

**NOHUT MAYASI VE HAMURUNDAN LAKTİK
ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE
İDENTİFİKASYONU**

Kadir ÇEBKİ

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Ferid AYDIN
2009
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NOHUT MAYASI VE HAMURUNDAN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN KÖZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU**

Kadir ÇEBİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

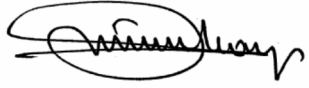
ERZURUM

2009

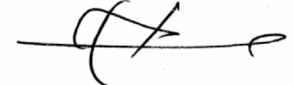
Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Ferid AYDIN danışmanlığında, Kadir ÇEBİ, tarafından hazırlanan bu çalışma 17 / 08 /2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mükerrerem KAYA

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Ö. Faruk ALGUR

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ferid AYDIN

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(İmza)

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NOHUT MAYASI VE HAMURUNDAN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

Kadir ÇEBKİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ferid AYDIN

Bu çalışmanın amaçları, laboratuvar koşulları altında geleneksel metotla üretilen nohut mayası ve nohut mayası hamurunda fermentasyon süresince gelişen laktik asit bakterilerini izole ve tanımlamak, fermentasyon süresince hem nohut mayasında hem de nohut mayası hamurundaki pH değişimleri analiz edilmiştir. Nohut mayasındaki laktik asit bakterileri, enterobakteriler ve toplam aerob mezofil bakterileri sayılmıştır. Nohut mayası ve nohut mayası hamurundan toplam 120 laktik asit bakterisi izole edilmiştir. İzolatlar Api 50 CHL kitleri ve bazı ek biyokimyasal testler kullanılarak fenotipik olarak tanımlanmıştır. İzole edilen laktik asit bakterileri *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Weissella* cinslerine aittir. Nohut mayasından izole edilen laktik asit bakterileri *Lactococcus ssp. lactis*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum*, nohut mayası hamurundan izole edilenler ise *Lactococcus ssp. lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* ve *Weissella confusa* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen heterofermentatif (gaz üreten) laktik asit bakterilerinin *Lactobacillus brevis* ve *Weissella confusa* olduğu bulunmuştur. Fermentasyon süresince hem nohut süzükü hem de nohut mayası hamurundaki en baskın laktik asit bakterisi *Lactococcus ssp. lactis* olarak belirlenmiştir.

2009, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nohut mayası, Nohut mayası hamuru, Laktik asit bakterileri, Laktik asit bakteri izolasyonu, Laktik asit bakteri identifikasyonu, API 50 CHL kiti.

ABSTRACT

MS Thesis

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM CHICKPEA YEAST AND DOUGH

Kadir CEBI

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ferid AYDIN

The aims of this study were to isolate and identify the lactic acid bacteria developed during the fermentation in chickpea yeast and chickpea yeast dough, prepared by traditional procedure under laboratory conditions. Changes in pH of both chickpea yeast and chickpea yeast dough during fermentation were analyzed. Lactic acid bacteria, enterobacteriaceae and total aerobic mesophilic bacteria in chickpea yeast and chickpea yeast dough were enumerated. A total of 120 lactic acid bacteria were isolated from chickpea yeast and chickpea yeast dough. Isolates were phenotypically characterised using API 50 CHL kits and some additional biochemical tests. The isolated lactic acid bacteria belonged to *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Weissella* genera. Lactic acid bacteria isolated from chickpea yeast were identified as *Lactococcus ssp. lactis*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*, and those isolated from chickpea yeast dough were identified as *Lactococcus ssp. lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Weissella confuse*. The isolated heterofermentative (gas-producing) lactic acid bacteria were found to be *Lactobacillus brevis* and *Weissella confuse*. The most dominated lactic acid bacterium in both chickpea yeast and chickpea yeast dough during the fermentation was determined as *Lactococcus ssp. lactis*.

2009, 60 pages

Keywords: Chickpea yeast, Chickpea yeast dough, Lactic acid bacteria, Lactic acid bacteria isolation, Lactic acid bacteria identification, API 50 CHL kit.

TELEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu araştıma süresince her türlü yardım esirgemeyen Sayın hocam Yrd. Doç. Ferid AYDIN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bilgilerinden faydalandığım Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mükerrrem KAYA ve bölümümüz öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Güzin KABAN'a teşekkür ederim.

Çeşitli katkılardan dolayı Biyoloji Bölümünden Sayın Arş. Gör. Mesut TALKIN'a ve çok değerli arkadaşım Murat ÇEBİ'ye teşekkür ederim.

Kadir ÇEBİ

Temmuz 2009

KÇKİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT	ii
TEİLEKKÜR	iii
<u>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</u>	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Un	20
3.1.2. Nohut	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1 Un analizleri	21
3.2.2 Nohut mayası (nohut süzüntüsü) ve nohut mayası hamuru hazırlanması	21
3.2.3. pH değerinin belirlenmesi	22
3.2.3.a. Nohut mayasında (nohut süzüntüsünde) pH'nın belirlenmesi	22
3.2.3.b. Nohut mayası hamurunda pH'nın belirlenmesi	22
3.2.4. Mikrobiyolojik analizler	22
3.2.4.a. Nohut mayası (nohut süzüntüsü)	22
3.2.4.b. Hamur	22
3.2.5. Laktik asit bakteri sayımı	23
3.2.6. Enterobacteriaceae sayımı	23
3.2.7. Toplam aerob mezofil bakteri sayımı	23
3.2.8. Laktik asit bakterileri izolasyonu ve identifikasyonu	23
3.2.9. Gram boyama	24
3.2.10. API test kitleri ile tanımlamanın yapılması	25
3.2.11. Katalaz testi	26

3.2.12. Glikozdan CO ₂ oluşumu	26
3.2.13. Arginin hidrolizi	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	28
<u>4.1. Nohut Mayası(Nohut Süzüntüsü) ve Nohut Mayası Hamurunda pH Değişimi .</u>	<u>28</u>
4.2. Nohut Mayası ve Nohut Mayası Hamuru Örneklerindeki Toplam Aerob Mezofil Bakteri, Laktik Asit Bakteri ve Enterobacteriaceae Sayılarının Belirlenmesi.....	29
4.3. Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu ve identifikasyonu	31
5. SONUÇ ve ÖNERİ.....	54
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

⁰ C	Santigrat Derece
g	Gram
kg	Kilogram
kob	Koloni Olulturan Birim
Log	Logaritma
ml	Mililitre
mm	Milimetre
%	Yüzde

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
LAB	Laktik Asit Bakteri
MRS	DeMan Rogosa Sharpe
PCA	Plate Count Agar
VRBD	Violet Red Bile Dextrose

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Una ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları	20
Çizelge 4.1. Nohut mayası ve nohut mayası hamurunda fermentasyona bakılarak pH değeri	29
Çizelge 4.2. Nohut mayası ve hamuru örneklerindeki Toplam Aerob Mezofil Bakteri, Laktik asit bakteri ve Enterobacteriaceae sayıları	30
Çizelge 4.3. M17 agar üzerinde nohut mayasından elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri	32
Çizelge 4.4. M17 agar üzerinde nohut mayası hamurundan elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri	34
Çizelge 4.5. MRS agar üzerinde nohut mayasından elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri	36
Çizelge 4.6. MRS agar üzerinde nohut mayası hamurundan elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri	38
Çizelge 4.7. M17 agar üzerinde nohut mayasından elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının katalaz aktivitesi, arginin hidrolizi ve CO ₂ oluşum sonuçları	42
Çizelge 4.8. M17 agar üzerinde nohut mayası hamurundan elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının katalaz aktivitesi, arginin hidrolizi ve CO ₂ oluşum sonuçları	43
Çizelge 4.9. MRS agar üzerinde nohut mayasından elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının katalaz aktivitesi, arginin hidrolizi ve CO ₂ oluşum sonuçları	44
Çizelge 4.10. MRS agar üzerinde nohut mayası hamurundan elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının katalaz aktivitesi, arginin hidrolizi ve CO ₂ oluşum sonuçları	45
Çizelge 4.11. M17 agar üzerinde nohut mayasından izole edilen ve API 50 CHL kiti ile tanımlanan laktik asit bakterileri	48
Çizelge 4.12. M17 agar üzerinde nohut mayası hamurundan izole edilen ve API 50 CHL kiti ile tanımlanan laktik asit bakterileri	49

Çizelge 4.13.	MRS agar üzerinde nohut mayasından izole edilen ve API 50 CHL kiti ile telhis edilen laktik asit bakterileri	50
Çizelge 4.14.	MRS agar üzerinde nohut mayası hamurundan izole edilen ve API 50 CHL kiti ile telhis edilen laktik asit bakterileri	51

1. GİRİŞ

Ekmek insanlığın başlangıcından itibaren temel gıda maddelerinden birisi olmuştur. Dünyadaki en eski fışın ve ocak kalıntılarė ekmekın M.Ö. 4000 yėlnda Babilöde yapıldığını göstermektedir. Mayalėekmekın ilk kez M.Ö. 1800 yėllarında eski Mışılđar tarafından tesadüfen hamurun kendi haline bırakılmasıyla olduğu bilinmektedir (Yılmaz 2002).

Ekmek, temel besin maddesi ve iyi bir enerji kaynağı olması nedeniyle gıda tüketiminde önemli bir yere sahiptir. Dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi Türkiyeöde de günlük kaloringin büyük bir kısmı hububat ve ürünlerinden saklanmaktadır. Kili başına yėlık ekmek tüketimi; Avustralyaöde 44 kg, Mışıröde 180 kg, İranöde 150 kg, İtalyaöde 73 kg, Kuveytöde 98 kg, Suriyeöde 130 kg, A.B.D.öde 34 kg olarak belirtilmekteyken Türkiyeöde ise 180-210 kg düzeylerinde olduğu ifade edilmektedir (Colıkuner vd 1999).

Ekmek nötr tat ve aromaya sahip olduğu için diğer aromatik gıda maddelerinin tüketilmesinde ideal bir tatlıyııcı rolü üstlenir. Ekmek doyurucudur ve yoğun bir enerji kaynağıdır. Her ne kadar içerdiki proteinlerin biyolojik değeri et, süt ve yumurta gibi hayvansal gıdalara nazaran eksiklik gösterse de protein içeriği azınsanamaz düzeydedir. Normal katkığı beyaz tava ekmekının yaklağık bileşimi %37 su, %8,7 protein, %50,5 karbonhidrat, %3,2 yağ, %2,0 kül olup; 100 gram ekmek yaklağık 270 kalori saklamaktadır (Elgün ve Ertugay 2003).

Enerji değeri yüksek, lezzetli bir gıda maddesi olan ekmek genellikle iki farklı mayalanma lékli ile yapılmaktadır. Birincisi olan ekli hamur yönteminde, hamur kendi haline bırakılır ve doğal florasında bulunan laktik asit bakterileri ve mayaların aktiviteleri sonucunda laktik asit, asetik asit, alkol ve bazı aroma bileşikleri meydana gelerek hamurun kabarmasını sağlarlar. Bu mikroorganizma gruplarının bulunduğu hamurdan alınan parçalar bir sonraki hamurun mayalanması için kullanılır. İkinci

yöntem ise, *Saccharomyces cerevisiae* ö n n ticari saf kültürünün hamura katılması ile hazırlanan yöntemdir (Wood and Hodge 1985; Aydın ve Çetin 2001; Yılmaz 2002).

Günümüzde ekmek yapmada, pres (yalı) maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve aktif kuru maya gibi ticari mayaların yanında tatlı ve ekli ev tipi doğal mayalar da kullanılmaktadır. Kuru üzüm, yoğurt, süt, sirke, nohut ve İerbetçiotu gibi hammaddeler tatlı ve ekli doğal mayaların ana malzemeleridir. Bu yolla hazırlanan karışın bir gün bekletilip maya formuna dönüşmesi saklanarak ekmek yapmada kullanıldık gibi, bazen de her gün un-su ile tazelenmek suretiyle ancak bir kaç gün sonra mayalama özelliğine sahip mayalar olumakta ve ekmek yapmada kullanılmaktadır (Baykara 2006).

Doğal mayaların ana malzemelerinden biri olan nohut, yemek kültürümüzün önemli gıdalarından birisi olup son yıllarda geliştirilen beslenme piramitlerinde en fazla tüketilmesi önerilen gıda grubu içerisinde yer almaktadır. Zengin protein, mineral ve vitamin içeriği yanında diyet lifi bakımından da çok önemli bir kaynaktır. Çelide ve yetiştirme koşullarına baklı olarak değilmekle birlikte, nohudun bileşiminde %38-73 karbonhidrat, %16-31 protein, %1,5-6 lipid, %2-10 kül ve %2-9 selüloz bulunmaktadır (Akçin 1988).

Nohut (*Cicer arietinum* L.) üretim alanı itibarıyla dünyada baklagil ürünleri içerisinde üçüncü sırayı almakta, ancak ürün olarak dünya ticaretinde az yer tutmaktadır. Ülkemizde yerel nohut tüketimi oldukça önemlidir. Eski dünyanın yarı kurak bölgeleri esas olmak üzere, sıcak ve ılıman iklim bölgelerinde eskiden beri yetiştirilmektedir. İnsan beslenmesinde büyük öneme sahip olan proteinlerin, hayvansal ve bitkisel olmak üzere başlıca iki kaynağı vardır. Dünya protein tüketiminin %70'i bitkisel kökenli olup bunun %18,5'i baklagiller tarafından karşılanmaktadır. Bitkiler içerisinde yemeklik tane baklagil bitkileri, tanelerinin yüksek oranda (%18-32) protein içermesi nedeniyle, hayvansal proteinlerin yeterli olmadığı zaman ve ülkelerde, protein açığının kapatılmasında önemli yere sahiptir. Nohut yemeklik tane baklagil bitkileri içerisinde proteince zengin (%20-22) olması nedeniyle değerli bir besin kaynağıdır. Ayrıca

proteinlerin beslenme değeri de hayvansal proteinlerinkine yakındır. Taneleri vitaminlerce de (özellikle A, B, C ve D vitaminlerince) oldukça zengindir. Bu özellikleri nedeniyle, gelişmekte olan ülkelerde, bölgesel olarak yetiştirilen yemeklik tane baklagiller içerisinde nohut, o yöredeki insanların beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır (Kara 1996).

Nohut kalsiyum, fosfor, magnezyum, potasyum, vitamin-A ve özellikle çocuk beslenmesinde gerekli olan histidin aminoasidi bakımından son derece zengindir. Diğer baklagillerden daha yüksek oranda demir ve kalsiyum içermektedir (Azkan 1999).

