



Ekşi Hamur Fermentasyonu ile Üretilmiş Kek Hamurunun Laktik Asit Bakterileri Çeşitliliği

Merve Kahraman^{1,2*}, Muhammet Arıcı²

¹Şölen Çikolata Gıda San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-3699-4524)

² Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya - Metalürji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0003-4126-200X)

(İlk Geliş Tarihi 15 Mart 2020 ve Kabul Tarihi 23 Mayıs 2020)

(DOI: 10.31590/ejosat.732009)

ATIF/REFERENCE: Kahraman, M., & Arıcı, M. (2020). Ekşi Hamur Fermentasyonu ile Üretilmiş Kek Hamurunun Laktik Asit Bakterileri Çeşitliliği. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19), 32-42.

Öz

Bu çalışmada Tip I ekşi hamur ile üretilmiş kek hamurunun laktik asit bakteri (LAB) çeşitliliği belirlenmiş ve izole edilen LAB türlerinin teknolojik özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla, 1:1 oranında un ve su karıştırılarak 25-27 °C' de, %80-90 bağıl nemde 24 saat fermentasyona bırakılmıştır. Ekşi hamurun sahip olduğu özellikleri elde edebilmek için fermente hamur tekrar beslenerek fermentasyona bırakılmıştır. %10, %15 ve %20 oranlarında tip I ekşi hamur içeren 3 farklı kek formülasyonu oluşturulmuştur. Tip I ekşi hamur ve formülasyonda yer alan diğer bileşenler karıştırılarak elde edilen hamurlar 30-35°C' de, %80-90 bağıl nemde 4-6 saat fermentasyona bırakılmıştır. Elde edilen kek hamurlarından 18 laktik asit bakterisi türü izole edilmiştir. 16S Ribozomal RNA (rRNA) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR-PCR) ile tür tanımlaması yapılmış ve *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Lactobacillus* cinslerine ait türler tanımlanmıştır. Tanımlanan LAB türlerinin asit üretim yeteneği, farklı pH değerlerinde gelişme, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme ve *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir. İzole edilen LAB türlerinin 24 saat sonunda 0,459-1,089 g/100 mL; 48 saat sonunda 0,585-1,890 g/100 mL laktik asit ürettiği belirlenmiştir. Farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri incelenen LAB izolatlarının pH 2'de zayıf gelişme gösterdiği ve *Pediococcus* cinsi örneklerden bazılarının gelişme göstermediği; pH 9,6'da bir tane *Pediococcus* cinsi bakteri hariç diğer LAB türlerinin iyi gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. LAB izolatları %9 tuz konsantrasyonunda en zayıf gelişmeyi gösterirken; %6 tuz konsantrasyonunda en iyi gelişmeyi *Pediococcus* cinsi örnekler göstermiştir. LAB izolatları en çok *Salmonella* Typhimurium'a karşı antibakteriyel etki göstermiştir. En büyük zon çapı 9 mm ile *Salmonella* Typhimurium'a karşı oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ekşi hamur, kek, laktik asit bakterileri

Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Cake Dough Produced by Sourdough Fermentation

Abstract

In this study, the lactic acid bacteria (LAB) variety of cake dough produced with Type I sourdough was determined and the technological properties of the isolated LAB species were investigated. For this purpose, flour and water were mixed in a 1: 1 ratio and fermented at 25-27°C with 80-90% relative humidity for 24 hours. In order to obtain the properties of sourdough, the dough was fed again and left for fermentation. Three different cake formulations were prepared, containing 10%, 15% and 20% of type I sourdough. The dough obtained by mixing type I sourdough and the other ingredients in the formulation were left to fermentation at 30-35°C, 80-90% relative humidity for 4-6 hours. 18 lactic acid bacteria types are isolated from the cake doughs. Species identification was made with 16S Ribosomal RNA (rRNA) Polymerase Chain Reaction (PCR) and *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bacillus* and *Lactobacillus* strains were identified. Acid production ability of LAB species, development at different pH values, development at different salt concentrations and antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* were determined. It was determined that the isolated LAB species produced 0.459-1.089 g/100 mL and

* Sorumlu Yazar: Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya -Metalürji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye, ORCID: 0000-0002-3699-4524, merve.kahraman@solen.com.tr

0.585-1.890 g/100 mL lactic acid after 48 hours. It was determined that LAB isolates, whose growth abilities at different pH values were examined, grew poorly at pH 2 and some of the *Pediococcus* species did not grow. It was determined that other LAB species showed good growth except for one *Pediococcus* isolate at pH 9.6. LAB isolates showed the least growth at 9% salt concentration. Samples of the genus *Pediococcus* showed the best growth at a 6% salt concentration. The greatest antibacterial activity of the LAB isolates were determined to be on *Salmonella* Typhimurium. The largest zone diameter of 9 mm was created against *Salmonella* Typhimurium.

Keywords: Sourdough, cake, lactic acid bacteria

1. Giriş

Ekşi hamur; bünyesinde laktik asit bakterileri ve mayaları bulunduran hamur kütlesi olarak tanımlanmaktadır. İçerdiği LAB ve maya sayısı sırası ile 6- 9 log kob / g ve 5- 8 log kob / g arasında değişiklik gösteren ekşi hamurun pH'sı yaklaşık 4 civarındadır (Minervini ve ark., 2013). M.Ö. 1800'lü yıllarda eski Mısır'da, hamurun kendi haline bırakılması ile tesadüfen bulunduğu düşünülmektedir. Çeşitli aşamalardan geçerek ekşi hamur yöntemi olarak günümüze kadar gelmiştir ve mayalama yöntemi olarak kullanılmaktadır (Elgün ve Ertugay, 2002; Çağlıyan, 2008).

Ekşi hamur elde edilme yöntemlerine göre Tip I, Tip II ve Tip III olarak sınıflandırılır. Tip I ekşi hamur geleneksel yöntemlerle üretilen ve günlük besleme gerektiren hamur tipidir. Belli oranlarda un ve suyun kontrollü koşullarda fermentasyona bırakılması ile elde edilir. Fermentasyon genellikle 20-30°C (oda sıcaklığı) aralığında gerçekleşir (Chavan ve Chavan, 2011; Meroth ve ark., 2003; Garofalo ve ark., 2008; Bocker ve ark., 1995). Tip II ve Tip III ekşi hamurlarda ise fermentasyonu başlatmak için adapte olmuş suşların bulunduğu kültürler kullanılır. Bu tip ekşi hamurlar çeşitli LAB ve mayaların un ve su karışımına eklenmesi ve kontrollü koşullarda fermentasyona bırakılması ile elde edilmektedir. Tip II ekşi hamur sıvı formdadır ve endüstriyel üretimlerde kullanımı daha kolay olduğu ve standart ürün üretimi sağlanabildiği için tercih edilmektedir. Tip III ekşi hamur ise ekşitilmiş hamurun kurutulması ile hazırlanmaktadır. Bu ekşi hamur tipi fırıncılık ürünlerinde aroma verici ve asitlendirici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca Tip I ekşi hamurdan farklı olarak Tip II ve Tip III ekşi hamura kabartma ajanı olarak *Saccharomyces cerevisiae* ilave edilmesi gerekmektedir (Decock ve Cappelle, 2005; De Vuyst ve Neysens, 2005; Kitahara ve ark., 2005; Corsetti ve Settanni, 2007).

