

Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterileri ve Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması

Fatih Bakırcı¹, Ergun Köse²¹Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Manisa²Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Manisa

Geliş Tarihi (Received): 27.03.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 17.07.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): fatih@fatihbakirci.com (F. Bakırcı)

☎ 0 236 201 22 51 📠 0 236 241 21 43

ÖZ

Gıda tüketiminde önemli bir yere sahip olan ekmeğin, son yıllarda raf ömrünü uzatmak ve besin kalitesini arttırmak için zengin aroma ve doğal mikrofloraya sahip ekşi hamur ile üretimleri tercih edilmektedir. Bu çalışmada, İzmir ilinde bulunan 10 farklı yerel fırından alınan 10 farklı ekşi hamur örneğinden izole edilen laktik asit bakterisi (LAB) ve maya suşlarının tanımlanması amaçlanmıştır. Ekşi hamur örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar biyokimyasal özelliklerine göre Vitek 2 Compact (Biomeriux, Fransa) cihazı ile tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda 8 farklı LAB türü (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. paralimentarius*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. sanfranciscensis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*) ve 4 farklı maya türü (*Candida humulis*, *Torulasporea delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii* ve *Saccharomyces cerevisiae*) tanımlanmıştır. İzmir ve Manisa'da üretilen ekşi hamurlarda en fazla rastlanılan (dominant) türlerin *L. mesenteroides* ve *D. hansenii* olduğu görülmüştür. *L. mesenteroides* ve *D. hansenii* türleri için sırasıyla 23S rRNA ve ITS1 gen bölgelerine ait spesifik primer ve prob dizaynları yaptırılarak, real-time PCR cihazı ile tür identifikasyon-doğrulama çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak raf ömrü uzun, zengin aromaya sahip ekşi mayalı ekmeklerin üretimi için mikrofloranın doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ekşi hamur, Mikroflora, Laktik asit bakterisi, Maya

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and Yeasts from Sourdough

ABSTRACT

In recent years, sourdough with rich aroma and natural microflora has been used to extend the shelf life and increase the quality of bakery foods, which have an important place in food consumption. In this study, the aim was to identify lactic acid bacteria (LAB) and yeast strains isolated from 10 different sourdough samples obtained from 10 different local bakeries in İzmir. Microorganisms in sourdough products were identified by the Vitek 2 Compact (Biomeriux, France) device according to their biochemical properties. As a result, 8 different lactic acid bacteria strains (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. paralimentarius*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. sanfranciscensis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*) and 4 different yeast strains (*Candida humulis*, *Torulasporea delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii* ve *Saccharomyces cerevisiae*) were determined. The most common (dominant) species in sourdoughs produced in the cities of İzmir and Manisa (Turkey) were *L. mesenteroides* and *D. hansenii*. Species identification of *L. mesenteroides* and *D. hansenii* detected in this study was also carried out by real-time PCR using primers and probes specific for 23S rRNA and ITS1 gene regions. In conclusion, correct identification of microflora is required for the production of sourdough bread that has rich aroma, has a long shelf life.

Keywords: Sourdough, Microflora, Lactic acid bacteria, Yeast

GİRİŞ

Dünya genelinde günlük kalorinin büyük bir kısmını sağlayan ekmek, temel bir besin maddesi ve iyi bir enerji kaynağı olması nedeniyle gıda tüketiminde önemli bir yere sahiptir [1].

Ülkemizde, üreticiler kısa sürede ve kapasitenin üzerinde ekmek üretmeyi hedeflediklerinden, tüketiciyi geleneksel ekmek lezzetinden uzaklaştırmaktadırlar. Günümüzde, hamur hazırlamada kullanılan ekmek mayası miktarının %2-3'ten %5-6 oranına çıkartılması, ekşi maya kullanımından vazgeçilmesi ve fermantasyon sürelerinin en aza indirilmesi sonucunda, alışılmış ekmek aromasından uzak, sünger yapısında ve kek benzeri ürünler tüketime sunulmaktadır. Oysaki ekmeğin zengin bir aromaya sahip olabilmesi için, yeterli bir süre fermantasyona ihtiyaç vardır [2].

Ekşi hamur 5000 yıldır kullanılan, buğday unu ve su karışımının laktik asit bakterisi (LAB) ve maya ile fermente edilmesi sonucu elde edilen bir üründür [3]. Ekmek yapımında ekşi hamur kullanılması ekmeğin hacmini, yapısını ve duyu kalitesini geliştirir, ekmeğin fiziksel ve mikrobiyolojik olarak raf ömrünü de uzatır [4].