Nohut   lat  p p  irilmek suretiyle doğrudan yemek yap n nda kullan dd   gibi, ekmek mayası ve şalgam suyu hazırlamada da kullanılmaktadır. Ayrıca, bazı yörelerimizde ( zellikle Güney ve Doğu bölgelerimizde) kavrulup     t lerek kahve benzeri bir içecek olarak da tüketilmektedir. Orta Asya, Orta Doğu ve Afrika  lkelerinde nohuttan  el tli fermente ürünler üretildiği bilinmektedir. Özellikle Hindistan da, nohuttan yapılan *dhokla*, *dosa* ve *idli* olarak bilinen kızartma ve meze türündeki yiyecekler yayın olarak tüketilmektedir (S    2003).

Diğer taraftan insanlar tarafından leblebi olarak ve samanı da değerli bir hayvan yemi olarak tüketilmektedir (Kara 1996).

Nohut mayası ekmek ülkemizde yayın olarak Ege bölgesi, Trakya bölgesi ve k  men de iç Anadolu ve Akdeniz bölgesinin bazı kesimlerinde evlerde üretilmektedir. Ege bölgesinin bazı illerinde ticari olarak nohut mayasından ekmek, peksimet ve simit üretimi yapılmaktadır. Ayrıca bu ekmek Yunanistan ve Makedonya da da yapılmakta ve  nohutlu ekmek  veya  eftazymo  olarak adland  lmaktadır (Hatzikamari *et al.* 2007a).

Geleneksel bir ürünümüz olan nohut mayası halk arasında veya az sayıda küçük f  nlarda fark l yöntemlerle hazırlanmaktadır. Geleneksel olarak nohut mayası bir miktar k     nohut üzerine kaynatıp 45-50 C ye soğutulmuş su ve bazen bir miktar tuz eklenerek hazırlanır. Yakla  k 37-40 C s cak  ta 15-16 saat fermentasyona

bırakıldıktan sonra elde edilen maya sevese hamur hazırlanmasında kullanılmaktadır (Tamerler 1975; Saka 2003).

Ülkemizin bazı bölgelerinde tatlı maya olarak da bilinen bu maya, çok özel bir doğal maya olup ekmeğinin tadına doyum olmaz. Oldukça sıcak ortamlarda gelişebildiğinden ve hiç maya ilave etmeden hazırlandığından, çok nazlı bir mayadır ve tutturulması biraz güçtür. Sadece nohut kavruları, un, tuz ve suyla hazırladığından mayanın tutması biraz da uzun sürmektedir (Anonymous 2005).

Ekmeğin yapışmasında kullanılan nohut mayası hamurun daha yumuşak olmasını ve kolay ilenmesini sağlarken, iç ve dış kabuk rengini, pırlama ilmini ve elde edilen ekmeğin tat ve aroması ile tekstürel özelliklerini olumlu yönde etkilemektedir. Nohut mayası kullanarak yapılan ekmeklerde hem nohut mayası (nohut süzütüsü) hem de nohut mayası hamurunda gelişen mikrofloradan dolayı ya da maya ile yapılan ekmeklere göre farklı tat ve aroma maddeleri oluşmaktadır (Özkaya 1992).

Doğal maya yapışmasında kullanılan hammaddenin özelliğine bağlı olarak maya oluşumu bir ya da birkaç gün almaktadır. Bu süre içinde, ayrıca bir ticari maya ve katkı maddesi ilavesine gerek kalmadan, doğal mayanın ana malzemeleri (kuru üzüm, yoğurt, süt, sirke, nohut, ferbentiotu) un ve su ile birlikte hamur fermentasyonunu (laktik asit, asetik asit, sitrik asit fermentasyonları) gerçekleştirirler (Yılmaz 2002).

Laktik asit ve asetik asit hamur fermentasyonunda oldukça önemli fermentasyon ürünleridir. Ancak ürüne sakladığı avantajlar nedeniyle laktik asit fermentasyonu daha fazla tercih edilmektedir. Lezzet açısından karlı olduğu için laktik asit, daha hafif ekli özellik taşımakta olup pH'ı düşürmesi nedeniyle antimikrobiyal etkiyi desteklemektedir. Asetik asit ise lezzet açısından daha ekli karakterde olup bu özelliği ile bazı ürünlerde (örneğin; ekli çavdar ekmeği) istenmekle birlikte hafif ekliğin tercih edildiği durumlarda miktarı artırılmaktadır (Salovaara 1998).

Laktik asit bakterileri g         ve hafif alkollü içeceklerin   retiminde uzun yılarda kullan  makla birlikte, özellikle son yılarda çok     tli fermente ürünlerin   retiminde rol oynayan en önemli endüstriyel mikroorganizmalar olarak bilinmektedirler (Batish *et al.* 1997; Ress 1997).

Laktik asit bakterileri ekşi hamur fermentasyonunda anahtar role sahiptirler. Hamurda asitliğin gelişmesi yanında, serbest halde     tli aminoasitleri ve küçük peptitleri hamur ortamına bırakarak diğer mikroorganizmalar  n gelişmelerini ve metabolik aktivitelerini artt    ken, hamurun reolojik özellikleri ile tat ve aroma üzerine de olumlu etkide bulunurlar. Ayrıca, ekmek  n bayatlamasını k  f ve bakteriyel kaynaklı bozulmaları geciktirirler (Martinez-Anaya 1996; Schieberle 1996; Gobbetti 1998; Angioloni *et al.* 2005).

Ekmek fermentasyonunda, tat ve aromasını oluşumunda bakteriyel fermentasyonun da çok büyük önemi vardır. Modern emek   retiminde hamurun ek  itilebilmesi için önemli düzeyde asit üretebilen laktik asit bakterileri hamura inoküle edilmektedir. Nitekim farklı ekmek tiplerinde *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermenti*, *Pediococcus cerevisia*, *Enterococcus faecalis* gibi laktik asit bakterilerinin de faaliyet g  sterdik  i saptanm    t  r (Aydın 2000).

G     endüstrisinde, laktik asit bakterilerinin gelişimi ile birlikte oluşan asidifikasyon ve enzimatik işlemler     tli fermente g        n tat, koku, tekstür özelliklerine etki etmektedir. Tüketiciler tarafından çok kullan  dan fermente g     maddelerinin do    al florasında baskın halde bulunmaları ekzopolisakkarit   retmeleri, starter kültür olarak kullan  malar   probiyotik ürünlere kat  malar  , baz        n bakteriyosin olarak adland    dan özel bir protein   retmeleri ve böylece g    lara raf ömürlerini uzatacak özellikler kazand  malar   bununla beraber g     endüstrisinde sağlamış oldukları bu faydalı özelliklere ek olarak, bazı laktik asit bakterilerinin g    larda bozulmalara sebep olması bu bakteri grubuna olan ilgiyi son yılarda artımı ve bu konu ile ilgili yapıdan ışımalar derinlik kazanmıştır (Rebecchi *et al.* 1998). Bu nedenlerden dolayı laktik asit

bakterilerini tanımlamak gerek endüstriyel açıdan gerekse bilimsel açıdan oldukça önemli hale gelmiştir (Rademaker and de Bruijn 2000).

Yapılan bu çalışmanın amacı laboratuvar şartlarında elde edilen nohut mayası (nohut süzüntüsü) ve nohut mayası hamurundaki laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanmasıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İlk ekmekün üretimi M.Ö. 4000 yıllarına kadar uzanmasına rağmen ilk mayalâ ekmekün üretiminin M.Ö. 1800 yıllarında, eski Mısırda, tesadüfen hamurun kendi haline bırakılmasıyla gerçekleştirildiği bilinmektedir. Bu tip mayalanma; havadan, sudan, undan gelen doğal maya ve bakterilerin yaptığı öspontan mayalanmaôdır. Bu durum daha sonraki çağlarda bazı âlamlardan geçerek ekli hamur yöntemi olarak günümüze kadar gelmiştir. Bir mayalama metodu olarak uygulanmakta olan ekli hamur yönteminin esasē normal kültür mayalarēn yanında havadan ve kullanılan hamur unsurlarēndan gelen yabancı mayalarēn, laktik, sitrik ve asetik asit bakterilerinin faaliyet gösterdiği bir hamur parçasēnē bir sonraki hamurda maya olarak kullanılmaktadır (Ergün ve Ertugay 2003).

Ekli hamur, mayalanmış ekmeklerin en eski ve en özgün İeklidir. Bu hamur parçasē depolanırken, doğal olarak undan gelen laktik asit bakterilerinin (LAB) metabolik aktivitesi nedeniyle laktik asit fermantasyonu meydana gelmektedir (Hansen and Schieberle 2005).

Ekli hamur ekmekinde laktik asit bakterileri mayadan daha düşük konsantrasyonlarda uçucu bileşen üretmektedirler. Laktik asit fermantasyonu esnasında mikrobiyal ya da buğday proteaz aktivitesi, maya tarafından kullanılâabilecek ya da pıdırme sırasında aroma bileşenlerine dönülebilecek olan aminoasitlerin oluşmasına neden olmaktadır (Meignen *et al.* 2001).

Ekli hamurun ekmek aromasē üzerine etkisi üç ana faktöre dayanmaktadır. Bu faktörler; i) asitliğin oluşumu, ii) amino asitler gibi aroma ön maddelerinin oluşumu, iii) uçucu bileşenlerin oluşumudur (Katina 2005).

Yapılan çalışmalar sonucunda buğday ekli hamur ekmeklerinde ürünün karakteristikini önemli ölçüde laktik asit bakterileri ve mayalarēn aktivitesine bağânlē olduğu ortaya

konmuştur. Mayaların ekli maya hamurunun kabarmasından sorumlu olduğu belirtilirken heterofermentatif laktik asit bakterilerinin de tek başlarına yeterli bir kabarma kapasitelerinin olduğu belirtilmektedir. Laktik asit bakterileri ekmeğin elastisitesini, asitliğini ve lezzetini etkilemektedir. Özellikle heterofermentatif laktik asit bakterileri lezzet oluşumundan sorumlu olup hamur ve ekmeğe tipik ekli maya ekmeklerine özgü duyusal özelliklerin oluşturulmasında rol oynamaktadır. Homofermentatif laktik asit bakterileri ise iyi bir kabuk elastisitesi verecek asitliği oluştururken ekmeğin lezzeti üzerinde önemli bir katkıları yoktur (Gobbetti 1994).

Ekli maya starterlerinin laktik asit bakterisi florasını tespit etmek üzere yapılan bir araştırmada, üç ekli maya starteri örnek olarak alınmış, bunlardan elde edilen 245 izolatın belirlenmesi sonucu izolatların üç laktik gruba dahil oldukları belirlenmiştir. İzolatların *Thermobacterium* grubundan *Lactobacillus acidophilus*, *Streptobacterium* grubundan *L. casei*, *L. plantarum*, *L. farciminis*, *L. alimentarius* ve *Betabacterium* grubundan *L. brevis*, *L. brevis* var. *lindneri*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. fructivorans* olarak tanımlanmışlardır. Örneklerdeki laktik asit bakterilerinin sayısının ve oranının değeri belirtilmiştir. A starterinde sadece *L. fructivorans* ve *L. fermentum*, B starterinde *L. brevis* ve *L. brevis* var. *lindneri* nin dominant olmasıyla birlikte çeşitli mikroorganizmalardan oluştuğu saptanırken, C starterinde *L. brevis*, *L. plantarum* ve *L. alimentarius* nin dominant organizmalar oldukları belirtilmiştir (Spicher and Schröder 1978).

Yapılan bir başka araştırmada İsveç'ten tipik çavdar ekli maya hamurunun mikroflorası belirlenmiş, laboratuvar da yapılan araştırmalar sonucu spontan ekli maya fermentasyonu ile hazırlanan hamurun pH değerinin fermentasyon sonunda 4,1 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca laktik asit bakteri konsantrasyonunun 1×10^9 kob/g düzeyinde bulunduğu ve florasında iki tür laktik asit bakterisinin dominant olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada izolatlardan birinin homofermentatif laktobasil türüne ait olduğu belirlenirken diğeri *Pediococcus pentosaceus* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca üründe *Saccharomyces delbrueckii* maya olarak izole edilmiştir. *L. casei* ve *S. rosei* ticari Alman starterinin mikroflorasından izole edilen izolatlar olarak belirlenmiştir. Çoğu ticari starterlerin

mikroflorasının hem heterofermantatif hem de homofermantatif bakterilerinden oluştuğu belirtilmektedir. Heterofermantatif laktik asit bakterilerinin daha ziyade lezzet açısından önemli oldukları homofermantatif laktik asit bakterilerinin ise kabuk elastikliği üzerinde pozitif etkisi olduğu ifade edilmiştir. Bu nedenle de Alman ticari starterlerinde homofermantatif *L. caseinin* dominant olmasının ilginç olduğu belirtilmiştir (Lönner *et al.* 1986).

Kisra Sudan'da geleneksel olarak sorgum ununun fermentasyonu ile üretilen bir ekmektir. Bu kisra ekmeğinin mikroflorasını belirlemek üzere yapılan bir araştırmada, *Lactobacillus fermentum*, *L. reuteri*, *L. amylovorus* ya da *L. fermentum* ve *L. amylovorus* dominant organizmalar olarak *Candida krusei* ise maya olarak izole edilerek tanımlanmıştır. Fermentasyon sonunda bakteri sayısının 9×10^8 kob/g maya sayısının da 10^6 kob/g'a ulaştığı belirtilirken pH'sinin 5,5'den 3,4'e düştüğü saptanmıştır. Fermentasyon süresince maltoz miktarının düştüğü gözlenirken glikoz miktarının arttığı gözlenmiştir. Bu glikoz artışı, nişastanın *L. amylovorus* tarafından hidrolizi sonucunda ortaya çıkan maltozun hidrolizi ile glikozun açığa çıkması sonucu oluştuğu, devamında glikozun *L. reuteri* ve *L. fermentum* tarafından kullanılarak bu zorunlu heterofermantatif organizmaların asetat oluşumundan sorumlu oldukları belirtilmiştir. Hamur fermentasyonu esnasında hamurda çukuru aminoasitin miktarı değişmezken sistein ve metiyonin miktarında azalma, treonin miktarında da artış olduğu saptanmıştır (Hamad *et al.* 1992).

Kuzey İtalya'nın Apulia bölgesinde geleneksel olarak üretilen buğday ekli maya hamurunun mikroflorasını belirlediği bir başka araştırmada; bu örneklerdeki laktik asit bakteri sayısının log 7,5 log 9,3 kob/g arasında değiştiğini ve maya sayısının ise log 5,5-8,4 kob/g arasında değiştiği belirtilmiştir. Bu çalışmada 317 laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Bu izolatların %38'i geleneksel fizyolojik ve biyokimyasal yöntemlerle tanımlanırken, fenotipik tanımlamaları genetik yöntemlerle kanıklanmıştır. Bu izolatların %30'ü *Lactobacillus sanfranciscensis*, %20'si *L. alimentarius*, %14'ü *L. brevis*, %12'si *Leuconostoc citreum*, %7'si *L. plantarum*, %6'sı *Lactococcus lactis*

subsp. Lactis, %4'ü *L. fermentum* ve *L. acidophilus*, %2'si *Weissella confusa* ve %1'ü *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* olarak tanımlanmıştır (Corsetti *et al.* 2001).

