön Tanımlamada Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan Kimyasal Adı	Kullanım Amacı
Formik Asit	Çözücü
Asetonitril	Çözücü
Matrix	MALDI-TOF ile tanımlama

3.1.3.2.2. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Gerçek-Zamanlı PZR ile Doğrulaması

MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile ön tanımlaması yapılan izolatların DNA izolasyonunda Geneall firmasına ait DNA ekstraksiyon kiti (REF: 108-101) kullanılmıştır. DNA izolasyonu ve moleküler tanımlaması sırasında kullanılan kimyasallar ve malzemeler Çizelge 3.5.’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. DNA İzolasyonu ve Gerçek-Zamanlı PZR ile Tanımlamada Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Malzeme Adı
Lambda tamponu
Lizozim (10 mg/mL)
Proteinaz K solüsyonu
BL tamponu
Saf Etanol ($\geq 99.5\%$)

BW tamponu
TW tamponu
AE tamponu
PK tamponu
Toplama tüpleri
Filtre tüpü

3.1.3.2.2.1. Lambda Tamponu Hazırlanması

1000 mL distile suya 5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 50 mL 1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 g jelatin (% 0.01) tartılarak çözündürülür ardından 121 °C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilize edilir. Hazırlanan karışım oda sıcaklığı koşullarında muhafaza edilir (Taban,2007).

3.1.3.2.2.2. Lizozim (10 mg/mL) Hazırlanması

Öncelikli olarak 1 M Tris-HCl (pH 7.4) ‘den 10 mM Tris-HCl stok çözeltisi hazırlanır. Ardından Eppendorf tüpe 0.01 g liyofilize formdaki lizozimden tartılıp, üzerine 1 mL 10 mM Tris-HCl eklenir ve vorteks yardımıyla homojen bir şekilde çözünmesi sağlanır. Lizozim çözeltisi -18 °C’de muhafaza edilir.

3.1.3.2.2.3. Proteinaz K Solüsyonu (20 mg/mL) Hazırlanması

DNA ekstraksiyon kiti içinden çıkan PK tamponu ile toz formdaki proteinaz K hesaplamalar sonucu çıkan oranlarda sulandırılarak hazırlanır ve -18 °C’de saklanır.

3.1.3.2.2.4. Oligonükleotidler

Çalışmada *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* için belirlenen türe özel gen bölgelerine ait özellikler Çizelge 3.6.’da verilmiştir. BM Labosis A.Ş. tarafından hazırlanan primerler ve problarla ilgili bilgiler Çizelge 3.7.’de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışmada Belirlenen Gen Bölgesinin Özellikleri

Bakteri Adı	Gen Bölgesinin Sembolü	Gen Bölgesinin Adı
<i>L. plantarum</i>	<i>plnF</i>	Putative bacteria precursor peptide Plan F
<i>L. brevis</i>	<i>recA</i>	Recombinant protein A

Çizelge 3.7. Primerlerin ve Probların Özellikleri

	Sekans 5' – 3'	OD (nm)	nmol	Uzunluk	Molekül Ağırlığı (Da)	Tm (°C)
<i>L. plantarum</i> -F	taattcacgggtcacgcaaaa	260	26.1	20	6094	54
<i>L. plantarum</i> -R	tgttcgacatgttgatgc	260	25.1	21	6458	57
<i>L. plantarum</i> -P	6famccacgaatgcctgcaactgaacbhq1	260	6.3	23	8055	66
<i>L. brevis</i> -F	tcgcracggattgtagaaa	260	25.2	20	6198	57
<i>L. brevis</i> -R	tcaatataggcggctgtcc	260	25.4	20	6108	58
<i>L. brevis</i> -P	6famcacgcagttgccgaggtccabhq1	260	7.5	20	7195	75

3.1.3.2.2.5. Master Mix Hazırlanması

Hazırlanan master mix karışımının standart kit protokolü Çizelge 3.8.'de verilmiştir. Gerçek-zamanlı PZR cihazında gerçekleşecek reaksiyonun olumsuz etkilenmemesi adına master mix karışımı hazırlanırken olası pipet kayıpları dikkate alınır ve standart kit protokülünde belirtilen miktarların % 10 oranında fazlası hazırlanır. Hazırlanan master mix pipet ile karıştırıldıktan sonra Eppendorf tüplere 15'er µL hacimde dağıtılır.

Çizelge 3.8. Master Mix Karışımı Standart Kit Protokolü

Reaksiyon Karışımının İçeriği	Konsantrasyon	Miktar (µL)	Son Konsantrasyon	Açıklama
H ₂ O, PCR Grade (Nuclease free water) (Roche, 03315932001)	-	3.8	-	
Primer (GOI) forward	20 µM	0.4	400 nM	
Primer (GOI) reverse	20 µM	0.4	400 nM	
UPL probe (GOI)	10 µM	0.4	200 nM	
LightCycler® 480 Probes Master (Roche, 04707494001)	2xkonsantrasyon	10.0	1xkonsantrasyon	Fast start Taq DNA polimeraz reaksiyon tamponu, dNTP karışımı ve 6.4 mM MgCl ₂
Hedef DNA (Kalıp DNA)	-	5.0	-	
Toplam	-	20.0	-	

3.1.3.3. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzole edilen laktik asit bakterilerinin bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi sırasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri

Kullanılan Kimyasal Adı	Kullanım Amacı
Oxgall (Oxoid, L 50)	Safra toleransının belirlenmesi
10 M HCl (Merck-Millipore, 100314)	Besiyeri asitlik düzeyinin optimizasyonu
MRS Broth (De Man Rogosa and Sharpe Broth, Merck-Millipore, 1.10661.0500)	Laktik asit bakterilerinin asit ve safra toleransı ile muamele edilmesi
MRS Agar (De Man Rogosa and Sharpe Agar, Merck-Millipore, 11.0660.0500)	Laktik asit bakterilerinin sayımı
Maximum Recovery Diluent (Merck-Millipore, 112535.0500)	Dilüsyon hazırlama
Microbiology Anaerocult A (Merck-Millipore, 1.13829.0001)	Anaerobik inkübasyon koşullarının sağlanması

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

3.1.4.1. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Tanımlaması

İzolatların alt tür düzeyinde ön tanımlama işlemleri MALDI-TOF Kütle Spektrometresi (Brucker marka Microflex MALDI Biotyper, Brucker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) tekniğinden yararlanılarak yapılmıştır. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Plak Görüntüsü Şekil 3.1.'de (Anonim e, 2019), MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Cihazının Görüntüsü Şekil 3.2.'de (Anonim f, 2019) gösterilmiştir.



Şekil 3.1. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Plak Görüntüsü



Şekil 3.2. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Cihazı

3.1.4.2. DNA İzolasyonu ve Saflaştırma İşlemi Deney Düzeneği

Çalışmada Hettich (Almanya), markalı Mikro 200 santrifüj kullanılmıştır. Bu cihaz 14.000 devir/dakika hızla çalışabilen, 24 adet mikrosantrifüj tüp haznesi olup cihaza ait görüntü Şekil 3.3.'te (Anonim g, 2019) verilmiştir.



Şekil 3.3. Hettich Mikro 200 Santrifüj

3.1.4.3. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Gerçek-Zamanlı PZR ile Doğrulaması

MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile ön tanımlaması yapılan laktik asit bakterilerinin moleküler doğrulamasının yapılması için Roche (Almanya) markalı Lightcycler 1.5 ve Applied Biosystems (A.B.D.) markalı 7500 Real-Time PCR System cihazı kullanılmıştır. Cihaza ait görüntüler sırasıyla Şekil 3.4. (Anonim h, 2019) ve Şekil 3.5.'te (Anonim i, 2019) verilmiştir.



Şekil 3.4. Lightcycler 1.5



Şekil 3.5. 7500 Real-Time PCR System

3.2. Metot

3.2.1. Hamur Örnekleri

Toplanan hamur örnekleri uygun şartlarda mikrobiyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvara getirilen hamur örnekleri laktik asit bakterisi izolasyonunu yapabilmek amacıyla analize alınmıştır.

3.2.2. Unlardan Elde Edilen Ekşi Hamur Örnekleri

Hamur örneklerinden izole edilen olası laktik asit bakterisi izolatlarının MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile ön tanımlaması sonucunda elde edilen verilere göre mikroflorada *Lactobacillus sanfranciscensis* gibi mikroorganizma türlerine rastlanması hamura ticari kültür ilave edilmiş olma ihtimalini arttırmıştır. Bu sebeple çalışmanın yönü değiştirilip sadece toplanan un örneklerinden hazırlanan ekşi hamurlar üzerinden çalışmaya devam edilmiştir. Proje kapsamında Türkiye'nin çeşitli illerinden ve yurtdışından toplamda 18 farklı un örneği toplanmıştır. Un örneklerinden “Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin ve Mayaların İzolasyonu ve Ekmek Kalitesi üzerine Etkilerinin Belirlenmesi” isimli proje kapsamında laboratuvar koşullarında ekşi hamur üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Stok Kültür Hazırlanması

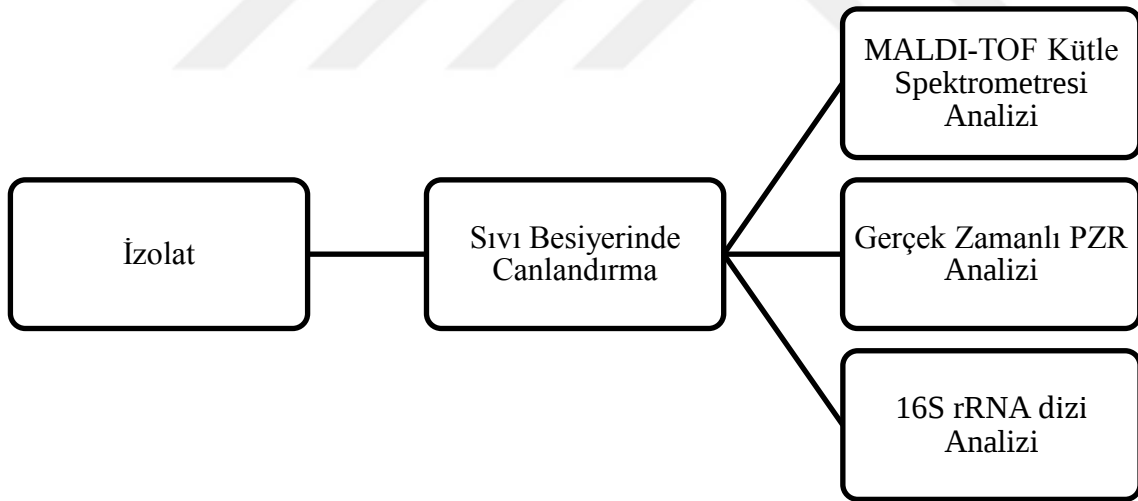
Ekşi hamur florasını belirlemek amacıyla öncelikli olarak 25 g ekşi hamur örneği, içinde 225 mL steril serum fizyolojik bulunan kapaklı şişeye aseptik şartlar altında aktarılmış ve homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Ardından bu karışımdan 1 mL

örnek alınarak % 0.85'lik serum fizyolojik ile 10^{-8} 'e kadar ardışık seyreltmeler yapılmıştır. Seyreltilmiş örneklerden 100 µL alınarak MRS (de Man, Rogosa ve Sharpe) agar besiyerine yayma yöntemi ile ekim işlemi gerçekleştirilmiş ve anaerobik koşullarda 30 °C'de 48 saat süre ile inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyon süresi sonunda farklı morfolojik görünüme sahip koloniler MRS broth besiyerine aktararak anaerobik koşullarda, aynı sıcaklık ve sürede inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişme gözlenen tüplerden MRS agara tek koloni düşürme yöntemi kullanılarak inokülasyon yapılmış ve yine aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda saflaştırılan kültürler MALDI-TOF Kütle Spektrometresinde tanımlamaları yapılmak üzere gliserollü MRS broth (% 50 gliserol - % 50 MRS broth) içeren ortamda, -70 °C'de saklanmışlardır.

3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlaması ve Doğrulaması

Elde edilen LAB'si izolatlarının tanımlama ve doğrulama işlemleri şematik olarak Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.

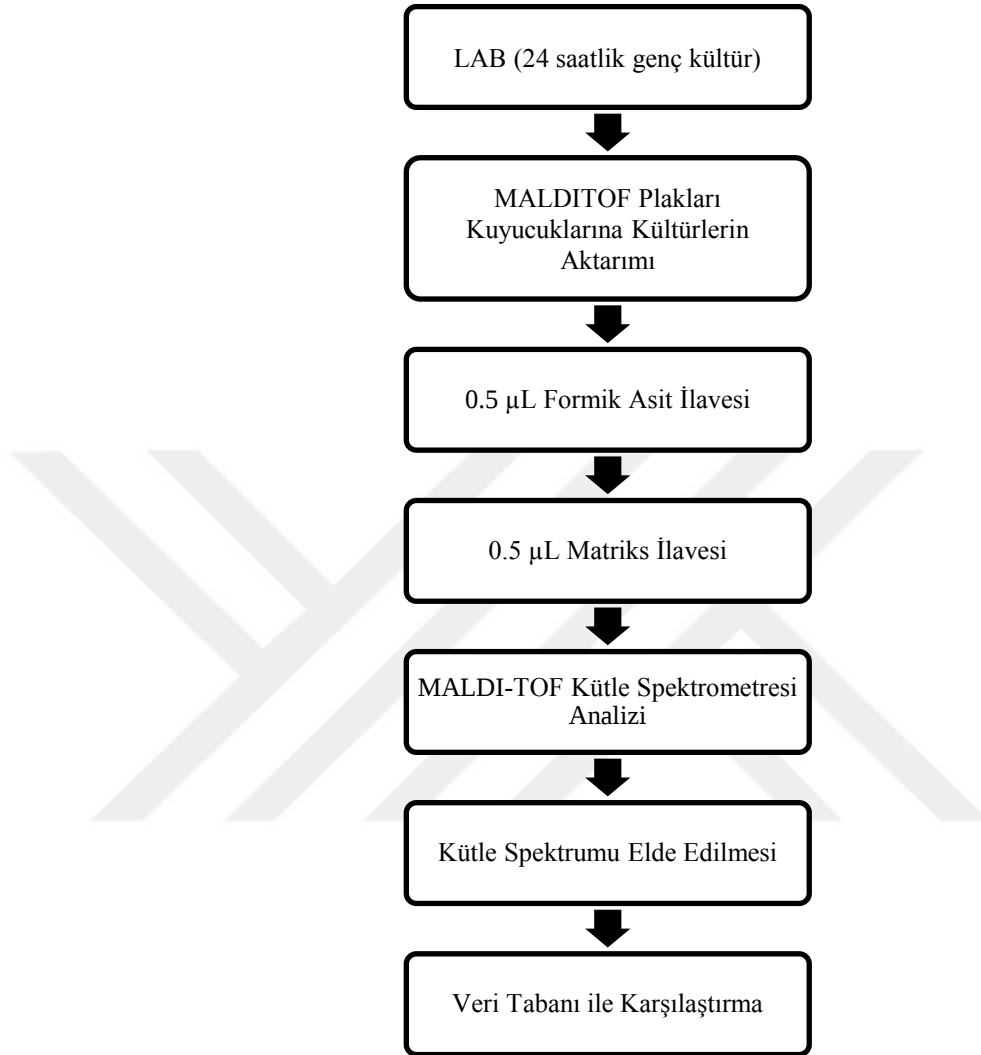


Şekil 3.6. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlama ve Doğrulama Aşamaları

3.2.4.1. Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Tanımlaması

Saflaştırılan LAB suşları MALDI-TOF kütle spektrometresi (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) yöntemi ile tanımlanmıştır.