Ekşi hamurla ortaya çıkan asidik koşullar, proteoliz ve nişastanın mikrobiyal hidrolizi ekmeğin raf ömrü süresince bir takım fiziko-kimyasal değişikliklere neden olur ve bunun sonucu da ekmeğin bayatlaması yavaşlar [5].

Ekmek ve unlu mamullerde ortaya çıkan en önemli mikrobiyolojik bozulmalar sünme (rope) hastalığı ve küflenmedir. Uygun olmayan hammadde kullanımı, üretim sırasında hijyene gerekli önemin verilmemesi ve üretimden tüketime kadar geçen süre içinde bulaşmanın engellenememesi, üründe mikrobiyolojik bozulmaya sebep olmaktadır. Mikrobiyolojik bozulmanın önlenmesinde kimyasal koruyucu ve laktik starter kültür kullanımı oldukça yaygındır.

LAB endüstriyel olarak önem arz eden başlıca bakterilerdir ve gıda üretimi, sağlığı düzenleme, makromoleküllerin, enzim ve metabolitlerin üretiminde kullanılmaktadır [6]. LAB, et ve balık ürünleri (sucuk vb.), süt ürünleri (yoğurt, kefir vb.), tahıl ürünleri (ekmek, boza vb.), şarap ve sebzeler (lahana ve salatalık turşusu vb.) gibi pek çok gıdada doğal veya starter kültür olarak ilave edilerek, gıdaların olgunlaştırılması, üretimi, dayanıklılığının artırılmasında önemli rol oynarlar [7].

LAB; oldukça fazla soy ve türe sahip çubuk, kok ve kokobasil şekilde, Gram pozitif, hareketsiz, spor şekillerini oluşturmayan, katalaz negatif, mikroaerofilik veya anaerobik, aside dayanıklı, kuvvetli fermentatif özelliğe sahip, nitratları indirgemeyen, büyüme ve gelişimleri için glikoz ve amonyum yanında bazı vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duyan mikroorganizmalardır [8].

Günümüze kadar laktobasiller, fermentatif özellikleri dikkate alınarak; obligat homofermentatifler, fakültatif heterofermentatifler ve obligat heterofermentatifler olmak üzere gruplandırılmıştır. Grup 1 ve 2'deki

bakterilerin çoğu grup 3'teki bazı bakteriler fermente gıdalarda kullanılmış, fakat grup 3 genelde gıda bozulmaları ile ilişkilendirilmiştir [9].

Ekşi hamur mayası, homo- ve heterofermentatif LAB'leri ve mayaları değişen oranlarda ve bileşimlerde içermektedir. Homofermentatif LAB'ler, şekeri fermente ederek laktik asit oluştururken; heterofermentatifler laktik asidin yanı sıra önemli miktarda CO₂, etil alkol, asetik asit ve diğer uçucu bileşikler de meydana getirmektedir [10].

Ekşi hamur fermantasyonunda mayalar ve laktik asit bakterilerinin sürdürdükleri simbiyotik yaşam sonucunda mayalar ve heterofermentatif LAB'leri hamurun kabarmasından sorumlu olurken, homofermentatif LAB'leri ekmeğin elastisitesini, asitliğini ve lezzetini etkilemektedir [5].

Lönnner ve Preve-Akesson [11] yaptıkları bir araştırmada, ekşi hamur yönteminde bazı heterofermentatif *Lactobacillus* spp. ile yapılan denemede homofermentatif türlere göre daha yüksek asitlik ve daha düşük pH değerine ulaşıldığını ve ekmekte daha güçlü, aromatik bir lezzet hissedildiğini tespit etmişlerdir. Martinez-Anaya ve ark. [12], beş maya ve altı LAB türünün etkileşimi ve ekmek kalitesi üzerine faydaları konusunu araştırmışlardır. *S. cerevisiae* içeren tüm maya kombinasyonları yüksek kaliteli ekmek üretimine uygun sonuçlar vermiştir. Ayrıca *Candida boidinii* ve *Saccharomyces fructuum* ile *S. cerevisiae* karışımları, *Hansenula subpelliculosa* ya da *Candida guilliermondii* ile *S. cerevisiae* karışımlarından daha iyi sonuç vermiştir. Mayalarla birlikte LAB'lerin kullanıldığı kombinasyonlar arasında yalnızca *S. cerevisiae* ile olan karışımlar pişme yeteneğini artırmışlardır.