İtalya'nın Umbria bölgesine özgü buğday ekli maya hamurunun mikroflorası ile ilgili yapılan bir araştırmada da laktik asit bakterisi florasının %49'unun *L. brevis subsp. lindneri*, %21'inin *L. plantarum*, %14'ünün *L. farciminis*, %4'ünün *L. acidophilus* ve *L. fermentum*, %3'ünün *L. fructivorans* ve *L. alimentarius*, %2'sinin *L. brevis* olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada maya florasının %66'sının *Saccharomyces cerevisiae*, %17'sinin *Candida krusei*, %16'sının *S. Exiguus* ve %1'ünün *Hansenula anomala*dan oluştuğu belirtilmiştir. Tanımlanan izolatların %92'sinin maltozu, %60'sinin fruktozu, %31'inin sakarozu fermente ettikleri belirlenmiş ve tüm laktik asit bakteri izolatlarının da glikozu kullandığı belirtilmiştir. Çalışma sonunda kokledeki laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinslerine rastlandığı ve bunların ekli maya hamurunda daha seyrek bulunduğu belirtilmiştir (Gobbetti 1994).

Geleneksel Fransız ekli hamurunda yapılan bir çalışmada da bakteri ve maya izole edilmiştir. Maya izoleleri *S. cerevisiae* (%46,6) ve *Candida milleri* olarak tanımlanmıştır. Laktik asit bakterileri olarak *Lactobacillus ssp*; *L. plantarum* (%52), *L. brevis* (%14), *L. buchneri* (%8) ve *L. casei alactosus* (%8), ikinci derecede önemli laktik asit bakterileri *L. casei casei* (%6) ve *L. casei rhamnosus* (%2) olarak bulunmuştur (Boraam *et al.* 1993).

Böcker (1995), ekli hamur starterlerini kullanarak yapılan ekli hamurun 3 farklı tipinin mikroflorasını araştırmıştır. Sıvı starterler tarafından fermente edilen ekli hamurlarda *L. reuteri*, *L. pontis* ve *L. sanfrancisco* başlı türler olarak tespit edilmiş, kurutulmuş starterler ile fermente edilen ekli hamurlarda da en dominant türler *L. plantarum*, *L. brevis* ve *Pediococcus pentosaceus* olarak bulunmuştur.

Dört ekli hamur sponge örneğinde laktik asit bakterilerinin kalitatif ve kantitatif özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada her bir sponge'da *Lactobacillus* cinsinin bir

veya iki türü bulunmuştur. Bu türlerden *L. reuteri* ve *L. curvatus* San Francisco ekli hamur spongeasında, *L. brevis* ve *L. hilgardii* İtalya'da üretilen Panetton ekli hamur spongeasında, *L. sanfrancisco* Almanya'da üretilen çavdar ekli hamur spongeasında, *L. casei* ve *L. curvatus* ise İsviçre'de üretilen çavdar ekli hamur spongeasında bulunmuştur (Okada *et al.* 1992).

Yapılan bir başka araştırmada geleneksel Portekiz ekli hamurunun mikrobiyolojik profili belirlenmiştir. Bu çalışmada 400'den fazla tür izole edilmiş, baskın gruplar mayalar ve laktik asit bakterileri bulunmuştur. En sık izole edilen mayalar *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida pelliculosa* olmuştur. En sık izole edilen laktik asit bakterileri laktobasiller içinde *Leuconostoc spp.*, *Lactobacillus spp.*; *L. brevis*, *L. curvatus* ve *L. lactis ssp. Lactis* en baskın türlerdir ve laktokoklardan *Lactococcus lactis ssp. Lactis*, Enterekoklardan *Enterococcus caseliflavus*, *E. durans* ve *E. faecium*, Streptokoklardan ise *Streptococcus constellatus* ve *S. equinus* en baskın türler olduğu belirlenmiştir. Belirlenen 421 izolattan 131'i ekli hamurdan alınmıştır ve bunlar 48 farklı tür olarak tespit edilmiştir (Rocha and Malcata 1999).

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, tabiatta çok yaygın olarak bulunduğu bilinen laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar da başlamıştır. İlk kez 19. yüzyıl sonlarında sütte fermentasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda Lactobacillaceae familyası içinde sınıflandırılmışlardır (Çon ve Gökalp 2000).

Laktik asit bakterileri (LAB) karbonhidrat fermentasyonu sonucu laktik asit oluşturan bakterilerdir. Farklı optimum büyüme sıcaklıklarına ihtiyaç duymakta olan LAB'nin uygun büyüme için kompleks bir besi yerine ihtiyacı vardır. Bu yüzden LAB'nin besin maddesince zengin besi ortamlarında kültüre alınmaları zorunluluk arz etmektedir. LAB genellikle fermente gıda üretiminde kullanılmaktadır. Örneğin yoğurt yapımında *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, peynir yapımında *Lactococcus spp.* LAB yaygın olarak kullanılmaktadır. LAB'nin pek çoğu insan, hayvan ve bitki gibi doğal ortamlarda bulunurlar. Belirli bir çevreye adapte olmuş gibidirler ve hemen

hemen her doğal habitatta bulunurlar (örneğin süt, sıcakkanlığarın bağısağı, dđkđ dudaklar, meyve ve sebzeler). Bu alandaki bilgiler eksik olmasına rağmen İöyle bir genellełtirmeye gidilebilir. *Streptococcus* cinsine ait türlere; insan, hayvan ve kułlarda rastlanabilir. *Lactobacillus* türleri daha çok insan, hayvan ve bitkilerle beraber bunların bulunduğu doğal ortamlarda bulunabilir. *Pediococcus* türleri ise ancak bitkilerde bulunurlar. *Leuconostoc* türleri de genellikle süt ürünlerinde ve sebzelerden izole edilebilir. Bazı LAB alt türleri insan sindirim sisteminde ve fermente gđdalarda bulunur (Klein *et al.* 1998).

Laktik asit bakterileri, tabiatta yaygın oluğları çeşitli gđda maddelerinde sıkça rastlanđan bozulmalara neden olmaları ve bazı gđdaların üretim ve olgunlaıtđmasında önemli rol oynamaları nedeniyle ile gđda teknolojisinde büyük önem tağınmaktadır (Çon ve Gökalp 2000).

Laktik asit bakterileri glikoz metabolizması sonucunda ürettikleri son ürüne bağlı olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (Ünlütürk ve Turantalı 2003).

1) Heksoz İekerlerin fermentasyonu sonucu birincil derecede laktik asit üreten türlere homofermentatif laktik asit bakterileri adı verilmiştir. Homofermentatif laktik asit bakterilerinin homolaktik karakteri ortamın pH'sı, besin maddeleri ve glikoz konsantrasyonu gibi kültürel koğulların değiğmesiyle farklılık gösterebilir. Homofermentatif özellik heksoz sekerlerin metabolizmasında gözlenir. Bazı homofermentatif laktik asit bakterileri pentozları kullanarak asetik asit ve laktik asit üretebilirler. Bu gruba dahil laktik asit bakterileri heterofermentatif laktik asit bakterilerine kıyasla iki kat daha fazla enerji üretebilmektedirler.

2) Metabolik faaliyetleri sonucu heksozlardan laktik asit, CO₂, ve etanol üreten laktik asit bakterileri ise heterofermentatif laktik asit bakterileri olarak adlandırılırlar. Heterofermentatif türler asetaldehit ve diasetil gibi tat ve aroma maddelerinin üretimi açısından önem tağılırlar.

Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri genetik ve fizyolojik farklılıklarından dolayı glikozu farklı metabolik yollar izleyerek kullanmakta ve farklı son ürünler üretmektedirler. Homofermentatif laktik asit bakterileri heksoisomerase (glukoz fosfat isomerase) ve aldolaz enzimine sahipken, fosfoketolaz enzimini içermezler ve Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) metabolik yolunu izleyerek bir molekül glikozdan iki molekül laktik asit üretirler. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise bunun tam tersi heksoisomerase ve aldolaz enzimi yerine fosfoketolaz enzimine sahiptirler. Bu gruba giren laktik asit bakterileri glikozun yavaşında EMP metabolik izyolu yerine fosfoketolaz glikolitik izyolunu kullanır (Ünlütürk ve Turantalı 2003).

Bu ana kadar tanımlanmış ve laktik asit bakterileri grubuna dâhil edilmiş mikroorganizmaların bazı genel özellikleri şöyledir:

- a) Bu mikroorganizmalar gelişebilmek için aminoasitler ve B grubu vitaminler gibi besin öğeleri ile purin ve pirimidin bazlarına ihtiyaç duyarlar.
- b) Çoğu mezofilik mikroorganizmalardır. Ancak bazıları 5°C'nin altında, termofilik türler ise optimum 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilirler.
- c) Bu mikroorganizmaların çoğu optimum 4,0-4,5 pH'da gelişebilmelerine rağmen bazıları 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH'da da gelişebilmektedir.
- d) Ayrıca bu mikroorganizmaların bazıları zayıf proteolitik ve lipolitik özelliklere sahiptir (Ünlütürk ve Turantalı 2003).

Morfolojik ve fizyolojik özellikler, bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterdir. LAB'lerinin cins ve türlere göre değişmekle birlikte genel olarak kok, düzgün çubuk ve düzensiz çubuk olmak üzere üç farklı morfolojik görünimleri vardır. LAB'ini tanımlamada ilk olarak kullanılan karakterler; sütte ve diğer besin ortamlarına alandıklarında oluşturdıkları laktik asit miktarı minimum, optimum ve maksimum gelişme sıcaklığı, oksijene tolerans, farklı NaCl konsantrasyonuna gösterdikleri tolerans, gaz ve uçucu aroma bileşikleri üretmeye yetenekleri ile pH'ya toleranstır. Bununla birlikte laktik asit bakterilerinin sütü asitletirme yeteneği artık ayrıca bir kriter olarak dikkate alınmaktadır. Çünkü laktik asit oluşturma yeteneği potansiyel

olarak stabil olmayan ekstra kromozomal elementlerden olan plazmitlere kodlanabilir. Bakterilerin ayrışmada önemli bir ipucu da onların gelişme sıcaklıklarıdır. Sıvı besi yerinde 50°C'de gelişme, *Enterococcus faecium*ü diğer enterokoklardan ayrılmaya yarar. *Lactococcus lactis ssp. cremoris* de diğer laktokoklardan 40°C'de gelişmeme özelliğiyle ayrılır. Laktik asit bakterileri ve gıda fermentasyonu öteden beri bilim adamlarının dikkatini çekmiş, Pasteur 1857 yılında gıda fermentasyonu ile ilgili çalışmalar yapmıştır. 1873 yılında Fischer ilk bakteri kültürünü izole etmiş, bu çalışmalardan sonra saf LAB kültürü Joseph Lister tarafından, *Bacterium lactis* olarak izole edilmiştir. Laktik asit bakteri sınıflaması son 10-20 yıl içerisinde değişim göstermektedir. Çünkü bu süreç öncesinde, orijinal bakteri sınıflaması bakterilerin morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre yapılmaktaydı Bunlara ilaveten hücre duvarı kompozisyonu, hücre yapısı oranı ve hücrenin diğer özellikleri sınıflamada kullanılmıştı (Stiles and Holzapfel 1997). Büyüme koşulları hücre morfolojisini önemli derecede etkilemektedir. Genetik analiz sonucunda *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* olarak sınıflandırılan bakteri *Lactobacilli xyloso* olarak sınıflandırılmaktaydı (Schleifer *et al.* 1985). LAB, 11 cins (*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Qenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, ve *Weissella*) içermektedir (Van Damme *et al.* 1996).

Lactobacillus türleri Gram (+), anaerobik veya fakültatif aerobik, spor oluşturmeyen çubuk şeklinde ve çok farklı kaynaklardan izole edilebilen bakterilerdir. Genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinirler (Wang *et al.* 2009) Fermentasyon sonunda oluşan ürünlere göre homofermantatif ve heterofermantatif türleri bulunmaktadır. Kromozomlarındaki nükleik asit kompozisyonunun %33-55'ini G+C(guanin ve sitozin) oluşturmaktadır (Stiles and Holzapfel 1997). Bunların çoğu bağırsak florasında yaşarlar. Bu bakteriler bağırsak hastalıklarının engellenmesine, istenmeyen patojenlere karşı antimikrobiyal maddelerin üretilmesine, kolon kanserinin baskılanmasına, vitaminlerin sentezlenmesine ve besinlerin sindirilmesine yardımcı olur (Wang *et al.* 2009)

Lactobacillus biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından oldukça fazla çeşitlilik içeren üyelerine sahip bir cinstir. Beslenme istekleri de oldukça kompleksdir (Weiss *et al.*

1984). *Lactobacillus* türlerinden biri olan *Lactobacillus plantarum*ın uç kışınlarē yuvarlak çubuk seklinde genellikle 0,9-1,2 μ m ende, 3-8 μ m uzunlukta, tekli, ikili veya kışa zincir seklinde bulunur. Hareketlilik ve flagella normalde yoktur, fakat yan flagellalē suıllarda hareketlilik belirlenmiıtır (Yaygēn ve Kēēç 1993). *Lactobacillus plantarum* diēer laktik asit bakterilerinden daha yüksek asit tōleransına sahiptir (Lu *et al.* 2003). *Lactobacillus plantarum* hayvan baēşak sisteminde taze ve fermente sebzelerde, ette ve balēkta bulunur (Fernandez *et al.* 1999).

Lactococcus laktik asit bakteri grubuna dahil kok İeklindeki bakterilerdir. Küre ya da kışa zincir halinde bir araya gelen koklar morfolojik görüntüyü oluıturur. Zincir uzunluēu türlere göre deēilir. Laktokoklar laktozu L (+) laktik aside çevirir. Gaz oluıumu gözlenmez. Optimum geliıme sıcaklıkē 30°C'dir. Süt ve bitki ürünlerinde bulunurlar. 10°C'de geliıebilmelerine karııē 45°C'de geliıemezler (Holt *et al.* 1994). Orla Jensen tarafından 1919 yēında yapıdan sēēflandēma neticesinde mezofilik laktik streptokok olarak *Streptococcus* cinsine dāhil edilmililerdir. Daha sonra patojenik streptokoklardan serolojik N antijen grubuna sahip olmalarē ile ayrılmēılardē. Teuber tarafından 1995ōde aēēklanan taksonomik sēēflandēmada *Lactococcus* olarak isimlendirilmililer ve diēer gruplardan ayrılmēılardē (Teuber 1995).

Lactococcus türlerinden biri olan *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*ın oval hücreleri 0,5-1,0 μ m ve düzgündür. İkili formu kışa zincir formuna göre daha sēēklēla bulunur. Bazē suıllarē uzun zincir oluıturur. Son geliıme pHōēē glukoz buyyonunda 4,0-4,5'dir. Proteolitik aktiviteye sahiptir. Mannitol, trehaloz, sakkaroz, arabinoz, ksiloz, laktoz, maltoz ve glukozdan asit üretir. Rafinoz, inülin, gliserol veya sorbitolēden asit oluıurmaz. Bazē suıllar nisin üretir (Hirsch and Grimsted 1951; Hirsch *et al.* 1951).