MALDI-TOF MS ile bakterilerin tanımlanmasının basamakları Şekil 3.7.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.7. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlama İşlemi Basamakları

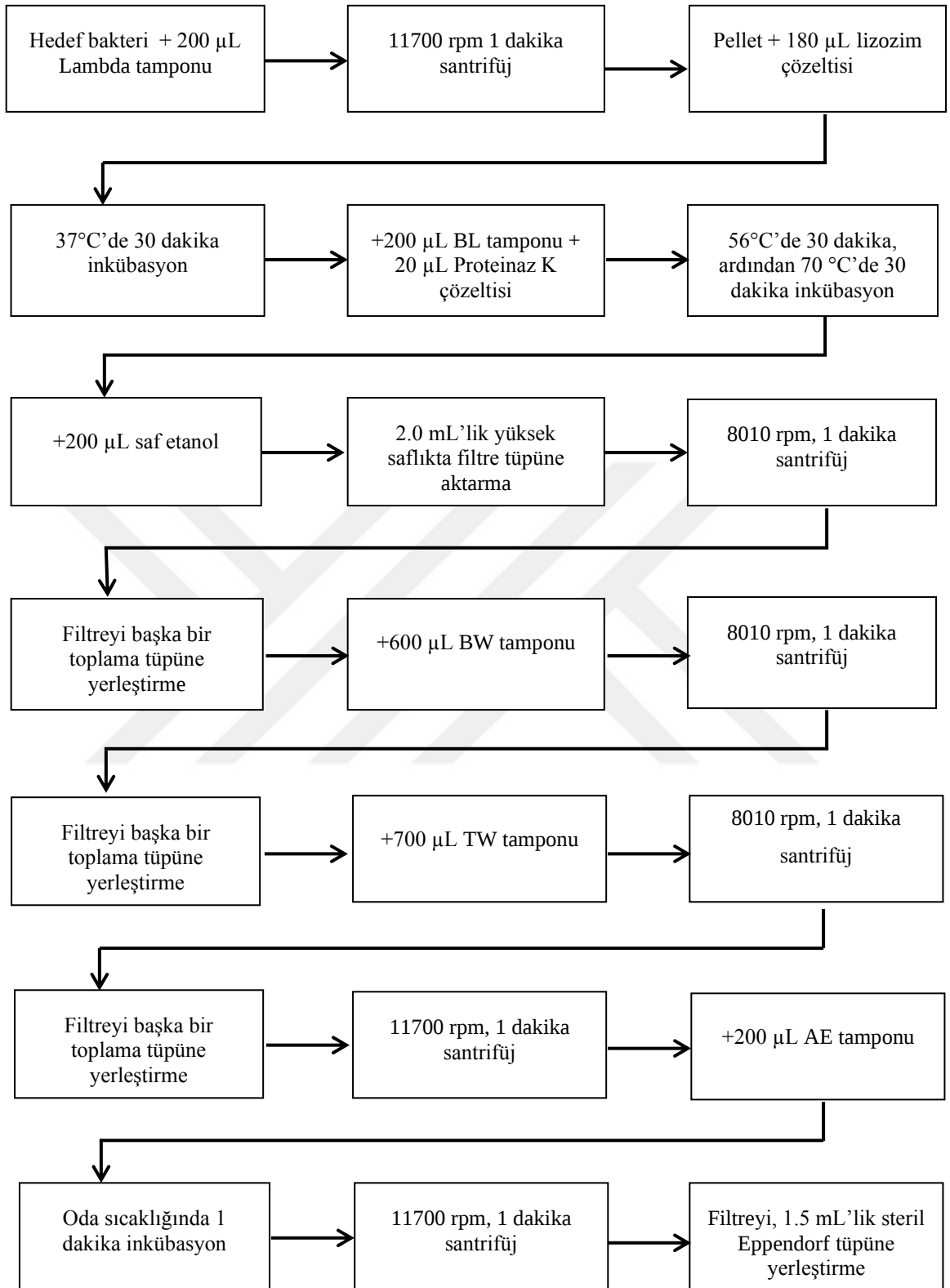
MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analizinde plak kuyucuklarına kürdan yardımı ile MRS agarda tek tip koloni şeklinde gelişen LAB suşları aktarılmıştır. Kuyucuklara 0.5 µL formik asit ilave edilerek 2-3 dakika oda sıcaklığında kurutulmuş ve ardından 0.5 µL matriks ilave edilmiştir. Matriks ilavesinden sonra yine 2-3 dakika süre ile oda sıcaklığında kurutulan plak cihaza yerleştirilerek okuma yapılmış ve cihaz kütüphanesinde bulunan veriler ile karşılaştırma yaparak sonuçları tablo şeklinde vermiştir.

3.2.4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Gerçek-Zamanlı PZR ile Doğrulaması

3.2.4.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin DNA İzolasyonu

-70 °C’de muhafaza edilen LAB izolatları MRS brothta aktif hale getirilmiş ve MRS agara çizilerek 30 °C’de 48 saat anaerobik şartlarda inkübe edilmiştir. Ardından Geneall firmasına ait DNA ekstraksiyon kiti (REF: 108-101) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakterilerden DNA izolasyonu ve saflaştırma işlemi akış şeması Şekil 3.8.’de verilmiştir.

Öncelikli olarak içinde 200 µL lambda tamponu bulunan 1.5 mL’lik Eppendorf tüplere kültürlerden eklenmiş ve 1 dakika süre ile 11.700 rpm’de santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi sonrası sıvı kısım pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Pellete 180 µL lizozim eklenerek 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada hücre duvarları zayıflatılarak etkili bir hücre parçalanması gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonunda 20 µL proteinaz K solüsyonu ile 200 µL BL tamponu eklenerek vortekste ya da pipet ile homojen hale getirilmiştir. Önce 56 °C’de 30 dakika, ardından 70°C’de 30 dakika süre ile inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası oda sıcaklığına soğutulmuştur. Tüp yavaş bir şekilde aşağı çevrilerek herhangi bir sıvının kalıp kalmadığı kontrol edilmiştir. 200 µL saf etanol eklenerek vortekste karıştırılmıştır. Tüm karışım SV columnne dikkatli bir şekilde aktararak 8010 rpm hızda 1 dakika süre ile santrifüjlenmiş, sonrasında collection tüp yenisiyle değiştirilmiştir. 600 µL BW tamponu ilave edilerek 8010 rpm hızda 1 dakika süre ile santrifüjlenmiş, sonrasında collection tüp yenisiyle değiştirilmiştir. Ardından 700 µL TW tamponu eklenerek 8010 rpm hızda 1 dakika süre ile santrifüjlenmiş, santrifüj sonrası collection tüp yenisiyle değiştirilmiştir. 11.700 rpm’de 1 dakika süre ile santrifüjlenerek varsa kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. 200 µL AE tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında arka arkaya 2 defa olacak şekilde 11.700 rpm’de 1 dakika süre ile tüpler santrifüjlenmiş ve böylelikle DNA izolasyonu işlemi tamamlanmıştır. İzolatlar kullanılabilecek -20 °C de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.8. Bakterilerden DNA İzolasyonu ve Saflaştırılması

3.2.4.2.2. Hedef DNA'nın Eklenmesi

Roche markalı Gerçek-Zamanlı PZR cihazı ile çalışmaları yürütürken master mix dağıtılan Eppendorf tüplere her bir örnek için hedef DNA'dan 5'er µL ilave edilmiştir. Pipet yardımıyla master mix ve örneğin iyice karışması sağlandıktan sonra LightCycler kapiler tüplere aktarımı gerçekleştirilmiştir. Aktarım sırasında kapilerler içinde oluşabilecek hava kabarcıklarının uzaklaştırılması amacıyla 3975 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve ardından kapiler tüpler diske dizilmiştir. LightCycler 1.5 PZR cihazına diskin yerleştirilmesinden sonra Çizelge 3.10.'da verilen PZR programına göre cihaz çalıştırılmıştır.

7500 Real-Time PCR System ile çalışırken plaka kuyucuklarına master mix dağıtılıp, üzerlerine her bir örnek için hedef DNA'dan 5'er µL ilave edilmiştir. Maksimum 1500 rpm olacak şekilde 2 dakika süre ile santrifüj edilmiş, santrifüj işlemi sonrası plaka cihaza yüklenmiştir. Çizelge 3.10.'da verilen PZR programına göre cihaz çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.10. Tanımlamada Belirlenen Programın Basamakları

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön inkübasyon	95	10 dk.	1
Amplifikasyon			45
Denatürasyon	95	10 sn	
Bağlanma	60	30 sn	
Uzama	72	1 sn	
Soğuma	40	30 sn	1

3.2.4.3. 16S rRNA Dizi Analizi

İzole edilen bakterilerin daha detaylı moleküler tanımlamasını yapabilmek amacıyla hizmet alımı yapılarak dizi analizi yapılmıştır. Öncelikli olarak bakterinin DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından ısıl işlem uygulanarak sarmal yapı bozularak tekli iplik hedef DNA kalıbı elde edilmiştir. DNA kalıbının bulunduğu örnek dörde ayrılarak her biri işaretli bir primer, DNA polimeraz, 4 tip dNTP ile birlikte her bir reaksiyon karışımında, 4 farklı nükleotidin modifiye formu dideoksi dNTP'lerden (ddNTP) birisi konulup inkübe edilmiştir. Yeni zincir sentezi primerlerde başlayarak ddNTP gelinceye dek devam etmiştir. ddNTP geldiğinde sentez engellendiğinden rastgele olarak ara ara normal nükleotid yerine bir ddNTP takılmıştır. Sonuç olarak farklı uzunluklara sahip bir seri işaretli zincir meydana gelmiştir.

Jel elektroforez yöntemi ile DNA zincirleri ayrılarak oluşan bantlar otoradyografi uygulanarak belirlenmiştir. Yeni sentezlenen zincirin dizisi otoradyograf üzerindeki bantlardan direkt okunarak orijinal kalıp zincirinin dizisi çıkartılmış, elde edilen sonuç veri tabanındaki bilgilerle karşılaştırılarak tanımlaması yapılmıştır (Anonim c, 2019).

3.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.5.1. Asit Toleransı

Suşların düşük pH'ya karşı olan dayanıklılık yeteneği son pH'sı 2.5 olacak şekilde ayarlanmış MRS Broth ile tespit edilir. Farklı türdeki laktik asit bakterileri 1 gecelik inkübasyon sonrasında hacim olarak % 1 oranında MRS Broth'a (pH 2.5) inoküle edilerek 37 °C' de 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. Ardından MRS agarlı Petri kutularına yayma yöntemi ile inoküle edilmiş ve 30 °C'de 48 saat süre ile anaerobik şartlarda inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sona erdiğinde bakteri sayımı yapılarak sonuç tespit edilmiştir (Manini ve ark., 2016).

3.2.5.2. Safra Toleransı

% 0.3 oranında oxgall içeren MRS brotha hacimsel olarak % 1 oranında mikroorganizma ilavesi gerçekleştirilir. 37 °C'de 24 saat süre ile anaerobik şartlarda inkübe edildikten sonra MRS agarlı Petri kutularına yayma yöntemi ile inoküle edilerek 30 °C'de 48 saat süre ile anaerobik şartlarda inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sona erdiğinde canlı kalan mikroorganizmaların sayısı tespit edilir (Manini ve ark., 2016).

3.2.6. İstatistiksel Analizler

İzole edilen laktik asit bakterilerinin asitlik (pH 2.5) ve safra tuzu (%0.3 oxgall) toleransı ile ilgili uygulamalarında bakteri sayısı ve canlı kalma oranları bakımından ölçümlenen muameleler arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile araştırılmıştır. Analizler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını incelemek üzere Tukey HSD çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. İstatistiksel analizler MINITAB istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde önemlilik düzeyi $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

4.1.1. Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çalışma kapsamında Kaynaşlı, Bolu, Ereğli, Akçakoca, Bolu Dağı, Doğanpınar ve Edincik bölgelerinden toplanan 7 farklı hamur örneğinden toplam 10 adet laktik asit bakterisi olduğu düşünülen izolat elde edilmiş olup izolatlara ait bilgiler Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hamurlardan İzole Edilen Olası Laktik Asit Bakterilerine Ait Bilgiler

Alındığı Yer	İncelemeye Alınan İzolat Sayısı
Kaynaşlı	5
Bolu	2
Ereğli	- *
Akçakoca	- *
Bolu Dağı	- *
Doğanpınar	1
Edincik	2

*Gelişme gözlenmemiştir.