LAB ve mayaların, fenotipik tanımlama yöntemleri genotipik yöntemlere nazaran daha ucuzdur. Fenotipik tekniklerin bazı LAB için kullanışlı olduğu düşünülse de, sonuçların benzer genotip gösteren türler arasında hatalı sonuç verdiği iddia edilmektedir. Otomatize tanılamalar hızlı, yüksek doğrulukta, tekrarlanabilir tanımlama yaparlar ve daha az teknik iş gücü gerektirirler. Pahalı olması, bakteri morfolojisini önceden bilmenin gerekliliği, çok uygun yoğunlukta bakteri süspansiyonu hazırlama zorunluluğu, biyokimyasal özellikleri yakın benzerlik gösteren türlerin identifiye edilerek birbirinden ayrılmasının zorluğu gibi dezavantajları da vardır. Bu nedenle, genotipik tanımlama yöntemlerinin kullanılması daha doğru sınıflandırma ve ayırım sağlamak amacıyla uygun görülmektedir [13].

MATERYAL ve METOT

Materyal

Araştırmada, İzmir'de bulunan yerel fırınlardan aseptik koşullarda alınan ve +4°C'de laboratuvara getirilen 10 adet ekşi hamur örneği kullanılmıştır. Örneklerin aseptik koşullarda maya ve LAB analizleri gerçekleştirilmiştir. Örnekler analizler sonuçlanıncaya kadar +4°C'de bekletilmiştir.

Metot

Ekşi Hamurdan LAB ve Mayaların Sayım ve İzolasyonu

Örneklerden LAB ve maya izolasyonu için sırasıyla ISO 15214 [14] ve FDA BAM Chapter 18 [15] tarafından önerilen yöntemler kullanılmıştır. Analiz örneklerinden aseptik koşullarda 25 g tartılmış, maya analizleri için 225 mL'lik %1'lik (w/v) pepton çözeltisi (Merck-107214) ile LAB analizleri için 225 mL'lik tamponlanmış peptonlu su (Merck-107228) çözeltileri kullanılarak örnekler 2 dakika stomacher ile homojenize edilmiştir. Homojenattan %1 peptonlu su ile ardışık seyreltiler hazırlanmış ve aşağıdaki besiyerlerine aşılanmıştır. İlgili metotlara göre; maya analizleri için örnekler 0.95'den daha az su aktivitesi içerdiği için Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agara (Merck-100466) üzerine yayma yöntemi, LAB analizleri için de *Lactobacillus* Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) agara (Merck-110660) dökme yöntemi kullanılarak, ekimler iki paralel olarak yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri LAB ve maya gelişimi için sırasıyla 30°C'de 3 gün ve 25°C'de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben gelişme görülen ve sayım aralığındaki besiyerlerinde toplam LAB ve maya sayısı hesaplanmıştır. Besiyerinde gelişen tipik kolonilerden edilen izolatlarda ise daha sonra tanılama testleri yapılmıştır.

Tanılama Testleri

Seçilen maya ve LAB izolatların tanımlanması amacıyla Gram boyama ve katalaz testi uygulanmış, ayrıca izolatların biyokimyasal ve moleküler düzeyde tür tanımlamaları ve doğrulaması Vitek 2 biyokimyasal ve real-time PCR yöntemi ile yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde gelişen tipik maya ve LAB kolonilerinden 2 veya daha fazla temsili koloni seçilmiştir. Seçilen farklı maya ve LAB kolonileri sırasıyla genel bir besiyeri olan Potato Dextrose Agar (Merck-110130) üzerinde 25°C'de 2 gün; Nutrient Agar (Merck-105450) üzerinde 30°C'de 3 gün boyunca geliştirilerek, saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlar, Vitek 2 Compact (Biomeriux, Fransa) cihazı ile biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanmıştır. En çok tanımlanan türlerden seçilen 7 adet maya ve 7 adet LAB izolatının DNA izolasyonu innuPREP Bacteria DNA Kit metoduna göre gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların LAB türleri için ITS1 ve maya türleri içinse 23S rRNA gen bölgelerine ait spesifik primer ve prob dizaynı yapılarak, real-time PCR (Stratagene-Agilent, Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) cihazı ile moleküler düzeyde identifikasyonu yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Analiz sonucunda İzmir'de bulunan yerel fırınlardan alınan 10 adet ekşi hamur örneğinin LAB ve maya yükleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Örneklerden elde edilen maya ve LAB yüklerinin birbirlerine yakın olduğu görülmüştür.