Birēok Gram (+) bakteriyi inhibe eder. %4 NaClōde geliıir. %6,5'da gelismez. 9,2 pHōda gelisir, 9,6'da ise gelisme göstermez. Bazē türleri lösiniē 3-metilbutanolē dönüştürür ve malt tadē olusturur. Besin istekleri çoktur. 4-5 vitamin, 10-13 aminoasidi sentetik besiyerlerinde isterler. Purin ve pirimidiniē stimülatör olarak kullanēlar. Optimum

gelişme sıcaklıkları 30°C'dir. Bazı türler 41°C'de gelişmez, 45°C'de ise hiç gelişme göstermez. DNA'sındaki % G+C oranı 38,4-38,6 mol'dür (Kâç 2001).

Laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc* türlerinin fermentasyon kapasiteleri monodisakkaritler ile sınırlı olup heterofermantatif laktik asit bakteri grubuna dahillerdir. Fermentasyon sonucunda D-laktat ve ethanol yanında gaz oluşumu gözlenir. Süt, peynir ve et gibi fermente ürünlerin oluşumunda ve organoleptik adı verilen tat, koku gibi özelliklerin kalitesinin belirlenmesinde önemli role sahiptirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C'dir (Holt *et al.* 1994; Dellaglio *et al.* 1995; Budde *et al.* 2003).

Enterococcus türleri oksijen kullanıma bakılmadan fakültatif anaerob bakterilerdir. Farklı karbonhidrat formlarını metabolize ederek L (+) laktik aside çevirir, fakat gaz oluşturmazlar. Son pH aralıkları 4,2-4,6 arasındadır. Optimum gelişim sıcaklıkları 37°C'dir. 10-45°C sıcaklık aralığında, pH: 9,6'da, %6,5 NaCl'de ve %40 tuzda gelişim gösterebilirler. Katalaz negatif özellik yansımalarına rağmen bazı türleri yalancı katalaz aktivitesi verebilir (Domig *et al.* 2003). Diğer türler kadar gıda endüstrisi açısından önem taşımamaktadır. Güney Avrupa'da bazı yöresel peynirlerde bulunmuştur. Tuza olan toleransları, hızlı asit üretimleri, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmaları starter kültür olarak kullanılmaları için idealdir. Özellikle probiyotik kültürlerde kullanımı bulunmaktadır (Franz *et al.* 2003). Enterokoklar da Laktokoklar gibi *Streptococcus* cinsi içinde sınıflandırılmışlardır (Holt *et al.* 1994).

Pediococcus türleri laktik asit bakterileri arasında mikroskop altında tetrad morfoloji gösteren gruptur (Stiles and Holzapfel 1997). Uluslararası Sistemik Bakteriyoloji Komitesi tarafından *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus halophilus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus cerevisiae* ve *Pediococcus dextrinicus* olmak üzere 7 türle temsil edilmektedir. (Raccach 1987). LAB'lerinin tanımlanmasında kullanılan metotlar genel olarak fenotipik ve genotipik metotlar olmak üzere iki temel başlıkta incelenmektedir. Suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen ekspresyonunun ürününü karakterize eden (gözlemlenebilir karakterleri) ve genelde cins tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlayan geleneksel

fenotipik metotlar arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik/ biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hücrel yağ asitleri, mikolik asit, polar lipidler, quininler, poliaminler, hücre duvar bileşikleri, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvar proteinlerinin elektroforetik patternleri (1D ya da 2D) yer almaktadır. LAB identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler bakterilerin cins ve tür bazında ayrım için halen önemli bir rol oynasa da yorumlaması oldukça zor olan bu teknikler aynı zamanda zaman alıcı ve moleküler metotlar ile karşılaştırıldıklarında ise daha az ayrıntı gücüne sahiptir (Temmerman *et al.* 2004).

Organizmanın genetik yapısının analizini temel alan genotipik metotlar ise DNA örneği yüzlerce fragmanlarına ayıran enzimler ile kromozomun kesimine dayanan DNA restriksiyon paternlerindeki polimorfizmini ve ekstrakromozomal DNA'nın varlığını ya da yokluğunu içeren çalışmalardır. DNA temelli teknikler, kullanılan tekniğin tipine bağlı olarak mikroorganizmaların cins seviyesinden suş seviyesine kadar identifikasyonunu sağlayabilmektedir. Nükleotit sekanslarının kullanımı içeren bu teknikler oldukça hızlı teknikler olup besi ortamındaki değişikliklerden etkilenmemeleri bakımından fenotipik identifikasyon metotlarına kıyasla oldukça önemli avantajlar sunmaktadır (Moschetti *et al.* 1998; Bush and Nitschko 1999).

Geleneksel olarak Nohut mayası 10-15 °C'de hazırlanır. Bir miktar kepekli nohut üzerine kaynatıldıktan sonra yaklaşık 45-50°C'ye kadar soğutulmuş su ilave edilir (Ayrıca isteğe bağlı olarak yaklaşık 1gr tuz da eklenebilir). Bu karışım yaklaşık 37-40°C'de 15-16 saat fermentasyona bırakıldıktan sonra süzülür ve elde edilen maya sıvısı hamurun hazırlanmasında kullanılır (Seker 2003). Yapılan bir çalışmada nohut mayasının pH değeri 3,85 olarak ölçülmüştür. Bu pH'da ki nohut mayasının hamura katılmadan önce ekli bir tat ve keskin aromaya sahip olduğu belirtilmektedir. Nohut mayası asit ortamın gelişmesine yardımcı olarak pH'ı düşürmekte ve ekmek aromasını geliştirmektedir. Asitliğin fazla gelişmesi tat ve aromayı olumlu etkilerken yüksek hacme sahip nohut ekmeği üretimini zorlaştırmaktadır. Düşük ortam pH'sının (yüksek asitlik gelişimi),

hamur fermentasyonunun da uzun olmasının etkisi ile hamurda oluŖan baŖlarē zayıflattıŖē ve hamur hacminin dūlmesine yol aŖtıŖē söylenebilir (Baykara 2006).

Nohut mayasē ticari mayaya göre hamuru kēsa sürede fermente edebilecek fonksiyonel yapē ve bu yapēyē saŖlayan enzimlere (invertaz enzimi, maltaz enzimi, zymas enzimi) sahip deŖildir. Ayrēca, nohut mayasē (nohut süzüntüsü) ve nohut mayasē hamurunda geliēen laktik asit bakterilerinin bir kēsmē glikozdan gaz üretebilecek özelliēe sahip olmayēp homofermantatif yapēya sahiptirler. Bunlardan dolayıē nohut mayasının hamur iēerisindeki ēekerleri parçalamasē ve CO₂ oluŖturma süresi oldukça uzun sürmektedir (Baykara 2006)

Geleneksel olarak yapēdan nohut ekmeēi İu ēekilde hazēlanē. Hazēlanmē nohut süzüntüsü, 500 g una eklenir. Ekmek yapēnēda kullanēacak unun su kaldēma miktarēndan ilave edilen nohut süzüēü miktarē ēēkarēarak, hamura ilave edilecek su miktarē hesaplanē. Un, su ve nohut süzüēü 500 devirde yoēurma makinesinde yaklāēık 4 dakika yoērulur. Elde edilen hamurun 400 g dēē parçasē elle ēekil verilip hafifēe yaklanmē tavaya yerleētirilir. 40°C'dē 4 saat fermente edilir. Fermentasyon sonunda hamur 200°C'dēlik fēēda 20 dakika pīirilir (Sēēē2003).

Yapēdan bir araētēmada %100 pres mayasē %0,5 Pres mayasē+Nohut Mayasē ve % 100 Nohut Mayasē ile yapēdan ekmekler karēlaētērmē tē (Baykara 2006).

Bu araētēma sonuçlarēna göre; nohut ekmeēi (%100 nohut mayalē) hamur fermentasyonu sonucunda, sēē bir iēyapē ve sert bir kabuēa sahip olduēu iēin sēē iēyapē ve sert kabuk yapēē pīlme sēasēda ekmekte olan buharlaēmanın az olmasē ve muhafaza süresince de nemin ekmek iēinde uzun süreyle tutulmasēda etkili olmuŖtur. Ekmek iēi sēē bir yapē gösterdiēi iēin, ekmek iēi yoēunluēu arttēēa, ürünün ēiēnenebilirliēi azalmaktadır. Nohut mayasēnē kullanēdēē ekmek örnekleri de aēēda ēiēneme özelliēi bakānēndan kontrol ekmeēinden daha dūlük puanlar almē tē. Nohut mayasēdan yapēdan ekmeklerde ekmek iēi rengi kontrol ekmeēine göre nispeten daha koyu ēēkmē tē. Bununda nohuttan gelen renk

pigmentlerinin maya yoluyla ekmeğe geçmesinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Ekmek içi rengi üzerine etkili olabilecek bir diğer faktör ise fermentasyon aşamasıdır. Fermentasyon sırasında enzimatik aktiviteye sahip mayaların kullanılması ile ekmek içi yapışının yoğunluğu azalmakta, homojen ve iri gözenekler oluşmakta ve ürünler daha açık ekmek içi rengine sahip olmaktadırlar. Nohut mayası hamuru ile yapılan araştırmada ekmek içi renk değerlendirmesinde, kontrol ekmeğinden farklı olarak nohut mayası ile yapılan ekmek örneklerinin de ekmek içindeki hafif sarımsı renk daha cazip bulunmuştur. Ekmek içi rengi bakımından en fazla beğeniyi ise %100 nohut mayasından yapılan ekmek örneği kazanmıştır. Tat ve aroma yönünden de, %0,5 pres maya+nohut mayasından yapılan ekmek hafif ekşimsi karakterdeki aroma/tat profili ile daha fazla tercih edilmiştir. Yapılan ekmekler hacim ve şekil simetrisi bakımından karşılaştırıldığında ise kontrol ekmeği (%100 pres maya), daha fazla kabul görmüştür. Kabuk rengi bakımından ise nohut ekmeği koyu kabuk rengi ile kontrol ekmeğinden daha yüksek puan almıştır. Pişme düzgünlüğü, kabuk düzgünlüğü ve kenar özellikleri bakımından ekmekler arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir. Nohut mayası ile yapılan ekmeklerin kabuk rengi, kabuk düzgünlüğü, ekmek içi rengi, tat ve aroma yönünden beğenilmiştir. Hacim, şekil simetrisi ve ekmeğin çıkışına bilirliliği açısından ise beğenilmemiştir. Bu nedenle pres maya ile kombinasyon halinde kullanılması daha fazla tercih edilir (Baykara 2006).

Nohut mayası ile hazırlanan ekmeklerde karbonil bileşiklerden propionaldehit, n-bütiraldehit, etilbütiriketon uçucu organik asitlerden de asetik asit, propionik asit, i-valerik asit, krotonik asit gibi aroma maddeleri saptanmıştır. Söz konusu bu aroma maddelerinin konsantrasyonları gerek ekli maya gerekse ticari (yal-pres) maya ile hazırlanan ekmeklerden daha yüksek olup nohut ekmeğinin karakteristik tat ve aromasını kazanmasında etkili olmaktadır (Sak 2003).

Nohut mayası ile hazırlanan ekmekler daha çok özel günlerde ve belli bir damak tadı arayanlar için vazgeçilmez niteliktedir. Ancak bu tadın, aromanın ve metodun yaratılması da bizlerin sorumluluğundadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Un

Hamur hazırlamak için piyasadan temin edilen Tip 1 un kullanılmıştır. Kullanılan unun özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Una ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları

Un Özellikleri	Değerler
Nem (%)	13,48
Ham Protein (%) *	11,6
Düğüme Sayısı(FN), (sn)	673
Seydarma Sayısı(LN)	9,6
Kül (%) *	0,425
Su Kaldırma (%)	60,3

* Kuru madde esasına göre

3.1.2. Nohut

Nohut mayası (nohut süzüntüsü) hazırlamak için piyasadan temin edilen sert yapılı pKoçbaşı olarak adlandırılan nohut çelidi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Un analizleri

Unda azot tayini Kjeldahl yöntemiyle yapılmış, protein miktarı 5,7 çarpım faktörü ve kuru madde esasına göre verilmiştir (Anonymous 1972). Unda kül miktarı tain edilmiş ve sonuç kuru madde esasına göre belirtilmiştir. (Anonymous 1967). Farinografta su kaldırma ICC 115'e göre tespit edilmiştir. Dölme sayışı sivilma sayışı ve nem miktarı tayinleri Elgün vd. (2002) tarafından belirtilen yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2. Nohut mayası (nohut süzütüsü) ve nohut mayası hamuru hazırlanması

Sert yapıya sahip 100 g nohut buğday iriliğinde kışmış ve steril ııeye konulmuştur. Kışmış nohut üzerine 1 g tuz ve kaynatıldıktan sonra 50°C soğutulmuş 350 ml su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu karışım 40°C'de 16 saat fermente edilmiştir. Fermantasyon sonunda nohut kışıkları süzülerek ayrılmış ve elde edilen nohut süzütüsü hamur hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanan nohut süzütüsü, 500 g una eklenmiştir. Ekmek yapımında kullanılacak unun su kaldırma miktarından ilave edilen nohut süzütüsü miktarı çıkarılarak, hamura ilave edilecek su miktarı hesaplanmıştır. Un, su ve nohut süzükü 500 devirde yoğurma makinesinde yaklaşık 4 dakika yoğrulduktan sonra elde edilen hamura ıekil verilerek hamur 40°C'de 4 saat fermente edilmiştir.

3.2.3. pH değerinin belirlenmesi

3.2.3.a. Nohut mayasında (nohut süzıntüsünde) pHnın belirlenmesi

Süzıntüden paralelli olarak örnekler alandıktan sonra pH değeri pHmetre (ATI ORION 420, MA 02129, USA) ile okunarak belirlenmiştir.

3.2.3.b. Nohut mayasėhamurunda pHnın belirlenmesi

Fermente olmuş hamur örneklerden 10 gr gram paralelli olarak tartıp üzerine 100 ml saf su ilave edilerek UltraTurrax (IKA Werk T 25, Germany) ile 1 dak. homojenize edildikten sonra pH değeri pHmetre (ATI ORION 420, MA 02129, USA) ile okunarak belirlenmiştir. pH metre kullanmadan önce uygun tampon çözeltiler (pH 4,0 ve pH 7,0) ile kalibre edilmiştir.

3.2.4. Mikrobiyolojik analizler

3.2.4.a. Nohut mayasė(nohut süzıntüsü)

Nohut süzıntüsünden direkt numune alıp steril serum fizyolojik (%0,85 NaCl) kullanarak uygun dilüsyonlar hazırlanmıştır.