4.1.2. Un Örneklerinden Hazırlanan Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çalışma kapsamında yurt içi ve yurt dışı olmak üzere farklı bölgelerden toplanan 18 farklı un örneğinden laboratuvar koşullarında hazırlanan ekşi hamur örneklerine ait toplam 143 adet laktik asit bakterisi olduğu düşünülen izolat elde edilmiş olup izolatlara ait bilgiler Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Un Örneklerinden Hazırlanan Hamurlardan İzole Edilen Olası Laktik Asit Bakterilerine Ait Bilgiler

Alındığı Yer	Çeşidi	İncelemeye Alınan İzolat Sayısı
Çankırı	Tam buğday	4
Etlik	Tam buğday	4
Maykat	Tam buğday	4
Ankara tarım ürünleri	Arpa	9
Ankara tarım ürünleri	Tam buğday	9
Ankara tarım ürünleri	Çavdar	10
Buğday unu	Buğday	10
Çavdar unu	Çavdar	10
Tam buğday unu	Tam buğday	7

Kastamonu	Siyez (kepek)	9
Kastamonu	Siyez (tam buğday)	9
Kalecik	Tam buğday	10
Gacemer	Buğday	8
Çin	Buğday	8
Hatap	Buğday	8
Weizen	Buğday	7
Biodinkel	Buğday	8
İzmir	Buğday	9

4.2. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Sonuçları

4.2.1. Hamurlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Sonuçları

Çalışma kapsamında Kaynaşlı, Bolu, Ereğli, Akçakoca, Bolu Dağı, Doğanpınar ve Edincik bölgelerinden toplanan 7 farklı hamur örneğinin sadece 4 tanesinden elde edilen olası 10 adet laktik asit bakterisi izolatının MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analizi ile ön tanımlaması yapılmıştır. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analizi ile yapılan ön tanımlama sonuçları Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Hamur Örneği İzolatlarının MALDI-TOF MS Sonucu

Örneğin Alındığı Yer	MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Sonucu
Kaynaşlı	<i>Lactobacillus kimchii</i> <i>Lactobacillus kimchii</i> <i>Lactobacillus kimchii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
Bolu	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
Doğanpınar	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
Edincik	<i>Lactobacillus kimchii</i> <i>Lactobacillus murinus</i>

4.2.2. Un Örneklerinden Hazırlanan Hamurlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF Kütle Spektrometresi Sonuçları

Elde edilen 143 adet olası laktik asit bakterisi izolatının öncelikli olarak MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analizi ile ön tanımlaması yapılmıştır. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analizi ile yapılan ön tanımlama sonuçları Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

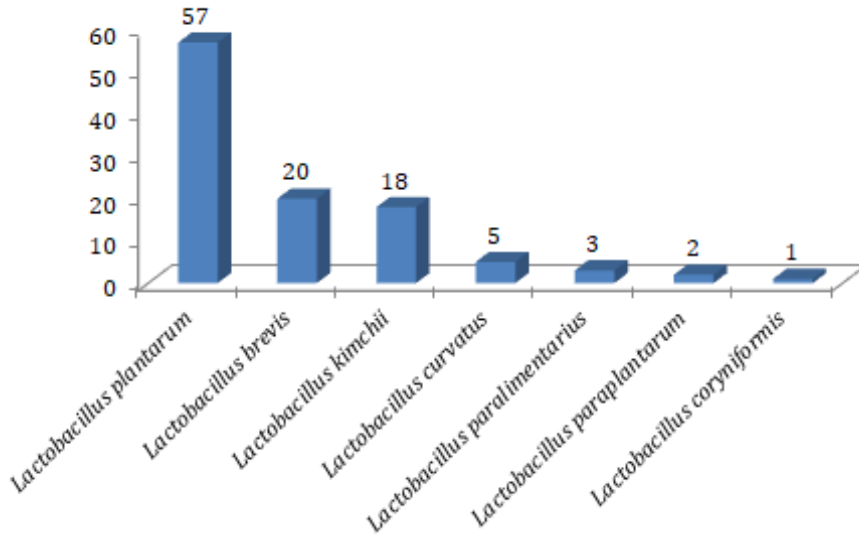
Çizelge 4.4. Un Örneği İzolatların MALDI-TOF MS Sonucu

Örneğin Alındığı Yer	Çeşidi	MALDI-TOF MS Sonucu
Çankırı	Tam Buğday	Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum
Etlik	Tam Buğday	Lactobacillus kimchii Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum
Maykat	Tam Buğday	Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum
Ankara Tarım Ürünleri	Arpa	Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum
Ankara Tarım Ürünleri	Tam Buğday	Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum Lactobacillus kimchii Lactobacillus plantarum Lactobacillus kimchii Lactobacillus plantarum
Ankara Tarım Ürünleri	Çavdar	Lactobacillus brevis Lactobacillus paraplantarum Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus kimchii Lactobacillus plantarum Lactobacillus kimchii Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus kimchii Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis
Buğday Unu	Buğday	Lactobacillus kimchii Lactobacillus brevis Lactobacillus brevis Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum Lactobacillus kimchii Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis
Çavdar Unu	Çavdar	Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis Lactobacillus kimchii Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis

		<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus brevis</i>
Tam Buğday Unu	Tam Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
Kastamonu	Siyez (kepek)	<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus brevis</i>
		<i>Lactobacillus brevis</i>
		<i>Lactobacillus brevis</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus coryniformis</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
Kastamonu	Siyez (tam buğday)	<i>Lactobacillus paraplanarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus brevis</i>
Kalecik	Tam Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
Gacemer	Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus brevis</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
Çin	Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
		<i>Lactobacillus brevis</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
Hatap	Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus kimchii</i>
Weizen	Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
Biodinkel	Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus curvatus</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus curvatus</i>

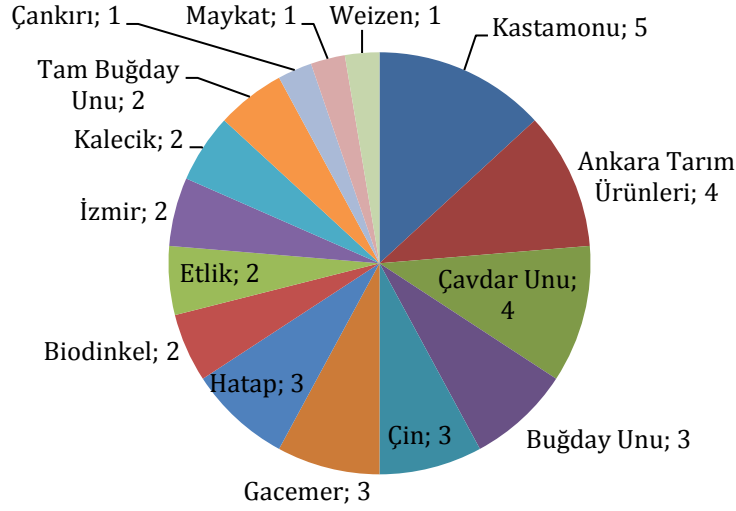
İzmir	Buğday	<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus curvatus</i>
Toplam		106

İzolatların MALDI-TOF Kütle Spektrometresi sonucuna göre tür düzeyinde dağılımlarına ait veriler Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. 106 adet izolatın 57'sinin (% 53.8) *Lactobacillus plantarum*, 20'sinin (% 18.9) *Lactobacillus brevis*, 18'inin (% 17.0) *Lactobacillus kimchii*, 5'inin (% 4.7) *Lactobacillus curvatus*, 3'ünün (% 2.8) *Lactobacillus paralimentarius*, 2'sinin (% 1,9) *Lactobacillus paraplantarum*, 1'inin (% 0.9) *Lactobacillus coryniformis*'e ait olduğu belirlenmiştir.



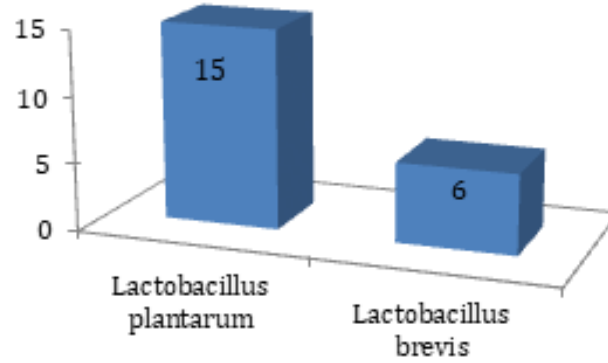
Şekil 4.1. İzolatların Tür Düzeyinde Dağılım Oranları

Un örneklerinden izole edilen farklı türdeki mikroorganizmaların sayılarının verildiği Şekil 4.2.'de incelendiğinde farklı lokasyonlardan temin edilen un örnekleri içinden Kastamonu'dan getirilen un ile yapılan ekşi hamurlarda 5 farklı türde (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus kimchii*) izolat tespit edilmiştir. Çankırı, Maykat ve Weizen örneklerinde ise sadece 1 tip (*Lactobacillus plantarum*) izolat tespit edilmiştir.



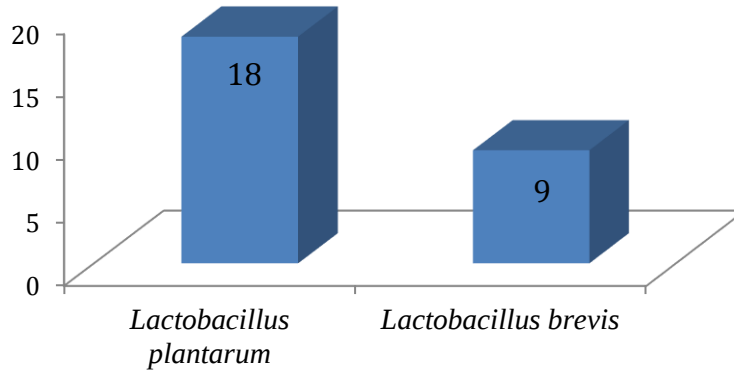
Şekil 4.2. Un Örneklerinden İzole Edilen Farklı Türdeki Mikroorganizmaların Sayısı

Şekil 4.3.'te *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis*'in lokasyonlara göre dağılımı gösterilmektedir. Toplam 15 farklı lokasyondan alınan un örneklerinden yapılan ekşi hamurların tamamından (% 100.0) *Lactobacillus plantarum* izole edilirken, sadece 6 tanesinden (% 40.0) *Lactobacillus brevis* izole edilmiştir.



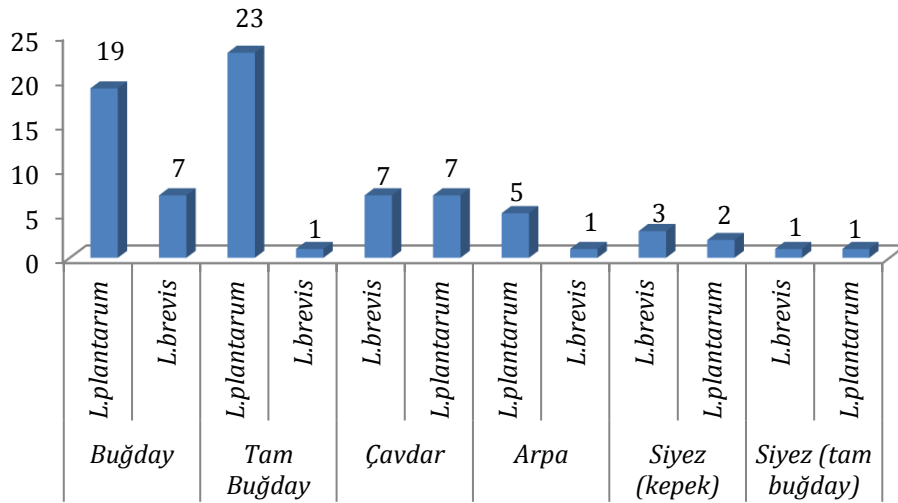
Şekil 4.3. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis*'in Lokasyonlara Göre Dağılımı

Şekil 4.4.'te 18 farklı un örneğinden *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* türü mikroorganizmaların izole edilme oranları gösterilmiştir. Şekil 4.4.'te de görüldüğü gibi toplam 18 farklı un örneğinin 18'inden (% 100.0) *Lactobacillus plantarum* izole edilirken, sadece 9'undan (% 50.0) *Lactobacillus brevis* izole edilmiştir.



Şekil 4.4. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* Türü Mikroorganizmaların 18 Farklı Un Örneğinden İzole Edilme Oranları

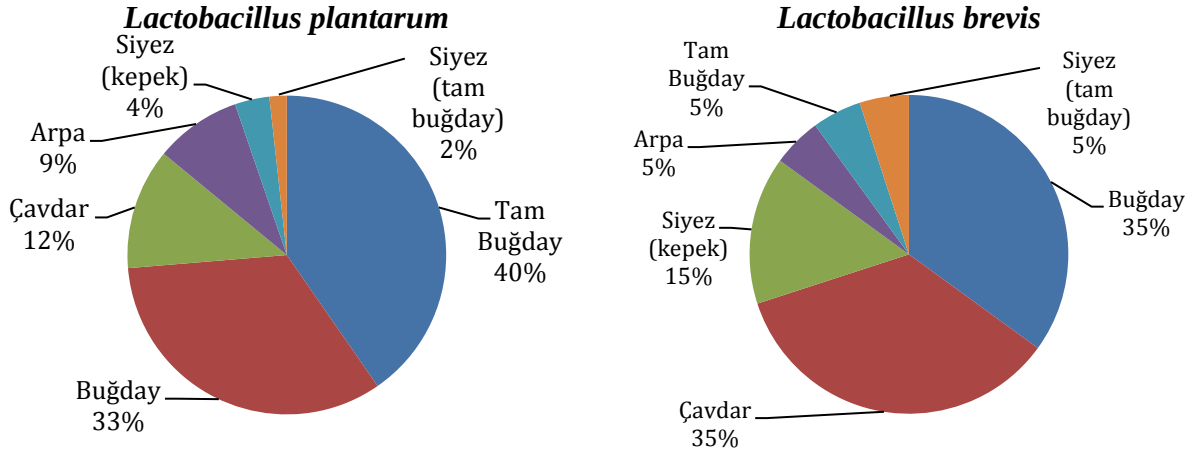
Şekil 4.5.'te un çeşitlerindeki farklılıklara bağlı olarak *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* türü mikroorganizmaların bulunma düzeyi gösterilmiştir. Şekil 4.5. incelendiğinde 6 farklı un çeşidinin tamamında mutlaka *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* türü mikroorganizmaların tespit edildiği görülmektedir.



Şekil 4.5. Un çeşitlerine göre *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* Türü Mikroorganizmaların Bulunma Düzeyi

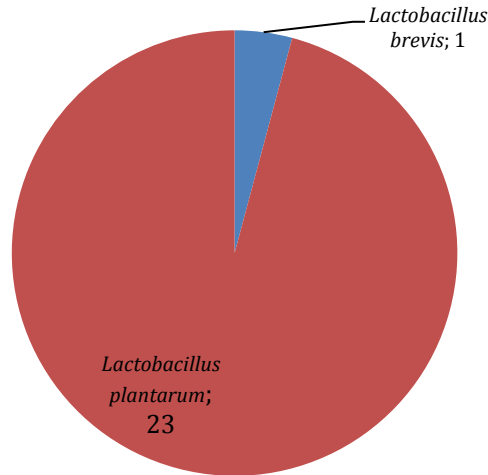
Şekil 4.6.'da *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* türü mikroorganizmaların un örnekleri türlerinden hangilerinde daha çok tespit edildiğine ilişkin veriler gösterilmiştir. Şekil 4.6.'da görüldüğü üzere *Lactobacillus plantarum* türü mikroorganizmalar çoğunlukla tam buğday (% 40.4) ve buğday (% 33.3) türü unlardan,

Lactobacillus brevis ise çoğunlukla buğday (% 35.0) ve çavdar (% 35.0) türü unlardan izole edilmiştir.