Tablo 1. Ekşi hamur örneklerindeki maya ve laktik asit bakterisi yükleri (kob/g)

Örnek No	Maya Sayısı	Laktik Asit Bakterileri Sayısı
1 (Menderes)	7.2x10 ⁷	5.0x10 ⁷
2 (Menderes)	2.1x10 ⁷	2.5x10 ⁸
3 (Seferihisar, Orhanlı Köyü)	2.3x10 ⁷	7.8x10 ⁷
4 (Urla, Germiyan Köyü)	6.4x10 ⁷	1.7x10 ⁸
5 (Güzelbahçe)	9.8x10 ⁶	1.2x10 ⁷
6 (Güzelbahçe)	8.2x10 ⁷	6.0x10 ⁷
7 (Çeşme)	2.8x10 ⁷	9.5x10 ⁷
8 (Çeşme)	5.4x10 ⁷	5.7x10 ⁷
9 (Seferihisar, Bademler Köyü)	8.4x10 ⁷	9.7x10 ⁷
10 (Dalyan)	1.8x10 ⁷	9.6x10 ⁶

Konu ile ilgili bir çalışmada Gobetti [16] ekşi hamurun ekme mayalarından *S. cerevisiae*, *S. inustatus*, *T. holmii*, laktik asit bakterilerinden ise *L. brevis*, *L. sanfrancisco*, *L. plantarum*, *L. pontis*, *L. fructivorans*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum* içerdiğini ve oldukça stabil olan bu bileşimde laktobasillerin 10⁹ kob/g, mayaların ise laktobasillerden 10-100 kat daha az olduğunu belirtmiştir.

Ekşi hamur örneklerinden izole edilen ve saflaştırılan LAB ve maya izolatlarının Gram boyama ve katalaz testleri yapıldıktan sonra tür düzeyinde identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. 10 adet ekşi hamur örneğinden izole edilen türlerin Vitek 2 Compact cihazı ile yapılan tür düzeyinde tanımlamaları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Vitek 2 Compact cihazı ile yapılan çalışma sonucunda, 8 farklı LAB türü ve 4 farklı maya türü tespit edilmiştir. Tespit edilen LAB'ler *L. plantarum* (%21.74), *L. casei* (%8.696), *L. paralimentarius* (%4.30), *L. acidophilus* (%8.696), *L. brevis* (%8.696), *L. sanfranciscensis* (%8.696), *Pediococcus pentosaceus* (%8.696), *Leuconostoc mesenteroides* (%30.43) olarak tanımlanmış iken, maya türleri ise *Candida humilis* (%18.75), *Torula delbrueckii* (%6.25), *Debaromyces hansenii* (%43.75) ve *Saccharomyces cerevisiae* (%31.25) olarak tanımlanmıştır. Araştırma sonucunda ekşi hamur örneklerinde en çok tespit edilen laktik asit ve maya türlerinin (dominant türlerin) *L. mesenteroides* (%30.43) ve *D. hansenii* (%43.75) olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2. Ekşi hamur örneklerinin VITEK 2 Compact analiz sonuçları

Örnek No	VITEK 2 GP Card	VITEK 2 YST Card
1	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i>	<i>D. hansenii</i>
2	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. casei</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. humulis</i>
3	<i>L. plantarum</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i>
4	<i>P. pentosaceus</i> , <i>L. mesenteroides</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. humulis</i>
5	<i>L. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i>	<i>D. hansenii</i>
6	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paralimentarius</i>	<i>D. hansenii</i>
7	<i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. casei</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>T. delbrueckii</i>
8	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. mesenteroides</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i>
9	<i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. brevis</i>	<i>D. hansenii</i> , <i>C. humulis</i>
10	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. acidophilus</i>	<i>D. hansenii</i>

Manini ve ark. [17] çalışmalarında, buğday kepeğinden elde edilen ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin fenotipik ve moleküler identifikasyonunu yapmışlardır. Örneklerdeki LAB mikroflorasını belirlemek için MRS broth içinde 30°C'de 24 saat LAB türlerinin gelişimini sağlamışlardır. İnkübasyon sonucunda *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. citreum*, *L. brevis*, *P. pentosaceus* ve *L. mesenteroides* türleri tespit edilmiştir. Ayrıca *L. mesenteroides* suşları için optimum sıcaklığın 30°C' olduğu belirlenmiştir [17].