3.2.4.b. Hamur

Fermente hamur örneğinden 25 g steril plastik torbaya tartılmış, üzerine 225 ml steril fizyolojik su (%0,85 NaCl, Merck) ilave edilerek Stomacherde (Lab Stomacher Blander 400-BA 7021, Sewardmedical, England) 1 dakika homojenize edilmiştir. Daha sonra bu homojenattan steril serum fizyolojik (%0,85 NaCl) kullanarak uygun dilüsyonlar hazırlanmış ve aşağıda belirtilen sayımlar yapılmıştır.

3.2.5. Laktik asit bakteri sayımı

Laktik asit bakteri sayımı için MRS Agar ve M17 Agar besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan MRS Agar plaklarına yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. 30°C'de 48 saatlik anaerobik inkübasyondan sonra, katalaz (-) koloniler dikkate alınarak laktik asit bakteri sayısı saptanmıştır.

3.2.6. Enterobacteriaceae sayımı

Uygun dilüsyonlardan VRBD (Violet Red Bile Dextrose) Agar plaklarına 0,1'er ml aktararak yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petri plakları anaerobik şartlarda 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonucunda 1mm'den büyük koloniler sayılarak Enterobacteriaceae sayısı tespit edilmiştir.

3.2.7. Toplam aerob mezofil bakteri sayımı

Toplam aerob mezofil bakteri sayısının belirlenmesi için Plate Count Agar (Oxoid CM 325) besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan yüzeye yayma yöntemiyle ekimler yapılmış ve 30°C'de 2 gün inkübe edildikten sonra sayı belirlenmiştir.

3.2.8. Laktik asit bakterileri izolasyonu ve identifikasyonu

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu amacı ile her bir örnekten MRS (de Man Rogosa Sharpe) Agar (Oxoid CM0361) ve M17 Agar besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmış, plaklar 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda MRS Agar ve M17 Agar besiyerinde gelişen kolonilerden rasgele 15 koloni seçilmiş, her bir koloni MRS (Oxoid CM0359) seçme besiyerine inoküle edilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda MRS Agar besiyerine çizim usulü ekim yapılmış, plaklar 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Tek düz kolonilerden saf kültür elde edilinceye kadar çizim usulü ekim ve seçme besiyerine alma işlemlerine devam

edilmiştir. Elde edilen saf kültürlere Gram boyama, mikroskopik görünüm ve katalaz (Bactident katalase, Merck 1.11351) testleri uygulanmıştır.

İzolatlara glukozdan gaz üretimi, arginin hidrolizi testleri uygulanmıştır. İzolatların identifikasyonu için API 50 CHL kiti (bioMérieux® SA, Fransa) kullanılmış, değerlendirme APIWEB™ (apiweb™ stand alone V 1.2.1 Ref 40012, bioMérieux® SA, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. Gram boyama

Temelde bakterilerin hücre çeperi geçirgenliği farkı kullanılarak; bakterilerin gram pozitif ve gram negatif şeklinde iki gruba ayrılmasını sağlayan Gram boyama dört farklı kimyasal reagent kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemi için daha önce saflaştırma işlemleri tamamlanmış olan izolatlar MRS agar petrilerinde çizgi ekim yapılarak tekrar aktifleştirilmiş ve çalışma için 48 saatlik taze kültürler kullanılmıştır. Gram reaksiyonunun gözlemlenebilmesi için; temiz bir lam üzerine bir damla distile su damlatılmış, katı besiyerinde geliştirilmiş olan kültürden öze yardımı ile alınan az miktardaki kültür bu su içerisinde emülsüfiye edilerek tüm lam yüzeyine yayılmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra, üç kez bek alevinden geçirilmek suretiyle fiksasyon yapılmıştır. Fiksasyonu gerçekleştirilen preparat ilk olarak kristal violet ile boyanmış ve 1-1,30 dakika bekletilmiştir. Preparat yüzeyindeki fazla boya distile su yardımıyla giderildikten sonra lügol çözeltisi tüm lam yüzeyine yayılmış ve 1 dakika bekletilmiştir. Fazla boyanın yıkanmasından sonra preparat 10-15 saniyelik %95'lik etil alkol ile muamele edilmiş ve ardından distile su ile tekrar yıkanmıştır. Son olarak preparat 30 saniye süreyle, safranin ile boyanmıştır. Ardından fazla boya distile suyla yıkanarak preparat kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan preparat 40x mikroskopunda immersiyon yağı kullanılarak 100x objektifte incelenmiş ve mevcut renge göre değerlendirme yapılmıştır. Boyama sonucunda mor renkli görülen bakteriler gram pozitif, pembe renkli olanlar ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer vd 1989).

3.2.10. API test kitleri ile tanımlamanın yapılması

API 50 CHL Medium, *Lactobacillus* ve ilişkili cinslerin identifikasyonu için hazırlanmış hazır bir besiyeridir. API 50 CH stribi (kuyucukların grup halinde bulunduğu bant) ile 49 karbonhidratın fermentasyon özellikleri tespit edilebilir. Besiyeri içinde test edilecek mikroorganizma ile bir süspansiyon hazırlanır ve stripteki her tüp inoküle edilir. Inkübasyon sırasında karbonhidratların fermentasyonu ile asidik ortam oluşur ve buna bağlı olarak pH düşer. Bu ortam değişikliği indikatörler sayesinde tespit edilir. Bu sonuçlar izolatın biyokimyasal profilini ortaya koyar ve tanımlama ya da tiplirmede kullanılır.

2-8°C'de muhafaza edilen besiyerleri ve kuyucuklar, kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmelidir ($20 \pm 5^{\circ}\text{C}$). Kullanılacak besiyeri ve süspansiyon şişeleri açılırken dik tutulup, plastik kapak balparmak ile mümkün olduğunca alçak doğru bastırılarak ve plastik kapak düzeltilen kışmından daha doğru ittirilerek kapak içinde kalan ampulün uç kısmının kopması sağlanmalıdır.

API 50 CHL ile identifikasyon için hazırlanmış olan petride üreyen saf bakteri kolonileri steril eküvyon yardımı ile toplanıp 2 ml'lik 6 Suspension medium çözeltisinin içine aktarılır ve bu şekilde yoğun bir stok süspansiyon hazırlanmalıdır.

2 McFarland standardi çalkalanarak bulanıklık elde edilmiştir. Suspension medium 5 ml'lik tüpü ile karıştırılarak, bulanık olan 2 McFarland standardi siyah bir zeminde yan yana tutulmuştur. Hazırlanmış yoğun stok süspansiyondan 5 ml'lik Suspension mediuma damlatılarak her damla sayılmıştır. Bu şekilde 5 ml'lik Suspension mediumda da aynı bulanıklığın elde edilmesi sağlanmıştır. Bulanıklığın elde edildiği damla sayısı not edilmiştir.

API 50 CHL Medium ampulüne (10 ml), 5 ml'deki bulanıklığın elde edilmesini sağlayan damla sayısının iki katı kadar, yoğun stok süspansiyondan damlatılarak tüp iyice karıştırılmıştır.

Bu İekilde hazırlanan inokulum steril pastör pipeti yardımıyla API 50 CH kuyucuklarına, kuyucukların boğazına kadar ve kuyucuklarda hiç hava kalmayacak şekilde dökülmüştür. Kuyucukların boğaz kısmından yukarıya mineral yağ ile doldurulmuş ve kuyucukların bulunduğu tepsinin üstü kapak ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan stripler 30°C'de 48 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuşlardır.

Tüm testler hem 24 ve hem de 48 saat sonra okunmuştur. Standard metoda uygun olarak; besiyeri içindeki bromkresol moru indikatörünün renk değiştirmemesi negatif (-), asidifikasyon etkisiyle sarıya dönmesi pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir. Sadece 25 numaralı kuyucuk (Esculin testi) siyah renkli ise (+), mor ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir. 24. ve 48. saatlerden sonra yapılan değerlendirmeler takip tablosuna isaretlenmiştir. Daha sonra değerlendirme APIWEBTM (apiwebTM stand alone V 1.2.1 Ref 40012, bioMérieux[®] SA, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.11. Katalaz testi

Bu testin yapıldığında incelenecek olan izolatın MRS sıvı besiyerinde geliştirilmiş 24 saatlik kültürden bir öze dolusu alınarak, temiz bir lam üzerinde 1 damla %3'lük H₂O₂ çözeltisi ile karıştırılmıştır. Hava kabarcıklarının çıkması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Harrigan and Mc Cance 1976).

3.2.12. Glikozdan CO₂ oluşumu

Bu test için MRS sıvı besiyerinde geliştirilen 24 saatlik kültür kullanılanıdır. Sitrat içermeyen durham tüplü modifiye MRS sıvı besiyerine 0,1 ml kültür aktarılmış ve 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında durham tüpünde gaz oluşumu, izolatın glikozdan gaz ürettiğini ve heterofermantatif özellikte olduğunu gösterirken, gaz oluşmaması izolatın homofermantatif olduğunu belirtmektedir (Schillinger and Lücke 1987).

3.2.13. Arginin hidrolizi

Bu test için glikoz ve et ekstraktı içermeyen, amonyum sitrat yerine %0,2 sodyum sitrat içeren ve %0,3 arginin eklenmiş modifiye MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. MRS sıvı besiyerinde geliştirilen 24 saatlik kültürden 0,1 ml eklenen besiyerleri, 30°C'de 3 gün inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda 1 ml kültür alınarak içinde 1 ml Nessler ayıracağı bulunan tüpe aktarılmıştır. Rengin portakal sarı-kahverengine dönüşmesine argininden amonyak oluşumunu gösterdiğinden pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Schillinger and Lücke 1987).

4. ARAĞTIRMA BULGULARI ve TARTILMA

4.1. Nohut mayasė(Nohut Sűzűntűsű) ve Nohut MayasėHamurunda Ph Deėilimi

Nohut mayasėnė hazėlanmasėndan baėlayėp, nohut mayasė hamuru elde edilinceye kadar her aėamasėnda farklı pH deėerleri elde edilmiėtir. Çizelge 4.1ėden de gėrűlebileceėi gibi ilk aėamanėn (nohut kėėklarėnėn su ve tuz ile karėtėėmasė) pH deėeri 6,34 olarak saptanmėėtır. Nohut kėėklarė saf su ve tuz ortamėnda 16 saatlik fermentasyona bėrakėldėėında elde edilen nohutmayasėnėn pHė 4,88 olarak bulunmuėtur. Bu durum ortamda geliėen mikroorganizmalarėn fermentasyona baėlı olarak űretmiė olduėu maddelere baėlanabilir. Nohut mayasėnėn un ile karėtėėėp elde edilen hamurun ilk pHė ۆlçűldűėűnde pH da bir atė gėzlenmiėtir (pH 5,04). Ortam pHėnda gėzlenen bu artėėın sebebi, un ilavesinin yapėmasėndan ileri gelmiė olabilir. Elde edilen hamur 4 saatlik fermentasyona bėrakėldėėında hamurun asitliėi artmė ve son pHė (4.77) ilk pHėna gėre daha dűlűk bulunmuėtur. Bu durum da yine ortamda ki mikrobiyal aktiviteye baėlanabilir. pH űzerine elde ettiėimiz bu sonuėlar diėer araėtėmacėlar tarafėndan belirlenen deėerler ile paralellik taėınmaktadır. Örneėin, Bayfield and Young (1964), Digrak ve zelik (1991) ve zkaya (1992) tarafėndan farklı zamanlarda yűrűtűlen alėmalar sonucunda, fermentasyon sűresi uzadėėa ortamda geliėen maddeler nedeniyle (laktik asit, asetik asit, CO₂ vb.) hamur pHėnda dűlmenin olduėu ve bir sűre sonra pHda ki dűlmenin yavaėlayėp stabil hale geldiėini tespit etmiėlerdir. Yapėan diėer alėmalarda fermentasyona baėlı olarak űretilen laktik asit, asetik asit ve CO₂ın ortam pH sėnė etkilediėini ve bu maddelerden de asitliėin artėėmasėnda en ۆnemli olanėn laktik asit olduėunu gėstermiėtir (Dikbaė 2003; Sėkė 2003).

Nohut mayasė űzerinde yapėan alėmalarda ۆzellikle *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus gallinarum*, *Pediococcus urinae-equi*, *Lactobacillus viridencens* ve *Streptococcus thermophilus* tűrlerinin ve *Saccharomyces cerevisiae*ın ortamda ki faaliyetleri sonucu pHűyėdűlűrdűkleri tespit edilmiėtir (Sėkė2003).

Fermantasyona bağılı olarak ortamın asitliğinin artması birçok avantaj sağlamaktadır. Nohut mayasında gelişen mikroflora gerekse fermentasyon sırasında yeni gelişen mikroflora fermentasyon süresince pH'nın düşmesine yardımcı olmakta, başka bir ifade ile ortamın asitliliğini artırmakta, istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini engelleyerek ve hamura daha belirgin tat ve aromaya kazandırmaktadır (Baykara 2006).

Çizelge 4.1. Nohut mayası ve nohut mayası hamurunda fermentasyona bağılı olarak pH değişimi

	Başlangıç pH	Son pH
Nohut mayası	6,34	4,88
Nohut mayası hamuru	5,04	4,77

4.2. Nohut Mayası ve Nohut Mayası Hamuru Örneklerindeki Toplam Aerob Mezofil Bakteri, Laktik Asit Bakteri ve Enterobacteriaceae Sayılarının Belirlenmesi

Laboratuvar şartlarında elde ettiğimiz nohut mayası ve hamurundan alınan örneklerin materyal ve metot kısmında belirtildiği gibi steril fizyolojik su içerisinde seri dilüsyonları hazırlanıp PCA agar, MRS Agar, M17 agar, ve VRBD agar besiyerlerine ekimler yapılmış ve gelişen koloniler sayılmıştır.

Çizelge 4.2'de görülebileceği gibi nohut mayasında toplam 6,14 log kob/g, nohut mayası hamurunda ise toplam 6,81 log kob/g aerobik mezofil bakteri sayılmıştır. M17 besiyerinde nohut mayası için toplam 6,31 log kob/g, nohut mayası hamuru içinse 6,72 log kob/g bakteri sayısı elde edilmiştir. MRS agarda ise nohut mayasında 6,43 log kob/g, nohut mayası hamurunda 6,76 log kob/g bakteri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki PCA agar, MRS Agar ve M17 besiyerlerinde nohut mayasına oranla nohut mayası hamurunda daha fazla sayıda koloni elde edilmiştir. Bu durum nohut mayası hamurunun 4 saatlik fermentasyon süresine tabi tutulması ve buna bağılı olarak

ortamdaki bakterilerin sayışının artmasıyla açıklanabilir. Çizelge 4.2'de ayrıca MRS agarda M17 agara göre daha fazla sayıda laktik asit bakterisi sayıldığını göstermektedir. Bu doğrultuda, MRS agarın gerek nohut mayası gerekse nohut mayası hamurunda toplam laktik asit bakteri sayışının belirlenmesi için daha uygun olduğunu söyleyebiliriz.