Şekil 4.6. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* Türü Mikroorganizmaların Un Çeşitlerinde Dağılımı

Şekil 4.7.'de tam buğday çeşidi unlardan hazırlanan ekşi hamurlardan *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* türü mikroorganizmaların izole edilme oranları verilmiştir. Tam buğday türünden toplamda izole edilen 24 adet izolattan 23'ünün (% 95.8) *Lactobacillus plantarum*, sadece 1 tanesinin (% 4.2) *Lactobacillus brevis* olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Tam Buğday Çeşidi Unlardan Hazırlanan Ekşi Hamurlardan *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* Türü Mikroorganizmaların İzole Edilme Oranları

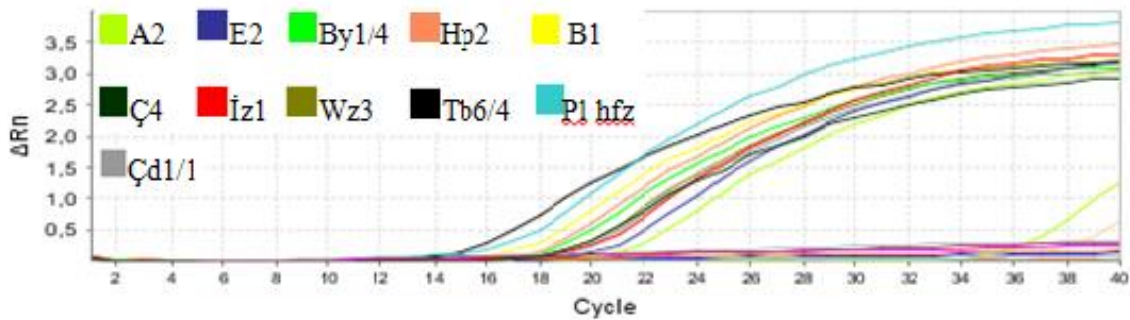
4.3. Gerçek-Zamanlı PZR Sonuçları

MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ön tanımlaması yapılan 106 adet laktik asit bakterisinin içinden *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* suşları tespit edilmiş ve ardından Gerçek-zamanlı PZR ile doğrulaması yapılmıştır.

Gerçek-zamanlı PZR ile doğrulama analizi yapılırken Cp değeri (geçiş noktası) 30'un üzerinde olan ya da herhangi bir Cp değeri tespit edilemeyen sonuçlar negatif sonuç olarak yani tanımlama yapılamadı şeklinde belirlenmiştir. Gerçek-zamanlı PZR ile *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanan izolatlar Çizelge 4.5.'te, *Lactobacillus brevis* olarak tanımlanan izolatlar ise Çizelge 4.6.'da verilmiştir. Ayrıca *Lactobacillus plantarum* izolatlarının gerçek-zamanlı PZR ile tanımlama görüntüsü Şekil 4.8.'de, *Lactobacillus brevis* izolatlarının Gerçek-zamanlı PZR ile tanımlama görüntüsü ise Şekil 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Gerçek-Zamanlı PZR ile *Lactobacillus plantarum* Olarak Tanımlanan İzolatlar

İzolatin Kodu	Alındığı yer
Ç4	Çankırı
E2	Etlik
A2	Ankara Tarım Ürünleri
B1	Ankara Tarım Ürünleri
By1/4	Buğday Unu
Çd1/1	Çavdar Unu
Tb6/4	Kalecik
Hp2	Hatap
Wz3	Weizen
İz1	İzmir
Pl hfz	Hıfzısıhha

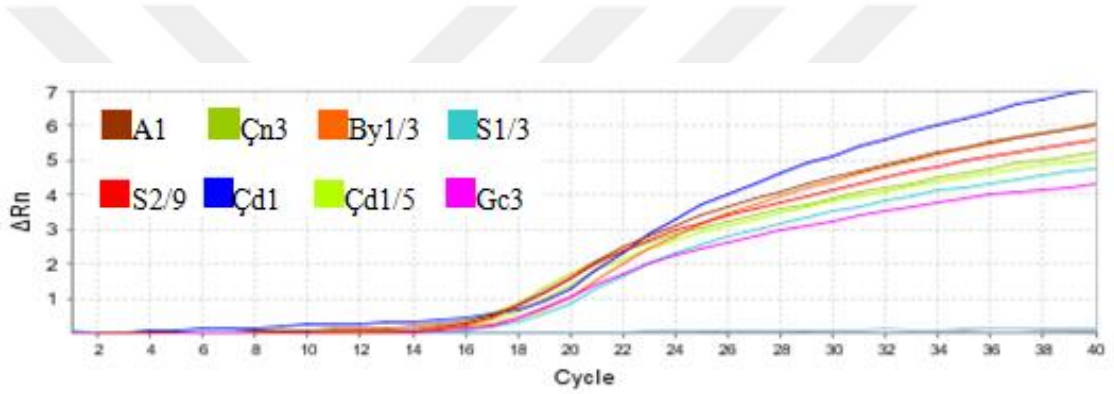


Şekil 4.8. *Lactobacillus plantarum* İzolatlarının Gerçek-Zamanlı PZR ile Tanımlama Görüntüsü

Lactobacillus plantarum izolatlarına ait PZR görüntüleri ayrıntılı olarak Ek-1’de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Gerçek-Zamanlı PZR ile *Lactobacillus brevis* Olarak Tanımlanan İzolatlar

İzolatın Kodu	Alındığı yer
A1	Ankara Tarım Ürünleri
Çd1	Ankara Tarım Ürünleri
By1/3	Buğday Unu
Çd1/5	Çavdar Unu
S1/3	Kastamonu
S2/9	Kastamonu
Gc3	Gacemer
Çn3	Çin



Şekil 4.9. *Lactobacillus brevis* İzolatlarının Gerçek-zamanlı PZR ile Tanımlama Görüntüsü

Lactobacillus brevis izolatlarına ait PZR görüntüleri ayrıntılı olarak Ek-2’de verilmiştir.

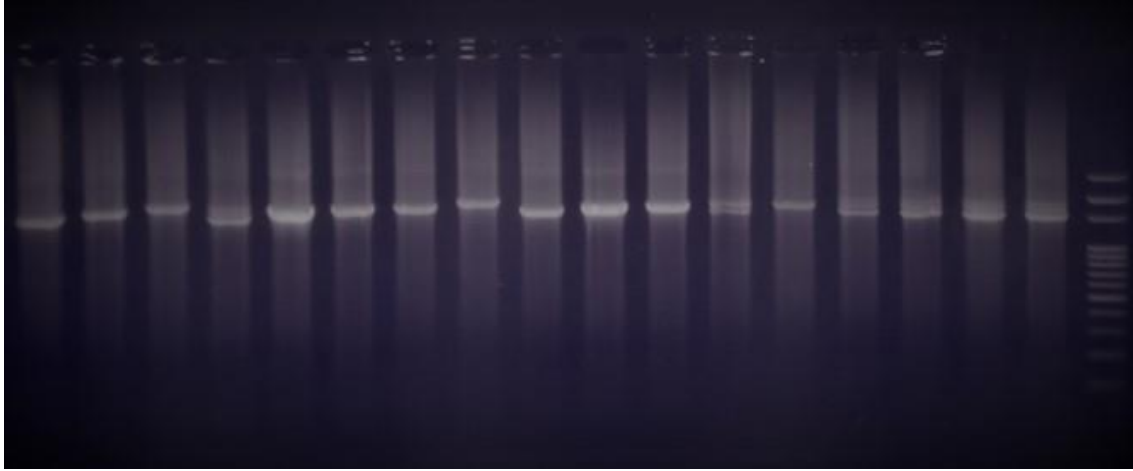
4.4. 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları

MALDI-TOF Kütle Spektrometresi analizi ile ön tanımlaması yapılan ve Gerçek-Zamanlı PZR ile moleküler düzeyde tanımlanan 10 adet *Lactobacillus plantarum* ve 7 adet *Lactobacillus brevis* izolatının 16S rRNA dizi analizi sonuçları Çizelge 4.7.’de verilmiştir. Ayrıca 16S rRNA dizi analizi sonucunda tür düzeyinde tanımlanan izolatların Gen Bankasına veri girişleri yapılmış olup, Gen Bank numaraları yine Çizelge 4.7.’de görülmektedir.

Çizelge 4.7. İzolatların 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları

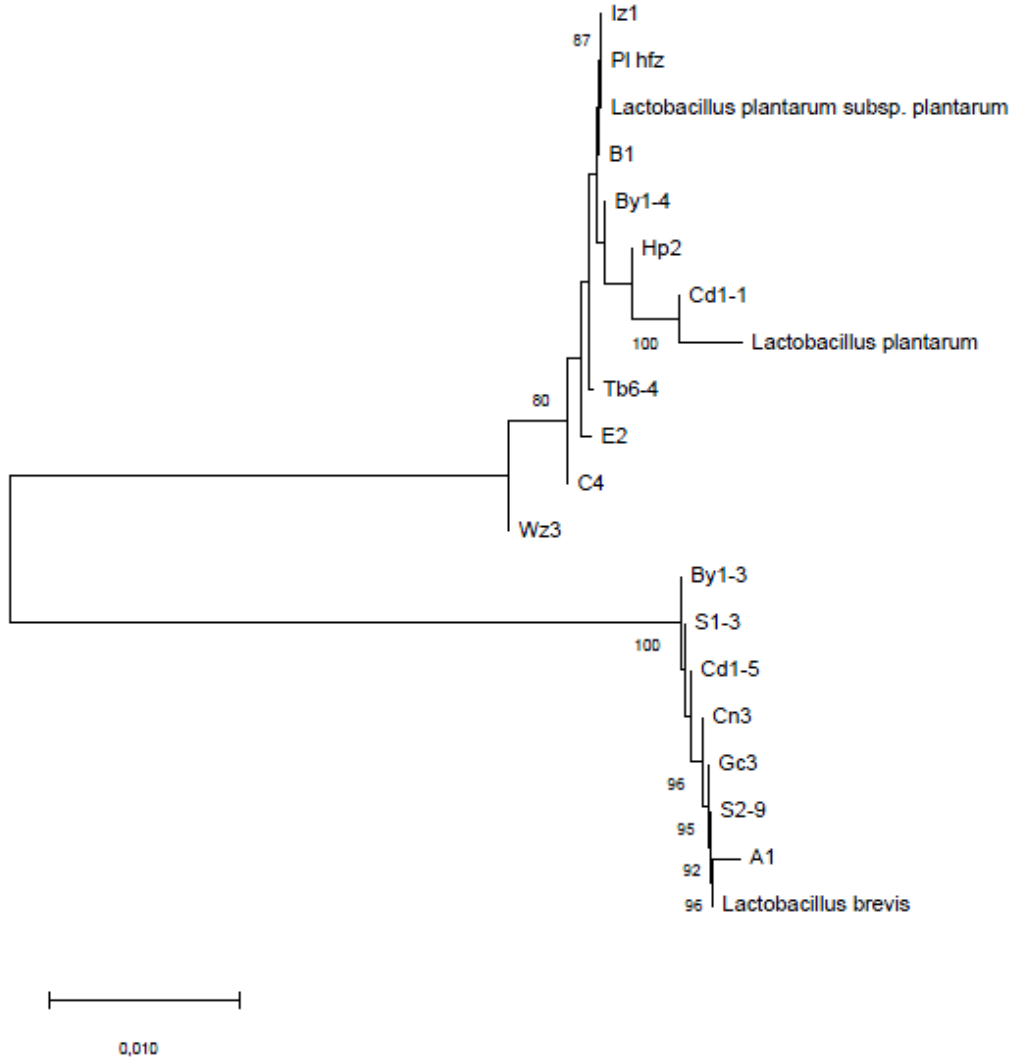
İzolatın Kodu	Alındığı yer	Bakteri Türü	Gen Bank No
Ç4	Çankırı	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826733
E2	Etlik	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826737
B1	Ankara Tarım Ürünleri	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826730
By1/4	Buğday Unu	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826732
Çd1/1	Çavdar Unu	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826734
Tb6/4	Kalecik	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826744
Hp2	Hatap	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826739
Wz3	Weizen	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826745
İz1	İzmir	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826740
Pl hfz	Hıfzısıhha	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826741
A1	Ankara Tarım Ürünleri	<i>Lactobacillus brevis</i>	MN826729
By1/3	Buğday Unu	<i>Lactobacillus brevis</i>	MN826731
Çd1/5	Çavdar Unu	<i>Lactobacillus brevis</i>	MN826736
S1/3	Kastamonu	<i>Lactobacillus brevis</i>	MN826742
S2/9	Kastamonu	<i>Lactobacillus brevis</i>	MN826743
Gc3	Gacemer	<i>Lactobacillus brevis</i>	MN826738
Çn3	Çin	<i>Lactobacillus brevis</i>	MN826735

İzolatların DNA'larının amplifikasyonu sonucunda elde edilen bantlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. İzolatların DNA'larının Amplifikasyonu Sonucunda Elde Edilen Bantlar

16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre oluşturulan dendrogram Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçlarına Göre Oluşturulan Dendrogram

B1, By1/4, Hp2, Çd1/1, Tb6/4, E2, Ç4 ve Wz3 kodlu izolatlar *L. plantarum*; Iz1 ve Pl hfz kodlu izolatlar ise *L. plantarum* ssp. *plantarum* olarak bulunmuştur. Wz3, Ç4, E2 ve Tb6/4 kodlu suşlaar bu referans türle birkaç baz farklılık (baz farklılıkları <%1'den daha az) göstermektedir. İkinci daldaki örnekler (By1/3, S1/3, Çd1/5, Çn3, Gc3, S2/9, A1) ise referans suşla tamamen benzerlik gösterip *L. brevis* olarak bulunmuştur.

4.5. Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özellikleri

İzole edilen laktik asit bakterilerinin asitlik (pH 2.5) ve safra tuzu (% 0.3 oxgall) toleransı ile ilgili uygulamalarında bakteri sayısı ve canlı kalma oranları bakımından ölçümlenen muameleler arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile araştırılmıştır. Analizler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını incelemek üzere Tukey HSD çoklu

karşılaştırma testleri kullanılmıştır. İstatistiksel analizler MINITAB istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde önemlilik düzeyi $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ olarak belirlenmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların asitliğe (pH 2.5) ve safra tuzuna (% 0.3 oxgall) toleransı ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. İzole Edilen Mikroorganizmaların Asitlik (pH 2.5) ve Safra Tuzuna (%0.3 Oxgall) Toleransı ile İlgili İki Yönlü Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri	Önem Düzeyi (p)
Asitliğe Dayanıklılık	16	3.202	0.200	108.362	0.000
Hata	17	0.031	0.002		
Genel	33	3.234			
Safraya Dayanıklılık	16	15.928	0.996	235.217	0.000
Hata	17	0.072	0.004		
Genel	33	16.000			

İzole edilen mikroorganizmaların asitliğe (pH 2.5) ve safra tuzuna (%0.3 oxgall) toleransı Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. İzole Edilen Mikroorganizmaların Asitlik (pH 2.5) ve Safra Tuzuna (%0.3 oxgall) Toleransı

Bakteri Suş Kodu	Bakteri Suşu Türü	Kör (Log Kob/ML) (Ortalama $\pm$ S.H.)	Asitliğe Dayanıklılık (pH 2.5) (Log Kob/ML) (Ortalama $\pm$ S.H.)	Safra Tuzuna Dayanıklılık (%0.3 Oxgall) (Log Kob/ML) (Ortalama $\pm$ S.H.)
Çd1/1	<i>L. plantarum</i>	9.24 $\pm$ 0.06	7.40 $\pm$ 0.01 def	8.73 $\pm$ 0.09 e
Hp2	<i>L. plantarum</i>	9.37 $\pm$ 0.01	7.47 $\pm$ 0.01 efg	8.57 $\pm$ 0.12 def
Pl hfz	<i>L. plantarum</i>	9.69 $\pm$ 0.03	7.49 $\pm$ 0.04 fg	7.08 $\pm$ 0.00 b
Tb6/4	<i>L. plantarum</i>	9.65 $\pm$ 0.01	7.64 $\pm$ 0.03 g	5.96 $\pm$ 0.05 a
E2	<i>L. plantarum</i>	9.40 $\pm$ 0.00	7.43 $\pm$ 0.03 ef	7.91 $\pm$ 0.02 c
B1	<i>L. plantarum</i>	9.36 $\pm$ 0.04	7.37 $\pm$ 0.01 def	8.44 $\pm$ 0.01 de
İz1	<i>L. plantarum</i>	9.54 $\pm$ 0.08	7.38 $\pm$ 0.04 def	8.36 $\pm$ 0.02 d
Ç4	<i>L. plantarum</i>	9.32 $\pm$ 0.06	6.73 $\pm$ 0.01 ab	8.42 $\pm$ 0.02de
By1/4	<i>L. plantarum</i>	9.46 $\pm$ 0.00	7.46 $\pm$ 0.01 ef	8.36 $\pm$ 0.04 d
Wz3	<i>L. plantarum</i>	9.02 $\pm$ 0.02	7.42 $\pm$ 0.04 ef	8.44 $\pm$ 0.03 de
S2/9	<i>L. brevis</i>	9.39 $\pm$ 0.03	7.24 $\pm$ 0.04 cd	8.38 $\pm$ 0.02 de
Çn3	<i>L. brevis</i>	8.91 $\pm$ 0.06	6.83 $\pm$ 0.08b	8.64 $\pm$ 0.08 ef
A1	<i>L. brevis</i>	8.88 $\pm$ 0.03	6.63 $\pm$ 0.03 a	8.82 $\pm$ 0.01 e
Çd1/5	<i>L. brevis</i>	8.94 $\pm$ 0.06	6.84 $\pm$ 0.01 b	8.39 $\pm$ 0.03 de
S1/3	<i>L. brevis</i>	9.03 $\pm$ 0.05	6.83 $\pm$ 0.01 b	8.45 $\pm$ 0.02 de
Gc3	<i>L. brevis</i>	9.40 $\pm$ 0.02	7.30 $\pm$ 0.00 de	8.58 $\pm$ 0.04 def
By1/3	<i>L. brevis</i>	9.28 $\pm$ 0.00	7.08 $\pm$ 0.04 c	8.58 $\pm$ 0.00 def

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

Aynı sütunda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p < 0.01$).

SH: Standart hata.

Çizelge 4.8.'de tek yönlü varyans analizi ve Çizelge 4.9.'da bakteri sayıları için gerçekleştirilen analiz sonuçları yer almaktadır. Tez çalışmasında yer alan bakteri suşları arasında asitliğe dayanıklılık ve safraya dayanıklılık bakımından istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Bakteri kültürlerine ilişkin analiz sonuçları, bakteri suşları arasında gözlenen farkların tüm laktik asit bakterilerinde istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğunu göstermektedir ($p < 0.01$).

Bakteri kültürlerine ilişkin kontrol grupları içinde en yüksek ortalama değerler Pl hfz (9.69), en düşük ortalama değerler ise A1 (8.88) kodlu bakteri suşunda; asitliğe dayanıklılık uygulamasında en yüksek değer Tb6/4 (7.64) en düşük değer ise A1 (6.63) kodlu bakteri suşunda; safra tuzuna dayanıklılık uygulamasında ise en yüksek ortalama değer A1 (8.82), en düşük ortalama değer Tb6-4 (5.96) kodlu bakteri suşunda hesaplanmıştır. Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre asitliğe dayanıklılık bakımından bakteri türleri arasındaki farklılık A1, Çdl/5, S1/3 ve By1/3 suşlarından kaynaklanmaktadır. Safraya dayanıklılık bakımından ise Tb6/4, Pl hfz, E2, İz1, Çdl/1 ve A1 suşları bakteri türleri arasındaki farklılık oluşturmuştur.

İzole edilen mikroorganizmaların asitlik (pH 2.5) ve safra tuzu (% 0.3 oxgall) uygulamalarından canlı kalma oranı (%) ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. İzole Edilen Mikroorganizmaların Asitlik (pH 2.5) ve Safra Tuzu (% 0.3 oxgall) Uygulamalarından Canlı Kalma Oranı (%) ile İlgili İki Yönlü Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
Asitliğe Dayanıklılık	16	171.270	10.704	25.141	0.000
Hata	17	7.238	0.426		
Genel	33	178.508			
Safraya Dayanıklılık	16	2624.493	164.031	342.101	0.000
Hata	17	0.479	0.479		
Genel	33	2632.644			

İzole edilen mikroorganizmaların asitlik (pH 2.5) ve safra tuzu (% 0.3 oxgall) uygulamalarından canlı kalma oranı (%) Çizelge 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. İzole Edilen Mikroorganizmaların Asitlik (pH 2.5) ve Safra Tuzu (%0.3 oxgall) Uygulamalarından Canlı Kalma Oranı (%)

Kodu	Türü	Kör (log kob/mL)	Asitliğe dayanıklılık (pH 2.5) (log kob/mL)	Asitlik canlı kalma oranı (%) (Ortalama ± S.H.)	Safra tuzuna dayanıklılık (%0.3 oxgall) (log kob/mL)	Safra canlı kalma oranı (%) (Ortalama ± S.H.)
Çd1-1	<i>L. plantarum</i>	9.24	7.40	80.03 ± 0.36 hi	8.73	94.42 ± 0.31 hi
Hp2	<i>L. plantarum</i>	9.37	7.47	79.72 ± 0.19 ghi	8.57	91.46 ± 1.18 efg
Plhfs	<i>L. plantarum</i>	9.69	7.49	77.34 ± 0.21cdefg	7.08	73.10 ± 0.19 b
Tb6-4	<i>L. plantarum</i>	9.65	7.64	79.21 ± 0.27fgh	5.96	61.74 ± 0.44 a
E2	<i>L. plantarum</i>	9.40	7.43	78.99 ± 0.27 efgh	7.91	84.15 ± 0.21c
B1	<i>L. plantarum</i>	9.36	7.37	78.74 ± 0.44 defgh	8.44	90.17 ± 0.49def
İz1	<i>L. plantarum</i>	9.54	7.38	77.31 ± 0.28cdefg	8.36	87.64 ± 0.53d
Ç4	<i>L. plantarum</i>	9.32	6.73	72.21 ± 0.36 a	8.42	90.29 ± 0.42def
By1-4	<i>L. plantarum</i>	9.46	7.46	78.81 ± 0.05 defgh	8.36	88.37 ± 0.42d
Wz3	<i>L. plantarum</i>	9.02	7.42	82.26 ± 0.26defgh	8.44	93.51 ± 0.07 gh
S2-9	<i>L. brevis</i>	9.39	7.24	77.15 ± 0.63bcdefg	8.38	89.29 ± 0.03de
Çn3	<i>L. brevis</i>	8.91	6.83	76.61 ± 1.36bcdef	8.64	96.97 ± 0.25ij
A1	<i>L. brevis</i>	8.88	6.63	74.65 ± 0.07 ab	8.82	99.38 ± 0.39 i
Çd1-5	<i>L. brevis</i>	8.94	6.84	76.51 ± 0.40 bcde	8.39	93.80 ± 0.91 gh
S1-3	<i>L. brevis</i>	9.03	6.83	75.58 ± 0.47 bc	8.45	93.52 ± 0.35gh
Gc3	<i>L. brevis</i>	9.40	7.30	77.70 ± 0.12 cdefgh	8.58	91.27 ± 0.52efg
By1-3	<i>L. brevis</i>	9.28	7.08	76.24 ± 0.38 bcd	8.58	92.46 ± 0.00 fgh

Aynı sütunda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0.01).

Çizelge 4.10.'da tek yönlü varyans analizi ve Çizelge 4.11.'de canlı kalma oranları için gerçekleştirilen analiz sonuçları yer almaktadır. Tez çalışmasında yer alan bakteri suşları arasında asitliğe dayanıklılık ve safraya dayanıklılık bakımından istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Bakteri kültürlerine ilişkin analiz sonuçları, bakteri suşları arasında canlı kalma oranları bakımından gözlenen farkların tüm laktik asit bakterilerinde istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğunu göstermektedir (p<0.01). Analizler kapsamında incelenen bakteri türlerinin asitlik canlı kalma oranına ait ortalama en yüksek değer Wz3 (% 82.26) en düşük değer

ise Ç4 (% 72.21) kodlu bakteri suşunda; safra canlı kalma oranında ise en yüksek ortalama değer A1 (% 99.38), en düşük ortalama değer Tb6/4 (% 61.74) kodlu bakteri suşunda hesaplanmıştır. Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre asitliğe dayanıklılık bakımından Ç4; safraya dayanıklılık bakımından Tb6-4, Pl hfz, E2 ve By1/4 suşlarının farklılığı oluşturan gruplar olduğu görülmektedir.

Kontrol grubu ile asitlik ve safra uygulama karşılaştırmasına ait veriler Çizelge 4.12.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Kontrol Grubu ile Asitlik ve Safra Uygulama Karşılaştırması

	Ortalama±SH	t	p-value
Asitliğe Dayanıklılık	7.2059±0.0536	-57.466	0.000*
Safraya Dayanıklılık	8.2397±0.1194	-7.013	0.000*
Kontrol	9.2856±0.2495		

*p<0.01

Safra ve asitlik uygulamasından önceki ve sonraki canlı kalma oranları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık tespit edilmiştir (p<0.01). Çizelge 4.12. incelendiğinde uygulamalar gerçekleştirilmeden önceki ve sonraki canlı kalma oranlarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

5. YORUM

Sunulan tez kapsamında 18 adet un örneğiyle hazırlanan ekşi hamurlardan 143 adet olası LAB izole edilmiştir. İzolatların MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile sadece 106 tanesi tanımlanabilmiştir. Ön tanımlaması yapılan izolatların içinden ekşi hamurlarda en yaygın olarak bulunan ve hızlı asit üretme, düşük sıcaklıkta inkübe olabilme gibi daha iyi teknolojik özellikler gösteren 57 adet *Lactobacillus plantarum* ve 20 adet *Lactobacillus brevis* türü suşlar elde edilmiştir. Örnek/mikroorganizma çeşidi şeklinde gruplandırma yapılarak içlerinden 10 adet *Lactobacillus plantarum* ve 7 adet *Lactobacillus brevis* türü izolat seçilmiştir. 17 izolatın Gerçek-Zamanlı PZR ile moleküler doğrulaması ve ardından 16S rRNA dizi analizi ile moleküler düzeyde tanımlaması yapılmıştır. PZR sonuçları ile 16S rRNA dizi analizi sonuçları birbiriyle % 100 uyum göstermiştir. Ayrıca izolatların bazı probiyotik özellikleri (asit toleransı ve safra toleransı) incelenmiştir. 17 adet izolat asit ve safra toleransı bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar göstermiştir ($p<0.01$). İzolatlar içinde Wz3 kodlu *Lactobacillus plantarum* türü olan izolat asit uygulamasına karşı en dayanıklı, Ç4 kodlu *Lactobacillus plantarum* türü olan izolat ise en dayanıksız izolat olarak tespit edilmiştir. Safra toleransı bakımından A1 kodlu *Lactobacillus brevis* türü olan izolat en dayanıklı, TB6/4 kodlu *Lactobacillus plantarum* olan izolat ise en dayanıksız izolat olarak tespit edilmiştir. Buna ek olarak izolatların tümünün hem safra hem de asit uygulamasına karşı direnç göstermiş olması ve canlı kalmaları önemli bir bulgu olarak saptanmıştır. Bu izolatların toplanan unlardan hazırlanan hamurlardan elde edilmesi sebebiyle ticari kültür olma olasılıklarının zayıf olduğu ve bu nedenle ticari preparatlara göre asite dayanıklılık, hızlı asit oluşturma gibi bazı teknolojik açıdan daha üstün özelliklere sahip oldukları düşünülmektedir. Yapılan analizler ışığında 17 izolatın ekşi hamur eldesinde starter olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu ve ayrıca probiyotik olan bakterilere benzer özellikler gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma ileride gerçekleştirilmesi düşünülen bir projenin ilk basamağı olup çalışma sonucunda elde edilen 17 adet suşun ileri aşamalarda teknolojik özelliklerinin araştırılması ile ekmekçilikte alternatif kültür olarak değerlendirilmesi hususunda yapılacak çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aksoy, Z., Kahramanmaraş ve Yöresinde Geleneksel Olarak Üretilen Ekşi Hamur Örneklerinden Laktik Asit Bakteri İzolasyonu, Antibiyotik Dirençliliği, Plazmid İçeriklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, **2009**.
- Akgün, F.B., Ekşi Hamur Tozu Eldesi ve Ekmek Üretiminde Kullanılabilme Olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, **2007**.
- Angeletti, S., Journal of Microbiological Methods, 138 (**2017**) 20.
- Anonim a, Toprak Mahsulleri Ofisi, http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/ekmek/tmo_brosuryeni2.pdf (Erişim tarihi: **2 Kasım 2019**).
- Anonim b, Drozdoğan, <https://www.drozdogan.com/polimeraz-zincir-reaksiyonu-nedir-pcr-tarihcesi-nasil-yapilir/> (Erişim tarihi: **10 Kasım 2019**).
- Anonim c, Slideshare, <https://www.slideshare.net/abduldvm/16s-ribosomal-dna-sequence-analyses> (Erişim tarihi: **26 Kasım 2019**).
- Anonim d, Bio-rad, <https://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU> (Erişim tarihi: **7 Aralık 2019**).
- Anonim e, Biotecon diagnostics <https://www.bc-diagnostics.com/maldi-tof-ms-target/> (Erişim tarihi: **8 Aralık 2019**).
- Anonim f, Medgaget, https://www.medgadget.com/2012/04/bruker-extends-maldi-biotyper-library-to-cover-mycobacteria-andfungi.html?utm_source=twitter_feed&utm_medium=twitter&utm_campaign=Feed%3A+Medgadget+%28Medgadget%29&utm_content=Google+Feedfetcher (Erişim tarihi: **8 Aralık 2019**).
- Anonim g, Labor, <https://www.labor.com.tr/urun/hettich-mikro-200-mikro-santrifuj-15000-rpm-30x15-2-ml> (Erişim tarihi: **8 Aralık 2019**).
- Anonim h, e-bay, <https://www.ebay.com/p/17022540444> (Erişim tarihi: **8 Aralık 2019**).
- Anonim ı, Thermo fisher scientific, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4351105#/4351105> (Erişim tarihi: **8 Aralık 2019**).

- Arendt, E.K., Ryan, L.A.M. and Dal Bello, F., Food Microbiology, 24 (2007) 165.
- Aslan, H., Isıl İşlem Görmüş Bazı Gıdalarda *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella typhimurium*'un Kantitatif Tespitinde Kültürel Yöntem, Real-Time PCR ve PMA-Real-Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2016.
- Barreau, M., Pagnier, I. and La Scola, B., Anaerobe, 22 (2013) 123.
- Bello, F.D., I. Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmer, H., Schober, T.J., Ström, K., Sjögren, J., van Sinderen, D., Schnürer, J. and Arendt, E.K., Journal of Cereal Science, 45 (2007) 309.
- Bircan, D., Güray, C.T. ve BOSTAN, K., Aydın Gastronomy, 1 (2017) 1.
- Brandt, M.J., Food Microbiology, 24 (2007) 161.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.L., Ferroni, A., Gutmann, L. and Nassif, X., Clinical Biochemistry, 44 (2011) 104.
- Carnevali, P., Ciatì, R., Leporati, A. and Paese, M., Food Microbiology, 24 (2007) 150.
- Catzeddu, P., Mura, E., Parente, E., Sanna, M. and Farris, G.A., Systematic and Applied Microbiology, 29 (2006) 138.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L. and Rossi, J., Journal of Food Science, 63 (1998) 347.
- Corsetti, A., De Angelis, M., Dellaglio, F., Paparella, A., Fox, P.F., Settanni, L. and Gobbetti, M., Journal of Applied Microbiology, 94 (2003) 641.
- Corsetti, A. and Settanni, L., Food Research International, 40 (2007) 539.
- Corsetti, A., Settanni, L., Valmorri, S., Mastrangelo, M. and Suzzi, G., Food Microbiology, 24 (2007) 592.
- Çarhan, A., Ercan, E. ve Yalçınkaya, T., Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 73 (2016) 183.
- Çiftçi, M.M., Ekşi Hamur Mayasından İzole Edilen *Lactobacillus* Türlerinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017.

- De Vuyst, L. and Neysens, P., Trends in Food Science & Technology, 16 (2005) 43.
- De Vuyst, L. and Vancanneyt, M., Food Microbiology, 24 (2007) 120.
- Decock, P. and Cappelle, S., Trends in Food Science & Technology, 16 (2005) 113.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Gallo, G., Settanni, L., Berloco, M.G., Siragusa, S., Parente, E., Corsetti, A. and Gobbetti, M., Journal of Applied Microbiology, 103 (2007) 821.
- Doan, N.T.L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Le Thanh, B. and Vandamme, P., Letters in Applied Microbiology, 55 (2012) 265.
- Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., Karpíšková, R., International Journal of Food Microbiology, 159 (2012) 107.
- Ekmekçi, İ., Glutensiz Ekşi Maya Ekmeği Üretimi İçin Starter Kültür Oluşturulması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014.
- Galli, V., Mazzoli, L., Luti, S., Venturi, M., Guerrini, S., Paoli, P., Vincenzini, M., Granchi, L. and Pazzagli, L., International Journal of Food Microbiology 286 (2018) 55.
- Ganzle, M.G., Vermeulen, N. and Vogel, R.F., Food Microbiology, 24 (2007) 128.
- Gerekova, P., Petrulakova, Z. and Sturdik, E., Acta Chimica Slovaca, 4 (2011) 118.
- Giasuddin, A.S.M., Journal of Islamic Academy of Sciences, 8 (1995) 29.
- Göçmen, D., GIDA 26 (2001) 13.
- Gül, H., Özçelik, S., Sağdıç, O. ve Certel, M., Process Biochemistry, 40 (2005) 691.
- Hamad, S.H., Dieng, M.C., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F., Journal of Applied Microbiology, 83 (1997) 764.
- Hansen, A., Lund, B., and Lewis, M.J., Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 22 (1989) 145.
- Hansen, A. and Schieberle, P., Trends in Food Science and Technology, 16 (2005) 85.
- Hüttner, E.K., Bello, F.D. and Arendt, E.K., European Food Research and Technology, 230 (2010) 849.

- Kaditzky, S., Seitter, M., Hertel, C., Vogel, R.F., *European Food Research and Technology*, 227 (2008) 433.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., Van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., Van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., De Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. and Siezen, R., *Antonie van Leeuwenhoek*, 82 (2002) 29.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H. and De Vos, W.M., *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (1991) 3390.
- Küçükçuban, A., *Sıvı Ekşi Hamur Sistemi İçin Uygun Laktik Asit Bakteri Kombinasyonunun Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 2012.*
- Lotong, V., Chambers, E. and Chambers, D.H., *Journal of Sensory Studies*, 15 (2000) 309.
- Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D. and Plumed-Ferrer, C., *Food Science and Technology*, 66 (2016) 275.
- Meignen, B., Onno, B., Gelinas, P., Infantes, M., Guilous, S. and Cahagnier, B., *Food Microbiology*, 18 (2001) 239.
- Menteş, Ö., Akçelik, M. ve Ercan, R., *Gıda*, 29 (2004) 347.
- Meroth, C.B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M.J. and Hammes, W.P., *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2003a) 475.
- Meroth, C.B., Hammes, W.P. and Hertel, C., *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2003b) 7453.
- Messens, W. and De Vuyst, L., *International Journal of Food Microbiology*, 72 (2002) 31.
- Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S. and Gobbetti, M., *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (2011) 1251.

- Narvhus, J.A. and Sorhaug, T., Food Biochemistry and Food Processing. SIMPSON, B.K. (Ed.), Vol. 2, Wiley Blackwell, New Jersey, Chapter 5, **2012**.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castano, M.J. and Solera, J., Clinica Chimica Acta, 439 **(2015)** 231.
- Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E. and Kalantzopoulos, G., Process Biochemistry, 41 **(2006)** 2429.
- Paramithiotis, S., Sofou, A., Tsakalidou, E. and Kalantzopoulos, G., World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23 **(2007)** 1417.
- Pepe, O., Blaiotta, G., Anastasio, M., Moschetti, G., Ercolini, D. and Villani, F., Systematic and Applied Microbiology, 27 **(2004)** 443.
- Pulvirenti, A., Solieri, L., Gullo, M., De Vero, L. and Giudici, P., Letters in Applied Microbiology, 38 **(2004)** 113.
- Randazzo, C.L., Heilig, H., Restuccia, C., Giudici, P. and Caggia, C., Journal of Applied Microbiology, 99 **(2005)** 251.
- Ricciardi, A., Parente, E., Piraino, P., Paraggio, M. and Romano, P., International Journal of Food Microbiology, 98 **(2005)** 63.
- Robert, H., Gabriel V. and Fontagne-Faucher, C., International Journal of Food Microbiology, 135 **(2009)** 53.
- Rollan G., Gerez, C.L., Dallagnol, A.M., Torino, M.I. and Font, G., Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2 **(2010)** 1168.
- Rosenquist, H. and Hansen, A., Food Microbiology, 17 **(2000)** 241.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., Science, 239 **(1988)** 487.
- Scheirlink, I., Van der Meulen, R., Schoor, A.V., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P. and Huys, G., Applied and Environmental Microbiology, 74 **(2008)** 2414.
- Şimşek, Ö., Çon, A.H. and Tulumoğlu, Ş., Food Control, 17 **(2006)** 263.

- Taban, B., İmmünomanyetik Ayırma-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (İMA-PZR) Yönteminin Uygulanması ile Tavuk Etlerinde *Salmonella* spp. Belirlenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2007**.
- Tannock, G.W., Applied and Environmental Microbiology, 70 (**2004**) 3189.
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. and Dousset, X., International Journal of Food Microbiology, 48 (**1999**) 167.
- Ur-Rehman, S., Paterson, A. and Piggott, J.R., Trends in Food Science & Technology, 17 (**2006**) 557.
- Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Galluzzo, P., Corona, O., Francesca, N., Caracappa, S., Moschetti, G. and Settanni, L., Food Microbiology, 51 (**2015**) 57.
- Vernocchi, P., Valmorri, S., Dalai, I., Torriani, S., Gianotti, A., Suzzi, G., Guerzoni, M.E., Mastrocola, D. and Gardini, F., Journal of Food Science, 69 (**2004**) 182.
- Vogel, R.F., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Wiezer, A., Liesegang, H., Offschanka, S., Voget, S., Angelov, A., Böcker, G. and Liebl, W., Microbial Cell Factories, 10 (**2011**) S6.
- Vrancken, G., Rimaux, T., Weckx, S., Leroy, F. and De Vuyst, L., Applied and Environmental Microbiology, 77 (**2011**) 2716.
- Vuyst, L.D., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., SWINGS, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. and Messens, W., Applied and Environmental Microbiology, 68 (**2002**) 6059.
- Wick, M., Stolz, P., Böcker, G. and Lebeault, J.M., Acta Biotechnology, 23 (2003) 51.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. and Schubert, S., Applied Microbiology and Biotechnology, 93 (**2012**) 965.
- Wu, C., Liu, R., Huang, W., Rayas-Duarte, P., Wang, F. and Yao, Y., Journal of Cereal Science, 56 (**2012**) 127.
- Yağmur, G., Ekşi Hamur Fermantasyonunda Etkili Olan Laktik Asit Bakterilerinin ve Mayaların Belirlenmesi ve Bunlardan Elde Edilen Sıvı Ekşi Hamurun Ekmek Kalitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2013**.

Zhou, B., Xiao, J., Liu, S., Yang, J., Wang, Y., Nie, F., Zhou, Q., Li, Y. and Zhao, G.,
Food Control, 32 (2013) 198.



EKLER

EK 1 – Tanımlanan *Lactobacillus plantarum* suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri

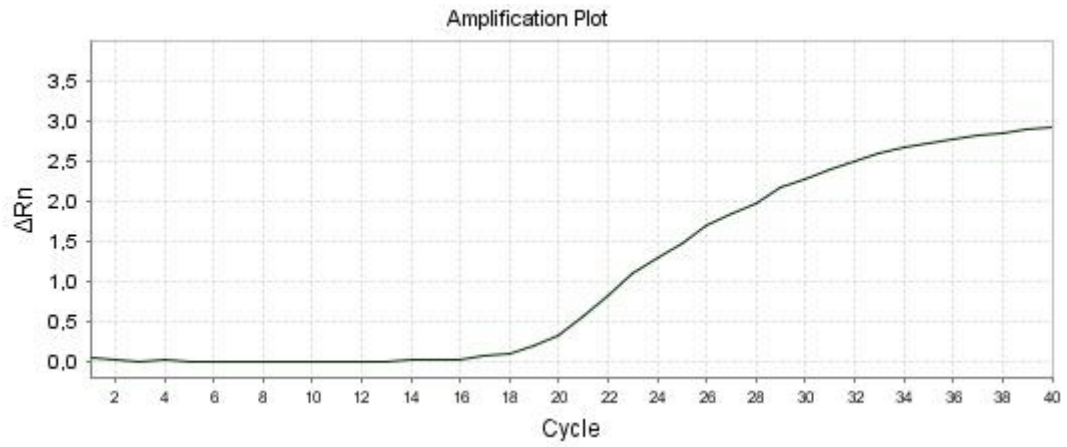
EK 2 – Tanımlanan *Lactobacillus brevis* suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri

EK 3 – Tezden Türetilmiş Bildiriler

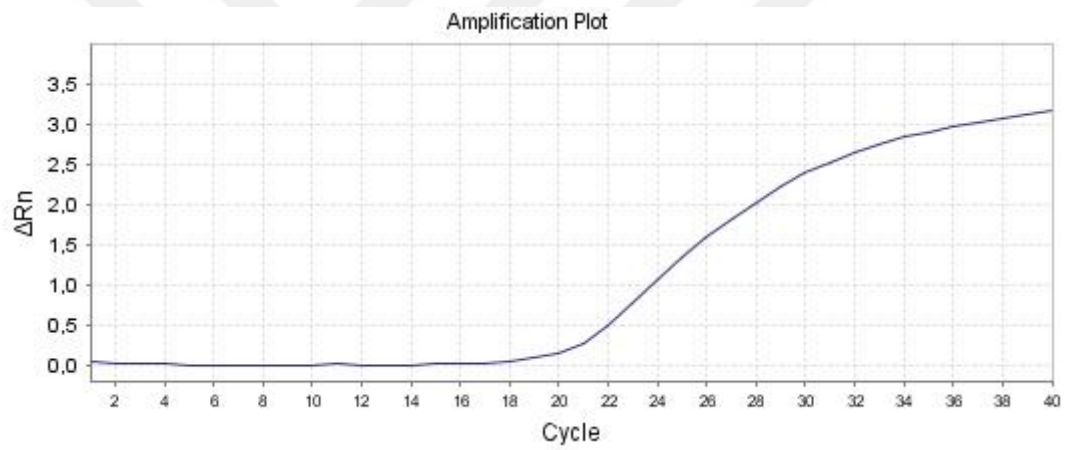
EK 4 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu



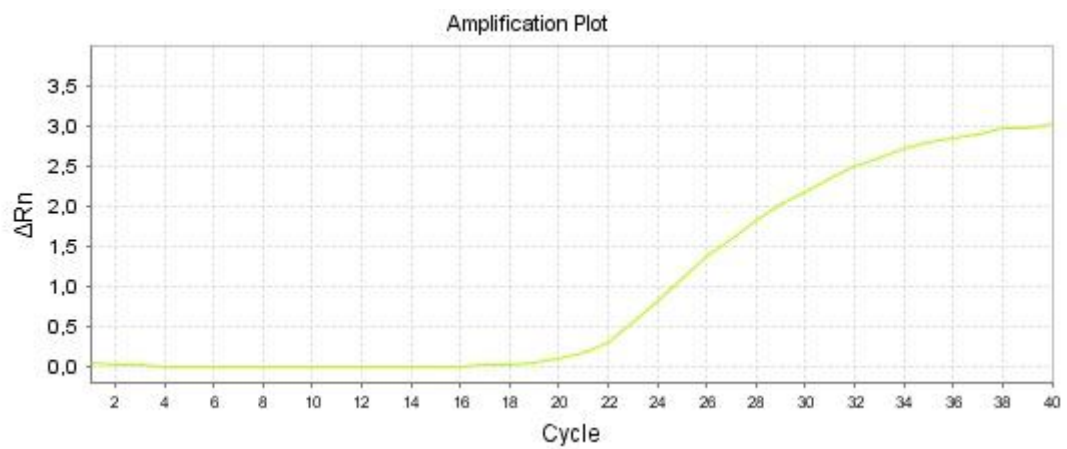
EK 1 – Tanımlanan *Lactobacillus plantarum* suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri



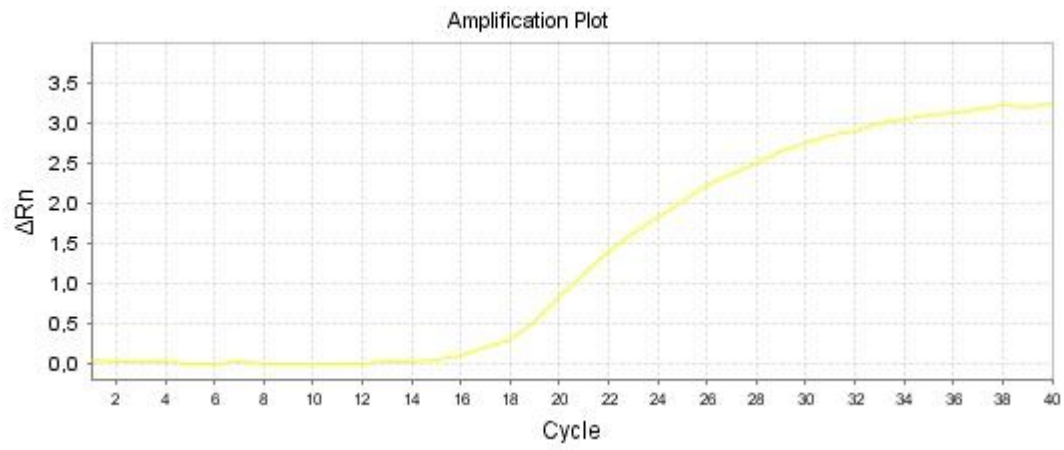
Ç4-C_p: 15.44



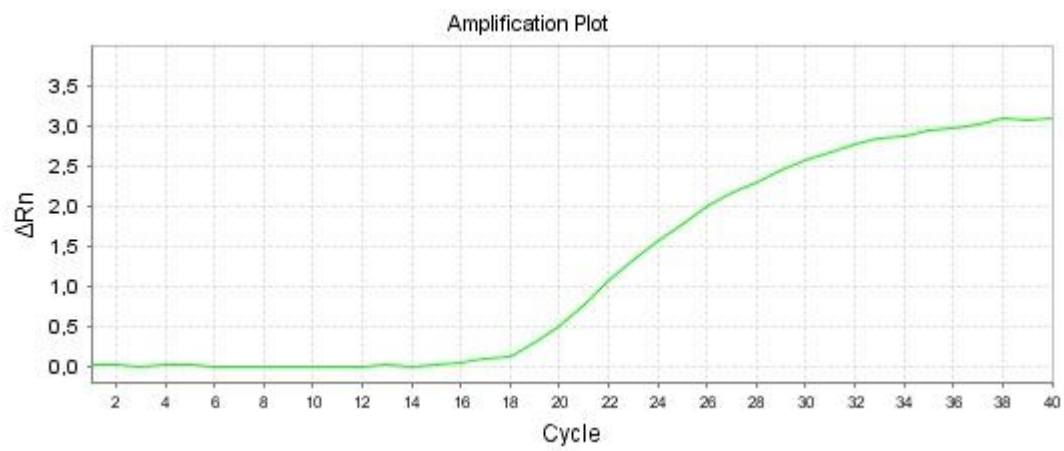
E2-C_p: 16.05



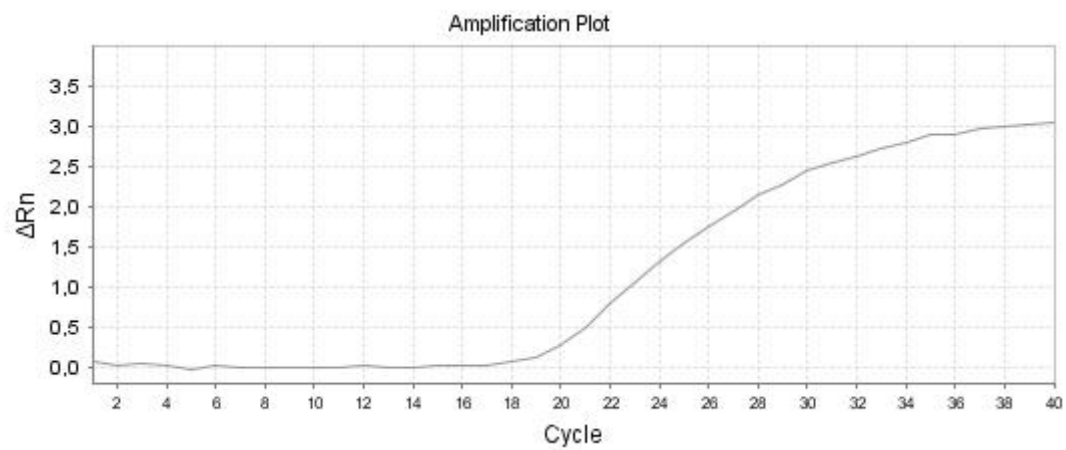
A2-C_p: 17.17



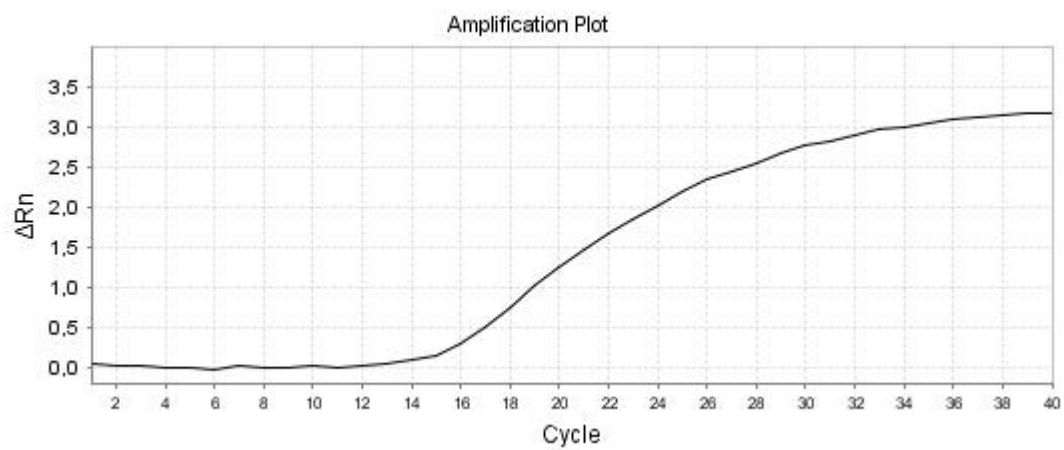
B1-C_p: 14.19



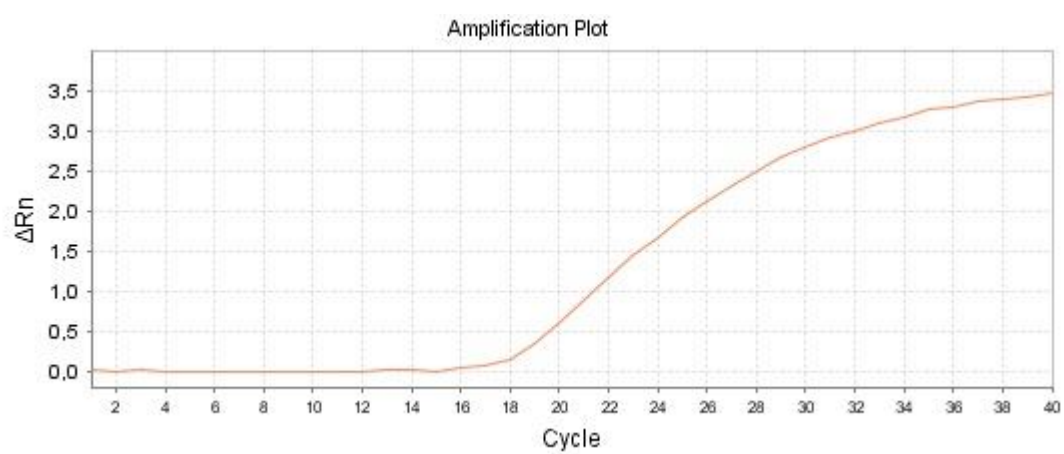
By1/4-C_p: 14.76



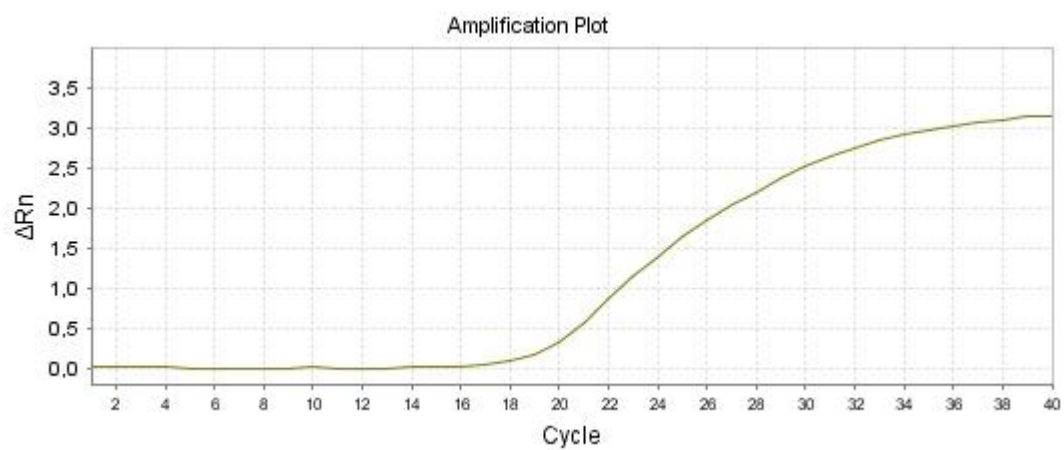
Çd1/1-C_p: 16.01



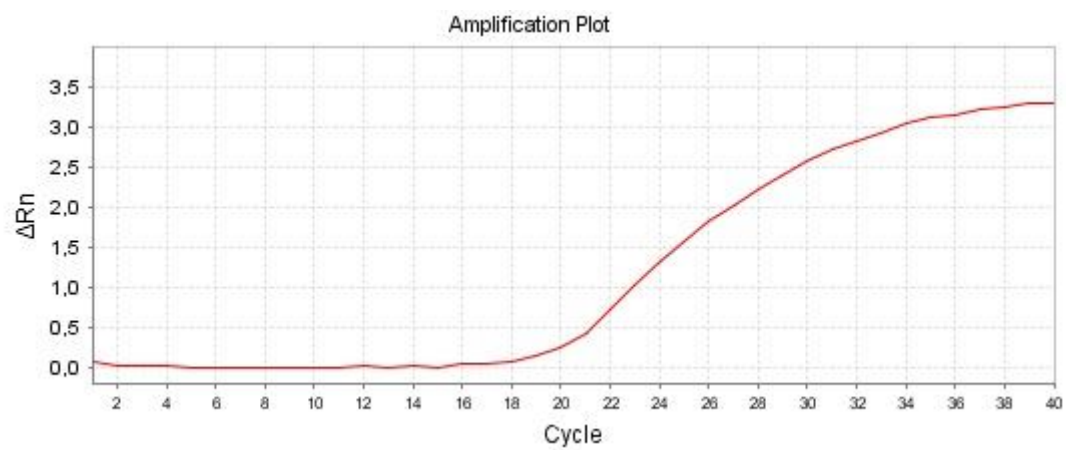
Tb6/4-C_p: 11.91



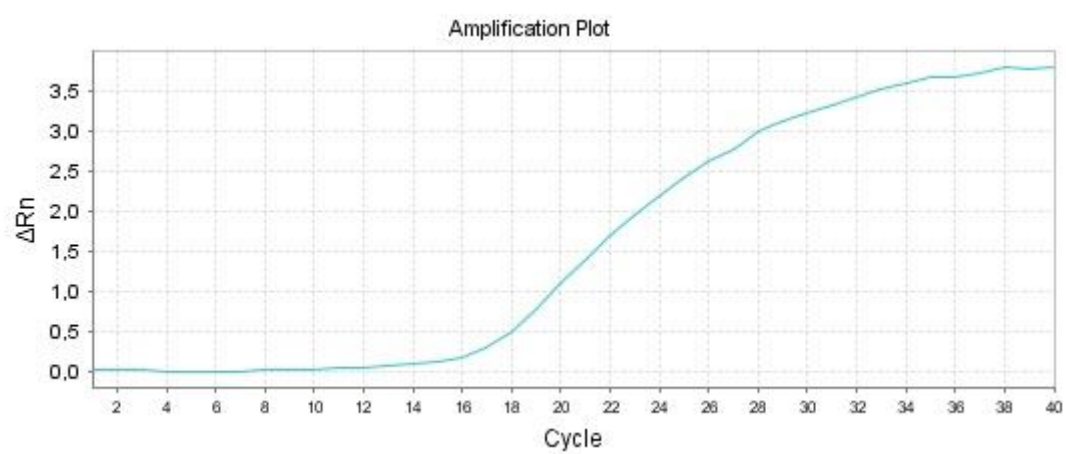
Hp2-C_p: 15.36



Wz3-C_p: 15.52

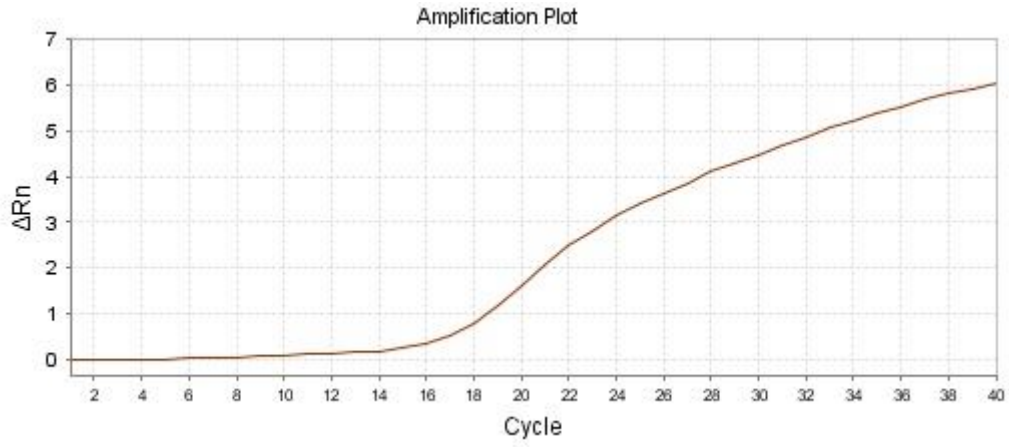


Iz1-C_p: 15.00

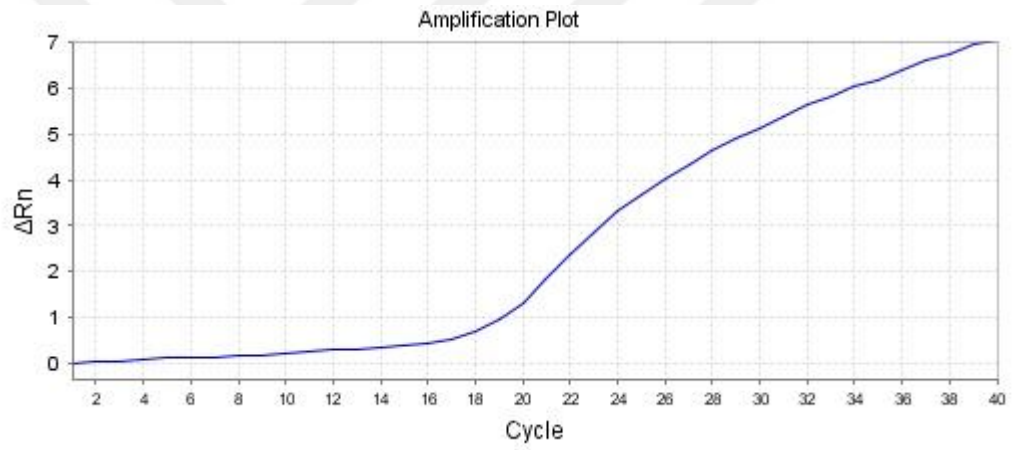


Pl hfz-C_p: 9.20

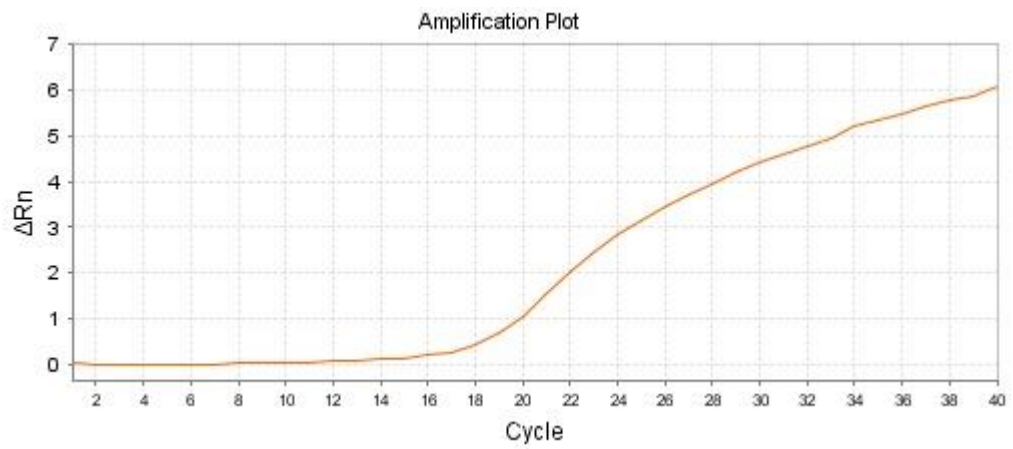
EK 2 – Tanımlanan *Lactobacillus brevis* suşlarının Gerçek-Zamanlı PZR Görüntüleri



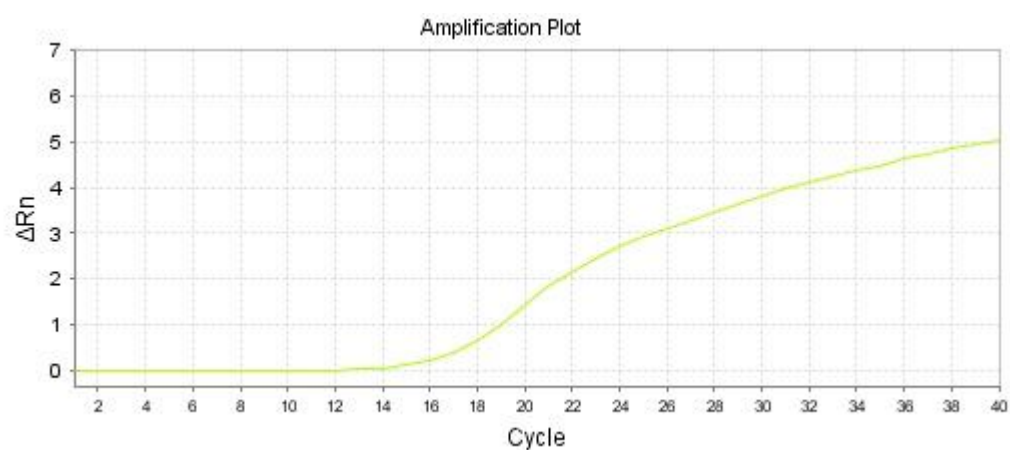
A1-C_p: 16.51



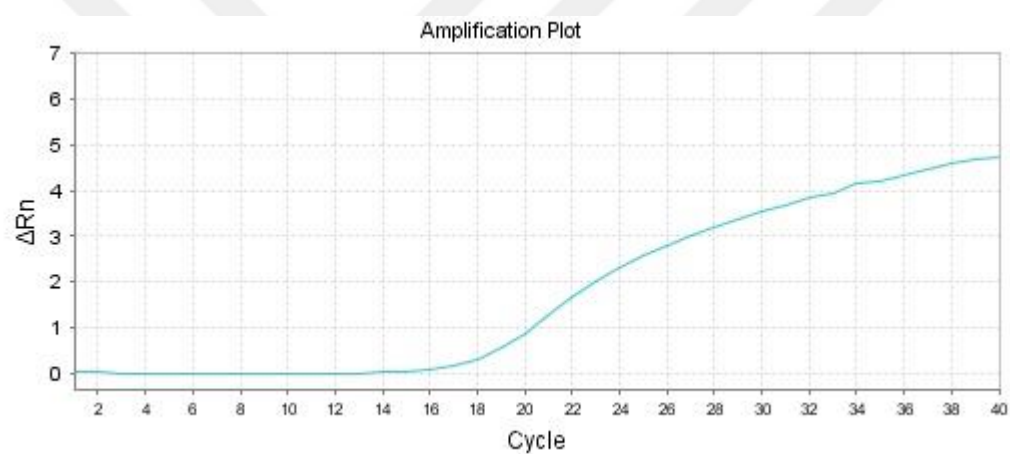
Çd1-C_p: 15.79



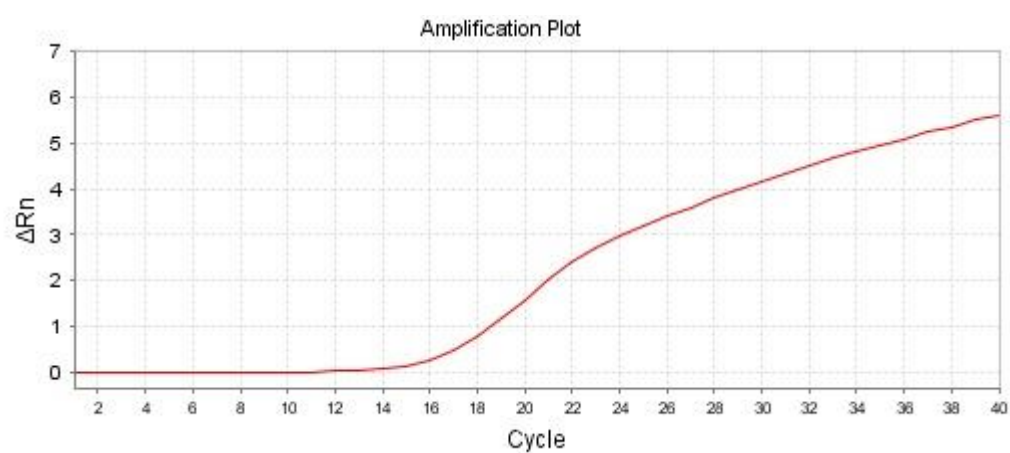
By1/3-C_p: 17.89



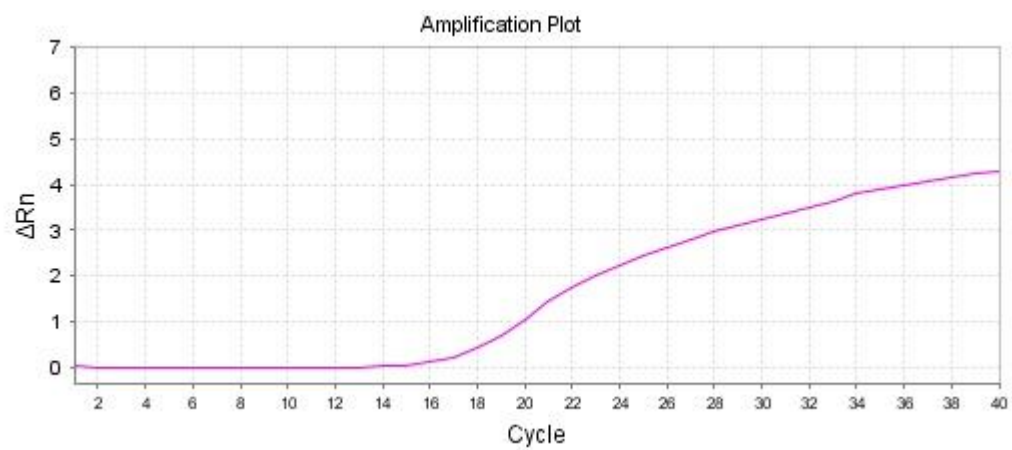
Çd1/5-C_p: 17.18



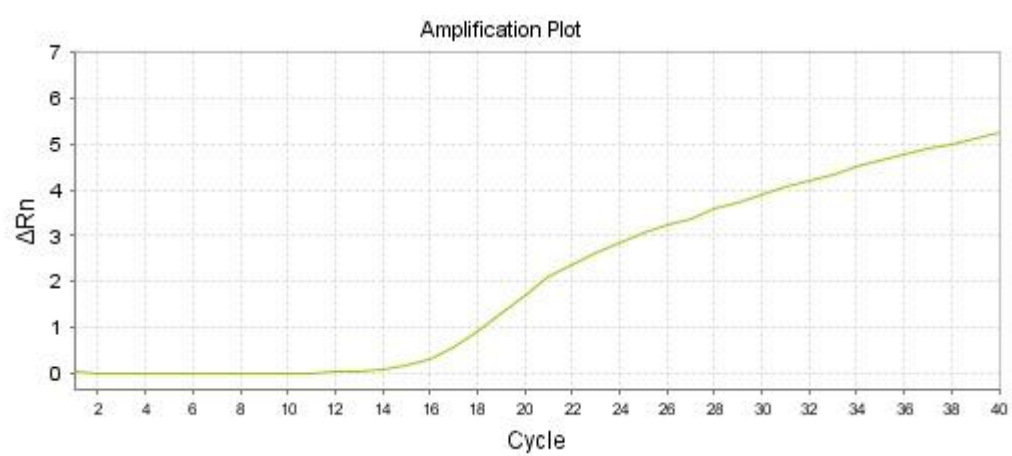
S1/3-C_p: 18.49



S2/9-C_p: 16.84



Gc3-C_p: 17.95



Çn3-C_p: 16.51

EK 3 – Tezden Türetilmiş Bildiriler

- Özdemir, G., Aytaç, S.A., Sivri Özay, D., Yazıhan, N., Ekşi hamur, Türkiye 12. Gıda Kongresi, 5-7 Ekim (503), Edirne, 2016.
- Özdemir, G., Aytaç, S.A., Sivri Özay, D., Yazıhan, N., Mumcuoğlu, İ., Farklı yörelerden temin edilen ekşi hamurlardan laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlaması, Türkiye 12. Gıda Kongresi, 5-7 Ekim (504), Edirne, 2016.





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 30/12/2019

Tez Başlığı / Konusu: Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması ile Bazı Probiyotik Özelliklerinin Saptanması

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 84 sayfalık kısmına ilişkin, 30/12/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar dâhil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

30/12/2019

Adı Soyadı: Gizem KEZER
Öğrenci No: N13148413
Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği
Programı: Gıda Mühendisliği-Doktora
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gizem KEZER
Doğum yeri : İzmir
Doğum tarihi : 26/11/1987
Medeni hali : Bekar
Yazışma adresi : Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü
Telefon : 0 (386) 280 48 40
Elektronik posta adresi : kezergizem@gmail.com
Yabancı dili : İngilizce (77.5/YÖKDİL)

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi (2005-2009)
Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2009-2013)
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda
Mühendisliği Anabilim Dalı (2013-2019)

İŞ TECRÜBESİ

03/09/2009 – 30/11/2011 : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Pilot Süt
İşleme Tesisi (Gıda mühendisi)
12/12/2011 - Halen : Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi)