Unlu mamüller sektöründe önemli bir yere sahip olan ekşi hamur, fırıncılık teknolojisinde ekmek, tatlı fırıncılık ürünleri, kraker, atıştırılabilir ürünler, pizza gibi ürünlerin üretilmesinde endüstriyel mayalara alternatif olarak kullanılmaktadır (Hansen ve Schieberle, 2005). Buğday unundan elde edilen ekşi hamur; 200'den fazla, farklı ekşi ekmek türü (INSOR, 2000) dahil olmak üzere İtalyan fırıncılık ürünlerinin %30'undan fazlasında kullanılır (Ottogalli ve ark., 1996). Ekmek üretimi haricinde, Tip I ekşi hamur kullanılarak geleneksel yöntemlerle pişirilmiş ve genellikle dini bayramlarda tüketilen bazı tatlı fırıncılık ürünlerinin de olduğu görülmüştür (Foschino ve ark. 1999; Vernocchi ve ark. 2004). Bu ürünlerin çoğu bölgeseldir; fakat Panettone, Pandoro ve Colomba gibi çeşitleri ulusal statü kazanmıştır. Endüstriyel tesislerde üretilerek İtalya başta olmak üzere dünyanın pek çok yerine dağılmışlardır. Kökeni Milano'ya uzanan Panettone, ekşi hamur ile hazırlanan kek hamuruna meyve şekerlemesi ve kuru üzüm ilavesi ile hazırlanır. 19. Yüzyılda popüleritesi artarak Kuzey İtalya'ya, daha sonra göçmenler ile Kuzey ve Güney Amerika'ya taşınmıştır. Noel zamanı bu ülkelerde, Panettone pişirmek veya hazır olarak satılan keklerden alarak aileleri ile tüketmek bir gelenek haline gelmiştir. Zamanla çikolata parçaları, kakaolu, krema dolgululu çeşitleri üretilmiştir. Veronese tatlısı olarak bilinen Pandoro, Panettone'ye benzer şekilde fakat daha zengin tereyağı ve yumurta kullanılarak üretilmektedir. İçerdiği yüksek miktarda yumurtadan dolayı "altın ekmek" olarak da isimlendirilmektedir. Panettone ile arasındaki bir diğer fark ise hamur hazırlanırken kuru meyve ve şekerleme ilave edilmemesi, sade şekilde pişirilmesidir. Kekler 8 köşeli yıldız şeklinde kek kalıbında pişirilir ve bu kekin kendine has özelliğini oluşturmaktadır. Bu iki ünlü İtalyan Noel tatlısına benzeyen Colomba, İtalya'nın geleneksel Paskalya kekidir. "Colomba" İtalyancada güvercin anlamına gelmektedir ve kek pişirilirken güvercin şeklinde kek kalıpları kullanılır. Panettone'ye benzer şekilde kek hamuru un, yumurta, şeker, ekşi hamur ve tereyağı kullanılarak yapılır. Panettone'nin aksine meyve kabuğu şekerlemesi ve kuru üzüm kullanılmaz. Hazırlanan hamurlara güvercin şekli verilir ve pişirilmeden önce üzerlerine inci şekeri ve badem koyulur (Garofalo ve ark., 2008).

Dünya'da, özellikle İtalya'da, yüzlerce farklı türde geleneksel ekşi hamur mevcuttur. Kullanılan unun türü, orijini ve saklama koşulları, diğer malzemelerin mikrobiyotası, hijyen koşulları, uygulanan teknoloji ve fermentasyon işlemlerinde farklılıklar gözlenir. Bu farklılıklar sonucunda ekşi hamur, metabolik olarak aktif olan, un ve su eklenmesi ile yeniden etkinleştirilebilen çeşitli LAB türleri ve mayalar için önemli bir kaynaktır (De Vuyst ve Vancannet, 2007; Katina, 2005). Fermente gıda uygulamalarının çoğunda laktik asit bakterilerinin homofermentatif türleri kullanılmasına rağmen ekşi hamur fermentasyonunda heterofermentatif LAB türleri etkin role sahiptir. Homofermentatif laktik asit bakterileri glikoliz (homolaktik fermentasyon) ile glukozdan başlayarak laktik asit üretirken, heterofermentatif laktik asit bakterileri laktik asitin yanında CO₂, asetik asit ve/veya etanol üretir (Corsetti ve Settanni, 2007). Zorunlu ve fakültatif heterofermentatif ve zorunlu homofermentatif türlerden oluşan ekşi hamur laktobasilleri tip I, tip II, tip III ekşi hamurlar ve tip 0 hamur ile ilişkilidir. Spontan şekilde gelişen Tip I ekşi hamurun mikrobiyotası başta kullanılan hammaddeler olmak üzere hijyenik koşullar, ortam ve depolama sıcaklığı, pH, fermentasyon süresi gibi parametrelere göre değişiklik göstermektedir. Ticari starter kültürlerin kullanıldığı Tip II ve Tip III ekşi hamurlarda ise starter kültürler baskın mikrobiyotayı oluşturmaktadır. Spontan şekilde gelişmeler mikrobiyota hakimiyeti göstermez (Katina, 2005; Liang ve ark., 2016; Stolz, 2003) Fermentasyonu ekmek mayası ile sağlanan tip 0 hamur ekşi hamur teknolojisi ile üretilmemektedir (Corsetti ve Settanni, 2007). Şimdiye kadar yapılan araştırmalarla, ekşi hamurdan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin 50'ye yakın farklı türü tespit edilmiştir. *Leuconostoc* (genellikle *Leuconostoc mesenteroides*), *Weissella*, *Pediococcus* (genellikle *Pediococcus pentosaceus*), *Lactococcus*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* cinslerine ait türler ekşi hamurdan izole edilse de en sık gözlenen bakteriler *Lactobacillus* suşlarıdır. *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lb. brevis*, *Lb. pontis*, *Lb. plantarum* ve *Lb. reuteri* ekşi hamurlardan en sık izole edilen laktobasillerdir (De Vuyst ve Neysens, 2005; Corsetti ve Settanni, 2007).

Yöresel ekşi hamurların sahip olduğu mikrobiyotaların belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Gobbetti (1998), İtalyada yetişen buğdaylardan elde edilen ekşi hamurda *Lb. sanfranciscensis* / *Lb. plantarum* birliğinin var olduğunu bildirmiştir. Rusya'da elde edilen ekşi hamurlar incelendiğinde genellikle *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum*'un *Lb. fermentum* ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Kazanskaya ve ark.,1983). *Lactobacillus zymae* hem Belçika hem de Yunan ekşi hamurundan izole edilmiştir. Coğrafi yayılım gösterdiği gözlenmesine rağmen suş sayısı her durumda tek bir izolatla sınırlandırılmıştır (De Vuyst ve ark. 2002; Vancanneyt ve ark., 2005). Türkiye'nin Doğu Karadeniz bölgesinden geleneksel Türk ekşi hamurlarına yapılan analizler sonucunda toplam 249 Laktik Asit Bakteri (LAB) izolatu bulunmuştur. Bu izolatların genotipik karakterizasyonu, 11 farklı türe ait 47 ayrı LAB suşunun varlığını ortaya çıkarmıştır: *Lb. plantarum*, *Lb. paraplanctarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. rossiae*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. brevis*, *Lb. paralimentarius*, *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leu. pseudomesenteroides* ve *Weissella cibaria*. Ekşi hamur LAB mikrobiyotasının, örnek kökenine, toplama periyoduna ve heterofermentatif LAB baskınlığına bağlı olarak farklılık gösterdiği gözlenmiştir (Dertli ve ark., 2016).

Geleneksel tatlı fırıncılık ürünlerini hazırlamak için kullanılan ekşi hamurlarda gelişen mikrobiyota, kültüre bağlı teknikler kullanılarak araştırılmıştır. Galli ve Ottogalli (1973), Panettone'de yaptığı inceleme ile *Lb. brevis* ve *Torulopsis holmii* izolatlarını tanımlayarak ilk mikrobik karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Ayrıca, Galli ve ark. (1988) Panettone ve tatlı çörek için kullanılan ekşi hamurlardan, *Starmarella bombicola* ve *Saccharomyces exiguus*'a ek olarak *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. brevis* ve *Leu. mesenteroides*'i izole etmişlerdir.

Bu çalışmada, Tip I ekşi hamur ile üretilmiş kek hamurundaki LAB çeşitliliği incelenmiş ve bu LAB türlerinin asit üretim yetenekleri ve hızları, farklı pH değerlerinde gelişme ve farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri ile antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir.

2. Materyal ve Metot

Yapılan çalışmada ürün formülasyonlarında un, su, yumurta, süt, şeker, fruktoz şurubu, yağlar, kabartıcı, aroma verici, tuz ve kuru meyve çeşitleri kullanılmış ve bu hammaddeler Şölen Çikolata Gıda San. ve Tic. A.Ş. tarafından sağlanmıştır.

2.1. Ekşi Hamur Fermentasyonu ile Kek Hamuru Üretimi

Ekşi hamur fermentasyonu ile üretilmiş kek hamurunda kullanılan Tip I ekşi hamur eldesi için 1:1 oranında un ve su karıştırılarak fermentasyon kabiniinde (Wiesheu GmbH, Almanya) 25-27°C'de, %80-90 bağıl nemde 24 saat fermentasyona bırakılmıştır. Ekşi hamurun sahip olduğu özellikleri elde edebilmek için fermentasyon sonunda elde edilen hamur; 1:1 oranında un ve su ile tekrar beslenmiş ve aynı koşullarda 24 saat fermentasyona bırakılmıştır.

Ekşi hamur fermentasyonu ile üretilmiş kek hamurlarının elde edilmesi için farklı oranlarda (%10, %15, %20) tip I ekşi hamur içeren 3 farklı kek formülasyonu oluşturulmuştur. Ekşi hamur ve formülasyonda yer alan diğer bileşenler karıştırılarak elde edilen hamurlar fermentasyon kabiniinde 30-35°C' de, %80-90 bağıl nemde 4-6 saat fermentasyona bırakılmıştır.

2.2. Laktik Asit Bakterisi (LAB) İzolasyonu

Fermentasyon sonunda farklı oranlarda (%10, %15, %20) ekşi hamur içeren kek hamurlarından laktik asit bakterilerinin izolasyonu için 10⁷ ar gram örnek tartılmış ve üzerlerine 90 mL steril peptonlu su ilave edilen örnekler homojenize edilmiştir. Bu şekilde 10⁻¹'lik dilüsyonlar elde edilmiş ve 10⁻⁸'e kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan MRS (Merck, Almanya) agara yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve besiyerleri 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen LAB'dan 18 tane farklı koloni seçilmiş ve tek koloniye düşürme yöntemi ile MRS (Merck, Almanya) agara ekim yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2.3. LAB Türlerinin Tanımlanması

DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için Fenol-Kloroform Ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen laktik asit bakterileri tek koloniye düşürme yöntemi kullanılarak MRS (Merck, Almanya) agara ekilmiş ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılarak aktifleştirilmiştir. Aktif bakterilerden tek koloni alınarak 1 mL MRS (Merck) broth içeren mikrosantrifüj tüpüne ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme sonrası mikrosantrifüj tüpleri 10 dakika 8000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırılarak elde edilen peletlere 450 µL TE (Tris-EDTA) tamponundan ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışımlara %10'luk 50 µL SDS (sodyum dodesil sülfat) ve 2,5 µL proteinaz K ilave edilmiştir. Elde edilen karışımlar iyice karıştırılmış ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışımlara fenol-kloroform karışımından 0,5 mL ilave edilmiş, aşağı ve yukarı yönlü çevrilerek iyice karışımları sağlanmış ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Bekletilen karışımlar 4°C'de 10 dakika 8000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel ve şeffaf kısım pipet ucu ile toplanmış ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. İşlem fenol-kloroform karışımı ile bir kez daha tekrarlanmış ve süpernatantlar toplanarak yeni mikrosantrifüj tüplerine alınmış, 5M Sodyum Asetat'dan 50 µL içeriğe ilave edilmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. İzopropanoldan 1 mL ilave edilerek çöken DNA'nın beyaz iplikleri görünene kadar aşağı ve yukarı yönlü çevrilerek hafifçe karıştırılmıştır. İçerik 10 dakika 5000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası süpernatant kısım uzaklaştırılarak 0,5 mL %70'lik etanol ilave edildikten sonra 10 dakika 5000 rpm hızda santrifüj edilen karışım 37°C'de 5-10 dk kurutulmuş ve 100 µL ultra saf su ilave edilerek karıştırılmıştır.

İzole edilen LAB türlerinin tanımlanması için 16S Ribozomal RNA (rRNA) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR-PCR) kurulmuştur. Primer olarak AMP-F ve AMP-R seçilmiştir. 18 DNA örneği için de Tablo 1a'da belirtilen bileşenler, belirlenen e-ISSN: 2148-2683

miktarlarda kullanılarak 25 µL'lik karışımlar elde edilmiştir. Elde edilen karışımlara belirtilen parametrelerde (Tablo 1b) termal döngü programı uygulanmıştır. DNA'lara agaroz jel elektroforez yöntemi uygulamak için 0,5 X TBE (Tris-Borat-EDTA) kullanılarak %1'lik agaroz jel hazırlanmış ve TBE (Tris-Borat-EDTA) dolu tanka yerleştirilmiştir. Jelde bulunan kuyucuklara 1 µL bromfenol mavisi ile boyanmış 4 µL DNA örneği koyulmuştur. Boş kalan kuyulara pozitif, negatif ve markır koyulduktan sonra yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi sonrasında jel etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmiştir. Alınan bant görüntüsü ve DNA örnekleri; sekans analizi için dış laboratuvara (Medsantek, İstanbul, Türkiye) gönderilmiştir. Filogenetik ağaç, PAUP sürüm 4.0 beta 10 kullanılarak 2000 önyükleme kopyaları ile komşu birleştirme mesafe yöntemi (neighbor-joining distance method) kullanılarak kümelendirilmiştir.

Tablo 1a. PZR karışımları

PZR Bileşenleri*	Miktar
Buffer	2,5 µL
dNTPs	2 µL
Primer 1	0,5 µL
Primer 2	0,5 µL
Taq polimeraz	0,0625 µL
DNA	0,5 µL
Ultra Saf Su	18,9375 µL
TOPLAM	25 µL

*Vivantis, Malezya

Tablo 1b. PZR parametreleri

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95°C	2 dk.
2	25	95°C	30 sn
		55°C	20 sn
		72°C	30 sn
3	1	72°C	5 dk.

2.4. LAB İzolatlarının Asit Üretim Yeteneklerinin ve Hızlarının Belirlenmesi

Tip I ekşi hamur fermentasyonu ile üretilmiş kek hamurlarından izole edilen LAB türleri MRS (Merck) sıvı besiyerinde 37°C'de 48 saat aktifleştirilmiş, 10 mL steril MRS sıvı besiyerine aktif kültürlerden %1 oranında 2 paralelli olarak aşılama yapılmış ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24. ve 48. saatinde, 0,01 N NaOH (Merck) çözeltisi ve %1'lik fenolftalein indikatörü kullanılarak titrasyon asitliği tayini ile oluşan asit miktarı belirlenmiştir. Titrasyon asitliği aşağıdaki formül kullanılarak % laktik asit cinsinden hesaplanmıştır (Bulut, 2003).

$$\% \text{Asitlik} = [(V_x F_x E)/m] \times 100$$

V: Titrasyonda harcanan NaOH miktarı (mL)

F: Titrasyonda kullanılan bazın normalitesi

E: 1 mL NaOH'ın eşdeğeri asit miktarı (g)

Laktik asit için E: 0,09 g

m: Örnek miktarı (mL)

2.5. LAB İzolatlarının Farklı pH Değerlerinde Gelişme Yeteneklerinin Belirlenmesi

Tip I ekşi hamur fermentasyonu ile üretilmiş kek hamurlarından izole edilen LAB türleri MRS (Merck) sıvı besiyerinde 37°C'de 48 saat aktifleştirilmiştir. 2N NaOH (Merck) ve 2N HCl (Merck) kullanılarak pH değerleri 2, 4 ve 9,6 olarak ayarlanan 5 mL'lik MRS sıvı besiyerlerine aktif kültürlerden %1 oranında 2 paralelli olarak ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme miktarını belirlemek için yayma yöntemi kullanılarak MRS (Merck) agara ekim yapılmış; 37°C'de 48 saat inkübasyon sonunda gelişen koloni sayıları sayılmıştır.

2.6. LAB İzolatlarının Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Yeteneklerinin Belirlenmesi

Tip I ekşi hamur fermentasyonu ile üretilmiş kek hamurlarından izole edilen LAB türleri MRS (Merck) sıvı besiyerinde 37°C'de 48 saat aktifleştirilmiştir. NaCl eklenerek hazırlanan %0, %3, %6, %9 tuz konsantrasyonlarına sahip 5 mL'lik MRS sıvı besiyerlerine aktif kültürlerden %1 oranında 2 paralelli ekim yapılmış ve 37°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme miktarını belirlemek için yayma yöntemi kullanılarak MRS (Merck) agara ekim yapılmış; 37°C'de 48 saat inkübasyon sonunda gelişen koloni sayıları sayılmıştır.

2.7. Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi için agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

İndikatör mikroorganizma olarak seçilen *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 0402, *Bacillus cereus* RSKK 963, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tek koloniye düşürme yöntemi ile Nutrient Agar (Merck) besiyerinde 37°C'de 24 saat aktifleştirilmiştir. Aktifleşen kültürlerden tek koloni alınarak 5 mL'lik Nutrient Broth (Merck) bulunan tüplere ekim yapılmış ve 37°C'de 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İzole edilen laktik asit bakteri türleri 37°C'de 48 saat aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden

tek koloni alınarak 1 mL'lik MRS (Merck) broth içeren ependorflara ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ependorflar santrifüj edilmiştir. İndikatör mikroorganizmaların geliştiği tüpler vortekslenmiş, kontrol ve örnekler için bölümlere ayrılmış Nutrient Agar besiyeri içeren petrilere yayma yöntemi kullanılarak ekim yapılmıştır. Belirlenen bölümlere 4 milimetrelük kuyular açılmıştır. Kontrol olarak belirlenen kuyulara 10 µL steril saf su, örnekler için hazırlanan kuyulara elde edilen süpernatantlardan 10 µL eklenmiştir. Petrilere 37°C'de 48 saat gelişmeye bırakılmıştır. Gelişme sonrası kuyuların çevresinde oluşan berrak zon çapı ölçülmüştür.

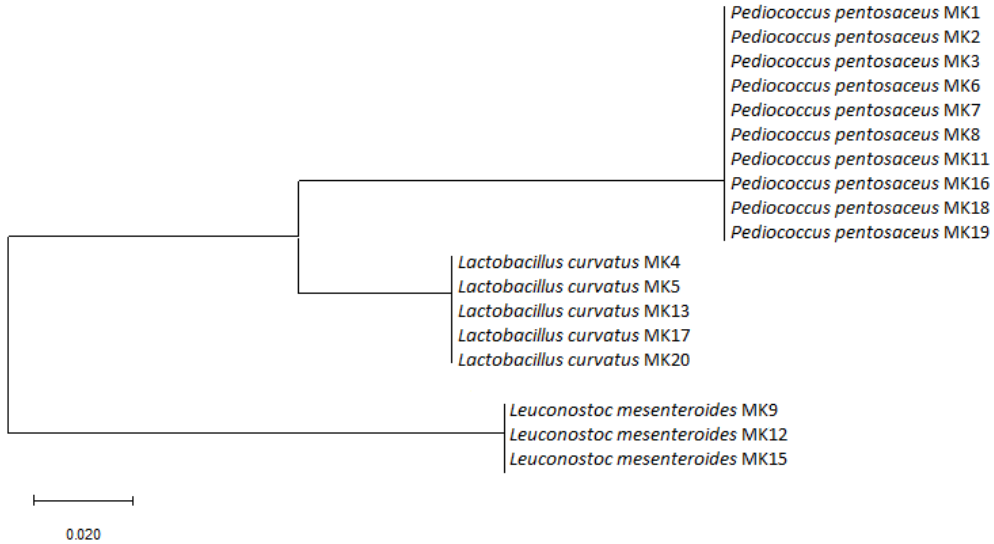
2.8. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin analizi ve değerlendirilmesi için JMP 6.0 programı kullanılmıştır. Veriler ortalama±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Değerlendirilen parametrelere iki yönlü varyans analizi yapılmış ve örnekler arasındaki farklılıklar $\alpha=0,05$ önem düzeyinde LS Means Student's t testi kullanılarak harflendirilmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Bakteri Türlerinin Tanımlanması

Sekans analizi sonucunda 10 adet *Pediococcus pentosaceus* (MK1, MK2, MK3, MK6, MK7, MK8, MK11, MK16, MK18, MK19), 5 adet *Lactobacillus curvatus* (MK4, MK5, MK13, MK17, MK20) ve 3 adet *Leuconostoc mesenteroides* (MK9, MK12, MK15) tanımlanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Filogenetik ağaç

3.2. LAB İzolatlarının Asit Üretim Yetenekleri ve Hızları

İzole edilen LAB türlerinin asit üretim miktarları 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda laktik asit cinsinden hesaplanmıştır (Tablo 2). 24 saat sonunda *Lactobacillus curvatus* (MK4) izolatının en az asit üretim miktarına sahip olduğu gözlenirken ($0,459\pm0,01$ g/100 mL), *Pediococcus pentosaceus* (MK16) izolatının en fazla asit üretim miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir ($1,089\pm0,01$ g/100 mL). 48 saat sonunda yapılan analiz sonucunda *Lactobacillus curvatus* (MK4) izolatının en az asit üretim miktarına sahip olduğu tespit edilirken ($0,585\pm0,05$ g/100 mL), *Lactobacillus curvatus* (MK5) izolatının en fazla asit üretim miktarına sahip olduğu gözlenmiştir ($1,809\pm0,03$ g/100 mL).

Tablo 2. Tip I ekşi hamur fermentasyonu ile üretilmiş kek hamurlarından izole edilen LAB türlerinin asit üretimi (g/100 mL)

LAB Örnekleri	24. saat	48. saat
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK1	0,756±0,05 ^{EFa}	0,810±0,02 ^{Ga}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK2	0,666±0,00 ^{GHa}	0,792±0,04 ^{Ga}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK3	0,612±0,00 ^{Hb}	0,720±0,02 ^{GHa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK4	0,459±0,01 ^{Ja}	0,585±0,05 ^{Ha}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK5	0,702±0,02 ^{FGb}	1,809±0,03 ^{Aa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK6	0,711±0,01 ^{EFGb}	0,846±0,00 ^{Ga}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK7	0,666±0,02 ^{GHa}	1,584±0,22 ^{Ba}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK8	0,774±0,02 ^{Eb}	1,260±0,02 ^{CDa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK9	1,026±0,02 ^{ABCa}	1,233±0,05 ^{CDa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK11	0,999±0,05 ^{BCb}	1,242±0,00 ^{CDa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK12	1,062±0,02 ^{ABa}	1,296±0,02 ^{Cb}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK13	0,864±0,02 ^{Db}	1,026±0,02 ^{EFa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK15	0,702±0,02 ^{FGb}	0,864±0,00 ^{FGa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK16	1,089±0,01 ^{Ab}	1,323±0,03 ^{Ca}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK17	0,549±0,01 ^{lb}	1,125±0,01 ^{DEa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK18	0,963±0,01 ^{Cb}	1,341±0,03 ^{Ca}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK19	1,044±0,02 ^{ABb}	1,296±0,00 ^{Ca}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK20	1,044±0,02 ^{ABb}	1,287±0,03 ^{CDa}

Farklı büyük harfler aynı saatte LAB türleri arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Farklı küçük harfler aynı LAB türlerinde farklı saatler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

Arslankoz (2011) tarafından turşulardan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* türlerinin 24 saat inkübasyon sonunda 0,06-0,44 g/100 mL ürettiği bildirilmiştir. Bulut (2003) tarafından peynirlerden izole edilen *Lactobacillus* türlerinin 0,6247 g/100 mL laktik asit ürettiği belirtilmiştir. Herreros ve ark. (2003) tarafından İspanyol keçi peynirinden izole edilen *Leu. mesenteroides* türlerinin 24 saat sonunda 0,22-0,26 g/100 mL, *Lb. plantarum* türlerinin 24 saat sonunda 0,19-0,21 g/100 mL, *Lb. brevis* türlerinin 24 saat sonunda 0,19-0,23 g/100 mL, *L. casei* türleri tarafından 24 saat sonunda 0,18-0,22 g/100 mL laktik asit ürettiği belirtilmiştir.

Yapılan bu çalışmada 24 saat inkübasyon sonunda *Lactobacillus* türlerinin 1,044-0,459 g/100 mL laktik asit ürettiği belirlenmiş ve Bulut (2003)'ün sonucunun elde edilen sonuçlar aralığında olduğu gözlenmiştir. *Pediococcus pentosaceus* (MK1, MK2, MK3, MK6, MK7, MK8, MK11, MK16, MK18, MK19) izolatlarının 0,612-1,089 g/100 mL asit ürettiği belirlenerek Arslankoz (2011)'ün sonuçlarına göre daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. *Leu. mesenteroides* (MK9, MK12, MK15) izolatlarının 24 saat sonunda ürettiği asit miktarının, Herreros ve ark. (2003) tarafından belirlenen değerlerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

3.3. LAB İzolatlarının Farklı pH Değerlerinde Gelişme Yetenekleri

İzole edilen LAB türlerinin pH 2, 4 ve 9,6 değerlerinde gelişme yetenekleri incelenmiştir. MK8 ve MK19 kodlu *Pediococcus pentosaceus* izolatlarının pH 2'de gelişme göstermediği, diğer LAB izolatlarının zayıf gelişme gösterdiği görülmüştür. pH 4'te en iyi gelişmeyi *Pediococcus pentosaceus* (MK6)'nın gösterirken (7,86±0,54 log kob/g), diğer bakteri türlerinin değişken gelişme gösterdikleri tespit edilmiştir. pH 9,6'da *Pediococcus pentosaceus* (MK8) izolatı zayıf gelişme gösterirken (2,15±0,15 log kob/g), diğer bakteri izolatlarının iyi gelişme gösterdiği görülmüştür (Tablo 3).

Tablo 3. Tip I ekşi hamur fermentasyonu ile üretilmiş kek hamurlarından izole edilen LAB türlerinin farklı pH değerlerinde gelişme sayısı (log kob/g)

LAB Örnekleri	pH 2	pH 4	pH 9,6
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK1	7,67±0,51 ^{Aab}	5,89±0,71 ^{CDEFGb}	9,75±0,29 ^{Aa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK2	3,77±0,02 ^{CDc}	6,41±0,01 ^{ABCDEb}	7,48±0,00 ^{BCDa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK3	3,77±0,54 ^{CDb}	7,54±0,06 ^{ABa}	6,35±0,13 ^{Da}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK4	4,47±0,07 ^{Aa}	5,52±0,48 ^{DEFGa}	7,50±1,20 ^{BCDa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK5	5,16±0,04 ^{Ba}	4,62±0,08 ^{FGHa}	7,94±1,76 ^{ABCDa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK6	1,67±0,18 ^{Fc}	7,86±0,54 ^{Ab}	9,95±0,25 ^{Aa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK7	4,43±0,31 ^{BCb}	4,78±0,00 ^{EFGb}	9,44±0,13 ^{ABa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK8	0,00±0,00 ^{Gc}	6,35±0,05 ^{ABCDEa}	2,15±0,15 ^{Eb}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK9	7,36±0,12 ^{Aa}	6,78±1,70 ^{ABCDa}	9,06±0,06 ^{ABCa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK11	4,39±0,01 ^{BCc}	7,43±0,02 ^{ABCb}	9,10±0,10 ^{ABa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK12	4,28±0,43 ^{BCa}	5,92±0,52 ^{BCDEFa}	7,40±1,90 ^{CDa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK13	2,75±0,02 ^{Ec}	6,42±0,01 ^{ABCDb}	8,35±0,09 ^{ABCa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK15	1,00±0,00 ^{Fc}	4,27±0,49 ^{GHb}	8,16±0,08 ^{ABCDa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK16	3,25±0,65 ^{DEc}	5,36±0,18 ^{DEFGb}	9,31±0,03 ^{ABa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK17	3,80±0,05 ^{CDb}	4,56±0,14 ^{EFb}	8,79±0,55 ^{ABCa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK18	1,54±0,54 ^{Fc}	5,85±0,55 ^{CDEFGb}	9,27±0,09 ^{ABa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK19	0,00±0,00 ^{Gc}	4,65±0,80 ^{FGb}	9,22±0,09 ^{ABa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK20	2,60±0,30 ^{Eb}	3,00±0,00 ^{Hb}	8,91±0,11 ^{ABCa}

Farklı büyük harfler aynı pH'da LAB türleri arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Farklı küçük harfler aynı LAB türlerinde farklı pH'lar arasındaki önemli farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Tangüler (2010) tarafından şalgam suyundan izole edilen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinslerinin pH 4,4' de gelişme gösterdiği fakat pH 9,6'da hiçbir bakterinin gelişme göstermediği belirtilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada (Kıran, 2006) hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından alınmış laktik asit bakterilerinin hiçbirisinin pH 2 ve pH 3 değerlerinde gelişme göstermediği tespit edilmiştir. pH 4, pH 5 ve pH 6 değerlerinde hepsi gelişme göstermiştir. pH 9,6 değerinde *Pediococcus pentosaceus* türlerinin bir kısmının geliştiği bazılarının zayıf gelişme gösterdiği tespit edilirken; *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* ve *Lb. fermentum* türlerinin geliştiği, *Leuconostoc* türlerinin zayıf gelişme gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada da pH 9,6 değerinde *Pediococcus pentosaceus* (MK1, MK2, MK3, MK6, MK7, MK11, MK16, MK18, MK19) izolatlarının iyi gelişme gösterdiği, bir *Pediococcus pentosaceus* (MK8) izolatının zayıf gelişme gösterdiği tespit edilmiştir.

3.4. LAB İzolatlarının Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Yetenekleri

İzole edilen LAB türlerinin %0, %3, %6, %9 tuz konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri incelenmiş, %3 tuz konsantrasyonunda en iyi gelişmeyi *Lactobacillus curvatus* (MK13) izolatının gösterdiği (7,33±0,02 log kob/g), en az gelişmeyi *Lactobacillus curvatus* (MK5) izolatının gösterdiği (3,71±0,01 log kob/g) tespit edilmiştir. %6 tuz konsantrasyonunda en iyi *Pediococcus pentosaceus* (MK2) (7,00±0,00 log kob/g) ve *Lactobacillus curvatus* (MK17) (6,85±0,62 log kob/g) izolatları gelişme gösterirken; %9 tuz konsantrasyonunda en iyi gelişmeyi *Lactobacillus curvatus* (MK17) izolatının gösterdiği (7,62±0,21 log kob/g) görülmüştür. %9 tuz konsantrasyonunda En zayıf gelişmeyi ise *Lactobacillus curvatus* (MK20) izolatının gösterdiği tespit edilmiştir (2,88±0,12 log kob/g) (Tablo 4).

Tablo 4. Tip I ekşi hamur fermentasyonu ile üretilmiş kek hamurlarından izole edilen LAB türlerinin farklı NaCl değerlerinde gelişme sayısı (log kob/g)

LAB Örnekleri	%0 NaCl	%3 NaCl	%6 NaCl	%9 NaCl
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK1	5,06±0,06 ^{CDEFa}	4,63±0,03 ^{DEb}	4,15±0,15 ^{BCDc}	5,00±0,00 ^{EFa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK2	5,65±0,35 ^{ABCDEab}	4,69±0,69 ^{DEb}	7,00±0,00 ^{Aa}	6,41±0,22 ^{BCa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK3	6,01±0,32 ^{ABCDEa}	4,95±0,05 ^{CDEa}	5,80±0,65 ^{ABCa}	6,26±0,96 ^{BCa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK4	5,52±0,07 ^{ABCDEab}	4,64±0,18 ^{DEb}	5,40±1,03 ^{ABCDb}	6,46±0,69 ^{BCa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK5	3,75±0,15 ^{Fb}	3,71±0,01 ^{Eb}	3,43±0,11 ^{CDb}	4,97±0,27 ^{EFa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK6	4,73±0,12 ^{DEFb}	6,31±0,35 ^{ABCab}	6,00±0,70 ^{ABab}	6,42±0,17 ^{BCa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK7	6,69±0,21 ^{ABCa}	6,65±0,35 ^{ABa}	5,72±0,02 ^{ABCb}	5,15±0,15 ^{DEFb}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK8	7,04±0,04 ^{Aa}	5,95±0,35 ^{ABCDb}	4,87±0,17 ^{ABCDc}	4,85±0,15 ^{EFc}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK9	6,34±1,86 ^{ABCDa}	6,95±0,05 ^{ABa}	6,06±2,64 ^{ABa}	7,06±0,36 ^{ABa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK11	5,00±0,00 ^{CDEFa}	5,59±1,31 ^{BCDa}	3,18±0,80 ^{Da}	4,69±0,02 ^{Fa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK12	5,19±0,19 ^{BCDEFa}	5,15±0,15 ^{CDa}	5,26±0,78 ^{ABCDa}	4,50±0,50 ^{Fa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK13	3,75±1,45 ^{Fa}	7,33±0,02 ^{Aa}	4,86±1,62 ^{ABCDa}	4,26±0,04 ^{FGa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK15	6,72±0,15 ^{ABCab}	6,93±0,47 ^{ABa}	5,93±0,03 ^{ABb}	4,62±0,12 ^{Fc}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK16	6,84±0,06 ^{ABa}	4,65±0,05 ^{DEc}	5,87±0,27 ^{ABCb}	3,24±0,24 ^{GHd}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK17	7,11±0,33 ^{Aa}	5,97±0,43 ^{ABCDa}	6,85±0,62 ^{Aa}	7,62±0,21 ^{Aa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK18	4,48±0,00 ^{EFa}	4,93±0,92 ^{CEa}	5,89±0,15 ^{ABCa}	5,81±0,01 ^{CDEa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK19	6,45±0,15 ^{ABCDa}	5,15±0,15 ^{CDb}	6,74±0,26 ^{Aa}	6,03±0,18 ^{BCDa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK20	5,04±0,04 ^{CDEFa}	4,65±0,05 ^{DEb}	4,23±0,06 ^{BCDc}	2,88±0,12 ^{Hd}

Farklı büyük harfler aynı NaCl oranında LAB türleri arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Farklı küçük harfler aynı LAB türlerinde farklı NaCl oranları arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. (p<0,05)

Yapılan bir çalışmada (Kıran, 2006) hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından alınmış laktik asit bakterilerinin %4 tuz konsantrasyonunda tümünün gelişme gösterdiği, %6,5 tuz konsantrasyonunda 5 tanesi hariç diğer bakterilerin gelişme gösterdiği, %12 tuz konsantrasyonunda 4 tanesinin zayıf gelişme gösterdiği diğerlerinin gelişmediği, %18 tuz konsantrasyonunda ise hiçbirisinin gelişme göstermediği belirtilmiştir. Bulut (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, %6,5 tuz konsantrasyonunda 9 tane *Lactobacillus* türünün gelişme gösterdiği belirtilmiştir. Arslankoz (2011) tarafından turşulardan izole edilen tüm bakterilerin %3 tuz konsantrasyonunda gelişme gösterdiği, %3 ve %6,5 tuz en konsantrasyonunda iyi gelişmenin *Lb. plantarum* 'a ait olduğu; %10 tuz konsantrasyonunda en iyi *P. ethanolidurans* ve *Lb. plantarum* türlerinin gösterdiği bildirilmiştir.

3.5. LAB İzolatlarının Antibakteriyel Aktiviteleri

İzole edilen LAB türlerinin indikatör mikroorganizma olarak seçilen *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 0402, *Bacillus cereus* RSKK 963, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'a karşı oluşturduğu zon çapları Tablo 5'te gösterilmiştir. Beş (5) mm'den küçük zon çapına sahip LAB türlerinin antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı kabul edilmiştir. İzole edilen LAB türlerinin seçilen 4 indikatör ve patojen bakteri üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu fakat *Salmonella* Typhimurium'a karşı oluşturdukları zon çaplarının diğer indikatör mikroorganizmalara karşı oluşturduklarından daha büyük olduğu görülmüştür. *Escherichia coli* ATCC 25922'a karşı en büyük zon çapını *Lactobacillus curvatus* (MK17) izolatı oluştururken (8±0,00 mm), *Salmonella* Typhimurium ATCC 0402 'a karşı en büyük zon çapını *Lactobacillus curvatus* (MK4) izolatı oluşturmuştur (9±0,00 mm). LAB izolatlarının *Bacillus cereus* RSKK 963 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'a karşı oluşturdukları zon çapları değişkenlik göstermektedir.

Tablo 5. Tip I ekşi hamur fermentasyonu ile üretilmiş kek hamurlarından izole edilen LAB türlerinin farklı mikroorganizmalar üzerindeki antibakteriyel aktivitesi sonucu oluşan zon çapları (mm)

LAB Örnekleri	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Bacillus cereus</i> RSKK 963	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> ATCC 0402
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK1	6,5±0,05 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{Aa}	5,5±0,05 ^{Ca}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK2	6,0±0,00 ^{ABa}	5,5±0,05 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{Aa}	7,0±0,10 ^{ABCa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK3	5,5±0,05 ^{Ba}	6,0±0,00 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{Aa}	7,0±0,10 ^{ABCa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK4	6,5±0,05 ^{ABab}	7,0±0,10 ^{Aab}	6,0±0,00 ^{Ab}	9,0±0,10 ^{Aa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK5	5,5±0,05 ^{Ba}	6,0±0,00 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{Aa}	6,0±0,00 ^{BCa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK6	7,0±0,10 ^{ABab}	6,0±0,00 ^{ABb}	6,0±0,00 ^{Ab}	8,0±0,00 ^{ABa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK7	7,0±0,10 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{Aa}	7,0±0,10 ^{ABCa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK8	7,0±0,10 ^{ABa}	5,0±0,00 ^{Ba}	6,0±0,00 ^{Aa}	7,0±0,10 ^{ABCa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK9	7,0±0,10 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{ABab}	5,0±0,00 ^{Bb}	6,0±0,00 ^{BCab}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK11	7,0±0,10 ^{ABab}	6,0±0,00 ^{ABb}	6,0±0,00 ^{Ab}	8,0±0,00 ^{ABa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK12	5,5±0,05 ^{Ba}	7,0±0,10 ^{Aa}	5,5±0,05 ^{ABa}	7,0±0,10 ^{ABCa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK13	6,0±0,00 ^{ABa}	7,0±0,10 ^{Aa}	5,5±0,05 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{BCa}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MK15	7,0±0,10 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{ABa}	5,5±0,05 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{BCa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK16	5,5±0,05 ^{Ba}	7,0±0,10 ^{Aa}	5,0±0,00 ^{Ba}	7,0±0,10 ^{ABCa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK17	8,0±0,00 ^{Aa}	6,0±0,00 ^{ABc}	5,0±0,00 ^{Bd}	6,0±0,00 ^{BCb}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK18	7,0±0,10 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{ABa}	6,0±0,00 ^{Aa}	7,0±0,10 ^{ABCa}
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MK19	6,0±0,00 ^{ABa}	5,5±0,05 ^{ABab}	5,0±0,00 ^{Bb}	6,0±0,00 ^{BCa}
<i>Lactobacillus curvatus</i> MK20	7,0±0,10 ^{ABab}	7,0±0,10 ^{Aab}	5,0±0,00 ^{Bb}	8,0±0,00 ^{ABa}

Farklı büyük harfler aynı mikroorganizmada LAB türleri arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Farklı küçük harfler aynı LAB türlerinde farklı mikroorganizmalar arasındaki önemli farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Erdoğan ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada fermente sucuklardan 4 adet *P. pentosaceus* türü izole etmiş ve *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* üzerine antimikrobiyal etkilerini araştırmıştır. İzole edilen suşlardan sadece birinin *Staphylococcus aureus*'a karşı 10 mm'lik zon oluşturduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada *Pediococcus pentosaceus* türlerinin 4 indikatör mikroorganizmaya karşı 5,0-8,0 mm büyüklüğünde zon oluşturduğu belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada (Arslankoz, 2011) turşulardan izole edilen *Pediococcus* izolatlarının *Listeria innocua*, *E. coli* ve *Salmonella* sp.'a karşı 10 mm ve 10 mm'den büyük zonlar oluşturduğu *B. cereus*, *Lb. brevis*'e karşı 10 mm'den küçük zonlar oluşturduğu bildirilmiştir.

4. Sonuç

Bu çalışmada Tip I ekşi hamur ile elde edilmiş kek hamurunun laktik asit bakterisi (LAB) çeşitliliği belirlenmiş ve izole edilen LAB türlerinin teknolojik özellikleri incelenmiştir. Bu maksatla, farklı oranlarda (%10, %15 ve %20) Tip I ekşi hamur kullanılarak üç farklı formülasyonda kek hamuru elde edilmiş ve 30-35°C' de, %80-90 bağıl nemde 4-6 saat fermentasyona bırakılmıştır. Fermente kek hamurlarından laktik asit bakterileri izole edilip (farklı morfolojiye sahip kolonilerden) 16S rRNA tekniği ile tür bazında tanımlama yapılmıştır.

İzolasyonu yapılan LAB'lerin *Pediococcus*, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait türler oldukları belirlenmiştir. Toplam 18 adet izolatın 10'u *Pediococcus pentosaceus*, 5'i *Lactobacillus curvatus* ve 3'ü *Leuconostoc mesenteroides* olarak tanımlanmışlardır.

Tanımlanan LAB türlerinin asit üretim yeteneği, farklı pH değerlerinde gelişme, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme ve *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir.

İzolatların çoğunun pH 2 'de zayıf gelişme gösterdiği ve *Pediococcus* izolatlarının bazılarının gelişme göstermediği; pH 9,6'da ise bir *Pediococcus pentosaceus* izolatı hariç diğer LAB izolatlarının iyi gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. LAB izolatları %9 tuz konsantrasyonunda en zayıf gelişmeyi gösterirken; %6 tuz konsantrasyonunda en iyi gelişmeyi *Pediococcus pentosaceus* izolatları göstermiştir. LAB izolatlarının en yüksek antibakteriyel etkiyi *Salmonella Typhimurium*'a karşı gösterdikleri tespit edilmiştir.

Ekmek üretimi için üretilen ekşi hamurlarda daha çok, özellikle *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* ve *Lb. brevis* gibi *Lactobacillus* cinsine ait türler baskın türler olarak tespit edilirken, kek ekşi hamurunda *Pediococcus pentosaceus* türünün öne çıktığı belirlenmiştir.

5. Teşekkür

Bu çalışma Şölen Çikolata Gıda San. ve Tic. A.Ş.'nin TÜBİTAK TEYDEB tarafından desteklenen 3180282 nolu projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Kaynakça

- Arslankoz, N. (2011). Ankara Çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 71 sayfa.
- Bocker, G., Stolz, P. & Hammes, W. P. (1995). Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie des Sauerteig-typischen Stammes *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. Getreide Mehl und Brot, 49, 370–74.
- Bulut, Ç. (2003). Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. İzmir Teknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 102 sayfa.
- Chavan, R.S. & Chavan, S.R. (2011). "Sourdough technology-A traditional way for wholesome foods: A review". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 169–182.
- Corsetti, A. & Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40, 539-558.
- Çağlıyan, B. İ. (2008). İzmir piyasasında satılan bazı ekmeğin çeşitlerinin nitelikleri ve yapım teknikleri. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 133 sayfa.
- Decock, P. & Cappelle, S. (2005). Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 113-120.
- Dertli, E., Mercan E., Arıcı, M., Yılmaz, M.T. & Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT- Food Science and Technology*, 71, 116-124.
- De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. & Messens, W. (2002). The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6059–6069.
- De Vuyst, L. & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Science Technology*, 16, 43–56.
- De Vuyst, L. & Vancanneyt, M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria, *Food Microbiology*, 24,120–127.
- Elgün, A. & Ertugay, Z. (2002). *Tahıl İşleme Teknolojisi*, Erzurum: Atatürk Üniversitesi Yayınları.
- Erdoğan, Ö.T., Çetin, Ö. & Ergün, Ö. (2002). Fermente sucuklardan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyel aktiviteleri üzerine çalışmalar. *İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28, 249-254.
- Foschino, R., Terrano, R., Mora, D. & Galli, A. (1999). Microbial characterization of sourdoughs for sweet baked products. *Italian Journal of Food Science*, 11, 19–28.
- Galli, A. & Ottogalli, G. (1973). Aspetti della microflora degli impasti per panettone. *Annali di Microbiologia e Enzimologia*, 23, 39–49.
- Galli A., Franzetti L. & Fortina M.G. (1988). Isolation and identification of sourdough microflora. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 6, 345–351.
- Garofalo, C., Silvestri, G., Aquilanti, L. & Clementi, F. (2008). PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast Dynamics during the production processes of three varieties of Panettone. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 243-254.
- Gobbetti, M. (1998). The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 267–274.
- Hansen, A. & Schieberle, P. (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 85–94.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., González -Prieto, M.J. & Tornadijo, M.E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (spanish goat's milk cheese). *International Dairy Journal*, 13, 469-479.
- Istituto Nazionale di Sociologia Rurale (INSOR) (2000). Atlante dei prodotti tipici: il pane. In: F. Angeli (Ed.), Roma, Agra RAI-ERI.
- Katina, K. (2005). Sourdough: A tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. VTT Publications 569.
- Kazanskaya, L. N., Afanasyeva, O. V., & Patt, V. A. (1983). Microflora of rye sourdoughs and some specific features of its accumulation in bread baking plants of the USSR. In J. Holas, & F. Kratochvil, *Developments in food science. Progress in cereal chemistry and technology*, 5B, 759–763. London: Elsevier
- Kıran, F. (2006). Hücre duvarı protein profilleri ve pilazmid içeriklerine göre laktik asit bakterilerinin moleküler tanısı. Ankara Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi. 130 sayfa.

- Kitahara, M., Sakata, S. & Benno, Y. (2005). Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolated from five sourdoughs. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 353-357.
- Liang, C. Sarabani, Z. & Berenjian, A. (2016). An overview on the health benefits and production of fermented functional foods. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies (JAMSAT)*, 2 (2), 224-233.
- Meroth, C. B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M. J. & Hammes, W. P. (2003). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 475-482.
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno R. & Gobbetti, M. (2014). Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 136-146.
- Ottogalli, G., Galli, A. & Foschino, R. (1996). Italian bakery products obtained with sour dough: characterization of the typical microflora. *Advances in Food Science*, 18, 131-144.
- Stolz, P. (2003). Biological fundamentals of yeast and *Lactobacilli* fermentation in bread dough. In: *Handbook of Dough Fermentations*, K. Kulp and K. Lorenz (Eds.), Marcel Dekker, New York, 23-43.
- Tangüler, H. (2010). Şalgam suyu üretiminde etkili olan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi ve şalgam suyu üretim tekniğinin geliştirilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 367 sayfa.
- Vancanneyt, M., Neysens, P., Dewachter, M., Engelbeen, K., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Van der Meulen, R., Hoste, B., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. & Swings, J., (2005). *Lactobacillus acidifarinae* sp. nov. and *Lactobacillus zymae* sp. nov., from wheat sourdoughs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 615-620.
- Vernocchi, P., Valmorri, S., Gatto, V., Torriani, S., Gianotti, A., Suzzi, G., Guerzoni, M.E. & Gardini, F. (2004). A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. *Food Research International*, 37, 469-476.