VRBD agar üzerinde Enterobacteriaceae familyası üyelerinin sayımında koloni oluşumu gözlemlenmemiştir. Bu durum laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin yanı sıra ortamın asitliğine de bağlanabilir. Enterobacteriaceae familyası üyeleri düşük pH değerlerine hassas mikroorganizmalar olduklarından dolayı olgunlaşma süresince düşen pH değerine bağlı olarak sayılarına düşmektedir (Kaban 2007).

Çizelge 4.2. Nohut mayası ve hamuru örneklerindeki Toplam Aerob Mezofil Bakteri, Laktik asit bakteri ve Enterobacteriaceae sayıları

	Nohut mayası (16 saatlik fermentasyon sonucunda)	Nohut mayası hamuru (4 saatlik fermentasyon sonucunda)
PCA agar üzerinde toplam aerob mezofil bakteri sayışı (log kob/g)	6,14	6,81
M17 agar üzerinde laktik asit bakteri sayışı (log kob/g)	6,31	6,72
MRS agar üzerinde laktik asit bakteri sayışı (log kob/g)	6,43	6,76
VRBDA agar üzerinde Enterobacteriaceae sayışı (log kob/g)	<1	<2

4.3. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu materyal metot da belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin en temel özelliklerinden olan Gram pozitif ve katalaz negatif reaksiyon gösterme özelliğine sahip olan izolatların laktik asit bakterisi olduğu düşünülerek daha sonraki testlere tabi tutulmuştur. Gram boyama ve katalaz testlerine bazı izolatların tam reaksiyon vermedikleri gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu izolatlar sonraki test işlemlerine tabi tutulmamıştır. Nohut mayasından alınan örnek M17 agar ve MRS agar üzerine yayılmış her iki besiyerinde gelişen kolonilerden toplam 90 tanesi seçilmiştir. Bu koloniler daha sonra saflaştırılmıştır.

90 izolata Gram boyama testi uygulanmış, Gram pozitif reaksiyon veren (lupheli olanlar değerlendirilmeye tabi tutulmadı) 60 izolat ayrıca katalaz testine de tabi tutulmuştur. 60 izolatın hepside katalaz negatif olarak bulunmuştur. Aynı işlemler nohut mayası hamuru içinde sırasıyla uygulanmıştır. 90 izolat Gram boyama testi uygulanmış, Gram pozitif reaksiyon veren (lupheli olanlar değerlendirilmeye tabi tutulmadı) 60 izolat ayrıca katalaz testine de tabi tutulmuştur. Gerek nohut mayasından gerekse nohut mayası hamurundan elde edilen ve katalaz testine tabi tutulan izolatların hepsi katalaz negatif olarak bulunmuştur. Diğer bir ifade ile 60 tane laktik asit bakterisi nohut mayasından 60 tanede nohut mayası hamurundan izole edilmiştir.

Nohut mayasından M17 ve MRS agar üzerinde yapılan izolasyon işlemlerin de morfolojik olarak sadece kok ve basil şeklinde laktik asit bakterilerine rastlandı. Nohut mayası hamurundan bu iki besiyerinde yapılan izolasyon işlemlerinde yine kok ve basil şeklinde bakterilere rastlandı. Nohut mayasından izole edilen bakterilerin 6 tanesi basil diğer 54 tanesi ise kok şeklinde tespit edilmiştir. Nohut mayası hamurundan izole edilen laktik asit bakterilerinin ise 13 tanesi basil 47 tanesi kok olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. M17 agar üzerinde nohut mayasından elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri

izolat kodu	Gram Reak.	Morfolojik özellikleri
M17 S1	+	Kok
M17 S2	*	*
M17 S3	+	Kok
M17 S4	+	Kok
M17 S5	*	*
M17 S6	*	*
M17 S7	+	Kok
M17 S8	+	Kok
M17 S9	+	Kok
M17 S10	+	Kok
M17 S11	*	*
M17 S12	+	Basil
M17 S13	+	Kok
M17 S14	+	Basil
M17S 15	+	Basil
M17S 16	+	Kok
M17S 17	*	*
M17S 18	+	Kok
M17S 19	*	*
M17S 20	*	*
M17S 21	+	Kok
M17S 22	+	Kok

Çizelge 4.3. (devam)

M17 S23	+	Kok
M17 S24	*	*
M17 S25	+	Kok
M17 S26	*	*
M17 S27	+	Kok
M17 S28	*	*
M17 S29	+	Kok
M17 S30	+	Kok
M17 S31	+	Kok
M17 S32	*	*
M17 S33	+	Basil
M17 S34	*	*
M17 S35	+	Kok
M17 S36	+	Kok
M17S 37	+	Kok
M17S 38	+	Kok
M17S 39	+	Kok
M17S 40	*	*
M17S 41	*	*
M17S 42	+	Kok
M17S 43	+	Kok
M17S 44	+	Kok
M17S 45	*	*

*izole edilememiştir.

Çizelge 4.4. M17 agar üzerinde nohut mayasėhamurundan elde edilen laktik asit bakteri izolatlarėnėn morfolojik özellikleri

İzolat Kodu	Gram Reak.	Morfolojik özellikleri
M17 H1	*	*
M17 H2	*	*
M17 H3	*	*
M17 H4	+	Kok
M17 H5	+	Kok
M17 H6	+	Kok
M17 H7	*	*
M17 H8	*	*
M17 H9	+	Basil
M17 H10	+	Basil
M17 H11	*	*
M17 H12	+	Kok
M17 H13	+	Kok
M17 H14	*	*
M17 H15	*	*
M17 H16	*	*
M17 H17	+	Kok
M17 H18	*	*
M17 H19	+	Kok
M17 H20	+	Kok
M17 H21	+	Kok
M17 H22	+	Kok

Çizelge 4.4. (devam)

M17 H23	+	Kok
M17 H24	+	Basil
M17 H25	+	Kok
M17 H26	+	Kok
M17 H27	+	Kok
M17 H28	*	*
M17 H29	+	Kok
M17 H30	*	*
M17 H31	*	*
M17 H32	+	Kok
M17 H33	+	Kok
M17 H34	+	Basil
M17 H35	+	Kok
M17 H36	+	Kok
M17 H37	*	*
M17 H38	*	*
M17 H39	+	Kok
M17 H40	*	*
M17 H41	*	*
M17 H42	+	Basil
M17 H43	+	Kok
M17 H44	*	*
M17 H45	+	Kok

*izole edilememiştir.

Çizelge 4.5. MRS agar üzerinde nohut mayasından elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri

İzolat Kodu	Gram Reak.	Morfolojik özellikleri
MRS S1	+	Kok
MRS S2	+	Kok
MRS S3	+	Kok
MRS S4	+	Kok
MRS S5	+	Kok
MRS S6	+	Kok
MRS S7	+	Basil
MRS S8	*	*
MRS S9	+	Basil
MRS S10	+	Kok
MRS S11	*	*
MRS S12	+	Kok
MRS S13	*	*
MRS S14	*	*
MRS S15	*	*
MRS S16	+	Kok
MRS S17	*	*
MRS S18	*	*
MRS S19	+	Kok
MRS S20	*	*
MRS S21	+	Kok
MRS S22	+	Kok

Çizelge 4.5. (devam)

MRS S23	*	*
MRS S24	+	Kok
MRS S25	+	Kok
MRS S26	+	Kok
MRS S27	+	Kok
MRS S28	+	Kok
MRS S29	+	Kok
MRS S30	+	Kok
MRS S31	+	Kok
MRS S32	*	*
MRS S33	*	*
MRS S34	*	*
MRS S35	+	Kok
MRS S36	*	*
MRS S37	+	Kok
MRS S38	+	Kok
MRS S39	+	Kok
MRS S40	+	Kok
MRS S41	+	Kok
MRS S42	+	Kok
MRS S43	*	*
MRS S44	+	Kok
MRS S45	*	*

*izole edilememiştir.

Çizelge 4.6. MRS agar üzerinde nohut mayasē hamurundan elde edilen laktik asit bakteri izolatlarınēn morfolojik özellikleri

izolat kotu	Gram Reak.	Morfolojik özellikleri
MRS H1	*	*
MRS H2	+	Kok
MRS H3	+	Basil
MRS H4	*	*
MRS H5	+	Kok
MRS H6	+	Basil
MRS H7	+	Kok
MRS H8	+	Basil
MRS H9	+	Basil
MRS H10	+	Kok
MRS H11	+	Basil
MRS H12	+	Kok
MRS H13	+	Kok
MRS H14	+	Basil
MRS H15	+	Kok
MRS H16	+	Kok
MRS H17	+	Basil
MRS H18	+	Kok
MRS H19	*	*
MRS H20	+	Kok
MRS H21	*	*
MRS H22	+	Kok

Çizelge 4.6. (devam)

MRS H23	+	Kok
MRS H24	+	Kok
MRS H25	+	Kok
MRS H26	*	*
MRS H27	+	Kok
MRS H28	+	Kok
MRS H29	*	*
MRS H30	+	Kok
MRS H31	+	Kok
MRS H32	+	Kok
MRS H33	+	Kok
MRS H34	+	Kok
MRS H35	+	Kok
MRS H36	*	*
MRS H37	+	Basil
MRS H38	+	Kok
MRS H39	*	*
MRS H40	*	*
MRS H41	*	*
MRS H42	*	*
MRS H43	*	*
MRS H44	+	Kok
MRS H45	+	Kok

*izole edilememiştir

Nohut mayası(60 adet laktik asit bakterisi) ve nohut mayası hamurundan (60 adet laktik asit bakterisi) izole edilen toplam 120 adet bakteri arginin hidrolizi ve CO₂ oluşturma testlerine tabi tutulmuştur.

Laktik asit bakterilerinin tan nlanmas  oldukça karmaşıktır. Eskiden *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinslerinden oluşan laktik asit bakterileri grubuna, son yıllarda yapılan taksonomik  al malarla mevcut cinslerin revizyonu ve yeni cinslerin tan nlanmas  sonucunda *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinslerinin dahil olduğu belirtilmiştir (Axelsson 1998).

Laktik asit bakterilerinin tan nlanmas nda önemli özelliklerden biri, standart koşullar altında glikoz fermentasyon şeklidir. Glikoz fermentasyon şekline göre heterofermantatif ve homofermantatif olmak üzere iki gruba ayr  lar. Heterofermantatif olanlar, glikoz fermentasyonunda laktik asit, ethanol, asetik asit ve CO₂  retir. Bunlar *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* ve *Lactobacil* türlerinin bazı grubunu içine alır. Diğer tüm laktik asit bakterileri ise homofermantatifdir. Homofermantatifler, glikoz fermentasyonuyla sadece laktik asit olu tur an bakterilerdir (Sharpe 1979).

Glikoz fermentasyonunda nohut mayasından elde edilen 60 izolatın sadece ikisinde (M17 S14 ve M17 S15) gaz oluşturma özelliği yani heterofermantatiflik g zlenmi tir. Diğer 58 izolatın tamamının homofermantatif olduğu belirlenmiştir. Nohut mayası mahurundan elde edilen izolatl r n 9 tanesini heterofermantatif diğer 51 tanesinin ise homofermantatif karakter taşıdı saptanm  t r. Nohut mayası ve nohutmayas  hamurundan izole edilen ve homofermantatif karakter gösteren toplam 109 izolatından 12 tanesinin morfolojik yapıları çubuk şeklinde olduğundan dolayı *Lactobacillus* cinsine ait oldukları belirlenmiştir.

Heterofermentatif karakter gösteren ve kokobasil íeklinde olan bazı *Lactobacillus* türleri bu iki özellik bakımından leukonostoklara benzetilmektedir. Arginin hidroliz testi bu sorunun çözülmesinde az da olsa yardımcı olmaktadır. Arginin hidroliz testi sonucuna göre pozitif reaksiyon veren türler, kesinlikle zorunlu heterofermentatif *Lactobacillus* grubuna girerken, arginin negatif reaksiyon veren *Leuconostoc* ya da *Lactobacillus* olduklarını saptanması için ürettikleri laktik asit konfigürasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir (Sak 2003). Ancak elde edilen sonuçlar izolatların hiç birinin kokobasil olmadığını ve bu izolatların hepsinin arginin hidroliz testine pozitif sonuç verdiğini göstermiştir. Dolayısıyla izole edilen laktik asit bakterileri arasında leukonostokların olma ihtimali göz ardı edilmştir.

Çizelge 4.7. M17 agar üzerinde nohut mayasından elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının katalaz aktivitesi, arginin hidrolizi ve CO₂ oluşum sonuçları

İzolat Kodu	Katalaz	Arginin	CO ₂
M17 S1	-	+	-
M17 S3	-	+	-
M17 S4	-	+	-
M17 S7	-	+	-
M17 S8	-	+	-
M17 S9	-	+	-
M17 S10	-	+	-
M17 S12	-	+	-
M17 S13	-	+	-
M17 S14	-	+	+
M17 S15	-	+	+
M17 S16	-	+	-
M17 S18	-	+	-
M17 S21	-	+	-
M17 S22	-	+	-
M17 S23	-	+	-
M17 S25	-	+	-
M17 S27	-	+	-
M17 S29	-	+	-
M17 S30	-	+	-
M17 S31	-	+	-
M17 S33	-	+	-
M17 S35	-	+	-
M17 S36	-	+	-
M17 S37	-	+	-
M17 S38	-	+	-
M17 S39	-	+	-
M17 S42	-	+	-
M17 S43	-	+	-
M17 S44	-	+	-

Çizelge 4.8. M17 agar üzerinde nohut mayasėhamurundan elde edilen laktik asit bakteri izolatlarėnėn katalaz aktivitesi, arginin hidrolizi ve CO₂ oluşum sonuçları

İzolat Kodu	Katalaz	Arginin	CO ₂
M17 H4	-	+	-
M17 H5	-	+	-
M17 H6	-	+	-
M17 H9	-	+	+
M17 H10	-	+	+
M17 H12	-	+	-
M17 H13	-	+	-
M17 H17	-	+	-
M17 H19	-	+	-
M17 H20	-	+	-
M17 H21	-	+	-
M17 H22	-	+	-
M17 H23	-	+	-
M17 H24	-	+	-
M17 H25	-	+	-
M17 H26	-	+	-
M17 H27	-	+	-
M17 H29	-	+	-
M17 H32	-	+	-
M17 H33	-	+	-
M17 H34	-	+	-
M17 H35	-	+	-
M17 H36	-	+	-
M17 H39	-	+	-
M17 H42	-	+	-
M17 H43	-	+	-
M17 H45	-	+	-

Çizelge 4.9. MRS agar üzerinde nohut mayasından elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının katalaz aktivitesi, arginin hidrolizi ve CO₂ oluşum sonuçları