Nuobariene ve ark. [18] ekşi hamur üzerine yaptıkları çalışmada *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* türlerinin dominant türler olduğunu belirlemişlerdir. Lhomme ve ark. [19] ise ekşi hamurdan *L. plantarum*, *L. mesenteroides* ve *L. sanfranciscensis* laktik asit bakterilerini ve *C. Humulis* ve *S. cerevisiae* maya türlerini izole etmişlerdir [19].

Buna benzer ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada, Isparta yöresindeki farklı fırınlardan toplanan 14 adet ekşi hamur örneğinden izole edilen LAB ve mayaların identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Tanımlama çalışmaları sonucunda izolatların; *L. divergens* (%6.1), *L. brevis* (%15.1), *L. amylophilus* (%6.1), *L. sake* (%6.1), *L. acetotolerans* (%6.1), *L. plantarum* (%3.0), *P. halophilus* (%3.0), *P. pentosaceus* (%6.1) ve *P. acidilactici* (%6.1) bakterileri ile *S. cerevisiae* (%27.0), *S. delbrueckii* (%2.7), *T. holmii* (%10.8) ve *T. unisporus* (%2.7) maya türleri olduğu belirtilmiştir [20].

Farklı coğrafi bölgelerde ekşi hamurlar üzerine yapılan benzer identifikasyon çalışmalarının [21-23] sonuçları karşılaştırıldığında araştırma sonucunun elde edilen veriler ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu durum ekşi hamur mikroflorası ile örnekleme bölgesi arasında doğrusal bir ilişki olmadığını göstermektedir. Ekşi hamur mikroflorasının endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılacak olan LAB ve maya suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak

ayrımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir. Çalışmamızda bu amaçla, Vitek 2 Compact ile en çok tespit edilen 7 adet *L. mesenteroides* LAB türünün ve 7 adet *D. hansenii* maya türünün moleküler düzeyde tür identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen *L. mesenteroides* ve *D. hansenii* DNA'ları için sırasıyla 23S rRNA ve ITS 1 gen bölgelerine ait spesifik primer ve probler kullanılarak (Tablo 3 ve 4) moleküler düzeyde tanımlama yapılmıştır. Moleküler düzeyde tanımlanan suşlar için elde edilen sonuçlar (Şekil 1 ve 2), VITEK 2 Compact analiz ile elde edilen fenotipik tanımlama sonuçlarıyla karşılaştırıldığında tanımlama sonuçlarının tür düzeyinde aynı olduğu belirlenmiştir.

Nuobariene ve ark. [18] ekşi hamur örneklerinden LAB izolasyonu ve identifikasyonu için yaptıkları çalışmada LAB türlerinin, modifiye MRS agar üzerinde 30°C'de 72 saat boyunca anaerobik ortamda inkübasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. Gelişen kolonileri modifiye MRS broth içerisinde 30°C'de 48 saat geliştirerek saflaştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda farklı yüklerde 168 LAB türü tespit etmişlerdir. 8 LAB türü üzerinde 16S rRNA gen bölgesine ait PCR analizleri yapmışlardır [18].

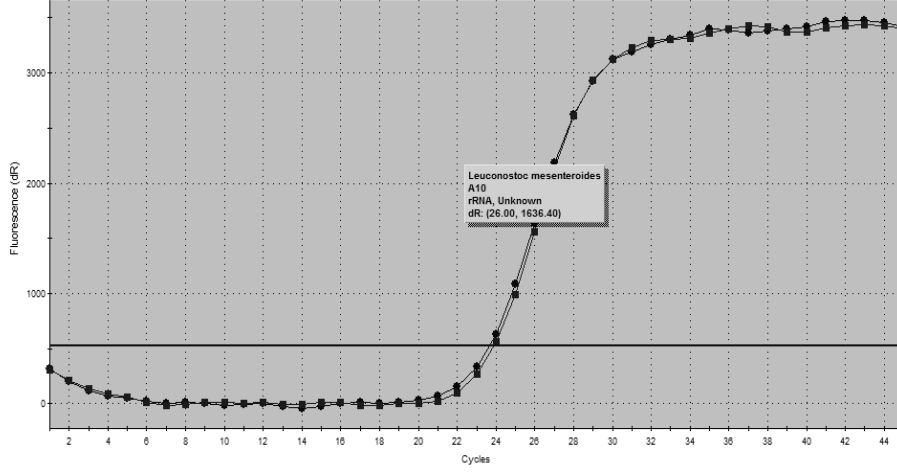
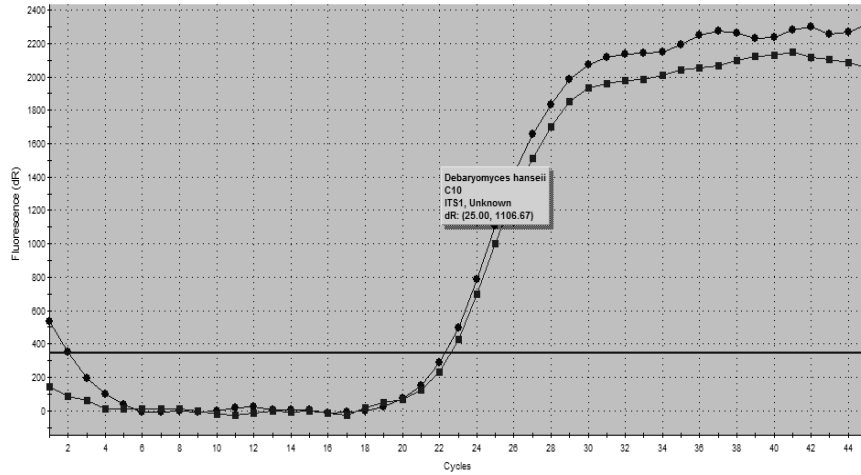
Lhomme ve ark. [19] organik ekşi hamur örneklerinden en çok izole ettikleri *L. sanfranciscensis* LAB türünün moleküler identifikasyonu için 16S rRNA gen bölgesine ait PCR analizleri yapmışlardır [19]. Benzer sonuçların elde edildiği diğer bir çalışmada Lee ve ark. [24] ekşi hamur örneklerinden izole ettikleri 30 LAB kolonisinin önce VITEK 2 Compact ile biyokimyasal identifikasyonun gerçekleştirmişlerdir. İzole edilen türlerin çoğunun *L. sanfranciscensis* türü olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca tanımlanan türlerin moleküler identifikasyonu için 16S rRNA gen bölgesine ait PCR analizlerini yaparak tür identifikasyonunu doğrulamışlardır [24].

Tablo 3. *Leuconostoc mesenteroides* 23S rRNA gen bölgesine ait spesifik primer/prob dizileri ve bağlanma sıcaklıkları

Primer/Probe	Sekans	Sıcaklık (°C)
LcmesS	CCA GTT GTA ATG CGT TAT TAC C	63
LcmesA	CAC AGC TTG TCC TTA TAG AAA A	63
TaqMan-Probe	5'FAM-TTC ACT CTT TTC AAG ACT TAC TG-3'TAMRA	63

Tablo 4. *Debaryomyces hansenii* ITS 1 gen bölgesine ait spesifik primer/prob dizileri ve bağlanma sıcaklıkları

Primer/Probe	Sekans	Sıcaklık (°C)
ITS1 Fw	TGA ACC TGC GGA AGG ATC AT	59
ITS2 Rev	TCC GTT GTT GAA AGT TTT GAA GAT T	59
TaqMan-Probe	5'FAM-TTG TTA TTA CAA GAA CTT TTG C-3'TAMRA	70

Şekil 1. *L. mesenteroides* 23S rRNA gen bölgesine ait real-time PCR görüntüsüŞekil 2. *D. hansenii*'nin ITS 1 gen bölgesine ait Real-Time PCR görüntüsü

SONUÇ

Araştırmamızda ekşi hamur izolatlarının doğru tespiti için biyokimyasal tür identifikasyonu yapılmış ve bu çalışmalar daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler çalışmalar ile de desteklenmiştir. Araştırma sonuçları, ileride yapılacak ekşi hamur çalışmalarında mikrofloraların doğru tespiti, izolasyonu ve tanımlanmasına kaynak oluşturacaktır. Çünkü endüstriyel alanda raf ömrü uzun olan, duyuşal olarak zengin aromaya sahip ekmeğin üretimi için uygun mikrofloraların doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Menteş, Ö., Akçelik, M., Recal, E., 2004. Türkiye'de üretilen ekşi hamurlardan *Lactobacillus* suşlarının izolasyonu, identifikasyonu ve bu suşların temel endüstriyel özellikleri. *Gıda* 29(5): 347-355
- [2] Coda, R., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Nionelli, L., Edema, O.M., Gobbetti, M., 2011. Utilization of African grains for sourdough bread making. *Journal of Food Science* 76(6): M329-35.
- [3] Vogel, R.F., Pavlovic, M., Eehrmann, M.A., Wiezer, A., Liesegang, H., Offschanka, S., Voget, S., Angelov, A., Böcker, G., Liebl, W., 2011. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as a stable element in traditional sourdoughs. *Microbial Cell Factories* 10 (Suppl. 1): 6.
- [4] Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G., 2005. Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochemistry* 40: 2813-2819.
- [5] Sıkılı, Ö.H., Karapınar, M., 2002. Ekşi maya ekmeğinin mikroflorası ve aromatik karakteristikleri.

- Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi, 3-4 Ekim 2002, Gaziantep, 165-175.
- [6] Tangüler H., Erten H., 2006. Gıdalarda bulunan bir laktik asit bakterisi: Weissella. Türkiye 9. Gıda Kongresi Bildiriler Kitabı Sayfa: 179-182, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- [7] Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R., 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* 15: 546-553.
- [8] Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (Suppl. 2): 365-373.
- [9] Stiles, M.E., Holzaphel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.
- [10] Göçmen, D., 2001. Ekşi hamur ve laktik starter kullanımının ekmekte aroma oluşumu üzerine etkileri. *Gıda* 26(1): 13-16.
- [11] Lönner, C., Preve-Akesson, K., 1988. Acidification of lactic acid bacteria in rye sour doughs. *Food Microbiology* 5: 43-58.
- [12] Martinez-Anaya, M.A., Pitarch, B., Bayarri, P., Benedito De Barber, C., 1990. Microflora of the sourdoughs of wheat flour bread. X. Interactions between yeasts and lactic acid bacteria in wheat doughs and their effects on bread quality. *Cereal Chemistry* 67: 85-91.
- [13] Yerlikaya, O., 2014. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan başlıca fenotipik ve moleküler yöntemler. *Gıda ve Yem Bilimi – Teknolojisi Dergisi* 14: 8-22.
- [14] ISO 15214, 1998. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at degrees C.
- [15] FDA BAM Chapter 18, 2001. Division Microbiology Center for Food Safety and Applied Nutrition. US. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online.
- [16] Gobbetti, M., 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science and Technology* 9: 267-274.
- [17] Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., Plumed-Ferrer, C., 2015. Characterization of lactic acid bacteria isolated wheat bran sourdough. *Food Science and Technology* 66: 275-283.
- [18] Nuobariene, L., Cizeikiene, D., Gradzeviute, E., Hansen, S.A., Rasmussen, K.S., Judeikiene, G., Vogensen, K.F., 2015. Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification. *Food Science and Technology* 63: 766-772.
- [19] Lhomme, E., Lattanzi, A., Dousset, X., Minervini, F., De Angelis, M., Lacaze, G., Onno, B., Gobbetti, M., 2015. Lactic acid bacterium and yeast microbiota of sixteen French traditional sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology* 215: 161-170.
- [20] Akgün, F.B., 2007. Ekşi Hamur Tozu Eldesi ve Ekmek Üretiminde Kullanılabilme Olanakları. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli.
- [21] Lattanzi, A., Minervini, F., Di Cagno, R., Diviccaro, A., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2013. The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. *International Journal of Food Microbiology* 163: 71-79.
- [22] Hamad, S.H., Dieng, M.C., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. 1997. Characterization of bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *Journal of Applied Microbiology* 83: 764-770.
- [23] Meroth, C.B., Hammes, W.P., Hertel, C., 2003. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12): 7453.
- [24] Lee, H., Baek, H., Lim, S.B., Hur, J.S., Shim, S., Shin, S., Han, N.S., Seo, J., 2015. Development of species-specific PCR primers and polyphasic characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolated from Korean sourdough. *International Journal of Food Microbiology* 200: 80-86.