İzolat Kodu	Katalaz	Arginin	CO ₂
MRS S1	-	+	-
MRS S2	-	+	-
MRS S3	-	+	-
MRS S4	-	+	-
MRS S5	-	+	-
MRS S6	-	+	-
MRS S7	-	+	-
MRS S9	-	+	-
MRS S10	-	+	-
MRS S12	-	+	-
MRS S16	-	+	-
MRS S19	-	+	-
MRS S21	-	+	-
MRS S22	-	+	-
MRS S24	-	+	-
MRS S25	-	+	-
MRS S26	-	+	-
MRS S27	-	+	-
MRS S28	-	+	-
MRS S29	-	+	-
MRS S30	-	+	-
MRS S31	-	+	-
MRS S35	-	+	-
MRS S37	-	+	-
MRS S38	-	+	-
MRS S39	-	+	-
MRS S40	-	+	-
MRS S41	-	+	-
MRS S42	-	+	-
MRS S44	-	+	-

Çizelge 4.10. MRS agar üzerinde nohut mayasė hamurundan elde edilen laktik asit bakteri izolatlarėnėn katalaz aktivitesi, arginin hidrolizi ve CO₂ oluşum sonuçları

izolat Kodu	Katalaz	Arginin	CO ₂
MRS H2	-	+	-
MRS H3	-	+	+
MRS H5	-	+	-
MRS H6	-	+	+
MRS H7	-	+	-
MRS H8	-	+	+
MRS H9	-	+	+
MRS H10	-	+	-
MRS H11	-	+	+
MRS H12	-	+	-
MRS H13	-	+	-
MRS H14	-	+	+
MRS H15	-	+	-
MRS H16	-	+	-
MRS H17	-	+	-
MRS H18	-	+	-
MRS H20	-	+	-
MRS H22	-	+	-
MRS H23	-	+	-
MRS H24	-	+	-
MRS H25	-	+	-
MRS H27	-	+	-
MRS H28	-	+	-
MRS H30	-	+	-
MRS H31	-	+	-
MRS H32	-	+	-
MRS H33	-	+	-
MRS H34	-	+	-
MRS H35	-	+	-
MRS H37	-	+	+
MRS H38	-	+	-
MRS H44	-	+	-
MRS H45	-	+	-

Nohut mayasından ve nohut mayası hamurundan izole edilen toplam 120 adet izolataın identifikasyonu için ayrıca API 50 CHL kiti (bioMérieux® SA, Fransa) kullanılmış ve sonuçların değerlendirilmesi APIWEB™ (apiweb™ stand alone V 1.2.1 Ref 40012, bioMérieux® SA, Fransa) ile geręekleřtirilmiřtir. Nohut mayasından izole edilen 60 adet laktik asit bakterisinin 54 tanesi *Lactococcus lactis ssp lactis*, 4 tanesi *Lactobacillus plantarum*, 2 tanesi *Lactobacillus brevis* olarak telhis edilmiştir. Nohut mayası hamurundan izole edilen 60 adet izolataın ise 47 tanesi *Lactococcus lactis ssp lactis*, 3 tanesi *Lactobacillus plantarum*, 5 tanesi *Weissella confusa*, 4 tanesi *Lactobacillus brevis* ve 1 tanesi de *Lactobacillus pentosus* olarak telhis edilmiştir. Nohut mayasından 3 farklı nohut mayası hamurunda ise 5 farklı laktik asit bakterisi türü izole edilmiştir. Hem nohut mayasında hem de nohut mayası hamurunda bulunan üç tür *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* olarak belirlenmiştir. Nohut mayasından farklı olarak nohut mayası hamurunda bulunan iki türün ise *Weissella confusa* ve *Lactobacillus pentosus* olduğu tespit edilmiştir.

İlimdiye kadar yapılannda kullanılan farklı hamurların mikroflorası üzerine pek çok çalışma yapılmamasına rağmen geleneksel nohut mayası ve nohut mayası hamurunun mikroflorası üzerine fazla çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar bu farklı hamurların mikrofloralarında laktik asit bakterisi olarak *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus brevis*, *L. fermenti*, *L. buchneri*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. casei rhamonasa*, *L. reuteri*, *L. amylovorus*, *L. curvatus*, *L. hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Weissella confusa*nın yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir (Hamad et al. 1992; Okada et al. 1992; Boraam et al. 1993; Corsetti et al. 2001). Nohut mayası hamuru mikroflorası üzerine yapılan bir çalışmada ise laktik asit bakterisi olarak *Enterococcus mundtii*/*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *Lactobacillus plantarum/pentosus*, *L. sanfrancisco*, *L. viridescens*, *L. bifermantans*, *Pediococcus urinea-equi*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* rastlanmıştır (Sakış 2003). Bahsedilen çalışmada telhis edilen izolatlardan sadece bir tür (*Lactobacillus plantarum/pentosus*), bizim nohut mayası hamurundan izole ettiğimiz türle aynı çıkmıştır. Ancak Sakışın (2003) bulduğu türlerden farklı olarak *Lactococcus lactis ssp lactis*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus brevis* türleri telhis edilmiştir.

Fermente olmuş nohut süzüğünün mikroflorası üzerine yapılan başka bir çalışmada ise *Bacillus cereus* ve *Clostridium perfringes* türlerinin ortamda baskın olduğu saptanmıştır. Ortamdaki diğer bakteri türleri *B. licheniformis* ve *C. beijerinckii* olarak tespit edilmiştir. Fermentasyonun ilk 8-10 saatlerinde *Bacillus* türleri daha sonra da 18 saate kadar olan süreçte ise *Clostridium* türleri gelişim gösterdiğini ve bu mikroorganizmaların nohuttan suya geçen bileşenleri parçalayarak gaz oluşturdıklarını belirlemiştir. Ayrıca fermentasyon sırasında baskın olarak gelişen *B. cereus* ve *C. perfringes*ın toksin üretmediği ve özellikle pilı ekmeğın tüketiminden sonra herhangi bir sağlık riski oluşturmadağı gözlemlenmiştir (Hatzikamari *et al.* 2007b). Fermente olmuş nohut süzüğünün mikroflorasını inceleyen diğer araştırmacılar, *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp ve *Clostridium* spp. türlerinin ortamda baskın olduğunu belirtmişlerdir (Zamora and Fields 1979; Katsaboxakis and Mallidis 1996).

Çizelge 4.11. M17 agar üzerinde nohut mayasından izole edilen ve API 50 CHL kiti ile tanımlanarak belirlenen laktik asit bakterileri

İzolat kodu	Tür adı
M17 S1	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S3	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S4	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S7	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S8	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S9	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S10	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S12	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M17 S13	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S14	<i>Lactobacillus brevis</i>
M17 S15	<i>Lactobacillus brevis</i>
M17 S16	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S18	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S21	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S22	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S23	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S25	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S27	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S29	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S30	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S31	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S33	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M17 S35	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S36	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S37	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S38	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S39	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S42	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S43	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 S44	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>

Çizelge 4.12. M17 agar üzerinde nohut mayasë hamurundan izole edilen ve API 50 CHL kiti ile telhîs edilen laktik asit bakterileri

izolat kodu	Bakteri isimleri
M17 H4	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H5	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17H 6	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H9	<i>Lactobacillus brevis</i>
M17 H10	<i>Lactobacillus brevis</i>
M17 H12	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H13	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H17	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H19	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H20	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H21	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H22	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H23	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H24	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M17 H25	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H26	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H27	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H29	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H 32	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H33	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H34	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M17 H35	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H36	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H39	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H42	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M17 H43	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
M17 H45	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>

Çizelge 4.13. MRS agar üzerinde nohut mayasından izole edilen ve API 50 CHL kiti ile tanımlanan laktik asit bakterileri

İzolat kodu	Tür adı
MRS S1	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S2	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S3	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S4	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S5	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S6	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S7	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS S9	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS S10	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S12	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S16	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S19	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S21	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S22	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S24	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S25	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S26	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S27	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S28	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S29	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S30	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S31	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S35	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S37	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S38	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S39	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S340	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S341	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S342	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS S344	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>

Çizelge 4.14. MRS agar üzerinde nohut mayasë hamurundan izole edilen ve API 50 CHL kiti ile telhîs edilen laktik asit bakterileri

izolat kodu	Tür adı
MRS H2	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H3	<i>Weissella confusa</i>
MRS H5	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H6	<i>Weissella confusa</i>
MRS H7	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H8	<i>Weissella confusa</i>
MRS H9	<i>Weissella confusa</i>
MRS H10	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H11	<i>Weissella confusa</i>
MRS H12	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H13	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H14	<i>Lactobacillus brevis</i>
MRS H15	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H16	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H17	<i>Lactobacillus pentosus</i>
MRS H18	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H20	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H22	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H23	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H24	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H25	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H27	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H28	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H30	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H31	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H32	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H33	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H34	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H35	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H37	<i>Lactobacillus brevis</i>
MRS H38	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H44	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
MRS H45	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>

Gıda kaynaklı pek çok laktik asit bakterisinin (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* ve *Propionibacterium*) gıda fermentasyonunda antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bunlar, fermente gıdalarda güvenilirliği sağlayarak raf ömrünü uzamasına sağlamaktadırlar. Bu bakterilere ait metabolitlerin binlerce yıldan beri farklı fermente gıdalarda sağlık için hiçbir tehlikesi olmadığı LAB'a ait antimikrobiyal metabolitlerin düzenleyici ajanlar olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, fermente gıdaların ve bazı LAB'ların tüketici sağlığı açısından doğal, sağlıklı ve yararlı etkileri oldukları bilinmektedir. LAB'a ait bazı metabolitler ve diğer starter kültür bakterileri gıdalarda gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Örneğin, laktik asit, diasetil, propiyonik asit ve asetik asit. Bununla beraber, gıda kökenli pek çok LAB gıda bozulmalarına ve gıda kökenli enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal etki gösteren ve öbakteriyosin olarak isimlendirilen protein yapısında ekstraselüler maddeler sentezlemektedir (Klaenhammer 1988; Hoover and Steenson 1993; Vuyst and Vandamme 1994). Bakteriyosinler, üretici suşun bazı özel bağışıklık mekanizma(lar) ile ilişkili olarak hücre dışına salınan birincil veya gelişmiş bakteriyel ribozomal sentez ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Bu bakteriyosinlerin çoğu küçük moleküler ağırlıklı proteinler olup bakterisidal etkilerini kendilerine yakın gruplara dâhil bakteriler üzerinde göstermektedir. LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinler gıda bozulmalarına ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok Gram pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki göstermekte ve öbiyokoruyucu olarak isimlendirilmektedir (Klaenhammer 1988; Ray 1992)

Günümüzde gıdaların raf ömrünü uzatabilmek için gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı olmalarına rağmen yapılan son çalışmalarda tüketici sağlığında ciddi problemlere neden oldukları belirlenmiştir. Çoğu kimyasal madde kökenli olan koruyucular insanlarda astım, damar problemleri gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen gıdalara yönelmişlerdir. Kimyasal gıda katkı maddelerine alternatif olarak doğal koruyucular tercih edilmeye başlanmıştır. Bunların memeliler üzerinde herhangi bir yan etkisinin bulunmadığı kanlanmıştır. Bunun nedeni ise; protein yapısında olan bu madde, sindirim sisteminde bulunan ve proteinleri hidrolize

eden enzimler tarafından parçalanmaktadır. Dolayış ile uygun olan bakteriyosin ya da bakteriyosin üreten LABönin gđdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de saklıklē kabul edilecektir. En iyi bilinen bakteriyosin nisin olup; *Lactococcus lactis* tarafından üretilmektedir ve gđda koruyucusu olarak kullanılmaktadır (Teuber 1995).

Ekli hamur üzerinde yapılan çalımalarda ekli hamur starterlerinde maya ve laktobasiller simbiyotik bir ilişki içerisinde olduğu gösterilmiştir. Laktobasillerin mayaların sevdiği ancak diğer organizmaların gelişemeyecekleri asidik bir ortam hazırladığē saptanmıştır. Laktobasiller ayrıca ekmeğin kabarmasında yardım ederler. (Anonymous 2002). Faid *et al.* (1993) ekli hamurun mayalanması için laktik asit bakterileri ve mayaların birleşimini çalışmışlardır. Sonuçta *Candida milleri* ya da *S. cerevisiae* ile *L. plantarum*ün birlikte uygulanmasını hamurun mayalanmasında çok iyi sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Benzer çalışmada yine Gobbetti *et al.* (1994) maya ve laktik asit bakterilerinin ekli hamurda birlikte bulunduğunu ve simbiyotik oratklēa baklı olarak hamurun daha iyi mayalanmasını sakladıklarıē ortaya çıkarmıştır. Özellikle çalışmalarıda mayaların laktik asit bakterileri için gerekli aminoasitleri sentezlediklerini saptamışlardır.

5. SONUÇ ve ÖNERİ

Bu çalışmada nohut mayası ve hamurundan laktik asit bakterilerinin izolasyon ve isimlendirilme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon süresince nohut mayası ve nohut mayası hamurunda pH'nın laktik asit bakterileri tarafından düşürüldüğü gözlemlendi. Fermantasyondan sonra nohut mayasının son pH'si 4,88 nohut mayası hamurunun ki ise 4,77 olarak bulunmuştur.

Nohut mayasında toplam 6,14 log kob/g, nohut mayası hamurunda ise toplam 6,81 log kob/g aerobik mezofil bakteri sayılmıştır. M17 besiyeri üzerinde nohut mayasında toplam 6,31 log kob/g, nohut mayası hamurunda 6,72 log kob/g bakteri sayılmıştır. MRS agarda nohut mayası mikrobiyolojisi için 6,43 log kob/g, nohut mayası hamurunun mikrobiyolojisi içinse 6,76 log kob/g bakteri sayılmıştır.

Elde edilen bakteri izolatlarının Gram boyanma, morfolojik yapıları, katalaz, arginin ve gaz oluşturma aktiviteleri araştırılmıştır. Nohut mayası ve nohut mayası hamurundan 60 adet olmak üzere toplam 120 laktik asit bakterisi izole edilmiştir. 120 izolat API 50 CHL ile isimlendirilmesi yapılmıştır. Nohut mayasından izole edilen 60 adet laktik asit bakterisinden 54 tanesinin *Lactococcus lactis ssp lactis*, 4 tanesinin *Lactobacillus plantarum*, 2 tanesinin *Lactobacillus brevis* olduğu belirlenmiştir. Nohut hamuru mayasından izole edilen 60 adet izolatın ise 47 tanesi *Lactococcus lactis ssp lactis*, 3 tanesi *Lactobacillus plantarum*, 5 tanesi *Weissella confusa*, 4 tanesi *Lactobacillus brevis* ve 1 tanesi de *Lactobacillus pentosus* olarak tanımlanmıştır. 5 farklı türden 3 tanesinin (*L. lactis ssp lactis*, *L. plantarum* ve *L. brevis*) hem nohut mayasında hemde nohut mayası hamuru mikrobiyolojisinde bulunduğu tespit edilirken, 2 tanesinin (*Weissella confusa* ve *Lactobacillus pentosus*) sadece hamur mayası mikrobiyolojisinde bulunduğu gözlemlenmiştir. 5 türün 3 tanesi (*L. lactis ssp lactis*, *L. plantarum* ve *L. pentosus*) homofermentatif, 2 tanesi de (*Weissella Confusa* ve *Lactobacillus brevis*) heterofermentatif olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda nohut mayası ve nohut mayası hamurunda *Lactococcus lactis ssp lactis*ın dominant tür olduğu belirlenmiştir. Bu bakterinin nisin üretme kapasitesi göz önüne alındığında nohut mayası hamuru ile hazırlanan ekmeklerin raf ömürlerinin uzun olabileceğini söylemek mümkündür.

Hazırlanan hamurda laktik asit bakterilerinin ve mayaların simbiyotik ortaklıkla mayalanmaya katkıları fazla olduğu göz önüne alındığında nohut mayası hamurunda mayaların bulunmasını daha iyi sonuç vereceğini söylemek olasıdır. Bu yüzden hamur fermentasyonunda önemli olan *S. cerevisiae* gibi mayaların nohut mayasına ya da nohut mayası hamuruna sonradan katılabileceği hususu araştırılmalıdır.

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal maddeler üreterek fermente gıdaların raf ömrünü uzattıkları tüketici sağlığı açısından dokal, sağlıklı ve yararlı maddeler üreterek gıdaların kalitesini artırdığı bilinmektedir. Bu yüzden laktik asit bakterileri starter kültür olarak da kullanmakta ve bu şekilde hem gıdanın raf ömrünün uzatılmasını hemde besinsel açıdan daha zengin içeriğe sahip olmaları amaçlanmaktadır.

Mevcut çalışmada izole ettiğimiz laktik asit bakterileri fermente gıda üretiminde ve özellikle de ekmek yapmada yeni avantajlar sağlayabilir. Elde edilen isolatların starter kültür olarak kullanılabilirliği ayrı ayrı hamur yapmada test edilebilir. Ekmeğin tadı, kokusu, fiziksel yapısı besinsel içeriği üzerine bu isolatların etkisi araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Akçin, A., 1988. Yemeklik Tane Baklagiller. Selçuk Üniversitesi Yayınları 43, Ziraat Fakültesi Yayınları 8, 377 s, Konya.
- Angioloni, A., Romani, S., Pinnavaia, G.G. and Rosa, M.D., 2005. Characteristics of Bread Making Doughs: Influence of Sourdough Fermentation on The Fundamental Rheological Properties, 222.
- Anonymous, 1967. Standard Method of the International Association for Cereal Chemistry, Deltmold, Germany.
- Anonymous, 1972. Approved Methods. Formerly Cereal Laboratory Methods. 8 th Ed. The Association of Cereal Chem. St. Paul, Minn USA.
- Anonymous, 2002. <http://www.angelfire.com/ab/bethsbread/FrontPage.html>
- Anonymous, 2005. <http://hurarsiv.hurriyet.com.tr/goster/haber.aspx?id=338686&p=2>
- Axelsson, L., 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects, Salminen, S. and Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1-72.
- Aydin, F., 2000. Starter cultures in breadmaking. Blacksea and Central Asian Symposium on Food Tech, Ankara-Turkey.
- Aydin, F. ve Çetin, B., 2001. Ekli hamur metodu ve seçilmiş mikroorganizmaların ekmek üretiminde kullanılması XII. Biyoteknoloji Kongresi, Balıkesir-Türkiye.
- Azkan, N., 1999. Yemeklik Tane Baklagiller. U.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Notları No:40, 107 s, Bursa.
- Batış, V.K., Roy, U. and Grover, S., 1997. Antifungal Attributes of Lactic Acid Bacteria-A Review. Critical Reviews in Biotechnology, 17(73), 209-225.
- Bayfield, E.G. and Young, W.E., 1964. Flavor Brew Studies. V. Effect of Brew Fermentation Time. Baker's Digest, 38(1), 69-70, 72-73.
- Baykara, P., 2006. Geleneksel Nohut Mayasının Endüstriyel Beyaz Buğday Unu Ekmeği Üretiminde Kullanılması Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Tekirdağ.
- Boraam, F., Faid, M., Larpent, J. P. and Breton, A., 1993. Lactic acid bacteria and yeast associated with traditional Moroccan sourdough bread fermentation. Sciences des Aliments, 13(3), 501-509.
- Böcker, G., Stolz, P. and Hammes, W.P., 1995. New results on the ecosystem sourdough physiology of sourdough specific of *Lactobacillus sanfrancisco* and *Lactobacillus pontis*. Getreide, Mehl und Brot, 49 (6), 370-374.
- Budde, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A.G., 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. International Journal of Food Microbiology, 83, 171-184.
- Bush, U. and Nitschko, H., 1999. Methods for differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B, 722, 263-278.

- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N. and Gobbetti, M., 2001, Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeast from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdough of Southern Italy, *International Journal of Food Microbiology*, 64, 95-104
- Col kuner, Y., Karababa, E. ve Ercan, R., 1999. D z Ekmeklerin  retim Teknolojisi. *Gıda*, 24(2), 89-97.
-  on, A.H. ve Gökalp, H.Y., 2000. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki  ekilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 30, 180-190.
- Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torani, S., 1995.  The genus *Leuconostoc *, in The lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria. Blackie Academics and Professionals, 2, 235-279.
- Di rak, M. ve  z elik, S., 1991. Elaz  ve Yöresinde Kullan an Ek li Mayanın Bileşimi, Morfolojik  zellikleri. *Gıda*, 16(5), 325-331.
- Dikbal , N., 2003. Vakfıkebir Ekmekinin Mikroflora ve Aroma Maddelerinin Tespiti (Doktora Tezi) A. . Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Erzurum.
- Domig, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W., 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.* 2.pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 165-188.
- Elgün, A., Ertugay, Z., Certel, M. ve Kotanc ar, H.G., 2002. Tah  ve  r nlerinde Analitik Kalite Kontrolü ve Laboratuar Uygulama K avuzu. (3. baskı) Atatürk Üniversitesi Yayın No: 867, Ziraat Fakültesi Yayın No: 335, Ders Kitapları Serisi, No: 82, 245 s, Erzurum.
- Elgün, A. ve Ertugay, Z., 2003. Tah   leme Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Yayınları No:718, 376 s.
- Faid, M., Boraam, F., Achbab, A. and Larpent, J.P., 1993.Yeast-lactic acid bacteria interactions in moroccan sourdough bread fermentation. *Technologie*, 26(5), 443-446.
- Fernandez, M., Margolles, A., Suarez, J.E., Mayo, B., 1999. Duplication of the b-galactosidase gene in some *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 48 ,113 123.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. and Holzapfel, W.H. 2003. Enterococci in foods a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105-122
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, La Rosa, F. and de Vincenzi, S., 1994. The sourdough microflora. Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from sourdoughs of Central Italy. *Italian journal of Food science*, 1, 85-94.
- Gobbetti, M., 1998. The Sourdough Microflora: Interactions of Lactic Acid Bacteria and Yeast. *Trends Food Science Technology*, 9, 267 274.
- Hamad, S.H., B cker, G., Vogel, R.F. and Hammes, W.P., 1992. Microbiological and chemical analysis of fermented sorghum dough for Kiswa production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 7, 728-731
- Hansen, A. and Schieberle, P., 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 1-10.

- Harrigan, W.F. and McCance, M.E., 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology, London Academic Press.
- Hatzikamari, M., Kyriakidis, N., Tzanetakis, N., Biliaderis, C.G., Tzanetaki, E.L., 2007a. Biochemical changes during a submerged chickpea fermentation used as a leavening agent for bread production. *European food Research and Technology*, 224, 715-723
- Hatzikamari, M., Yiangou, M., Tzanetakis, N., Tzanetaki, E.L., 2007b. Changes in numbers and kinds of bacteria during a chickpea submerged fermentation used as a leavening agent for bread production. *International journal of food microbiology*, 116, 37-43.
- Hirsch, A. and Grimsted, E., 1951. The Differentiation of the Lactic Streptococci and Their Antibiotics. *J. Dairy Res*, 18, 198.
- Hirsch, A., Grimsted, E., Chapman, H.R., Mattick, A., 1951. A Not Inhibition of Anaerobic Sporeformer in Swiss-Type Cheese by a Nisin-Producing., *J. Dairy Sci.*, 3, 892.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Ninth Edition, Williams and Wilkins, London, U.K.
- Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (Edt) 1993. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Kaban, G., 2007 Geleneksel olarak üretilen sucuklardan laktik asit bakterileri ile katalaz pozitif kokların izolasyonu-identifikasyonu, üretimde kullanılabilecek imkanları ve uçucu bileşikler üzerine etkileri. Doktora Tezi. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Erzurum.
- Kara, K., 1996. Tarla Bitkileri Ders Kitabı Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları No:191, 214-216 s, Erzurum.
- Katina, K., 2005. Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. *VTT Publications* 569, 92 p.+ app.81 p.
- Katsaboxakis, K. and Mallidis, K., 1996. The microflora of soak water during natural fermentation of coarsely ground chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. *Letters in Applied Microbiology* 23, 261-265.
- Köç, S., 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542, Sayfa: 37-55, Bornova-İzmir.
- Klaenhammer, Y.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International journal of Food Microbiology* 41, 103-125
- Lönner, C., Welander, T., Molin, N. and Dostálek, M., 1986. The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food Microbiology*, 3, 3-12.
- Lu, Z., Breidt, F., Fleming, H.P., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., 2003. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, AJL-1, from a cucumber fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 225-235.
- Martinez-Anaya, M.A., 1996. Carbohydrate and Nitrogen Related Components in Wheat Sourdough Processes. *Adv. Food Science*, 18, 185-200.

- Meignen, B., Onno, B., Gélinas, P., Infantes, M., Guilois, S. and Cahagnier, B., 2001. Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiology*, 18, 239-245.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Vilani, F., Deiana, P. and Coppola, S., 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 25-36.
- Okada, S., Ishikawa M., Yoshida, I., Uchimura, T., Ohara, N. and Kozaki, M., 1992. Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from sourdough sponges. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(4), 572-575.
- Özkaya, B., 1992. Starter Kültür Olarak Paket Mayasë Eksi Hamur Mayasë ve Nohut Mayasënin Hamurun Reolojik Özellikleri ve Ekmegin Kalitesine Etkileri (Doktora Tezi) A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Ankara.
- Raccach, M., 1987. *Pediococci and Biotechnology*. CRC Critical Review in Microbiology, 14, 291-309.
- Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J., 2000. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis, <http://www.msu.edu.edu/user/debruijn/dna1-4.htm>.
- Ray, B., 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives: an overview. In *Food biopreservatives of microbial origin*. Ed: Bibek Ray and Mark Daeschel, CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G. and Cocconcelli, P.S., 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1043-1049.
- Rees, T.J., 1997. The development of a Novel Antifungal Silage Inoculant. Doctoral Research Thesis, Cranfield University Biotechnology Centre, UK, 8-23.
- Rocha, J.M. and Malcata, F.X., 1999. On the microbiological profile of traditional Portuguese sourdough. *J.Food. Protect*, 62(12), 1416-1429.
- Salovaara, H., 1998. Lactic Acid Bacteria in Cereal - Based Products, In *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects* Second Edition. (Ed. Salminen and Wright), Marcel Dekker, Inc. New York Basel, 115-137.
- Schieberle, P., 1996. Intense Aroma Compounds. Useful Tools to Monitor The Influence of Processing and Storage on Bread Aroma. *Adv. Food Science*, 18, 237-244.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K., 1987, Identification of lactobacilli from meat and meat products, *Food Microbiology*, 4, 199-208
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, G., Klipper-Bälz, R., Collins, M. D., and Fischer, W., 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol*, 6, 138-195.
- Sharpe, M.E., 1979. Identification of the lactic acid bacteria,. In *Identification Methods for Microbiologists*, 2nd ed., Soc. Appl. Bacteriol. Technical Series, No. 14 (Ed: F. A. Skinner and D. W. Lovelock), Academic Press. London, 246-255
- Sakde Ö.H., 2003. Nohut mayasënin mikrobiyolojik lezzet ve karakteristiklerinin araştırılması Doktora Tezi, Ege Üniversitesi. Gıda bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı İzmir

- Spicher, G. and Schröder, R., 1978. The microflora of sour dough. IV. Communication: Bacterial composition of sourdough starters. Genus *Lactobacillus* Beijerinck. Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und- Forschung, 167, 342-354.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, H.W., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1-29.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, K., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R., 1989. 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Saklık ve Bilimsel Araştırma Çalışmalar Vakfı Yayınları No: 74, 23-25, 240, Eskişehir.
- Tamerler, T., 1975. Çeşitli mayalama ve pıdırme yöntemleriyle hazırlanan ekmeklerde aroma maddeleri üzerinde araştırmalar. Doktora tezi. E.Ü. Ziraat fakültesi. Gıda ve Fermentasyon Teknolojisi kürsüsü, 69s.
- Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J., 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture independent methods. Trends in Food Science and Technology, 15, 348-359.
- Teuber, M., 1995. The genus *Lactococcus*, in the lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria. Blackie Academics and Professionals, 2, 173-235.
- Ünlütürk, A. and Turantalı F., 2003. Gıda mikrobiyolojisi. Sayfa: 427-430, İzmir
- Van Damme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbial Review 60, 407-438.
- Vuyst, L.D. and Vandamme, E.J., 1994. In Bacteriocins of lactic acid bacteria. Ed: de Vuyst, L. and Vandamme, E. J., Blackie academic and Professional. England, 107-123.
- Wang, B., Li, J., Li, Q., Zhang, H., Li, N., 2009. Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization and immune response by *Lactobacillus plantarum* L2 in the rat gastrointestinal tract. International Journal of Food Microbiology, 132, 59-66.
- Weiss, R.A., Eichne, R., and Sun, T.T. 1984. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: A 48 and 56 kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. The Journal of Cell Biology, 98, 1397-1406.
- Wood, B.J. and Hodge, M.M., 1985. Yeast-lactic acid bacteria interactions and their contribution to fermented foodstuffs, in microbiology of fermented foods. Volume 1 (Ed. Wood, B.J.B.) Elsevier Applied Science Publishers London and NewYork, 263-293.
- Yaygın, H. Ve Kâç, S., 1993. Süt Endüstrisinde Saf Kültür. Altındağ Matbaası 108 s.
- Yılmaz, M., 2002. Ekli hamur ile ekmek yapma ve ekli hamur mikroflorası Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda bilimi ve Teknolojisi Anabilimdalı Erzurum.
- Zamora, A.F. and Fields, M.L., 1979. Nutritive quality of fermented cowpeas (*Vigna sinensis*) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Journal of Food Science, 44, 234-236.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Araklıda doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Araklıda tamamladı 2001 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünden 2005 yılında mezun oldu. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı