

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NORMAL VE KEPEKLİ EKMEKLERDE SÜNME ETMENİ *BACILLUS*
TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE SÜNME ÜZERİNE KİNETİK
ÇALIŞMALAR**

FUNDAGÜL EREM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2007

**NORMAL VE KEPEKLİ EKMEKLERDE SÜNME ETMENİ *BACILLUS*
TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE SÜNME ÜZERİNE KİNETİK
ÇALIŞMALAR**

FUNDAGÜL EREM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2006.02.0121.010 proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2007

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NORMAL VE KEPEKLİ EKMEKTE SÜNME ETMENİ *BACILLUS*
TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE SÜNME ÜZERİNE KİNETİK
ÇALIŞMALAR**

FUNDAGÜL EREM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**Bu tez .../.../2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (....) not takdir edilerek
Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.**

Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. İbrahim YILDIRIM

Yrd. Doç. Dr. Sibel TUNÇ

ÖZET

NORMAL VE KEPEKLİ EKMEKLERDEP SÜNME ETMENİ *BACILLUS* TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE SÜNME ÜZERİNE KİNETİK ÇALIŞMALAR

Fundagül EREM

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Eylül 2007, 181 Sayfa

Bu çalışmada, ekmeklerde görülen başlıca bozulmalardan olan sünme hastalığının gelişimini incelemek üzere, laboratuvar koşullarında üretilip 4, 25, 37 ve 45°C’de 7 gün boyunca muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere 24 saatte bir mikrobiyolojik (toplam mezofilik aerobik bakteri, *Bacillus* ve küf sayımı), kimyasal (toplam indirgen şeker, toplam serbest amino asit, kalıntı protein) analizler yapılmış ve ekmeklerin tekstürel özellikleri (sertlik, adezif yapışkanlık, kohezif yapışkanlık, zamksılık, çiğnenebilirlik, elastikiyet, esneklik) ölçülmüştür. Kimyasal analizler spektrofotometrik olarak yapılmış, tekstürel özellikler tekstür profil analizi ile belirlenmiştir.

Sünmüş ekmeklerden izole edilen hastalık etmeni *Bacillus* türleri, klasik yöntemlerle ve API tanılama kitleri kullanılarak tanılanmıştır. Muhafaza edilen ekmeklerin spektrofotometrik olarak tayin edilen toplam serbest amino asit içeriğindeki değişim ile tekstür profil analizi ile tayin edilen sertlik değerindeki değişim hidroliz derecesinin bir göstergesi olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler sünme hastalığının kinetik parametrelerinin hesaplanması ve matematiksel olarak modellenmesinde kullanılmıştır.

Yapılan analizlerle, sünme hastalığının en iyi geliştiği sıcaklığın 37°C olduğu, 4°C’de ise hastalığın 7 günlük periyotta hiç oluşmadığı belirlenmiştir. Görsel olarak hastalığın oluşum süresi her iki ekmek türü için 45°C’de 2 gün, 25°C’de 4 gün iken 37°C’de normal ekmek için 3, kepekli ekmek için 1 gündür. Muhafaza süresi boyunca toplam

indirgen şeker, toplam serbest amino asit ve kalıntı protein miktarlarındaki değişime bağlı olarak hastalığa neden olan *Bacillus* türlerinin amilaz aktivitelerinin proteaz aktivitesinden daha fazla olabileceği görülmüştür. Muhafaza sıcaklığına bağlı olarak tekstürel özelliklerin farklı şekillerde değiştiği gözlenmiştir.

Ekmeklerden izole edilen *Bacillus* türlerinin belirlenmesinde kullanılan her iki tanılama yönteminin sonuçları arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Bu yöntemlerle bazı izolatlar için kesin tanılamamın mümkün olmadığı, ancak muhtemelen tanılanabildiği görülmüştür. Biyokimyasal testler ile normal ekmeklerde *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* ve *B. pumilus*, kepekli ekmeklerde *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* bulunduğu belirlenirken; API tanılama kitleri ile normal ekmeklerde *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis/amyloliquefaciens*, muhtemelen *B. megaterium*, kepekli ekmeklerde *B. licheniformis*, muhtemelen *B. megaterium*, *Bacillus* spp., *B. subtilis/amyloliquefaciens* ve muhtemelen *B. thuringiensis* bulunduğu tespit edilmiştir. Hem normal hem de kepekli ekmeklerde klasik yöntemlerle yapılan tanılamada en fazla bulunan türün *B. subtilis*, API kitleri ile yapılan tanılamada ise baskın türün *B. licheniformis* olduğu saptanmıştır. Bazı izolatların daha kesin tanılanması için moleküler biyolojik yöntemlerle çalışmanın gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bacillus türlerinin sündürme kapasitelerinin doğrulanması için yapılan testte izole edilip tanısı yapılabilen tüm türlerin sünme yapabildiği belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Ekmek, sünme hastalığı, *Bacillus*, tanılama, kinetik, matematiksel modelleme

JÜRİ: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. İbrahim YILDIRIM

Yrd. Doç. Dr. Sibel TUNÇ

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE ROPE FORMING SPECIES OF BACILLUS IN WHITE BREAD AND WHOLE MEAL BREAD AND KINETIC STUDIES ON ROPE DEVELOPMENT

Fundagül EREM

M.Sc. Thesis in Food Engineering

Adviser: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

September 2007, 181 Pages

In this study, white and whole meal breads baked at laboratory conditions were stored at 4, 25, 37 and 45°C for 7 days to investigate the development of rope spoilage which is one of the main bacterial problems in breads. Microbiological (total mesophilic aerobic bacteria, *Bacillus* and mold counts), chemical (total free amino acids, total reducing sugar, residual protein contents) and textural (hardness, adhesiveness, cohesiveness, gumminess, chewiness, springiness, resilience) analyses were carried out on these breads in 24 hour intervals. Chemical analyses were determined spectrophotometrically. Also, texture profile analyses were performed to determine bread texture properties.

The *Bacillus* species which were isolated from ropey bread as the disease factor were identified by using classical methods and API identification kits. The changes in the total free amino acids content, and hardness of stored breads were determined as indicators of the degree of hydrolysis. The data thus obtained were used to calculate the kinetic parameters and the mathematical model of rope spoilage.

Results of the analysis showed that 37°C is the optimum temperature for the development of rope spoilage and no symptoms of the disease were observed at 4°C. It was determined that the visual symptoms of the disease were apparent in the second day of storage at 45°C and in the fourth day at 25°C for both types of bread. At 37°C the disease was perceptible within the first day for whole meal breads and on the third day

for white breads. The change in total free amino acids, total reducing sugars and residual protein contents throughout the storage period indicated that the disease factor *Bacillus* species had a higher amylase activity compared to their protease activity. It was observed that throughout storage, depending on the storage temperature, textural characteristics changed in a different manner.

It was observed that there were discrepancies between the results of two identification methods which were used for identifying the *Bacillus* species isolated from ropy breads. It was understood that definite identification of some of the isolates using these methods was not possible and these strains could only be identified as being most likely a certain species. Isolates from white bread were identified as *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* and *B. pumilus*; and isolates from whole meal bread were identified as *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* using biochemical tests. Using the API identification kits, on the other hand, resulted in the identification of *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis/amyloliquefaciens*, most likely *B. megaterium* in white breads and *B. licheniformis*, *Bacillus* spp., *B. subtilis/amyloliquefaciens*, most likely *B. megaterium*, and most likely *B. thuringiensis* in whole meal breads. According to the results of the classical methods *B. subtilis* was the most abundant species in both white and whole meal breads. API kits, on the other hand, confirmed *B. licheniformis* as the predominant species. It can be concluded that biomolecular methods may provide to be more helpful in obtaining a more exact and credible identification for some of the isolates studied. All of the *Bacillus* species subjected to identification were also tested for their potential to be the causative agents in rope spoilage and were confirmed as being so.

KEYWORDS: Bread, rope spoilage, *Bacillus*, identification, kinetic, mathematical modeling

COMMITTEE: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Adviser)

Asst. Prof Dr. İbrahim YILDIRIM

Asst. Prof Dr. Sibel TUNÇ

ÖNSÖZ

Ekmek, nötr karakterdeki tadı ve aroması nedeniyle tüm yiyeceklerin yanında yer alan ve özellikle az gelişmiş ülkelerde oldukça fazla tüketilen bir besin maddesidir. Ancak, uygun şartlarda muhafaza edilip tüketilmediği takdirde bozulmakta ve israf edilmektedir. Dünya genelindeki nüfus artış hızından kaynaklanan, gıda açığının kapatılabilmesi için öncelikle mevcut kaynakların daha bilinçli kullanılması, israf edilmemesi ve hatta atıkların değerlendirilmesi gerekmektedir. Açlıkla mücadelede önemli bir yeri olan ekmeğin bozularak, israf edilmesini önlemek de çok önemlidir.

Ekmek kayıplarının başlıca sebeplerinden olan sünme hastalığı uygun katkı maddelerinin kullanılması ile önlenabilmektedir. Ancak son yıllarda, tüketici talepleri doğrultusunda, pek çok gıda maddesinde olduğu gibi, ekmeklerde de kullanılan koruyucu katkı maddelerinin azaltılmasına yönelik eğilim artmıştır. Bu da ekmeklerde sünme riskini artırmaktadır. Bu durumda üretim koşullarının iyileştirilmesinin yanı sıra ekmeklerin muhafaza koşullarını da doğru seçmek önem arz etmektedir.

Bu çalışmada farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen ekmeklerdeki sünme gelişimi incelenmiş, gelişme kinetiğine ait bazı yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmış ve sünmeye neden olan *Bacillus* türleri tanılanmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Muharrem CERTEL'e (Akdeniz Üni. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü), tavsiyelerinden yararlandığım Yrd. Doç. Dr. İbrahim YILDIRIM'a, çalışmamın her aşamasında tecrübesi ve desteği ile yanımda olan Arş. Gör. Sibel MİLCİ'ye ve Arş Gör. Barçın KARAKAŞ'a, tekstür analizlerinde yardımcı olan Arş. Gör. M. Kemal USLU'ya, her türlü desteklerinden ötürü Arş. Gör. Aybegüm AKDOĞAN'a, Arş. Gör. Cüneyt DİNÇER'e ve Yüksek Lisans öğrencisi İclal KOYUNCU'ya (Akdeniz Üni. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü), Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki tüm hoca ve çalışma arkadaşlarıma, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme ve araştırmamı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	5
2.1. Sünme Spor (Rope) Sayımının, Sünmenin Oluşumunun ve Etmen <i>Bacillus</i> Türlerinin Tanılanmasının Yapıldığı Çalışmalar.....	7
2.2. Sünme Hastalığının Engellenmesine Yönelik Olarak Yapılan Çalışmalar.....	13
2.3. Ekmekte Tekstür Ölçümüne Yönelik Olarak Yapılan Çalışmalar.....	16
2.4. Ekmekte Yapılmış Bazı Kinetik Çalışmalar.....	23
3. MATERYAL ve METOT.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.2. Metot.....	26
3.2.1. Hammaddelerde sünme (rope) sporu sayımı.....	26
3.2.2. Ekmek pişirme yöntemi.....	27
3.2.3. Ekmeklerde yapılan analizler.....	29
3.2.3.1. Nem tayini.....	29
3.2.3.2. Ham yağ tayini.....	29
3.2.3.3. Ham protein tayini.....	29
3.2.3.4. Kül tayini.....	30
3.2.3.5. Ham lif tayini.....	30
3.2.3.6. Nişasta tayini.....	31
3.2.4. Ekmeklerin muhafazası.....	32
3.2.5. Muhafaza edilen ekmeklerde gerçekleştirilen analizler.....	32
3.2.5.1. Mikrobiyolojik analizler.....	32

Örneklerin mikrobiyolojik analize hazırlanması.....	32
Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı.....	32
<i>Bacillus</i> sayımı.....	33
Küf sayımı.....	33
3.2.5.2. Fiziksel analizler.....	34
Su aktivitesinin belirlenmesi.....	34
3.2.5.3. Yapısal analizler.....	34
Tekstür profil analizi.....	34
3.2.5.4. Kimyasal analizler.....	34
Toplam indirgen şeker miktarı tayini.....	35
Toplam serbest amino asit miktarı tayini.....	35
Kalıntı protein miktarı tayini.....	36
3.2.6. Ekmeklerden sünme etmeni <i>Bacillus</i> türlerinin izolasyonu ve tanılanması.....	36
3.2.6.1. Biyokimyasal testler ile <i>Bacillus</i> türlerinin tanılanması....	37
Gram boyama.....	37
İnkübasyon sıcaklığının belirlenmesi.....	38
Katalaz testi.....	38
Sodyum klorürde gelişme testi	38
Anaerobik gelişme	38
Voges-Proskauer ve Metil-Red testi	39
pH 5.7'de gelişme testi.....	39
Karbonhidrat fermentasyon testi.....	39
Nişasta hidroliz testi.....	40
Sitrat testi.....	41
İndol testi.....	41
Dihidroksiaseton üretimi testi.....	41
Fenilalanin deaminaz testi.....	42
Kazein hidrolizasyon testi.....	42
Tirozin hidrolizasyon testi.....	43
Jelatin hidrolizasyon testi.....	43
Yumurta sarısı testi.....	43

Lizozime dayanıklılık testi.....	44
3.2.6.2. API test kitleri ile <i>Bacillus</i> türlerinin tanılanması.....	44
API 20 E striplerinin inokülasyonu.....	44
API CH striplerinin inokülasyonu.....	45
3.2.7. <i>Bacillus</i> türlerinin sündürme kapasitelerinin doğrulanması.....	46
3.2.8. Sünme hastalığının kinetik parametrelerinin belirlenmesi.....	46
3.2.9. İstatistiksel değerlendirme.....	47
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	48
4.1. Ekmeklerin Bazı Besin Öğelerine Ait Analiz Sonuçları.....	48
4.2. Ekmeklere Ait Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	49
4.2.1. Hammaddelerdeki sünme sporu sayısı.....	49
4.2.2. Normal ve kepekli ekmeklerdeki toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısına muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi.....	51
4.2.3. Normal ve kepekli ekmeklerdeki <i>Bacillus</i> sayısına muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi.....	55
4.2.4. Normal ve kepekli ekmeklerde yapılan küf sayımı sonuçları.....	65
4.3. Ekmeklere Ait Fiziksel Analiz Sonuçları.....	65
4.3.1. Su aktivitesi ölçüm sonuçları.....	65
4.4. Normal ve Kepekli Ekmeklerdeki Tekstürel (Yapısal) Değişimlere Muhafaza Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi.....	69
4.4.1. Ekmeklerde sertlik ölçümüne ait sonuçlar.....	69
4.4.2. Ekmeklerde adezif yapışkanlık ölçümüne ait sonuçlar.....	75
4.4.3. Ekmeklerde kohezif yapışkanlık ölçümüne ait sonuçlar.....	80
4.4.4. Ekmeklerde elastikiyet ölçümüne ait sonuçlar.....	85
4.4.5. Ekmeklerde zamksılık analizine ait sonuçlar.....	89
4.4.6. Ekmeklerde çiğnenebilirlik analizine ait sonuçlar.....	95
4.4.7. Ekmeklerde esneklik ölçümüne ait sonuçlar.....	99
4.5. Normal ve Kepekli Ekmeklerin Toplam İndirgen Şeker, Toplam Serbest Amino Asit ve Kalıntı Protein Miktarları Üzerine Muhafaza Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi.....	105
4.5.1. Ekmeklerin toplam indirgen şeker analizine ait sonuçlar.....	105
4.5.2. Ekmeklerin toplam serbest amino asit analizine ait sonuçlar.....	113

4.5.3. Ekmeklerin kalıntı protein analizine ait sonuçlar.....	119
4.6. Sünme Etmeni <i>Bacillus</i> Türlerinin Tanılanması.....	124
4.6.1. Sünme etmeni <i>Bacillus</i> türlerinin tanılanmasına yönelik olarak yapılan biyokimyasal testlere ait sonuçlar.....	124
4.6.2. Biyokimyasal testler ve API (Analitik Profil İndeksi) kitleri sonuçlarına göre izole edilen türlerin tanılanması.....	132
4.7. Tanısı Yapılan <i>Bacillus</i> Türlerinin Sündürme Kapasitelerinin Doğrulanması.....	141
4.8. Sünme Hastalığının Matematiksel Olarak Modellenmesi.....	145
4.8.1. Normal ekmeklerin sertlik değeri değişim kinetiğinin modellenmesi.....	145
4.8.2. Normal ekmeklerde serbest amino asit oluşum kinetiğinin modellenmesi.....	147
5. SONUÇ.....	150
6. KAYNAKLAR.....	154
7. EKLER.....	163
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

s	: Saniye
dk	: Dakika
mg	: Miligram
g	: Gram
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
L	: Litre
ppm	: Milyonda bir kısım
cal	: Kalori
kob	: Besiyerinde bir mikroorganizma kolonisi oluşturan birim
cfu	: Colony forming unit (Koloni oluşturan birim sayısı)
cm	: Santimetre
dm	: Desimetre
nm	: Nanometre
N	: Newton
a _w	: Su aktivitesi

Kısaltmalar

TMAB	: Toplam Mezofilik Aerob Bakteri
TPA	: Tekstür Profil Analizi
X	: Ortalama Değer
SE	: Standart Hata
API	: Analytical Profile Index (Analitik Profil İndeksi)
ICC	: International Association for Cereal Chemistry
TS	: Türk Standartları
EMS	: En Muhtemel Sayı
T.E.	: Tespit Edilemedi

Kısaltmalar'ın Devamı

T	: Tanılanamadı
k	: Hız sabiti
Ea	: Aktivasyon Enerjisi
R	: İdeal Gaz Sabiti



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Sporlaşma döngüsü.....	5
Şekil 2.2.	Sporun çimlenmesi.....	6
Şekil 2.3.	Tekstür profil analizi grafiği.....	18
Şekil 3.1.	Ekmek hamurlarının fermentasyonu.....	27
Şekil 3.2.	Ekmek hamurlarına pişirme öncesi bıçak atma işlemi.....	28
Şekil 3.3.	Normal ve kepekli ekmek.....	28
Şekil 3.4.	Ekmeklerin etüvde muhafazası.....	28
Şekil 4.1.	Ekmek hammaddelerinin sünme sporu yükü.....	51
Şekil 4.2.	Normal ve kepekli ekmeklerdeki TMAB'lere ait gelişme eğrileri.....	56
Şekil 4.3.	37°C'de muhafaza edilen normal ekmeklerde sünme hastalığının gelişimi.....	59
Şekil 4.4.	Sünme hastalığı sırasında ekmek içinde oluşan kahverengimsi ve ipliksi yapı.....	60
Şekil 4.5.	Normal ve kepekli ekmeklerdeki <i>Bacillus</i> 'lara ait gelişme eğrileri.....	64
Şekil 4.6.	Normal ve kepekli ekmeklerin su aktivitesi değerinin sıcaklık etkisiyle değişimi.....	68
Şekil 4.7.	Normal ve kepekli ekmeklerdeki sertlik değişimi.....	74
Şekil 4.8.	Normal ve kepekli ekmeklerde adezif yapışkanlıktaki değişim.....	79
Şekil 4.9.	Normal ve kepekli ekmeklerde kohezif yapışkanlıktaki değişim.....	84
Şekil 4.10.	Normal ve kepekli ekmeklerdeki elastikiyet ölçüm sonuçları.....	88
Şekil 4.11.	Normal ve kepekli ekmeklerde tekstür ölçümü.....	93
Şekil 4.12.	Normal ve kepekli ekmeklerdeki zamksılık analizi sonuçları.....	94
Şekil 4.13.	Normal ve kepekli ekmeklerdeki çiğnenebilirlik analizi sonuçları...	100
Şekil 4.14.	Ekmeklerin muhafaza sıcaklıklarına ait esneklik değeri ortalamaları.....	102

Şekil 4.15.	Normal ve kepekli ekmeklerdeki esneklik analizi sonuçları.....	104
Şekil 4.16.	<i>Bacillus</i> sayısı-toplam indirgen şeker miktarı-muhafaza süresi ilişkisi.....	109
Şekil 4.17.	Normal ve kepekli ekmeklerde toplam indirgen şeker miktarı değişimi.....	112
Şekil 4.18.	<i>Bacillus</i> sayısı-toplam serbest amino asit miktarı-muhafaza süresi ilişkisi.....	116
Şekil 4.19.	Normal ve kepekli ekmeklerde toplam serbest amino asit miktarı değişimi.....	118
Şekil 4.20.	Normal ve kepekli ekmeklerde kalıntı protein miktarı değişimi.....	123
Şekil 4.21.	Negatif indol testi.....	124
Şekil 4.22.	Pozitif ve negatif Voges-Proskauer testi sonuçları.....	128
Şekil 4.23.	Karbonhidrat fermentasyon testine ait pozitif ve negatif sonuçlar.....	130
Şekil 4.24.	Pozitif ve negatif kazein hidrolizasyon testi sonuçları.....	131
Şekil 4.25.	İnkübasyon öncesi ve sonrasında API 20 E ve API CH stripleri.....	137
Şekil 4.26.	Biyokimyasal testler ile tanılaması yapılmış normal ekmekten elde edilen izolatların % dağılımı.....	139
Şekil 4.27.	API kitleri ile tanılaması yapılmış normal ekmekten elde edilen izolatların % dağılımı.....	139
Şekil 4.28.	Biyokimyasal testler ile tanılaması yapılmış kepekli ekmekten elde edilen izolatların % dağılımı.....	140
Şekil 4.29.	API kitleri ile tanılaması yapılmış kepekli ekmekten elde edilen izolatların % dağılımı.....	141
Şekil 4.30.	<i>Bacillus</i> türlerinin sündürme kapasitelerinin doğrulanması.....	144
Şekil 4.31.	Sertlik değeri değişimi için reaksiyon derecesinin belirlenmesi.....	146
Şekil 4.32.	Sertlik değeri için farklı sıcaklıklardaki hız sabitlerine bağlı olarak elde edilen Arrhenius eğrisi.....	147
Şekil 4.33.	Serbest amino asit konsantrasyonunun (C) doğal logaritmasının süreye karşı grafiği.....	148
Şekil 4.34.	Serbest amino asit miktarı için farklı sıcaklıklardaki hız sabitlerine bağlı olarak elde edilen Arrhenius eğrisi.....	149

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Bazı kimyasal koruyucuların ve laktik starterin fırıncılık ürünlerinde bozulma etmeni bakteri ve küfler üzerine etkileri.....	13
Çizelge 3.1.	İndikatörlerin reaksiyon ortamına verdikleri renkler.....	40
Çizelge 4.1.	Ekmeklerin bazı besin öğelerine ait sonuçlar.....	48
Çizelge 4.2.	Hammaddelerdeki sünme sporu sayımı sonuçları.....	50
Çizelge 4.3.	Farklı sıcaklık derecelerinde muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait TMAB sayımı sonuçları.....	53
Çizelge 4.4.	Normal ve kepekli ekmeklerin TMAB sayımlarına ait varyans analizi sonuçları.....	54
Çizelge 4.5.	Normal ve kepekli ekmeklerin TMAB sayımı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	55
Çizelge 4.6.	Farklı sıcaklık derecelerinde muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait <i>Bacillus</i> sayım sonuçları.....	57
Çizelge 4.7.	Normal ve kepekli ekmeklerin <i>Bacillus</i> sayımlarına ait varyans analizi sonuçları.....	60
Çizelge 4.8.	Normal ve kepekli ekmeklerin <i>Bacillus</i> sayımı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	61
Çizelge 4.9.	Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı su aktivitesi ölçüm sonuçları.....	66
Çizelge 4.10.	Normal ve kepekli ekmeklerin su aktivitesi ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları.....	67
Çizelge 4.11.	Normal ve kepekli ekmeklerin su aktivitesi ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	67
Çizelge 4.12.	Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı sertlik ölçüm sonuçları.....	69
Çizelge 4.13.	Normal ve kepekli ekmeklerin sertlik ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları.....	70

Çizelge 4.14.	Normal ve kepekli ekmeklerin sertlik değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	72
Çizelge 4.15.	Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı adezif yapışkanlık ölçüm sonuçları.....	75
Çizelge 4.16.	Normal ve kepekli ekmeklerin adezif yapışkanlık ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları.....	76
Çizelge 4.17.	Normal ve kepekli ekmeklerin adezif yapışkanlık ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	78
Çizelge 4.18.	Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı kohezif yapışkanlık ölçüm sonuçları.....	80
Çizelge 4.19.	Normal ve kepekli ekmeklerin kohezif yapışkanlık ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları.....	81
Çizelge 4.20.	Normal ve kepekli ekmeklerin kohezif yapışkanlık ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	82
Çizelge 4.21.	Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı elastikiyet ölçüm sonuçları.....	85
Çizelge 4.22.	Normal ve kepekli ekmeklerin elastikiyet ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları.....	86
Çizelge 4.23.	Normal ve kepekli ekmeklerin elastikiyet ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	87
Çizelge 4.24.	Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı zamksılık analizi sonuçları.....	89
Çizelge 4.25.	Normal ve kepekli ekmeklerin zamksılık değerine ait varyans analizi sonuçları.....	90
Çizelge 4.26.	Normal ve kepekli ekmeklerin zamksılık değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	92
Çizelge 4.27.	Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı çiğnenebilirlik analizi sonuçları.....	95

Çizelge 4.28.	Normal ve kepekli ekmeklerin çiğnenebilirlik değerine ait varyans analizi sonuçları.....	96
Çizelge 4.29.	Normal ve kepekli ekmeklerin çiğnenebilirlik değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	97
Çizelge 4.30.	Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı esneklik ölçüm sonuçları.....	99
Çizelge 4.31.	Normal ve kepekli ekmeklerin esneklik değerine ait varyans analizi sonuçları.....	101
Çizelge 4.32.	Normal ve kepekli ekmeklerin esneklik değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	103
Çizelge 4.33.	Normal ve kepekli ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarı üzerine muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi.....	106
Çizelge 4.34.	Normal ve kepekli ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarına ait varyans analizi sonuçları.....	107
Çizelge 4.35.	Normal ve kepekli ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	107
Çizelge 4.36.	Normal ve kepekli ekmeklerin toplam serbest amino asit miktarı üzerine muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi.....	113
Çizelge 4.37.	Normal ve kepekli ekmeklerin toplam serbest amino asit miktarına ait varyans analizi sonuçları.....	114
Çizelge 4.38.	Normal ve kepekli ekmeklerin toplam serbest amino asit miktarı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	114
Çizelge 4.39.	Normal ve kepekli ekmeklerin kalıntı protein miktarı üzerine muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi.....	119
Çizelge 4.40.	Normal ve kepekli ekmeklerin kalıntı protein miktarına ait varyans analizi sonuçları	120
Çizelge 4.41.	Normal ve kepekli ekmeklerin kalıntı protein miktarı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	121

Çizelge 4.42.	Normal ekmekten izole edilen <i>Bacillus</i> türlerine ait biyokimyasal test sonuçları.....	125
Çizelge 4.43.	Kepekli ekmekten izole edilen <i>Bacillus</i> türlerine ait biyokimyasal test sonuçları.....	126
Çizelge 4.44.	Biyokimyasal testlerle tanılamada karşılık arz eden testler.....	133
Çizelge 4.45.	Biyokimyasal testler ve API kitleri ile yapılan tanılama sonuçları.....	136
Çizelge 4.46.	<i>Bacillus</i> türlerinin sündürme kapasitelerinin doğrulanması testi sonuçları	143
Çizelge 4.47.	Sertlik değeri değişimine ait k değerleri.....	146
Çizelge 4.48.	Serbest amino asit konsantrasyonu değişimine ait k değerleri....	148

1.GİRİŞ

Ekmek; temel bileşen olarak buğday unu, maya, tuz ve suyun belli oranlarda karıştırılıp yoğrulması ve oluşan hamurun belli bir süre fermente ettirilip pişirilmesi ile elde edilen temel bir gıda maddesidir (Elgün ve Ertugay 2002).

TS 5000 Ekmek Standardı'nda ekmek, "Elenmiş buğday ununa (TS 4500), su (TS 266), tuz (TS 933) ve maya (TS 3522) katılması ile hazırlanan kütlenin, tekniğine uygun bir şekilde işlenip fermentasyona bırakılması ve pişirilmesi ile yapılan bir mamuldür" şeklinde tanımlanarak katkısız ve katkılı ekmek olarak iki çeşide ayrılmıştır (Anonim 1987).

TS 12000 Ekmek-300 gram Standardı'nda "Ekmek, buğday ununa (TS 4500), içme suyu (TS 266), tuz (TS 933), maya (TS 3522) ve gerektiğinde sadece C vitamini, malt unu veya fungal alfa amilaz katılarak hazırlanan hamurun yoğrulup, tekniğine uygun bir şekilde işlenip fermentasyona bırakılması ve pişirilmesi ile yapılan bir mamuldür" şeklinde tanımlama yapılmaktadır (Anonim 1996).

Türk Gıda Kodeksi Ekmek ve Ekmek Çeşitleri Tebliği'nde ise; "Ekmek, ekmeklik buğday ununa içilebilir nitelikte su, tuz, maya (*Saccharomyces cerevisiae*), gerektiğinde "Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği"nde izin verilen katkı maddeleri ile Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'ndan üretim izni almış şeker, enzim ve benzeri maddeleri içeren ekmek katkı karışımları katılarak hazırlanan hamurun tekniğine uygun bir şekilde yoğrulup, çeşitli şekillerde hazırlanıp fermentasyona bırakılması ve pişirilmesi ile yapılan üründür" şeklinde tanımlanmaktadır (Anonim 2002).

Temel besin maddesi ve iyi bir enerji kaynağı olması nedeniyle gıda tüketiminde ekmek, önemli bir yere sahiptir. Dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de günlük kaloringin büyük bir kısmı hububat ve ürünlerinden sağlanmaktadır (Talay 1997). Dünyada kişi başına ekmek tüketimi yıllık olarak 41-303 kg iken, ülkemizde kişi başına yıllık tüketim ortalama 180-210kg civarındadır (Gül vd 2003). Tahıla dayalı bir beslenmenin hakim olduğu Türkiye'de kişi başına tüketilen enerjinin %66'sı

tahıllardan, bunun da %56'lık kısmı yalnız başına ekmekten, proteinin ise %50'si ekmekten karşılanmaktadır (Elgün ve Ertugay 2002).

Ekmek, çeşidine ve üretim teknolojisine göre farklılıklar göstermekle birlikte, değişik oranlarda besin unsurları içermektedir. Bu besin unsurları içerisinde %51.8 oranında bulunan karbonhidrat ile %8.5 oranındaki protein, beslenme açısından önemli bir yere sahiptir. Bunun yanı sıra A ve C vitaminlerini içermemesine karşılık buğday ekmeği B grubu vitaminler yönünden iyi bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Ayrıca beyaz ekmekte %0.5, kepekli ekmekte %1.2 oranında bulunan selüloz, gıdaların bağırsaktaki emilimini olumlu yönde etkiler; divertikül, hemoroid, kolon kanseri, kronik kalp rahatsızlıkları ve şişmanlık gibi hastalıkların görülme sıklığını azaltır (Talay 1997, Gül ve Özçelik 2000).

Asırlardır süregelen alışkanlıkların ve milli kültürün etkisiyle karbonhidrat ve protein kaynağı olarak insan beslenmesinde birinci derecede öneme sahip olan ekmek, yüksek su aktivitesi (0.96-0.98) ve pH değeri (5.6-5.8) nedeniyle mikroorganizma gelişmesi için de uygun bir ortamdır (Aran ve Boyacıoğlu 2005).

Tüketici açısından bir gıda maddesini duyuşal olarak kabul edilemez hale getiren herhangi bir değişim, bozulma olarak karakterize edilir. Bozulma, fiziksel (nem kaybı, bayatlama), kimyasal (oksidasyon, renk değişimi) ve mikrobiyal (maya, küf, bakteri gelişmesi) olmak üzere üç şekilde meydana gelebilir (Smith vd 2004). Fırın ürünlerinde fiziksel ve kimyasal bozulmalar da görülmekle birlikte, raf ömrünü kısaltan ve ekonomik kayıplara sebep olan başlıca etmenlerden birisi mikrobiyal kaynaklı bozulmalardır (Pateras 1999).

Ekmeklerde görülen ve ekmek hastalığı olarak nitelendirilen başlıca mikrobiyal bozulmalar; küflenme, rope (sünme), kırmızı leke ve tebeşir hastalıklarıdır (Elgün ve Ertugay 2002).

Kırmızı leke hastalığı, kırmızı pigmentler üreten *Serratia marcescens* (Elgün ve Ertugay 2002) bakterisinin neden olduğu, ekmekte kırmızı lekeler şeklinde görülen ve

çok az rastlanan bir hastalıktır. Sıcaklık ve rutubet koşulları uygun olduğunda, etken bakteri, 24 saat içinde ekmeklerde kan kırmızısı renkte bir görüntüye yol açar. Hastalık, kanayan ekmek olarak da bilinir (Vangöl 1999).

Tebeşir hastalığı da çok nadir görülen bir hastalık olup ekmek üzerinde enfeksiyon bölgesindeki rengin tebeşirimsi yani beyaz bir hal alması nedeniyle bu ad ile anılmaktadır (Vangöl 1999). Hastalık etmeni *Endomycese fibuliger* ve *Trichosporo variable*'dir (Elgün ve Ertugay 2002).

Ancak ekmek başta olmak üzere fırın ürünlerinde mikrobiyal bozulmaların çoğunu küflenme ve sünme oluşturmaktadır (Ellis vd 1997). ABD'de yapılan ve sadece üretim/satış yerlerini kapsayan bir araştırma, bu bozulmalar sonucu oluşan kayıpların üretim ve satış aşamasında ülke genelinde yıllık olarak 90 bin tona karşılık geldiğini, tüketici boyutunda değerlendirildiğinde ise bu kayıpların çok daha yüksek miktarlara ulaşacağını ortaya koymaktadır (Smith vd 2004).

Her ne kadar tropikal ülkelerde, küf oluşumunda *Aspergillus* spp. büyük öneme sahip olsa da genel olarak ekmekte küf oluşumuna neden olan başlıca mikroorganizma *Penicillium* spp.'dir. Unlarda önemli miktarda küf sporu olduğu bilinmektedir. Bu sebeple ekmeğe bulaşmaları da başta un olmak üzere hammadde yoluyla olur. Pişme sırasında bu sporlar önemli ölçüde ölür. Dolayısıyla ekmeklerde küf sporunun bulunması, ekmeklere pişirme aşamasından sonraki soğutma, dilimleme ve ambalajlama gibi işlemler sırasında bulaşma olduğunun göstergesidir (Legan 1993).

Sünme (rope), özellikle sıcak ve nemli iklime sahip bölgelerde mikrobiyal yükü fazla hamur unsurlarının kullanılması ile hijyen ve sanitasyon kurallarına da uyulmaması sonucunda ekmeklerde oluşan bakteriyel bir bozulmadır. Bu bozulma, ekmekte hastalık olarak değerlendirilmektedir. Hastalık etmeni, genellikle *Bacillus subtilis* (eski adıyla *Bacillus mesentericus*) olmakla birlikte, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* ve *B. cereus* türleri de hastalığa sebep olabilmektedir (Sorokulova vd 2003). Bu bakteriler toprak kökenli olup ekmeğe un, su, maya ve katkı maddeleri gibi hammaddeler yoluyla

bulaşmakta, uygun olmayan üretim koşullarında sayıları artmakta, spor oluşturarak pişirme sırasında ise canlılıklarını sürdürebilmektedirler (Smith vd 2004).

Toprak mikroflorasına bağlı olarak buğdayın mikroflorası, buğdayın mikroflorasına bağlı olarak da unun mikroflorası değişmektedir. Bu durum farklı bölgelerde yetişen buğdaylardan çekilen unların mikroflorasının da farklı olacağı anlamına gelmektedir. Ayrıca hastalık etmeni bakterilerin toprak kökenli olması buğdayın kabuk tabakasında daha fazla bakteri bulunmasına, dolayısıyla kepek içeriği yüksek unlar ile yapılmış ekmeklerde sünme etmeni bakterilerin daha fazla bulunmasına neden olmaktadır (Kirschner ve von Holy 1989).

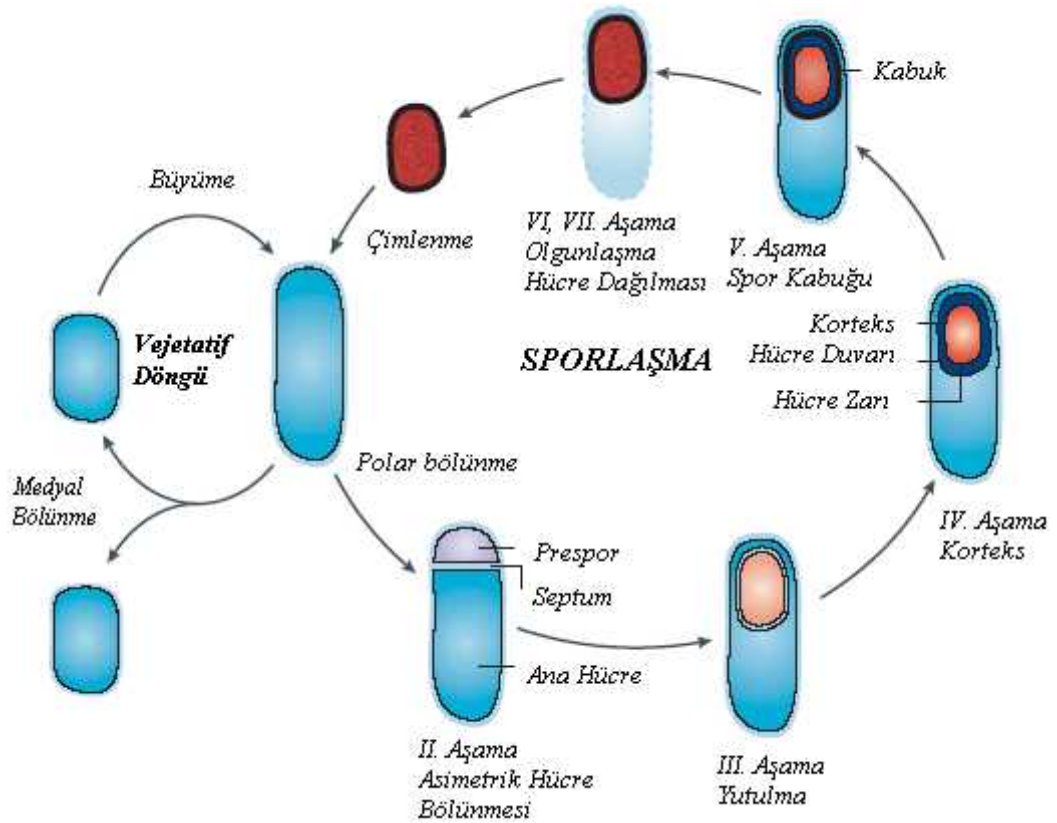
Batı ülkelerinde ekmeklerin sünme nedeniyle bozulması çok az görülen bir durumdur. Bunun nedeni iyi üretim tekniklerinin (Good Manufacturing Practices, GMP) uygulanması, mikroorganizma yükü az hamur unsurları kullanılması, üretimin kontrollü bir şekilde yapılması, hijyen standartlarının yüksekliği ve kimyasal koruyucuların yasal sınırlara uygun olarak kullanılmasıdır. Ancak son yıllarda, tüketici talepleri doğrultusunda, pek çok gıda maddesinde olduğu gibi, ekmek başta olmak üzere fırın ürünlerinde de kullanılan koruyucuların (propiyonat vb. antimikrobiyal maddeler) azaltılmasına yönelik eğilimin artması nedeniyle ekmeklerde sünme hastalığı riskinin artacağı düşünülmektedir (Bailey ve von Holy 1993). Ayrıca kepekli veya yüksek randımanlı un kullanılarak üretilmiş ekmeklerin tercih edilmesi, bu ekmeklerin ise sünme eğiliminin yüksekliği ve bunların yanı sıra tüketicinin sıcak ekmek talebi ve uygun olmayan satış yerleri gibi parametreler de dikkate alındığında, özellikle sıcak ve nemli bölgelerde sünme hastalığı önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır (Thompson vd 1998, Pattison vd 2004).

Bu araştırmada laboratuvar koşullarında pişirilmiş normal ve kepekli ekmekler, üretimden hemen sonra 7 gün süreyle 4 farklı depolama koşulunda (4°C, 25°C, 37°C ve 45°C) saklanarak 24 saatte bir bu ekmeklerin mikrobiyolojik, kimyasal ve yapısal özellikleri belirlenmiştir. Hidroliz derecesinin bir göstergesi olarak; serbest amino asit miktarındaki değişim ile yapısal özelliklerden sertlikteki değişim, sünmenin kinetik parametrelerinin hesaplanması ve matematiksel olarak modellenmesinde kullanılmıştır.

KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Fırın ürünleri, bakteri sporlarının imhasına yönelik son bir işlem geçirmemelerine rağmen, genellikle spor oluşturan mezofilik aerobik bakteriler tarafından kolayca bozulabilen riskli gıdalar değildir. Bununla birlikte, gerek üretim gerekse tüketim sırasında meydana gelen yanlış uygulamalar bu tür gıdaları riskli hale getirmektedir (Doğan vd 2005).

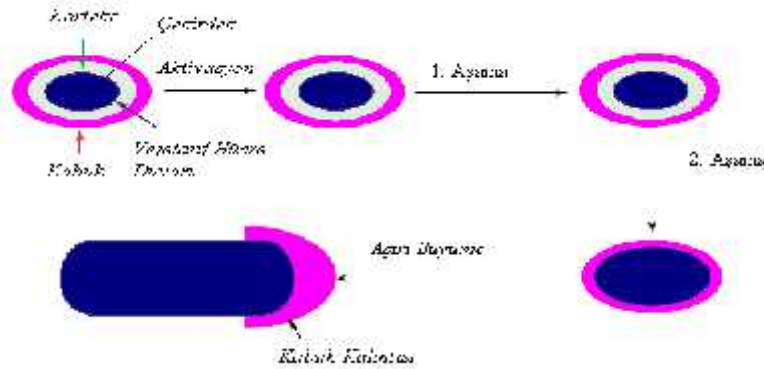
Sünme hastalığının oluşmasına, pişirme işlemi sırasında, hastalık etmeni bakterilerin vejetatif formlarının çoğu ölürken, özellikle ekmek merkezine yakın kısımlarda sıcaklığın 100°C'nin altında kalması sonucu bu bakterilerin spor oluşturarak canlılıklarını sürdürmeleri neden olur (Volavsek vd 1992). *Bacillus subtilis*'in sporlaşma döngüsü Şekil 2.1.'de (Errington 2003) verilmiştir.



Şekil 2.1. Sporlaşma döngüsü

Bacillus türlerinde spor oluşumunu tetikleyen en önemli faktör açlıktır. Ortamda besin olarak karbon, nitrojen veya bazı durumlarda fosfor kaynağı olmadığı zaman *Bacillus* türlerinin büyüyen hücreleri sporlaşır. Spor oluşumu 37°C’de yaklaşık 7 saat sürer (Piggot ve Hilbert 2004). Ayrıca *Bacillus* türleri ekstrem sıcaklıklarda, mineraller, tuzlar ve şeker gibi hipertonic ortam koşullarında da spor oluşturur. Sporlar dormant (hareketsiz) haldedir ve ısı, radyasyon, kurutma, ekstrem pH koşulları ve toksik kimyasallara karşı dayanıklıdır. Dormant haldeki spor çevresini daima kontrol altında tutar ve koşullar, gelişmek için uygun hale geldiğinde çimlenerek büyümeye devam eder (Setlow 2003). Diğer bir deyişle sporlar çevresel bir sinyale cevap olarak çimlenir, yani, vejetatif hale geçer. Çimlenmeyi sağlayan en yaygın öğeler ise amino asitler, şekerler ve ribositlerdir (Moir 2003).

Çimlenme, ortamdaki besin öğelerinin sporun iç zarındaki reseptörlere bağlanmasıyla başlar. Bu reaksiyon, spor çekirdeğinin büyük deposundaki dipikolinik asit (DPA) ve katyonların serbest bırakılmasına ve bunların yerini suyun almasına neden olur. Bu olay, sporların peptidoglikan korteksinin bakteri enzimleri tarafından hidrolizine yol açar. Korteks hidrolizinin tamamlanması ve ardından hücre duvarının genişlemesi ile tüm spor çekirdeği hidrate olur ve böylece çimlenme gerçekleşir (Setlow 2003). Spor çimlenmesi Şekil 2.2.’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.2. Sporun çimlenmesi¹

¹ Birinci aşamada katyonlar ve (DPA) serbest bırakılır, çekirdek kısmen hidrate olurken, direnç de azalma başlar. İkinci aşamada korteks hidrolize olur, çekirdek daha ileri düzeyde hidrate olur ve çekirdek genişler. Dirençte daha fazla kayıp olurken, dormansi durumu da ortadan kalkar. Aşırı büyüme aşamasında ise asitte çözünür spor proteinleri degrade olur, makromoleküler sentez gerçekleşir ve çekirdek, spor kabuğundan çıkar (Setlow 2003).

Uygun olmayan ekmek saklama koşullarında da sporlar, gelişmek için uygun ortamı bulmuş olduklarından vejetatif hale geçerek sünme hastalığını oluşturmaktadır.

Yüksek miktarda spor içeren ekmeklerin, bakteri sporlarının çimlenmesine elverişli nem ve sıcaklık koşullarında depolanması ile bakteriler vejetatif hale geçer, çoğalır, amilaz ve proteaz salgılayarak ekmekte hastalığı başlatır (Volavsek vd 1992). Fırından çıkan ekmeklerin yavaş soğutulması, ekmeklerin ılık ve rutubetli yerlerde bulundurulması, hastalığın ortaya çıkmasındaki en büyük etkidir. Hastalık etmeni sporlar 32°C'de gelişmeye başlar ve optimum 37-40°C arasında çoğalırlar. Ancak hastalık bir kez başlayınca düşük sıcaklıklarda da gelişme olur (Elgün ve Ertugay 2002).

Sünme etmeni bakterilerin gelişimi 36-48 saat içinde gerçekleşebilir ve karakteristik olarak olgun meyvemsi (kavun ya da ananas kokusuna benzer) ağır bir koku oluşumu ile birlikte ekmek içi yumuşak, lifli, yapışkan, kahverengi ve benekli bir kitle halini alır. Ekmek koparıldığında uzun ve sakız gibi lifler gözlenmektedir (Voysey 1989, Pateras 1999). Duyusal nedenlerle böyle bir ürünün tüketilemeyeceği düşünülmeyle birlikte, ürünle yüksek miktarlarda spor ($\sim 10^6$ - 10^9 spor/g) tüketilmesi durumunda bulantı, kusma, ishal, baş ağrısı vb. belirtilerle ortaya çıkan gıda zehirlenme vakaları görülebilmektedir (Smith vd 2004).

2.1. Sünme (Rope) Spor Sayımının, Sünmenin Oluşumunun ve Etmen *Bacillus* Türlerinin Tanılanmasının Yapıldığı Çalışmalar

Türk Gıda Kodeksine göre tahıl unlarında en fazla 4.5×10^3 adet/g, yaş veya kuru ekmek mayasında en fazla 2.1×10^2 adet/g ve ekmekte en fazla 1.1×10^4 adet/g spora müsaade edilmektedir (Anonim 2001).

Yapıcı ve Barut (2003) Manisa'nın Salihli ilçesindeki fırınlarda üretilen ekmeklerin bazı mikrobiyolojik analizini yaptıkları bir çalışmada ilkbahar aylarında inceledikleri 20 adet ekmek örneğindeki toplam aerobik mezofil bakteri sayısının ortalama 5.6×10^4 kob/g, küf sayısının ise ortalama olarak 1.9×10^3 kob/g olduğunu tespit

etmişlerdir. Rope (sünme) sporu açısından bir değerlendirmeye gidildiğinde incelenen örneklerin 9 tanesinde sünme sporuna rastlanmazken, sünme etmeni bulunanlarda ortalama değerin 5.7×10^3 kob/g olduğu belirlenmiştir. Yaz aylarında çalıştıkları 40 adet örnekte ise ortalama toplam aerobik mezofil bakteri ve küf sayısını sırasıyla 5.5×10^4 kob/g ve 1.4×10^3 kob/g olarak tespit etmişlerdir. 3 adet örnekte sünme sporu bulunmazken, bulunanlarda ortalama değerin 2.4×10^4 kob/g olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar, aldıkları 60 adet ekmek örneğinin, ilgili standartlarda yer alan mikrobiyolojik kriterler dikkate alındığında, 36 adedinin tüketime uygun olmadığını tesbit etmişlerdir.

Karaoğlu (2002) farklı sıcaklık ve sürelerde muhafaza edilen kısmi pişmiş ekmeklerin teknolojik ve mikrobiyolojik özelliklerini belirlediği çalışmada depolama süresine bağlı olarak beyaz tava ekmeği, çavdar ekmeği ve kepekli ekmekte *Bacillus* spor sayısının katkısız ve katkılı ekmek için sırasıyla 2,00-6.25 log kob/g ve 2,00-2.78 log kob/g, 2,00-7.95 log kob/g ve 2,00-2.24 log kob/g, 2,00-7.75 log kob/g ve 2,00-3.65 log kob/g arasında değiştiğini tespit etmiştir.

Ekmeğe *Bacillus* sporlarının bulaşmasına neden olan en önemli kaynak un olmakla birlikte, maya ve su gibi diğer hammaddelerin yanı sıra ekmek katkı maddesi, fırın atmosferi ve üretimde kullanılan ekipmanların yüzeyi de bulaşma kaynakları arasında yer alır.

Bailey ve von Holy (1993) ticari bir fırının tipik esmer ekmek üretim hattındaki *Bacillus* sporu kontaminasyon profilini (spor sayısı, tipi ve kontaminasyon kaynağı) belirlemek için mikrobiyolojik çalışmalar yapmış ve *Bacillus* türlerini karakterize etmişlerdir. Araştırma sonunda spor içeriği en fazla olan ham maddenin maya ($5.15 \log \text{cfu g}^{-1}$) olduğunu, bunu sırasıyla katkı maddeleri ($4.01 \log \text{cfu g}^{-1}$), un ($2.69 \log \text{cfu g}^{-1}$) ve suyun ($1 \log \text{cfu g}^{-1}$) takip ettiğini belirlemişlerdir. Katkı maddesinde beklenilenden daha fazla spor bulunmasına, içeriğindeki soyanın neden olduğu bildirilmiştir. Temas yüzeyleri dikkate alındığında; spor sayısı en yüksek olan bölümlerin, pişirme öncesinde bölücü, konveyör, yuvarlayıcı ve ara fermentör, hamur ceplerinin olduğu ($>2 \log \text{cfu/eküvyon}$), pişirme sonrasında ise ambalajlama ve paketleme bölümlerinin olduğu

saptanmıştır. Raf ömrünü belirlemek amacıyla, ekmekler 30°C’de 3 gün depolanmış ve ekmeklerin spor yükü 6.38 log cfu g⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Bu süre içinde ekmeklerde sünme hastalığının oluştuğu gözlenmiştir.

Aynı çalışmada gıda temas yüzeyi, ham madde, ekmek hamuru ve pişmiş ekmeklerden elde edilen 300 izolatin tamamının Gram pozitif, sporlu ve çubuk şeklinde bakteriler olduğu belirlenmiş ve bunların karakterizasyonu yapılmıştır. Baskın türlerin *Bacillus licheniformis* (%45.4) ve *B. subtilis* (%38.0) olduğu; *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. laterosporus* ve *B. cereus*’un ise sırasıyla %9.3, %4.0, %2.3 ve %1.0 oranlarında bulunduğu tespit edilmiştir.

Volavsek vd (1992) un ve hamur örneklerinin sünme oluşturma potansiyelini değerlendirdikleri bir çalışmada toplam aerobik bakteri sayımı, mezofilik spor sayımı ve sünme (rope) spor sayımı yapmışlardır. Un örneklerinin %36.4’ünde 2-3 log cfu g⁻¹ spor bulurken, %54.4’ünde 1-2 log cfu g⁻¹ spor bulmuşlardır. Ayrıca toplam bakteri sayısı ile spor sayısı arasında da korelasyon olmadığını belirlemişlerdir.

Rosenkvist ve Hansen (1995) ekmek ve hammaddelerindeki *Bacillus* yükünü tür bazında belirlemiş, izole edilen türlerin ısıya dayanıklılığını ve sünme oluşturma yeteneğini araştırmışlardır. Ekmek hammaddelerinin ısıl dayanımı yüksek *Bacillus* sporlarının önemli bir kaynağı olduğu belirlenirken, yapılmış diğer çalışmalara nazaran hammaddelerde daha az miktarda spor bulunmasına rağmen, bu hammaddeler kullanılarak yapılmış ekmeklerin birkaç gün depolanmasının ardından her 1 gram ekmek içinde oldukça yüksek miktarda *Bacillus* olduğu saptanmıştır. Koruyucu ya da ekşi maya kullanılmadan üretilmiş ekmekler satın alınıp 25-30°C’de 2 gün depolandıktan sonra analiz edildiğinde *Bacillus* yükünün (10⁶ kob g⁻¹) oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ekmeklerden *Bacillus subtilis* (%70), *B. licheniformis* (%24), *B. pumilus* (%2) ve *B. cereus* (%2) izole edilmiş ancak sünme hastalığına yalnızca *Bacillus subtilis* suşlarının neden olduğu bulunmuştur.

Thompson vd (1998) fırın ortamından (hammadde, hamur, üretim hattı ve ekmek) izole ettikleri farklı *Bacillus* türlerinin sünme oluşturma potansiyellerini belirlemek için

bunlardan elde ettikleri bakteri kültürlerini doğrudan ekmek dilimlerine inoküle etmiş, bakterilerin tanımlanması işlemini API (Analytical Profile Index) kitleri ile yapmışlardır. Denemelerde yumuşak buğday unu ile yapılmış, kalsiyum propiyonat içeren yedi ekmek, yumuşak buğday unu ile yapılmış sirke içeren yedi ekmek ve kalsiyum propiyonat içeren beyaz ekmek olmak üzere üç tip ekmek kullanmışlardır. Sonuçta sirke içeren ekmeklerde sünme gelişmemiştir. Aynı tip ekmeklerde, içerdiği koruyucu maddeye bağlı olarak, sünmenin aynı derecede oluşmadığı belirlenmiştir. Ayrıca koruyucu maddelerin etkinliği ölçülürken, pişirilmek üzere hazırlanmış hamura *Bacillus* sporlarının ilave edilmesinin sünme oluşumunun tahmininde doğru bir metod olmadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışma sünme gelişimine ekmek tipi, pH, *Bacillus* türü, *Bacillus* türleri arasındaki antagonistik etki gibi çeşitli faktörlerin etkili olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar sünme gelişiminin engellenmesinde kalsiyum propiyonata göre sirkenin çok daha etkili bir koruyucu olduğunu belirlemişlerdir.

Leuschner vd (1998) yarı-pişmiş ve tekrar-fırınlanmış, sodalı esmer ekmekte sünme gelişimini incelemiş, sünme etmeni *Bacillus* türlerini izole edip tanılamışlardır. Ayrıca ekmeğin bozulmasına neden olan bakteri sporlarının çimlenip gelişmesini engelleyecek pH ve sıcaklık koşullarını da araştırmışlardır. Çalışma pH ve sıcaklığı olarak pH 6-10 ile 4°C, 20°C, 30°C ve 37°C seçilmiştir. Ekmeklerden *Bacillus pumilus*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* izole edilmiş ancak sadece *B. subtilis*'in bulunduğu ekmeklerde sünme oluştuğu gözlenmiştir. 4°C'de hiç gelişme olmadığını, 20°C'de üç türün de gelişebildiğini, her üç türün en hızlı geliştiği sıcaklık derecesinin ise 37°C olduğunu belirlemişlerdir. Gelişmenin gerçekleşmediği asitlik derecesi pH 10 olarak saptanmıştır. Tekrar fırınlamanın ise *Bacillus* türlerini aktive ettiği hatta; taze, yarı-pişmiş ekmek hazırlama sırasında *Bacillus* türlerinin artmasına neden olan en önemli aşama olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus türleri Gram pozitif, aerobik, çubuk şeklinde, endospor oluşturan canlılar olup doğada çok yaygın olarak bulunurlar. *Bacillus* cinsi ilk kez 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından tanımlanmıştır. O zamandan beri Krasil'nikov, Prevot ve Gordon vd tarafından üç temel sınıflandırma cetveli oluşturulmuştur. Gordon vd tarafından oluşturulan, aralarında en iyi olandır ancak yeni izole edilen *Bacillus* türlerinin

sınıflandırmaya dahil edilmesinde problemler çıktığı bildirilmektedir. Yapılan DNA çalışmalarının sonuçlarına göre *Bacillus* cinsinin homojen olmadığı, dolayısıyla türlerinin çeşitli yeni cinsler içinde yeniden sınıflandırılması gerektiği savunulmaktadır. Ayrıca daha önceden izole edilmiş olan *Bacillus*'ların çoğunun önemli ölçüde heterojen olması nedeniyle de taksonomik revizyona ihtiyaç duyulmaktadır. *Bacillus* türleri Gram boyama gibi klasik yöntemlerle ya da API gibi ticari olarak satılan kitlerle ayırt edilebilmektedir. Özellikle yeni izole edilen *Bacillus* türlerinin klasik yöntemlerle tanılanması esnasında referans suşların kullanılması, tanılamamanın güvenilirliği açısından önemlidir. Klasik yöntemlerde kullanılan kimyasalların raf ömrünün kısa olması, analiz için uzun zamana ihtiyaç duyulması ve *Bacillus* cinsinin heterojen olması nedeniyle tanılamamanın tam olarak yapılamaması, araştırmacıları *Bacillus* suşlarını hızlı ve doğru bir şekilde tanılamaya yönelik çalışmaları yapmaya itmiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda geliştirilen API tanılama kitlerinin, klasik yöntemlere göre daha güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği bulunmuştur (Logan ve Berkeley 1984, Collins vd 1991).

İzolatların tiplendirilmesinde, yakın zamana kadar, genellikle fenotipik özellikler önemli rol oynamıştır. Ancak fenotipik karakterlerin stabil olmaması ve çeşitli nedenlerle değişebilmesi, değerlendirmelerin yanlış sonuçlara ulaşmasına neden olmaktadır. Son yıllarda daha yaygın olarak kullanılmaya başlanan modern moleküler yöntemlerin temeli daha stabil genotipik karakterlere dayandığından daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Moleküler yöntemlerden biri olan ribotiplendirme (moleküler tiplendirme), bakterileri rRNA'daki farklılıklarına dayalı olarak tanılamaya ve sınıflandırmaya dayanan bir metottur. Bu metod tür kategorisinin ötesinde bakterileri doğrudan cinsinden sınıflandırmada kullanılan kesin bir parmak izidir. Bu teknikte bakteri kolonisinden DNA ekstrakte edilir. Sonra farklı ölçüdeki fragmanlar sınırlandırılır. Daha sonra DNA bir membrana transfer edilir ve rRNA geninin kalıbını ortaya çıkarmak için rRNA operonunun bir bölgesi ile problanır. Kalıp kayıtlanır, sayısallaştırılır ve bir veri tabanı içinde depolanır. Her iki pozisyondaki bakteriler arasında varyasyonlar vardır ve rRNA bantlarının yoğunluğu bakterilerin tanılanmasında kullanılabilir. Ribotiplendirme, tüketim ürünleri ve diğer bütün kaynaklardan izole edilen bakteriler arasındaki ilişkilerin anlaşılır şekilde kurulmasına

izin verir. Bu açıdan kontamine olmuş yiyeceklerin tanılanmasında ve yok edilmesinde önemlidir (Sarıkaya 2004).

Collins vd (1991) daha önce sünmüş ekmek, fırın ekipmanları ve ham maddelerden izole ettikleri 202 *Bacillus* türünü katalaz üretimi, Voges-Proskauer testi, anaerobik agarda gelişme, 50°C’de gelişme, %7 NaCl içinde gelişme ve nişasta hidrolizi testlerini kullanarak tanılamışlardır. İzolatları *B. subtilis* (%63.7), *B. licheniformis* (%24.5), *B. pumilus* (%8.8), *B. cereus* (%2.0) ve *B. firmus* (%1.0) olarak ayırt etmişlerdir. Tanılama işlemini API 50CHB kullanarak yaptıklarında ise izolatları *B. subtilis* ve *B. amiloliquefaciens* (%58.2), *B. pumilus* (%20.4), *B. licheniformis* (%17.4), *B. cereus* (%3.0) ve *B. circulans* (%1.0) olarak gruplandırmışlardır.

Thompson vd (1993) 170 fırından aldıkları ekmek katkısı, hamur, ekmek ve ekmek içi ile proses hattından aldıkları örneklerdeki *Bacillus* türlerini hem klasik yöntemlerle hem API 50CHB hem de modern moleküler bir yöntem olan ribotiplendirme kullanarak tanılamışlardır. Klasik yöntemlerle yapılan tanılama sonuçları şu şekildedir: *B. pumilus* (17.1), *B. licheniformis/B. coagulans* (ayırte dileyemeyen profil) (%12.9), *B. subtilis* (%9.4), *B. cereus* (%6.5) izolatların %34.7’si ise tanılanamamıştır. API 50CHB ile yapılan tanılamaya göre ise izolatlar, *B. subtilis* ve *B. amiloliquefaciens* (%34.7), *B. licheniformis* (%28.7), *B. pumilus* (%16.0), *B. circulans* (%4.1), *B. megaterium* (%3.6), *B. polymyxa* (%3.5), *B. macerans* (%3.0), *B. mycoides* ile birlikte *B. cereus* (%2.4), *B. stearothermophilus* (%0.6) olarak belirlenmiş ve %4.2’lik kısım ise kabul edilemez profil olarak bulunmuştur. Ribotiplendirme yapıldığında, API 50CHB ile benzer profil veren bazı izolatların (*B. subtilis*), benzer ribotip verdikleri görülmüştür. Ancak karbonhidrat kullanımı açısından değerlendirildiğinde benzer profil göstererek *B. pumilus* olarak tanılanan iki suşun farklı ribotipler verdiği görülmüştür.

Sorokulova vd (2003) farklı un ve sünmüş ekmek örneklerindeki *Bacillus* türlerini sayıp karakterize etmiş ve ekmekte sünme hastalığının oluşmasında rol oynayan bazı suşların genetik profillerini, moleküler bir yöntem olan RAPD-PCR kullanarak ortaya çıkarmışlardır. Un örneklerindeki *Bacillus* sayısının 1.1×10^4 ile 8.3×10^4 kob g⁻¹ arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Üretimin hemen akabinde *Bacillus* sayısı 7×10^2 -

1.3×10^4 kob g^{-1} iken 2 gün süre ile $37^\circ C$ 'de depolama sırasında 2.0×10^4 - 7.2×10^6 kob g^{-1} arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. *Bacillus* sayısı 6×10^6 kob g^{-1} ve daha fazla olduğunda ise ekmeklerde sünme hastalığının oluştuğunu gözlemişlerdir. Un örneklerinden fenotipik karakterlerine göre tanıladıkları 30 suşun 25'inin *B. subtilis*, 5'inin *B. licheniformis* olduğunu, dört örnekte her iki türün de bulunduğunu belirlemişlerdir. Aynı türleri, fırınlardan alınan sünmüş ekmeklerden de izole etmiş, ancak türlerin %50'sinin *B. licheniformis* olduğunu saptamışlardır. RAPD analizi de unlardan izole edilen bu iki *Bacillus* türünün depolama sırasında ekmekte sünme hastalığının oluşmasına neden olduğunu doğrulamıştır.

2.2. Sünme Hastalığının Engellenmesine Yönelik Olarak Yapılan Çalışmalar

Ekmek ve unlu mamüllerde görülen sünme ve küflenmenin önlenmesinde kimyasal koruyucu ve laktik starter kullanımı oldukça yaygındır. Uygulanan kimyasal koruyucular; propiyonik asit, sorbik asit, benzoik asit, asetik asit ve tuzları ile laktik asit ve fosfat tuzlarıdır. Laktik starter kullanımı ise fermentasyon sırasında asit oluşumu ile pH'yı düşürerek, zararlı mikroorganizmalar üzerine inhibe edici etki yaratmaktadır. (Göçmen ve Gürbüz 2000). Bu koruyucuların etki düzeyleri Çizelge 2.1.'de görülmektedir.

Çizelge 2.1. Bazı kimyasal koruyucuların ve laktik starterin fırıncılık ürünlerinde bozulma etmeni bakteri ve küfler üzerine etkileri

Kimyasal koruyucu	Bakteri	Küf
Propiyonik asit ve tuzları	Kısmen etkili	Etkili
Sorbik asit ve tuzları	Kısmen etkili	Etkili
Benzoik asit ve tuzları	Zayıf etkili	Etkili
Benzoik asit esterleri	Etkili	Etkili
Benzoat ve sorbat karışımları	Etkili	Etkili
Asetik asit ve tuzları	Etkili	Zayıf etkili
Laktik asit	Etkili	-
Fosfat tuzları	Etkili	-
Laktik starter	Etkili	Etkili

Kullanılan inhibitör maddeler, düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilmeli, insan vücudunda zehirli etki göstermemeli ve üründe arzu edilmeyen değişikliklere sebep olmamalıdır (Göçmen ve Gürbüz 2000).

Laktik asit bakterilerinde antibakteriyel aktivite; organik asitler, karbondioksit, etanol, hidrojen peroksit ve diasetil yanında düşük moleküler ağırlıklı peptidleri içeren bakteriyosinlerden ileri gelebilmektedir. Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen, antibakteriyel etkiye sahip ve protein yapısında olan ya da proteinler ile birlikte bazı yan gruplar da içerebilen metabolitler olarak tanımlanmaktadır. Ekşi hamur örneklerinden izole edilerek tanımlanan *Lactobacillus* (*Lb. alimentarius* LMO6, LMO7 ve *Lb. plantarum* LMO23, LMO25, ve LMO28) suşlarının bakteriyosin üretim özellikleri ve bu suşların farklı indikatör bakterilere karşı antibakteriyel etki spektrumlarının araştırıldığı bir çalışmada kullanılan suşların sünme etmeni olan *Bacillus subtilis* ve *B. licheniformis*'e karşı da en yüksek inhibitör etki zonunu oluşturduğu saptanmıştır (Menteş vd 2005).

Menteş vd (2007) ekmek hamuruna, ayrı ayrı olmak üzere, *Lactobacillus plantarum* LMO25 ve *Lactobacillus alimentarius* LMO7 içeren ekşi maya ilave ederek sünme gelişimini önlemeye yönelik yaptıkları diğer bir çalışmada, ekşi maya pH'sı (pH 3.5-4.0) düşük iken %15 veya %20, ekşi maya pH'sı (pH>4) daha yüksek olduğunda ise %20 oranında ekşi maya ilavesinin ekmeklerde *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis*'in neden olduğu sünme hastalığının engellenebildiğini belirlemişlerdir.

Ekmeklerde sünme hastalığının önlenmesinde en etkili koruyucu madde propiyonik asitin sodyum ve kalsiyum tuzlarıdır. Tavsiye edilen kullanım düzeyi ise un ağırlığına göre %0.125-0.32'dir (Göçmen ve Gürbüz 2000). Ancak kimyasal koruyucuların kanserojen olduğunun belirlenmesi üzerine tüketicilerin doğal ya da katkısız ürünleri talep etmesi nedeniyle araştırmacılar, sünme hastalığının önlenmesinde doğal antimikrobiyal maddelerin kullanımının etkilerini araştırmaya yönelmiştir. Sünme inhibitörü olarak, doğal antimikrobiyal maddelerin (asetik asit, laktik asit, kalsiyum laktat, laktat içeren karışım) farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarının kalsiyum propiyonat ile karşılaştırıldığı bir çalışmada test ekmekleri, ticari bir fırında standart koşullarda üretilmiştir. Bir grup ekmekte kalsiyum propiyonat hiç kullanılmazken, diğer bir grup ekmekte az miktarda kullanılmıştır. Kalsiyum propiyonatın miktarı azatılarak doğal koruyucularla birlikte kullanıldığında sünmenin engellenebildiği gözlenmiştir. Kalsiyum propiyonat hiç kullanılmayıp diğer koruyucu maddeler teker teker

uygulandığında sünmenin tam olarak kontrol altına alınamadığı, doğal koruyucularla kombine halde kullanıldığında ise sünmenin önemli ölçüde engellenebildiği belirlenmiştir (Pattison vd 2004).

Rosenquist ve Hansen (1998) sünmeyi önlemek ve ekmek güvenilirliğini sağlamak amacıyla buğday ekmeğinden izole edilen *Bacillus subtilis* ve *B. licheniformis* suşları üzerine organik asitler (laktik asit, asetik asit, propiyonik asit), ekşi maya (bazıları bakteriyosin üretebilen laktik asit bakterileri ile fermente edilmiş) ve nisinin antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Un ağırlığına göre %0.1 propiyonik asit veya asetik asit; *Lactobacillus plantarum* C11, *Lactobacillus brevis* L62, *Lactobacillus plantarum* ('vege-start60'), *Lactobacillus plantarum* (ch 20), *Lactobacillus maltaromicus* (ch 15) ile fermente edilmiş %15 ekşi maya ya da ticari ekşi maya starter kültürü, *Lact. sanfrancisco* L99 ilavesinin sünmeyi engelleyebildiği, hamura starter kültür olarak ilave edilen bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri ve unda 100ppm'e kadar nisin *Bacillus subtilis* ve *B. licheniformis* üzerine baskılama etkisinin olmadığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir.

Laktik asit bakterileriyle, ekmeklerde sünmenin önlenmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada ise *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076 ve *Pediococcus pentosaceus* VTT E-90390 ile fermente edilmiş ekşi maya ya da ticari starter kültür olan *Lactobacillus brevis* kullanılarak yapılan ekmeklerde ekşi hamur pH'sı < 4, toplam titre edilebilir asitliği >12 olduğu zaman, laktik asit bakterilerinin *B. subtilis* ve *B. licheniformis* üzerinde baskılayıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Ancak laktik asit tek başına kullanıldığı zaman sünme gelişimini engelleyemediği tespit edilmiştir (Katina vd 2002).

Pepe vd (2003) sünme etmeni *Bacillus* türlerini fenotipik ve genotipik düzeyde karakterize etmek ve starter kültür olarak seçmiş oldukları laktik asit bakterilerinin sünmeyi önleyip önlemeyeceğini belirlemek için bir yıl boyunca fırın ve marketlerden aldıkları farklı ekmeklerde *Bacillus* türlerinin oluşumunu incelemişlerdir. Ekmeklerdeki sünme farklılığının, ekmek boyutlarından ileri geldiğini bildirmişlerdir. Yüksekliği $\geq 10\text{cm}$ ve $\leq 10\text{cm}$ olan ekmekler kullanılmıştır. Yüksekliği fazla olan ekmeklerde sünme gelişiminin daha fazla olduğu saptanmıştır. Biyokimyasal testlerle tüm isolatlar

Bacillus subtilis olarak karakterize edilirken, moleküler metotlar uygulandığında *B. subtilis*'in yanı sıra *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. clausii* ve *B. firmus* da tanımlanmıştır. Ekşi mayadan izole edilen ve doğrudan ekmek mayasına ilave edilen çeşitli laktobasil suşlarının ise *Bacillus* türlerinin gelişimini 7-15 gün baskılayabildiği sonucuna varmışlardır.

Odame-Darkwah ve Marshall (1993) *Propionibacterium shermanii*'nin *Bacillus pumilus* ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişimi üzerindeki etkilerini ve *P. shermanii* ile *B. pumilus* arasındaki etkileşimin ekmeklerde sünmeyi engellemede etkili olup olmadığını belirlemek için bir araştırma yapmışlardır. *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* laktik asit, karbonhidratlar ve bazı polialkoller fermente ederek propionik asit, asetik asit ve karbondioksit üretebilme yeteneğine sahiptir. Yapılan çalışmada *P. shermanii*'nin *S. cerevisiae* üzerine herhangi bir inhibe edici etkisinin olmadığı, ancak *B. pumilus* üzerine baskılayıcı etkisi olması sebebiyle, ön hamur (sponge) yöntemiyle üretilen ekmeklerde sünmenin engellenmesi için *P. shermanii* kullanımının yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Marshall ve Odame-Darkwah (1994) başka bir çalışmada ise *Propionibacterium shermanii*'nin *Bacillus pumilus*'un gelişmesini inhibe etme mekanizmasını araştırmışlardır. Propionik asit üretimi sonucu düşen pH'nın (pH=4.3) *B. pumilus* gelişimini engellediği ve propiyonik asit üretiminin devamlılığının sağlanması için kültür ortamında %0.8-1.0 laktat bulunması gerektiği belirlenmiştir.

2.3. Ekmekte Tekstür Ölçümüne Yönelik Olarak Yapılan Çalışmalar

Gıdaların kalitesini belirlemede en çok yararlanılan özelliklerden biri olan tekstür, gıdaların, duyu organlarıyla algılanabilen yapısal ve mekanik özellikleridir (Szczeniak 1998). Tekstür, bir ürünün tüketiminin ardından ağız ve dil ile algılanabilen bir özelliktir ve yoğunluk, vizkozite, yüzey gerilimi ve diğer fiziksel özelliklerle yakından ilgilidir (McKenna 2003).

Gıdaların duyu özellikleri genellikle görünüm, aroma ve tekstür olmak üzere üç grup altında incelenir. Fakat bu üç grup da birbirinden bağımsız düşünülemez. Örneğin;

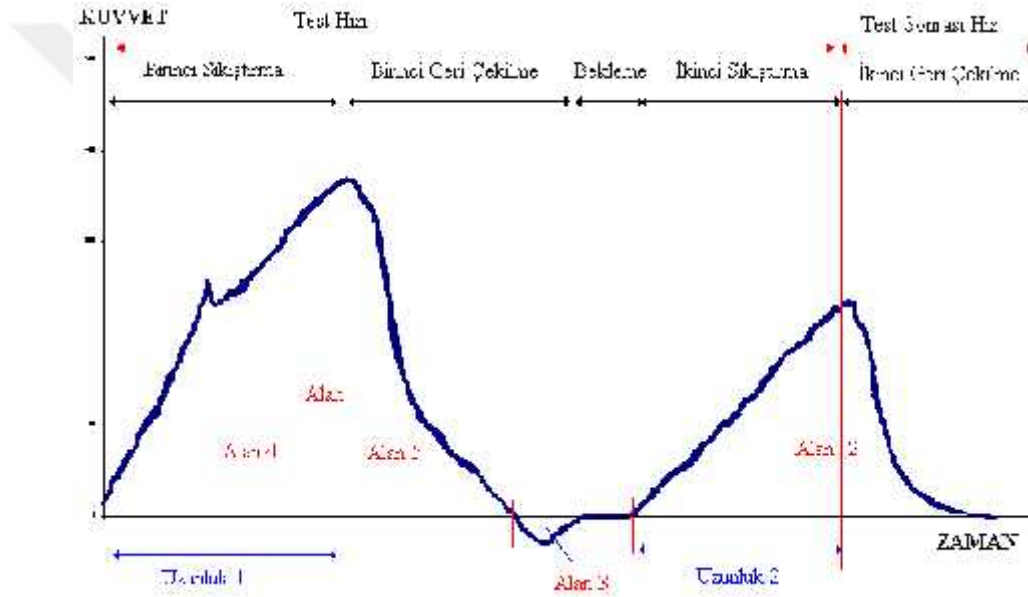
renk, görsel bir özellik olmasına rağmen aromanın algılanmasında da etkilidir. Benzer olarak, vizkozite gibi tekstürel özellikler aromanın algılanmasını, asitlik gibi aromatik özellikler de tekstürün algılanmasını etkiler. Gıdaların duyuşsal özelliklerinin tanımlanmasında kullanılan aroma ile tekstür arasında yakın bir ilişki olmasına karşın bunları birbirinden ayıran özellikleri de vardır (Kilcast 2004). Aroma kimyasal kökenli iken, tekstür fiziksel kökenlidir. Aroma, ağızdaki spesifik tat reseptörleriyle algılanırken; tekstürel özelliklerin algılanması için spesifik reseptörler yoktur. Aroma, koku hissine bağlı olarak belirlenirken, tekstürel özelliklerin çoğu bir kuvvete karşı gösterilen direncin ölçülmesi ile belirlenir (Szczeniak 1998).

Gıdaların tekstürel özelliklerinin belirlenmesi ve ölçülmesinde en sık kullanılan yöntem olan Tekstür Profil Analizi (TPA), tekstürel özellikleri analiz metodunda ilk kez kullanan Szczeniak (1963) tarafından geliştirilmiş, nesnel bir yöntemdir. TPA testi bir gıda maddesinin, çene hareketine benzer şekilde, bir piston yardımıyla iki kez sıkıştırılması prensibine dayanır. Bu sıkıştırma sırasında çizilen Kuvvet-Zaman grafiğinden yararlanarak da tekstürel özelliklere ait sonuçlar elde edilir. Gıdaların tekstürel özellikleri birincil (sertlik, kohezif yapışkanlık, elastikiyet, adezif yapışkanlık) ve ikincil özellikler (kırılganlık, çiğnenebilirlik, zamksılık) olmak üzere iki grupta incelenir. Orijinal TPA grafiklerinden beşi ölçülen, ikisi hesaplanan olmak üzere toplam yedi tekstürel özellik hakkında bilgi edinilir (Anonymous 2007).

Tekstürel özellikler genellikle sertlik, adezif ve kohezif yapışkanlık, zamksılık, kırılganlık, çiğnenebilirlik, vizkozite, elastikiyet, esneklik gibi terimlerle ifade edilir. Bu kavramlar Türkçe olarak bilim literatürüne henüz tam olarak yerleşmemiştir.

Şekil 2.3.'de örnek TPA grafiği gösterilmiştir. Birinci sıkıştırma anında elde edilen maksimum kuvvet değeri sertlik olarak ifade edilirken, yine birinci sıkıştırma anında elde edilen belirgin ilk pik kırılganlık değerini verir. Ürünün ikinci deformasyona ne kadar iyi dayanabildiğinin bir ölçüsü olan kohezif yapışkanlık (cohesiveness) değeri, şekle göre, Alan 2'nin Alan 1'e oranlanması ile hesaplanır. Elastikiyet ise ürünün ilk sıkıştırma esnasında deforme olduktan sonra geri dönüşünün ne kadar iyi olduğuyula ilgili bir değerdir ve uzunluk 2'nin uzunluk 1'e oranı olarak ifade edilir. Çiğnenebilirlik,

yalnızca katı gıdalar için uygulanabilen ve zamksılık (gumminess)*elastikiyet (uzunluk 1/uzunluk 2) olarak hesaplanan bir değerdir. Zamksılık ise sadece yarı katı gıdalara uygulanabilir ve sertlik*kohezif yapışkanlık olarak hesaplanır. Adezif yapışkanlık (adhesiveness) gıda ile prob yüzeyi arasındaki çekim kuvvetinin üstesinden gelebilmek için yapılması gereken iş olarak tanımlanır (Alan3). Esneklik, (resilience) ürünün eski halini almak için gösterdiği direnci gösteren bir değerdir (Alan 5/Alan4) ve birinci sıkıştırmanın geri dönüşü sırasında, bekleme zamanı başlamadan önce ölçülür (Anonymous 2001).



Şekil 2.3. Tekstür profil analizi grafiği

Tekstür profil analizlerinde dikkat edilmesi gereken, her iki sıkıştırma grafiğini aynı koşullar altında elde etmek ve eğri altında kalan alanları tam olarak karşılaştırabilmek için test hızı ile test sonrası hızın aynı olmasını sağlamaktır (Anonymous 2007).

Ekmek ve benzeri ürünlerde, kaynağı çok çeşitli olmak üzere, oldukça fazla tekstürel değişim söz konusudur. Bütün pişmiş ürünler bir dış (kabuk) bir de iç tabakadan oluşur. Kabuk tabakasının daha koyu renkli ve düşük nem içerikli olması, ürünün iç ve dış kısımlarının farklı tekstürel özellikler göstermesine neden olur (Cauvain 2004).

Ekmekte tazeliğin bir göstergesi olan tekstür, tüketiciler tarafından ekmeklerin kabul edilebilirliğinde önemli bir özelliktir. Çalışmalar, bayatlama ile değişen tekstürel özelliklerin, ekmek bileşiminde yer alan nişasta, protein, lipit ve suda meydana gelen değişimlerle ilgili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Brady ve Mayer 1985).

Ekmegin yapısal özelliklerinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntem, duyu analizlerin yanı sıra, ekmeğin sertliğini ölçmektir. Ekmekte sertlik, genellikle ekmek için yumuşaklığında meydana gelen azalma olarak ifade edilir. Yumuşaklıkta meydana gelen azalmanın muhtemel iki sebebi vardır. Birincisi, ekmek için nem kaybetmesi, ikincisi ise nişastanın retrogradasyonudur. Kabuk kısmı için negatif bir özellik olan sertliğin gevreklik ile karıştırılmaması gerekir (Cauvain 2004). Patel vd (2005) farklı pişirme koşullarının ekmek sertleşmesi ve nişasta özellikleri üzerine etkisini inceledikleri bir çalışmada, bütün pişirme koşulları için piştikten 2 saat sonra, ekmek sertliğinin hemen hemen aynı olduğunu, 15 gün depolandıktan sonra ekmek sertliğinde artış olduğunu ve bu artışın yüksek sıcaklıkta pişmiş olan ekmeklerde düşük sıcaklıkta pişmiş olanlara göre daha fazla olduğunu bulmuşlardır.

Ekmekte sertlik ölçümü ile bayatlama arasındaki korelasyonun çok iyi olduğu belirlenmiştir. Ancak tüketici için tekstürün ölçülmesinde sertliğin yanı sıra yapışkanlık, elastikiyet, çiğnenebilirlik, kırılabilirlik gibi özelliklerin de oldukça önemli olduğu bildirilmiştir. Ekmek tekstürünün duyu ve aletsel ölçümü arasındaki korelasyonu belirlemeye yönelik bir çalışmada fırınlardan alınan çavdar ve Fransız ekmekleri bireysel olarak kilitli poşetlerle ambalajlanmış ve test edilinceye kadar -15°C’de depolanmıştır. Analizden hemen önce ekmekler 2.5cm kalınlıkta dilimlenmiş ve duyu testleri yapılmış, duyu testten 4 saat sonra da aletsel ölçümler yapılmıştır. Ölçümler ile ekmeklerin sertlik, yapışkanlık, elastikiyet ve çiğnenebilirlik özellikleri belirlenmiştir. Her iki ekmek tipi için duyu analiz sonuçlarına göre sözü geçen özellikler arasında çok fazla fark olmadığı ancak tekstür profil analizi sonuçları arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiş, bu durum da iki test arasındaki farkın bekleme süresinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Her iki ekmek tipi için de duyu ve aletsel ölçümler arasındaki korelasyon katsayısı hesaplanmış, çavdar ekmeğinde korelasyonun istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiş, yapışkanlık ve

çiğnenebilirlik için korelasyon katsayılarının sırasıyla 0,49 ve -0,58 olduğu saptanmıştır. Fransız ekmeğinde ise sadece çiğnenebilirlik (-0,47) ile ilgili olan korelasyonun istatiki olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Duyusal ve aletsel ölçümler arasındaki ilişkinin, çavdar ekmeğinde fransız ekmeğine oranla daha güçlü olduğu bulunmuştur (Brady ve Mayer 1985).

Carson ve Sun (2001) altı çeşit ekmekte sertlik ve kohezif yapışkanlık, elastikiyet, adeziv yapışkanlık gibi diğer tekstürel özellikleri belirlemek amacıyla tekstür profil analizini kullanmış ve sözü geçen parametrelere ait aletsel ölçüm sonuçları ile duyusal analiz sonuçları arasında güçlü bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır.

Esmer tava ekmeklerinde enzim ilavesinin tekstür üzerine olan etkisinin incelendiği bir çalışmada yapılan duyusal analizler ile, test süresi boyunca ksilanaz ilavesinin pürüzsüzlük ve yapışkanlığı azalttığı, amilaz ya da amilaz:ksilanaz karışımının ise 7 günlük depolama sürecinde pürüzsüzlük, yapışkanlık ve yumuşak merkez alanı değerlerini en yüksek seviyeye ulaştırdığı saptanmıştır. Amilaz:ksilanaz karışımının bayatlamayı geciktirmede tek başına amilaz kullanımına göre daha etkili olduğu ve depolamanın 17. gününde pürüzsüzlük, 10. gününde de yapışkanlık değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aletsel tekstür ölçümlerinde ise depolama süresince sertlik ve çiğnenebilirlik önemli düzeyde artarken elastikiyet ve yapışkanlık azalmıştır. Ksilanazla formüle edilmiş ekmeklerde, ürünün raf ömrü boyunca, elastikiyet değerinin düştüğü, amilaz veya amilaz:ksilanaz karışımı ile formüle edilmiş ekmeklerde ise sertlik azalırken, yapışkanlığın arttığı saptanmış; duyusal ölçümler ile aletsel ölçümler arasında güçlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Gambaro vd 2006).

Aspergillus foetidus'dan elde edilmiş ksilanaz ile katkılanan tam buğday ekmeğinin kalitesinin arttığı; aroma, tat ve yumuşaklık gibi ürünün kabul edilebilirliğini etkileyen özelliklerin de geliştiği yapılan başka bir çalışma ile belirlenmiş, duyusal değerlendirme sonuçları tekstür profil analizi ile de doğrulanmıştır. Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında ksilanaz ile katkılanmış ekmeklerde sertliğin yaklaşık 4 kat azaldığı, kohezif yapışkanlığın önemli ölçüde geliştiği, zamsılık ve çiğnenebilirlik azalırken, elastikiyetin çok fazla değişmediği saptanmıştır (Shah vd 2006).

Carr vd (2006) dondurulmuş depolama süresinin kısmi pişmiş Fransız ekmeklerinin fiziksel, tekstürel ve duyusal özellikleri üzerindeki etkisini belirlemek üzere yaptıkları bir çalışmada, ekmeği 250°C’de 7 dakika pişirdikten sonra merkez sıcaklığı -18°C oluncaya kadar soğutmuş, 7 gün boyunca aynı sıcaklıkta depolamış ve günlük olarak ekmekleri çıkararak 250°C’de 6 dakika pişirdikten sonra analizlerini yapmışlardır. Ekmeğin sertlik ve çiğnenebilirliği depolama süresinden önemli ölçüde etkilenirken, elastikiyet ve kohezif yapışkanlıktaki değişimin önemli olmadığı belirlenmiştir. 4. güne kadar azalış eğilimi gösteren sertlik ve çiğnenebilirlik değerlerinin, 4. günden sonra arttığı gözlenmiştir. Dondurulmuş kısmi pişmiş fransız ekmeklerinin fiziksel ve tekstürel özellikleri üzerine maya ve bitkisel yağların etkisinin belirlendiği başka bir çalışmada da yine benzer sonuçlar elde edilmiş, maya ve bitkisel yağ ilavesinin kohezif yapışkanlık ve elastikiyette önemli bir artışa neden olmadığı, bitkisel yağların yumuşatıcı etkisi nedeniyle, bitkisel yağ içeren formülasyonlarda sertlik ve çiğnenebilirlik değerlerinin daha düşük olduğu saptanmıştır (Carr ve Tadini 2003).

Katkı maddesi kullanılmadan yapılan ekmeklerde hamur ve ekmek özellikleri arasındaki interaksiyonları belirlemek için yapılan bir çalışmada, dondurucuda muhafaza edilmiş hamurlardan üretilen ekmeklerin tekstürel ve kalite özellikleri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda hamur sertliğinin 0.4-0.7N, ekmek içi sertliğinin 7.4-18.6N arasında, hamur elastikiyetinin ise 1.1-1.3s arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Hamur sertliği oldukça değişken bir davranış göstermiş, 5 ay depolandıktan sonra sabitlenmiştir. Hamur örneklerinin elastikiyeti ve ekmek içinin sertliği uzun süreli depolama boyunca benzer davranış göstererek ilk üç ay boyunca hızla artmış, sonra sabitlenmiştir (Giannou ve Tzia 2007).

Arendt vd (2007) ekşi mayanın ekmeğin kalitesini geliştirici, raf ömrünü artırıcı olduğunu, ekşi maya fermentasyonu sırasında laktik asit bakterilerinin, ekmek bayatlaması ve tekstürü üzerine pozitif etki gösteren organik asit, ekzopolisakkarit ve/veya enzim gibi birçok metabolit ürettiğini bildirmişlerdir.

Buğday ekmeğinin aroma ve tekstürel özelliklerini geliştirmek için optimum ekşi maya proses koşullarını belirlemek üzere yapılan bir çalışmada fermentasyon sıcaklığı

(16-32°C), unun kül içeriği (0,6-1.8g/100g) ve fermentasyon süresinin (6-20saat), ekşi maya ile üretilmiş ekmeğin duyusal özellikleri, spesifik hacmi ve sertliğini ne şekilde etkilediği araştırılmıştır. Düşük kül içerikli un kullanıldığında ve kullanılan kültüre bağlı olarak fermentasyon süresi optimize edildiğinde ekmek hacminin geliştiği ve 4 gün depolamanın ardından sertliğin 260g'a kadar düştüğü gözlenmiştir (Katina vd 2006).

Ekşi mayadaki laktik asit bakterilerinin ekmeğin bayatlaması ve sertleşmesi üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada ekmek içi sertliği Instron Test cihazı ile ölçülmüş ve 8 gün depolama boyunca sertliğin 9.2N'dan 27.6N'a kadar çıktığı, en düşük sertliğin ise *Saccharomyces cerevisiae* ve *Lactobacillus plantarum*'un starter olarak birlikte kullanıldığı zaman olduğu tespit edilmiştir. Depolama sırasındaki nem varyasyonunun kısıtlı olması nedeniyle ekmek sertliğini starter tipinin yanı sıra diğer fizikokimyasal faktörlerin de etkileyebildiği doğrulanmıştır (Corsetti vd 1998).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, ekmeğin değerini artırmak, sağlığa daha faydalı hale getirmek için ekmek hamuruna antioksidan, antikarsinojen ve antimikrobiyal özellikler gösterdiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiş olan polifenoller içeren yeşil çay ekstraktı 1.5 ve 5.0g/kg un düzeyinde ilave edilmiş, ekmek üzerindeki etkisi duyusal ve aletsel olarak değerlendirilmiştir. Parlaklık, gözeneklilik, sertlik, yapışkanlık, tatlılık ve burukluk duyusal olarak değerlendirilirken, aletsel ölçümler gözeneklilik, parlaklık, sertlik ve yapışkanlık için yapılmıştır. Sonuçlar, aletsel ölçümler ile duyusal ölçümler arasında korelasyon olduğunu, ekstrakt miktarı arttıkça parlaklık ve tatlılığın azaldığını; sertlik, yapışkanlık ve burukluğun ise arttığını göstermiştir (Wang vd 2007).

Yeni izole edilmiş *Paenibacillus pabuli* US 132 suşunun siklodekstrin glikoziltransferaz aktivitesine sahip olduğu ve bu enzim ekmek üretiminde kullanıldığında ekmek hacmini önemli düzeyde artırırken, depolama boyunca ekmek sertliğini azalttığı belirlenmiştir (Jemli vd 2007).

2.4. Ekmekte Yapılmış Bazı Kinetik Çalışmalar

Depolama sırasında ekmek içinde gerçekleşen tekstürel değişimlerin de başlıca sorumlusu nişasta retrogradasyonu, bilimsel ve ekonomik etkileri nedeniyle, son yıllarda ilgilenilen başlıca konular arasında yer almaktadır. Nişasta retrogradasyon kinetiğinin belirlenmesi üzerine yapılan matematiksel modelleme çalışmalarının çoğunda kullanılan model, Avrami eşitliğidir. Buğday ekmeğindeki nişasta retrogradasyon kinetiğinin modellenmesinde Avrami eşitliği kullanılarak yapılan bir çalışmada; ilk olarak depolama sırasında nişastanın kristallenme düzeyini, ikinci olarak da bu kristallenme düzeyinin ekmek içi yapısı ile nasıl ilişkili olduğunu belirlemek için iki eşitlik kullanılmıştır. Bu çalışmada, modelin geçerliliğini değerlendirmek üzere ekmeklere 5°C’de ve iki farklı su aktivitesi (1.0 ve 0.877) koşulunda hızlandırılmış testler yapılmış, her iki koşulda da deneme sonuçlarının modele çok iyi uyduğu, düşük su aktivitesinde nişasta kristallerinin büyüme hızının arttığı belirlenmiştir (Nobile vd 2003).

Ekmek, taze olarak tüketilen ve ambalajlanmış olsa bile raf ömrü 1-2 gün gibi oldukça kısa olan bir üründür. Ekmek içinin sertleşmesi üzerine yapılan çalışmalarda non-lineer regresyon modellerinin kullanılmasının daha uygun olduğu düşünülmektedir. Bayatlamayı engelleyici katkılar (monogliseritler, DATEM, sodyum stearol laktilat, karboksimetil selüloz, hidroksipropilmetilselüloz ve α -amilaz) ilave edilerek üretilmiş ekmeklerde, ekmek içi sertleşme kinetiğinin belirlendiği bir çalışmada da yine Avrami eşitliğinden yararlanılmış ve bu eşitliğin kinetik hesaplamalara iyi uyum sağladığı saptanmıştır (Armero ve Collart 1998).

Ekmeğin rengi, tekstürü ve aroması tüketici beğenisini etkileyen en önemli faktörlerdir. Ekmekte istenen altın sarısı rengin oluşmasından karamelizasyon ve Maillard reaksiyonları sorumludur. Maillard reaksiyonunu etkileyen faktörlerin başında sıcaklık ve nem düzeyi gelir. Ekmekteki esmerleşme kinetiğinin araştırıldığı bir çalışmada ekmekler, 3 farklı sıcaklık derecesinde (180, 200, 220°C) pişirilmiş, ekmeklerin rengi ve ağırlık kaybı ölçülmüştür. Ekmeklerin esmerleşmesinden ağırlık kaybı ve pişirme sıcaklığının sorumlu olduğu, ekmeklerin toplam renk değişimi ve

ağırlık kaybı arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiş, toplam renk değişimi aşağıdaki şekilde modellenmiştir (Purlis ve Salvadori 2007).

$$E^* = kWL$$

$$k = k_0 T_F + k_1$$

E*: Toplam renk değişimi

WL: Ağırlık kaybı

k, k₁: Esmerleşme sabitleri

k₀: Esmerleşme sabiti (°C⁻¹)

T_F: Pişirme sıcaklığı (°C)

Bakterilerin davranışını karakterize etmek için birçok matematiksel model mevcuttur. Sigmoidal fonksiyonlara dayalı kinetik modellerin mikrobiyal gelişme verilerine çok iyi uyduğu, maksimum büyüme hızı ve diğer kinetik parametrelerin tahmin edilmesinde çok faydalı olduğu bilinmektedir (Taub vd 2003).

Feeherry vd (2003) yaptıkları bir çalışmada ekmek içinde *Staphylococcus aureus*'un gelişme kinetiğini su aktivitesinin (0,836-0.909) fonksiyonu olarak pH 5.2-5.3'de 35°C'de belirlemişlerdir. Büyüme kinetiği verileri, koloni sayısının inkübasyon süresine karşı grafiğinin çizilmesi ile elde edilmiş ve 4 parametrelili logaritmik fonksiyona uyduğu (R²= 0.939-0.996) belirlenmiştir. Ayrıca *S. aureus*'un gelişme hızının a_w'ye güçlü bir şekilde bağlı olduğu saptanmıştır. Logaritmik fonksiyonun denklemi aşağıda gösterilmiştir.

$$\log N_t = \frac{\log N_f / N_i}{1 + \exp[b(t_m - t)]} + \log N_i$$

N_t: t anındaki mikrobiyal yük

N_i: Başlangıçtaki mikrobiyal yük

N_f: Son mikrobiyal yük

t_m: Büyüme hızının maksimum olduğu zaman

b: Maksimum büyüme hızı

Taub vd (2003), orta nemli ekmekte *S. aureus*'un gelişme ve ölme kinetiğini yarı-kimyasal bir modelle incelemiş, farklı su aktivitesi, pH ve sıcaklık değerlerinde modelin çok iyi uyum sağladığını bulmuşlardır. Modelde elde edilen parametreler, Gombertz modeli ile de karşılaştırılmıştır.



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan deneme ekmeklerinin üretiminde materyal olarak, bir firmaya ait aynı gün üretilmiş, aynı parti numaralı ticari ekmeklik, kepekli ve tip 650 buğday unları; bir firmaya ait aynı üretim, tarih ve seri numaralı ticari çözünür kuru maya; bir firmaya ait aynı parti ve seri numaralı ticari rafine yemeklik tuz, bir firmaya ait aynı parti ve seri numaralı ticari kristal şeker ve şehir şebekesinden alınan içme suyu kullanılmıştır.

Deneme deseninde yer alan kimyasal ve mikrobiyolojik analiz yöntemlerinde belirtilen kimyasallar ve besi ortamları, yöntemin gerektirdiği saflık derecesinde, bilimsel çalışmalarda atıfta bulunulan ticari firmalardan temin edilerek kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Hammaddelerde sünme (rope) sporu sayımı

Ekmek yapımında hammadde olarak kullanılan un, su, tuz ve mayada, başlangıç spor yükünü belirlemek için, sünme sporu sayımı yapılmıştır. Analizler hammaddelerin spor yüküne bağlı olarak Anonim'in (1992) metodu modifiye edilerek yapılmıştır. Bunun için; un, tuz ve maya örneklerinden 11'er gram tartılıp içerisinde 99ml steril distile su bulunan erlenlere konularak 1/10'luk dilüsyon hazırlanmış, 5 dakika çalkalandıktan sonra bütün vejetatif hücrelerin ölmesi için 20 dakika kaynar su banyosunda tutulmuştur. Isıtılan 1/10'luk ilk dilüsyondan 1ml alınarak içerisinde 9ml steril ringer çözeltisi bulunan tüplere aktarılmış, bu işlem aynı şekilde tüpten tüpe 1'er ml aktarmak suretiyle tekrarlanarak 1/100 ve 1/1000'lik dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra 1/10, 1/100 ve 1/1000'lik seyreltilerden 1'er ml alınıp içerisinde 9'ar ml Dextrose Tryptone Broth bulunan 3 tüpe ekim yapılmıştır. Su örneği için ise hiç seyreltilmemiş örnek ile 1/10 ve 1/100 oranında seyreltilmiş dilüsyonlardan 1'er ml alınıp içerisinde 9'ar ml Dextrose Tryptone Broth bulunan 3 tüpe ekim yapılmış ve tüpler 32°C'de 3 gün

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her sırada zar gelişmesi gösteren tüp sayısı kaydedilip En Muhtemel Sayı (EMS) çizelgesinden (EK-1) ve Anonymous'dan (2004) faydalanılarak, uygun faktörlerle çarpılıp numunelerin her 1g ya da ml'sindeki sünme sporu sayısı tespit edilmiştir.

3.2.2. Ekmek pişirme yöntemi

Deneme ekmekleri her bir analiz seti için 3kg un, 45g tuz, 60g kristal toz şeker, 75g çözüdür kuru maya önce 2 dakika karıştırıldıktan sonra, 1950g içilebilir nitelikte şebeke suyu ile 10 dakika yoğrulmuş, hamur 340g'lık 15 parçaya bölünmüş, yuvarlak yapılarak kepekli ekmek hamurları 40, normal ekmek hamurları 30 dakika ana fermentasyona tabi tutulmuş, gazı çıkarılıp tekrar şekillendirildikten sonra her iki tip ekmek hamurları 30 dakika son fermentasyon işleminden sonra 20 dakika 200°C'de pişirilmiştir. Pişirilip, 2 saat dinlendirilip, soğutulan ekmekler analizler için kullanılmak üzere polietilen kilitli torbalara tek tek ambalajlanmıştır. Ambalajlı ekmekler deneme desenine uygun olarak muhafaza ortam sıcaklığına ayarlı soğutmalı etüvlere yerleştirilmiş ve her gün bir tanesi analizlerde kullanılmıştır. Sünme denemeleri 7'şer gün süreyle iki tekerrürlü sürdürülecek şekilde ekmek pişirme denemeleri tekrarlanmıştır. Ekmek pişirme ve muhafaza aşamaları Şekil 3.1-3.4.'te resimlerle gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Ekmek hamurlarının fermentasyonu



Şekil 3.2. Ekmek hamurlarına pişirme öncesi bıçak atma işlemi



a



b

Şekil 3.3. a) Normal ekmek b) Kepekli ekmek



a



b

Şekil 3.4. Ekmeklerin etüvde muhafazası

3.2.3. Ekmeklerde yapılan analizler

Laboratuar koşullarında pişirilen ekmeklerde ilk gün nem, ham yağ (Elgün vd 2002), protein (Anonymous 1980a), kül (Anonymous 1960), ham lif (Anonim 1983) ve nişasta analizleri (Anonymous 1976) yapılmış, sonuçlar kuru madde üzerinden % olarak ifade edilmiştir.

3.2.3.1. Nem tayini

105°C’de kurutularak sabit tartıma getirilmiş kurutma kaplarına homojenize edilmiş ekmek örneklerinden 2g tartılmış, 105±2°C’deki etüvde sabit ağırlık elde edilinceye kadar kurutulmuştur. Desikatörde soğutulup tartılan örneklerin ağırlık farkından yararlanılarak % nem miktarı belirlenmiştir (Elgün vd 2002).

3.2.3.2. Ham yağ tayini

Soxhelet ekstraksiyon kartuşlarına tartılan 5g örnek içindeki yağ soxhelet ekstraksiyon düzeneğinde petrol eteri ile 6-7 kez sifon yaptırılarak darası alınmış şilifli balonda toplanmıştır. Balon içindeki yağ-petrol eteri karışımından petrol eteri vakum altında döner buharlaştırıcıda ayrıldıktan sonra içinde yağ bulunan balon 103°C’de kurutulmuş ve yağ miktarı kuru madde üzerinden % olarak hesaplanmıştır (Elgün vd 2002).

3.2.3.3. Ham protein tayini

Kjeldahl tüplerine yaklaşık 1g olarak tartılan ekmek örnekleri üzerine 10ml derişik sülfürik asit ve katalizör tablet ilave edilmiştir. Tüpler yakma ünitesine yerleştirilip 100°C’den başlamak üzere sıcaklık kademeli olarak 400°C’ye kadar artırılmış, örnekler berraklaşınca kadar yakma işlemine devam edilmiştir. Yakma işleminden sonra soğutulan örnekler üzerine 50ml saf su ilave edilerek tüpler distilasyon ünitesine yerleştirilmiştir. Burada örnek üzerine 75ml %40’lık NaOH ilave edilerek cihaz 5 dakika süreyle çalıştırılmış ve distilatın 25ml indikatörlü %2’lik borik asit (1L %2’lik

borik asit çözeltisine 20ml %1'lik bromkrezol yeşili ve 14ml %1'lik metil kırmızısı ilave edilmiştir) içeren erlenmayerde toplanması sağlanmıştır. Toplanan distilat 0.1N HCl ile titre edilmiş ve örnekteki toplam azot miktarı aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$\%Azot = \frac{(Vh - Vk) \times 0.0014 \times 100 \times F}{m}$$

Vh: Titrasyonda harcanan 0.1N HCl hacmi (ml)

Vk: Kör için titrasyonda harcanan 0.1N HCl hacmi (ml)

F: 0.1N HCl'nin faktörü

m: Tartılan ekmek örneği miktarı (g)

Bulunan azot değeri çevirme faktörü 6.25 ile çarpılarak ham protein miktarı kuru madde üzerinden % olarak hesaplanmıştır (Anonymous 1980a).

$$\% \text{ Toplam Azotlu Madde} = 6.25 \times \%Azot$$

3.2.3.4. Kül tayini

625°C'de sabit tartıma getirilmiş ve darası alınmış porselen krezeller içine tartılan yaklaşık 3g örnek üzerine etil alkol ilave edilip ön yakma işlemi gerçekleştirildikten sonra kül fırınında sıcaklık aşamalı olarak artırılmak üzere 550±5°C'de beyaz kül elde edilinceye kadar yakılmıştır. Kül fırınından çıkarılan krezeller desikatörde soğutulduktan sonra tartımları yapılmış ve sonuçlar kuru madde üzerinden % olarak ifade edilmiştir (Anonymous 1960).

3.2.3.5. Ham lif tayini

Önceden kurutulup öğütülmüş yaklaşık 1g örnek 250ml'lik balona alınarak üzerine 25ml asit çözeltisi (70ml %70'lik asetik asit, 5ml derişik nitrik asit ve 2g triklor asetik asit) ilave edilmiştir. Geri soğutucu altında 30 dakika kaynatıldıktan sonra

soğutulmuştur. Ardından kurutulup darası alınmış filtre kağıdından (Whatman 41) süzölmüş ve kap içeriğı 80-90°C'deki sıcak suyla yıkanarak aktarılmıştır. Filtre kağıdındaki örnek, filtrat nötral bir reaksiyon verinceye kadar önce sıcak saf su ardından aseton ve dietil eter ile yıkanmıştır. Filtre kağıdı 130°C'deki etüvde kurutulup desikatörde soğutularak tartılmış ve sonuç kuru madde üzerinden % olarak ifade edilmiştir (Anonim 1983).

3.2.3.6. Nişasta tayini

Kurutulup öğütölmüş ekmekten 100ml'lik erlene yaklaşık 2g tartılmış üzerine 20ml etanol çözeltisi (0.25g HgCl₂ 225ml saf suda çözölmüş, üzerine 25ml %95'lik etanol ilave edilerek hazırlanmıştır) ilave edilerek 2 dakika çalkalanmıştır. Karışım, kaba filtre kağıdından süzölmüş ve erlen içeriğı 25ml etanol çözeltisi ile yıkanarak aktarılmıştır. İçeriğı ile birlikte filtre kağıdı 100ml'lik behere alınmış, yaklaşık 15ml HCl ile beherdeki kalıntı iyice ezilmiş ve kalıntılar 100ml'lik balon jojeye 35ml HCl ile yıkanarak aktarılmıştır. Proteinli maddeleri çöktürmek için balon jojeye 2ml Carrez I ve 2ml Carrez II ilave edilerek karıştırılmış ve balon joje 15 dakika süreyle termostatlı su banyosunda 20°C'de tutulmuştur. Ardından saf su ile 100ml'ye tamamlanıp çalkalanarak 5 dakika düz bir zeminde bekletilmiştir. İçerik filtre kağıdından süzöldükten sonra berrak filtrat polarimetre tüpüne doldurulmuş ve polarimetre ile optik rotasyon ölçölmüştür. Nişasta miktarı aşağıdaki formöle göre kuru madde üzerinden % olarak hesaplanmıştır (Anonymous 1976).

$$\%Nişasta\ miktarı = \frac{10^6 \times \sim}{(\sim)_D \times l \times E \times (100 - U)}$$

α : Örnek çözeltinin optik çevirme derecesi

$(\alpha)_D$: Nişastanın spesifik çevirme açısı (buğday nişastası için 182,7)

l : Polarimetre tüpünün uzunluğu (dm)

E : Tartılan örnek miktarı (g)

U : Örneğın nem içeriğı (%)

3.2.4. Ekmeklerin muhafazası

Ekmeklerde yüzeysel küf gelişimini engellemeye yönelik olarak fırına verilmeden önce hamur üzerine %40'lık sodyum propiyonat/propiyonik asit karışımı püskürtülmüş, pişen ekmekler hijyenik koşullarda 2 saat dinlendirilip, kilitli polietilen poşetler (PE) içinde ambalajlanmış ve 4 farklı sıcaklıkta (4°C, 25°C, 37°C, 45°C), 7 gün boyunca her 24 saatte bir örnekleme yapılabilecek sayıda muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Muhafaza edilen ekmeklerde gerçekleştirilen analizler

Kontrollü sıcaklıklarda muhafaza edilen ekmeklerden 24 saatte bir alınan örnekler üzerinde mikrobiyolojik, fiziksel, yapısal ve kimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Mikrobiyolojik analizler

Örneklerin mikrobiyolojik analize hazırlanması

Her bir ekmek örneğinden aseptik koşullarda 10g tartılarak içinde 90ml %0.85'lik fizyolojik tuzlu su bulunan stomacher poşetine koyulmuş ve stomacher ile 5 dakika homojenize edilmiştir. Bu şekilde elde edilen 10⁻¹'lik dilüsyondan 1ml alınarak içinde 9ml dilüsyon sıvısı bulunan tüpe ilave edilmiştir. Bu işlem aynı şekilde tüpten tüpe 1'er ml aktarmak suretiyle tekrarlanarak seri dilüsyonlar elde edilmiştir.

Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı:

Hazırlanan dilüsyonlardan 1ml alınarak Plate Count Agar'a (Merck 105463) iki paralelli olarak, dökme ekim yapılmıştır. Petri kapları 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 15-300 arası koloni içeren petriler sayılarak toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir (Anonymous 1978).

$$N = C / [V \times (n_1 + 0.1 \times n_2) \times d]$$

- N: Gıda örneğinin 1g ya da 1ml'sindeki mikroorganizma sayısı
C: Sayımı yapılan tüm petri kutularındaki koloni sayısı toplamı
V: Sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacim (ml)
 n_1 : İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusunun adedi
 n_2 : İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusunun adedi
d: Sayımın yapıldığı ardışık iki seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranı

Bacillus sayımı:

Hazırlanan dilüsyonlardan 1ml alınarak Muller Hinton Agar'a (Merck 105437) iki paralelli olarak, dökme ekim yapılmıştır. Petri kapları 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 15-300 arası koloni içeren petriler sayılarak *Bacillus* sayısı aşağıdaki formül kullanılarak saptanmıştır (Sorokulova vd 2003).

$$N = C / [V \times (n_1 + 0.1 \times n_2) \times d]$$

- N: Gıda örneğinin 1g ya da 1ml'sindeki mikroorganizma sayısı
C: Sayımı yapılan tüm petri kutularındaki koloni sayısı toplamı
V: Sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacim (ml)
 n_1 : İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusunun adedi
 n_2 : İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusunun adedi
d: Sayımın yapıldığı ardışık iki seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranı

Küf sayımı:

Hazırlanan dilüsyonlardan 0.1ml alınarak Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar'a (Merck 100466) ve Patato Dextrose Agar'a (PDA) iki paralelli olarak, yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petri kapları 25°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 15-300 arası koloni içeren petriler sayılarak toplam küf sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Anonymous 1980b).

$$N = C / [V \times (n_1 + 0.1 \times n_2) \times d]$$

N: Gıda örneğinin 1g ya da 1ml'sindeki mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V: Sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacim (ml)

n_1 : İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusunun adedi

n_2 : İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusunun adedi

d: Sayımın yapıldığı ardışık iki seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranı

3.2.5.2. Fiziksel analizler

Su aktivitesinin belirlenmesi

Ekmeklerin su aktivitesi değerleri Testo 650 su aktivitesi ölçme cihazı ile belirlenmiştir. Yaklaşık 2g (kabın 2/3'ünü dolduracak kadar) ekmek içi cihazın kendine özel küçük kaplarına tartılmış ve kapağı kapatılarak dengeye gelmesi için bir süre beklenmiştir. Ardından kaplar cihaza yerleştirilmiş ve a_w değeri, 15-20 dakika sonra otomatik olarak ölçülmüştür (Miyazaki vd 2004).

3.2.5.3. Yapısal analizler

Tekstür profil analizi

Ekmeklerde tekstür profil analizi (TPA) TA.XT Plus tekstür analiz cihazı (Stable Microsystems, Godalming, Surrey, UK) ile 1mm'lik silindir prob kullanılarak tayin edilmiş, ayarlar şu şekilde yapılmıştır: Test hızı 5mm/s, bekleme süresi 5s, trigger kuvveti 5g, uzaklık 10mm. Ekmeklerin sertlik, adezif ve kohezif yapışkanlık, esneklik, zamksılık, elastikiyet ve çiğnenebilirlik özellikleri belirlenmiştir.

3.2.5.4. Kimyasal analizler

24 saatlik muhafaza periyotları sonunda kimyasal analizler yapılınca kadar, enzim aktivitesini en aza indirmek amacıyla ekmek örnekleri -18°C'de tutulmuştur.

Toplam indirgen şeker miktarı tayini

Örneklerin ekstraksiyonu, Nielsen vd'nin (2006) yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır. 2g ekmek içi tartılıp üzerine 20ml destile su ilave edildikten sonra 2 dakika süreyle Ultra Turrax (T-25, IKA Labortechnik, Stauten, Germany) kullanılarak homojenize edilmiş ve 12100 x g'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra kaba filtre kağıdı ile süzölmüştür.

Toplam indirgen şeker miktarı tayini dinitrosalisilik asit kullanılarak spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Örnek çözeltisinden 3ml alınıp üzerine 3ml dinitrosalisilik asit ayıracı (250ml'lik balon jodede 2.5g dinitrosalisilik asit, 0.5g fenol, 0.125g sodyum sülfid karıştırılıp %1'lik NaOH çözeltisi ile çizgisine tamamlanarak hazırlanmıştır) ilave edilmiş ve kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. 1ml %40'lık potasyum sodyum tartarat ilave edilip akan su altında soğutulduktan sonra ölçümler 575nm dalga boyunda yapılmış ve glukoz kullanılarak oluşturulmuş standart eğrilere (Ek 2) göre hesaplamalar yapılmıştır (Miller 1959).

Toplam serbest amino asit miktarı tayini

Amino asitlerin ekmekten ekstraksiyonu Erbas vd'ne (2005) göre yapılmıştır. Buna göre 2g ekmek içi üzerine 17ml 0.2M perklorik asit ile 5ml metanol ilave edildikten sonra karışım Ultraturrax (T-25, IKA Labortechnik, Stauten, Germany) kullanılarak 12000 d/d'da 2 dakika süreyle homojenize edilmiş ve ultrasonik banyoda 15 dakika tutulmuştur. Ardından 3250 x g'de 30 dakika santrifüjlendikten sonra supernatant Whatman 41 filtre kağıdından süzölmüştür.

Toplam serbest amino asit miktarı Yokoyama ve Hiramatsu'nun (2003) belirttiği yöntemle göre saptanmıştır. Bunun için ekstrakte edilen örnekten test tüpüne 1ml alınıp üzerine pH'sı 5.0 olan 2ml 0.5 M sodyum sitrat tamponu (3.5164g sitrik asit ve 9.3214g sodyum sitrat tartılıp hacim saf su ile 100ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır) ve 1ml ninhidrin ayıracı (0.015g askorbik asit, 0.5g ninhidrin ve 60ml 2-metoksietanol karıştırılarak hazırlanmıştır) ilave edilmiştir. 15 dakika kaynar su banyosunda bekletilip

buz banyosunda soğutulan tüplere 1ml %60'lık etanol ilave edilmiş ve 570nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Hesaplamalar, glutamik asit kullanılarak oluşturulmuş standart eğrilere göre yapılmıştır (Ek 2).

Kalıntı protein miktarı tayini

Örneklerin ekstraksiyonu, Nielsen vd'nin (2006) yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır. 2g ekmek içi tartılıp üzerine 20ml destile su ilave edildikten sonra 2 dakika süreyle Ultraturrax (T-25, IKA Labortechnik, Stauten, Germany) kullanılarak homojenize edilmiş ve 12100 x g'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra kaba filtre kağıdı ile süzölmüştür.

Kalıntı protein tayini için süzöntüden 0.1ml alınıp üzerine 3ml Bradford ayırıcı ilave edilmiş, oda sıcaklığında 5-45 dakika inkübe edildikten sonra 595nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır (Bradford 1976, Anonymous 2006). Albumin ile oluşturulan standart eğriye göre hesaplamalar yapılmıştır (Ek 2).

3.2.6. Ekmeklerden sünme etmeni *Bacillus* türlerinin izolasyonu ve tanılanması

Ekmeklerin muhafazası sırasında 37°C'de bekletilerek sünmüş olanlardan Nutrient Agar'a (Merck 105450) ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası petriker parafilm ile sarılarak tanılama işlemi yapılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Tanılama işlemi için muhafaza edilmiş petrikerden birbirine temas etmeyen ve *Bacillus* cinsinin özelliklerine uygun olan koloniler öze yardımı ile alınmış, tek koloni düşürme tekniği ile Nutrient Agar'a ekim yapılarak 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Anonim 2005). Bu işlem sırasında 22'si normal, 19'u kepekli ekmekten olmak üzere toplam 41 izolat elde edilmiştir. Testlerin yapılması aşamasında petriker yine parafilm ile sarılarak 4°C'de bekletilmiştir. İzole edilen kolonilerin tanılanması hem biyokimyasal testler hem de API 20E ve API CH test kitleri kullanılarak yapılmıştır.

3.2.6.1. Biyokimyasal testler ile *Bacillus* türlerinin tanılanması

Tek koloni düşürme tekniği ile elde edilen *Bacillus* kolonileri, çeşitli morfolojik incelemelere, yetiştirme denemelerine ve biyokimyasal testlere tabi tutulmuş ve tanılama işlemi Ek 3'den yararlanılarak yapılmıştır. Her bir biyokimyasal testte genç kültür (18-24 saatlik) kullanılması gerektiği için testlerden önce, testin özelliğine göre koloniler Nutrient Agar ya da Nutrient Broth'a ekilerek canlandırma işlemi yapılmıştır (Anonim 2005). Denemelerde kontrol suşu olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6633 standart suşu kullanılmıştır.

Gram boyama

Temiz bir lam üzerine bir damla damıtık su konulup Nutrient Agar'da (Merck 105450) geliştirilmiş genç (18-24 saatlik) kültürden öze ile alınarak önce su damlası yanında ezilmiş, daha sonra da su damlası ile azar azar karıştırılarak lamın üzerine ince bir film halinde yayılmıştır. Havada kuruması sağlandıktan sonra bunzen bekenden üç kez geçirilerek bakterilerin lam üzerine tespiti (fiksasyon) yapılmıştır. Hazırlanmış preparatın üzerine kristal viyole boyası (A) damlatılıp 1 dakika beklendikten sonra distile su ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Preparata bu kez lugol çözeltisi (Merck 109261) damlatılarak 1 dakika bekletilmiş ve distile su ile yıkanarak lugol çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Preparatın üzerine %96'lık etil alkol damlatılarak 10-15 saniye beklenmiş, distile su ile yıkanmış ve karşıt boya olarak safranin (B) damlatılarak 10-30 saniye bekletilmiştir. Preparat distile su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakılmış ve preparata immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifle incelenmiştir. Gram pozitif, çubuk şekilli bakteriler *Bacillus* olarak değerlendirmeye alınmıştır (Temiz 2000).

A (Kristal Viole Boyası): 0.5g kristal viole 100ml distile su içerisinde çözülüp kaba filtre kağıdından süzülerek hazırlanmıştır.

B (Safranin): 0.5g safranin 10ml %95'lik etil alkol içinde çözündürüldükten sonra 100ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

İnkübasyon sıcaklığının belirlenmesi

Nutrient Agar'a ekilen kültürler yaklaşık olarak maksimum gelişme sıcaklıklarının 10-15°C altında inkübe edilerek inkübasyon sıcaklıkları belirlenmiştir. Psikrofiller için 20°C, mezofiller için 30°C, termofiller için 45°C'de inkübasyon yapılmıştır. 65°C'de gelişebilen türleri belirlemek için ise 45°C ve 55°C'de inkübasyon yapılmıştır (Sneath 1984).

Katalaz testi

Yatık Nutrient Agar'da (Merck 105450) 1 gün geliştirilen bakteri kültürü üzerine 0.5ml %10'luk H₂O₂ ilave edilerek gaz çıkışı olup olmadığı incelenmiştir. Gaz çıkışının olmadığı durumda aynı işlemler Chocolate Agar'da geliştirilmiş kültürlerle uygulanmıştır (Sneath 1984).

Sodyum klorürde gelişme testi

%5, %7 ve %10 NaCl içeren 3ml Nutrient Broth'a (Merck 105443) yine Nutrient Broth'da geliştirilmiş kültürden iki paralelli olarak inokülasyon yapıp hafif yatık olarak 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve her gün gelişmenin olup olmadığı gözlenmiştir. Gelişme gözlenenler pozitif kabul edilmiş, gelişmenin olmadığı tüplerde ise inkübasyona 14 güne kadar devam edilmiştir (Sneath 1984).

Anaerobik gelişme

Nutrient Broth'da (Merck 105443) geliştirilmiş kültürden alınarak, tüp içerisindeki Anaerobik Agar'ı (Merck 105452) delmek suretiyle tüp dibine iğne öze ile iki paralelli olarak inokülasyon yapılmıştır. Tüpler anaerobik jarlara yerleştirilerek 45°C'de 3-7 gün inkübe edilmiştir (Sneath 1984).

Voges-Proskauer ve Metil-Red testi

Metil Red/Voges-Proskauer (MR-VP) Broth'a (Merck 105712) Nutrient Broth'da geliştirilmiş kültürden paralelli olarak inokülasyon yapıp gelişme gözleninceye kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplerden birinin üzerine Voges-Proskauer testi için 3ml 0.5-1mg kreatin içeren %40'luk NaOH (Sneath 1984), diğerinin üzerine metil red testi için metil red indikatörü (A) ilave edilmiş (Anonim 2005) ve 30-60 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra üst kısımda pembeden parlak kırmızıya kadar değişen renkte halka oluşumu incelenmiş ve bu oluşum pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sneath 1984).

A (Metil Red İndikatörü): 0.1g metil red önce 300ml %96'luk etil alkol içerisinde çözülüp sonra 200ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

pH 5.7.'de gelişme testi

Nutrient Broth'da (Merck 105443) geliştirilmiş kültürden Sabouraud Dextrose Agar (Merck 107315) ve Sabouraud Dextrose Broth'a (Merck 108339) iki paralelli olarak ekim yapılmış ve 37°C'de inkübe edilerek gelişme olup olmadığı her gün gözlenmiş, gelişmenin olmadığı durumlarda inkübasyona 14 güne kadar devam edilmiştir (Sneath 1984).

Karbonhidrat fermentasyon testi

1g diamonyum hidrojen fosfat, 0.2g potasyum klorür, 0.2g magnezyum sülfat, 0.2g maya özü ve 15g agar 1000ml distile suda çözülmüş, pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra 15ml %0.04 bromkresol moru çözeltisi (A) ilave edilmiş ve hazırlanan besiyeri 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Karbonhidrat çözeltileri olarak D-(+)-glukoz, L-(+)-arabinoz, D-(+)-ksiloz ve D-(-)-mannitol'ün %10'luk sulu çözeltileri hazırlanmış ve 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyonun ardından 5ml besiyeri üzerine, aseptik olarak, son konsantrasyon %0.5 olacak şekilde (0.25ml) karbonhidrat çözeltisi ilave edilmiştir.

Yatık olarak hazırlanan besiyerine Nutrient Broth'da geliştirilmiş kültürden paralelli olarak inokülasyon yapıp, 37°C'de gelişme gözleninceye kadar (10 güne kadar) inkübe edilip düzenli olarak koloni gelişimi, asit ve gaz oluşumu gözlenmiştir (Sneath 1984).

Bromkresol morunun reaksiyon ortamında verdiği renkler doğrultusunda Çizelge 3.2.'de verilen kıstaslara göre sonuçlar değerlendirilmiştir (Arda 2006).

A (Bromkresol moru çözeltisi): 0.04g bromkresol moru 100ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. İndikatörlerin reaksiyon ortamında verdiği renkler

İndikatör	Asit	Nötr	Alkali
Andrade	Kırmızı	Sarı	Renksiz
Bromtimol mavisi	Sarı	Hafif mavi	Mavi-koyu mavi
Bromkresol moru	Sarımsı	Morumsu	Mor
Fenol kırmızısı	Sarı	Renksiz	Pembe

Nişasta hidroliz testi

Nutrient Agar'da (Merck 105450) yetiştirilen kültürden Starch Agar'a (A) paralelli olarak ekim yapıp 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri gelişimi gözlendiği zaman petrilerden birine %95'lik etanol eklenip 15-30 dakika beklendikten sonra koloni etrafında zon (açık alan) oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. Zon oluşumu nişastanın hidrolize olduğunun göstergesidir. Negatif durumlarda bu alan süt beyazı şeklindedir (Sneath 1984).

A (Starch Agar): 1g patates nişastası 10ml soğuk distile suda çözündürülmüş ve 100ml Nutrient Agar ile karıştırıldıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Sitrat testi

Yatık olarak hazırlanmış sitrat besiyerine (A) Nutrient Broth'da geliştirilmiş kültürden inoküle edilmiş ve 37°C'de gelişme gözleninceye kadar inkübasyona bırakılmıştır. Gelişmenin olmadığı durumlarda inkübasyona 7 güne kadar devam edilmiştir. Besiyeri renginin maviye dönüşmesi ile yatık agar yüzeyinde, ekim hattı boyunca üreme varlığının gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Mavi renk, bakterilerin sitratı kullanarak alkali ürünler oluşturduğuna işaret eder.

A (Simmons Sitrat Agar): 1g amonyum dihidrojen fosfat, 1g dipotasyum fosfat, 5g sodyum klorür, 2g sodyum sitrat, 0.2g magnezyum sülfat, 15g agar ve 0.08g brom timol mavisi 1000ml distile suda çözündürülüp pH 6.6'ya ayarlanıp otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edilerek hazırlanmıştır (Temiz 2000).

İndol testi

121°C'de 20 dakika sterilize edilmiş 5ml Tryptone Broth'a (Sigma 93657) Nutrient Broth'da geliştirilmiş kültürden inoküle edilmiş ve bakterinin gelişme durumuna göre en fazla 14 güne kadar inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplere 2ml test çözeltisi (A) ilave edilip çalkalanıp pembeden kırmızıya kadar değişen renk oluşumu gözlenmiştir. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon, sarımsı halka oluşumu ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Sneath 1984, Arda 2006).

A (Test Çözeltisi): 5g p-dimetilaminobenzaldehit, 75ml iso-amil alkol, 25ml konsantre HCl karıştırılarak hazırlanmıştır.

Dihidroksiaseton üretimi testi

Gliserol agar (A) üzerine Nutrient Agar'da geliştirilmiş kültürden iki paralelli olarak tek çizgi ekim yapıp her gün gelişmenin olup olmadığı kontrol edilerek 10 güne kadar

inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda aşağıda belirtilen çözeltiden ilave edilip 2 saat beklenmiş ve kırmızı renkli halka oluşumu gözlenmiştir (Sneath 1984).

A: 100ml Nutrient Agar, 1g maya özü ve 2ml gliserol karıştırılmış ve 121°C’de 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

B: 34.66g sulu bakır sülfat 500ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

C: 173g potasyum sodyum tartarat ve 50g sodyum hidroksit 500ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Buzdolabında saklanan B ve C çözeltileri testten hemen önce 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır.

Fenilalanin deaminaz testi

Yatık olarak hazırlanmış Fenilalanin Agar (Fluka 78052) besiyerine kültürler paralelli olarak inoküle edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme durumu her gün gözlenerek gelişme gözlenmeyen tüplerin inkübasyon süresi 7 güne kadar uzatılmıştır. Ardından tüplerden birine 4-5 damla %10’luk demir klorür (A) çözeltisi damlatılmış ve kolonilerin altında fenilalaninin fenilprüvik asite dönüşümünün göstergesi olan yeşil renk oluşumu gözlenmiştir. Testin negatif olması durumunda aynı işlemler 21 gün inkübe edilen ikinci tüpe uygulanmıştır (Sneath 1984).

A (Demir Klorür Çözeltisi): 10g demir klorür 100ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Kazein hidrolizasyon testi

Milk Agar’a (Fluka 70147) Nutrient Agar’da geliştirilen kültürden iki paralelli olarak tek çizgi ekim yapıp 14 güne kadar inkübe edildikten sonra koloniler etrafında açık alan oluşumu gözlenmiştir. Koloni etrafında hafif opaklaşma negatif reaksiyon, açık alan ise pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Sneath 1984).

Tirozin hidrolizasyon testi

Nutrient Agar'da geliştirilmiş kültürden Tirozin Agar'a (A) çizme yöntemi ile ekim yapıldıktan sonra inkübasyona bırakılan petriler düzenli olarak gözlenmiş ve gelişme olup olmamasına göre inkübasyona 14 güne kadar devam edilmiştir. Kolonilerin etrafında ve altında tirozin kristallerinin oluşturduğu açık alan pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Sneath 1984).

A (Tirozin Agar): 0.5g L-tirozin 10ml distile suda çözündürülüp otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edilmiş ve aseptik şartlarda 100ml steril Nutrient Agar ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Jelatin hidrolizasyon testi

Nutrient Broth'da geliştirilmiş kültürden Nutrient Jelatin (Fluka 70151) içeren tüplere inokülasyon yapıp 37°C'de 15 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında yaklaşık 1-2 saat bekletilerek jelatinin katılaşp katılaşmadığı gözlenmiştir. Buzdolabında katılaşmama jelatinin hidrolize olduğunun göstergesidir (Sneath 1984).

Yumurta sarısı testi

Nutrient Broth'da geliştirilmiş kültürden Egg-yolk Broth (A) içeren tüplere inoküle edilip 37°C'de inkübe edilmiş, kontrol için tüplerden birine egg-yolk koyulmamıştır. Düzenli olarak tüpler gözlenmiş, yüzeyde beyaz ağır bir çökelti oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

A (Egg-yolk Broth): 10g tripton, 5g disodyum hidrojen fosfat, 1g potasyum dihidrojen fosfat, 2g sodyum klorür, 0.1g magnezyum sülfat heptahidrat, 2g glukoz 1000ml distile suda çözündürülüp pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra 121°C'de 20dk sterilize edilmiştir. 100ml broth'a 1.5ml steril egg-yolk ilave edilmiş ve bir gece

buzdolabında bekletildikten sonra serum kısmından 2.5ml alınarak steril tüplere aktarılmıştır.

Lizozime dayanıklılık testi

Nutrient Broth'da geliştirilmiş kültürden lizozime dayanıklılık besiyerine (A) ve kontrol örneği olarak da Nutrient Broth'a ekim yapıp 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve 14 güne kadar gelişmenin olup olmadığı gözlenmiştir.

A (Lizozime dayanıklılık besiyeri): Distile su ile 10000 enzim birimi/ml olacak şekilde lizozim çözeltisi hazırlanmış ve filtrasyon ile sterilizasyon yapılmıştır. Bu çözeltiden 1ml alınıp 99ml steril Nutrient Broth ile karıştırılmış ve kapaklı tüplere bu karışımdan 2.5ml ilave edilmiştir.

3.2.6.2. API test kitleri ile *Bacillus* türlerinin tanılanması

Bacillus türlerinin tanılanması için API 20 E ve API CH test kitlerinden yararlanılmış ve kitler üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

API 20 E striplerinin inokülasyonu

Nemli atmosfer yaratmak için inkübasyon kutusunun kuyucuklarına 5ml saf su koyulmuş ve stripler kutuya yerleştirilmiştir. Tanılanacak olan *Bacillus* türlerinin Nutrient Agar'da kültürü yapılmış (gençleştirme amaçlı), daha sonra bir eküvyon yardımı ile kültürdeki bakteriler alınıp 2ml %0.85'lik NaCl içeren tüpe ilave edilerek yoğun bir bakteri süspansiyonu (S) hazırlanmıştır. 5ml %0.85 NaCl içeren ampul açılıp S'den belirli sayıda (n) damlatılarak 2 Mc Farland'a eş değer bulanıklıkta yeni bir süspansiyon oluşturulmuştur. Bulanıklık düzeyini ayarlamak için hazırlanmış olan süspansiyonu içeren ampul ile 2 Mc Farland'lık standardı içeren ampul siyah bir zemin üzerinde karşılaştırılmıştır. İnkübasyon kutusuna yerleştirilen API 20 E striplerinin yalnızca ilk 12 tüpüne inokülasyon yapılmış, inokülasyonda bulanıklık düzeyi ayarlanmış olan bakteri süspansiyonu kullanılmıştır. (Diğer tüplerdeki testler API CH

striplerinde de bulunduğu için inoküle edilmemiştir). Striplerdeki CIT, VP ve GEL testlerinin tüp ve küpülleri, diğeri testlerin ise sadece tüpleri bakteri süspansiyonu ile doldurulmuştur. ADH, LDC, ODC, H₂S ve URE testleri anaerobik ortam sağlamak amacıyla mineral yağ ile kaplanmıştır. Daha sonra inkübasyon kutusunun kapağı kapatılarak tüplerin tabanı aşağıya doğru gelecek şekilde hafifçe eğilmiş ve 36°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda strip okuma tablosuna (Ek-4) göre değerlendirme yapılmış, 3’den daha az pozitif test olması durumunda inkübasyona 24 saat daha devam edilmiş, aksi halde reaktif ilavesi gereken testler (TDA, IND, VP, NIT) yapılmıştır. TDA testi için tüpe 1 damla TDA reaktif damlatılmış ve kırmızı/kahverengi renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir. IND testi için tüpe 1 damla JAMES ilave edilmiş ve pembe renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. VP testi için tüpe 1’er damla VP1 ve VP2 damlatılıp 10 dk beklendikten sonra koyu pembe renk oluşumu pozitif kabul edilmiştir. NIT testi için ise GLU tüpüne 1’er damla NIT1 ve NIT2 eklenip 2-5 dk beklenmiş ve kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Test sonuçları apiweb yazılımı kullanılarak, değerlendirilmiş ve tanılama gerçekleştirilmiştir (Anonymous 2006a).

API CH striplerinin inokülasyonu

Nemli atmosfer yaratmak için inkübasyon kutusunun kuyucuklarına 10ml saf su koyulmuş ve stripler kutuya yerleştirilmiştir. API 20 E stripleri için hazırlanan bakteri süspansiyonundan (S), API CHB/E Medium ampulüne API 20 E’nin inokülasyonu için kullanılan süspansiyonun damla sayısının iki katı kadar (2n) ilave edilmiştir. Bakteri süspansiyonu ile karıştırılan API CHB/E Medium ampülü API CH striplerinin inokülasyonunda kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından inkübasyon kutusunun kapağı kapatılarak açığa çıkan gazların kaçışını önlemek için tüplerin tabanı aşağıya doğru gelecek şekilde hafifçe dik tutulmuş, termofilik türler 55°C’de 3-6 saat ve 24 saat diğeri türler ise 30°C’de 24 saat ve 48 saat inkübe edilerek ikişer defa okuma yapılmıştır. İnkübasyon sonunda medium içindeki fenol kırmızısı indikatörünün renginin sarıya ve 25 numaralı tüpün (Eskulin testi) kırmızıdan siyaha dönmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Test sonuçlarına göre bakteri türlerinin tanınması apiweb yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Anonymous 2002, Anonymous 2005)

3.2.7. *Bacillus* türlerinin sündürme kapasitelerinin doğrulanması

Sünme gelişimi olan ekmeklerden izole edilen türlerin tanılanması gerçekleştirildikten sonra, sündürme kapasitelerini belirlemek için bu türlerin ekmek özütüyle (A) hazırlanan sıvı besiyerinde, 30°C’de 24 saat büyütme ile hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Daha sonra bu süspansiyonlardan ikili, üçlü, dördü ve beşli kombinasyonlar olacak şekilde 1:1 oranda karışımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar, 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavlanmış ekmek dilimlerinin belirli bir bölgesine homojen olarak dağıtılmış ve dilimlerde 37°C’de saklama sırasında sünme oluşup oluşmadığı günlük olarak kontrol edilmiştir.

A (Ekmek Özütü): 100g ekmek 350ml distile su ile birlikte stomacher’de 2dk parçalanıp elde edilen süspansiyon Whatman No 1 filtre kağıdından süzölmüş ve pH 1N NaOH ile 6.8’e ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C’de 15dk sterilize edilerek hazırlanmıştır (Pepe vd 2003).

3.2.8. Sünme hastalığının kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Normal ve kepekli ekmeklerde sünme hastalığının gelişimine ait kinetik parametreler, ekmeklerin tekstürel ve kimyasal özelliklerinde meydana gelen değişim göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Reaksiyon derecesinin belirlenmesi için incelenen kimyasal özelliklere ait konsantrasyonlar, tekstürel özelliklerin ise değişim değerleri zamana karşı olarak aritmetik ve logaritmik skalaya yerleştirilmiş; doğrusal eğri aritmetik skalada elde edilirse sıfırıncı, logaritmik skalada elde edilirse birinci dereceden reaksiyon olduğuna karar verilmiştir. 2. dereceden reaksiyona uygunluğu belirlemek için ise değişim değerleri $(C-C_0/CC_0)$ olarak dönüştürölmüş ve aritmetik skalaya yerleştirilerek doğrusal eğrinin oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Doğrusal eğrinin elde edildiğı reaksiyon derecesine ait denklemin eğimi doğrudan hız sabiti (k) olarak alınmıştır (Özkan ve Cemeroğlu 2005). 0., 1. ve 2. dereceden reaksiyonlara ait denklemler aşağıda verilmiştir.

$$C = kt + C_0 \quad (\text{Sıfırıncı derece})$$

$$C = C_0 \exp(-k_1t) \quad (\text{Birinci derece})$$

$$C = \frac{1}{\frac{1}{C_0} + k_2 t} \quad (\text{İkinci derece})$$

C : Reaktanın t süre sonundaki konsantrasyonu

C₀ : Reaktanın başlangıç konsantrasyonu

k, k₁, k₂ : reaksiyon hız sabitleri

Reaksiyon hızının sıcaklığa bağlı olarak hangi düzeyde değiştiğini belirlemek için ise sıcaklık değerlerinin resiprokalarına karşı lnk grafiği (Arrhenius eğrisi) çizilerek doğrunun eğiminden (Ea/R) aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır (Özkan ve Cemeroğlu 2005). Arrhenius eşitliği aşağıda gösterilmiştir.

$$k = k_0 e^{-E_a/RT}$$

Eşitliğin her iki tarafının doğal logaritması alınarak;

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} \left(\frac{1}{T} \right) + \ln k_0 \quad \text{elde edilmiştir.}$$

Burada; k reaksiyonun hız sabiti, k₀ frekans faktörü (s⁻¹), Ea aktivasyon enerjisi (J/mol), R ideal gaz sabiti (8.314 J / mol K), T mutlak sıcaklıktır (°K).

3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

İki farklı un kullanılarak üretilen ekmekler, sünme hastalığı üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek üzere dört farklı sıcaklıkta muhafaza edilmiş, dolayısıyla normal ve kepekli ekmek ayrı ayrı olmak üzere ekmekler dörder parti halinde pişirilmiş ve muhafaza edilmiştir. Deneme 2*4*2 faktöriyel düzenlenmiş ve analizler iki paralelli yürütülmüştür. SAS istatistik programı (SAS Instutue Inc. 1996) kullanılarak analiz edilen parametrelerin bu faktörlere ilişkin değişim ve etkileri varyans analizleriyle test edilmiş, önemli bulunan varyasyon kaynaklarının etki düzeyleri ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile ortaya konmuştur. İstatistiksel değerlendirme sonuçları varyans analizi tabloları, Duncan çoklu karşılaştırma tabloları ve grafikler halinde tartışılmıştır (Düzgüneş vd 1987).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ekmeklerin Bazı Besin Öğelerine Ait Analiz Sonuçları

Ekmeklerin kuru madde, protein, yağ, lif, nişasta ve toplam kül içeriklerine ait analiz sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ekmeklerin Bazı Besin Öğelerine Ait Sonuçlar ($X \pm SE$)

Bileşim Öğesi	Normal Ekmek	Kepekli Ekmek
Toplam Nem (%)	40.750 $\pm$ 0.590	40.200 $\pm$ 0.290
Ham Protein (%)	12.150 $\pm$ 0.560	11.455 $\pm$ 1.445
Ham Yağ (%)	1.480 $\pm$ 0.050	0.960 $\pm$ 0.020
Ham Lif (%)	0.400 $\pm$ 0.010	2.660 $\pm$ 0.130
Zedelenmemiş Nişasta (%)	4.305 $\pm$ 0.215	4.170 $\pm$ 0.070
Toplam Kül (%)	2.275 $\pm$ 0.015	2.710 $\pm$ 0.010

TS 5000'e göre katkılı ekmekler 6 tip olarak sınıflandırılmış ve Tip 5'in sahip olması gereken nem miktarının en fazla %40 olabileceği bildirilmiştir. Yine TS 5000'e göre katkısız ekmek un, su, tuz ve maya ile hazırlanan ekmek olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla pişirilen ekmeklerde saptanan %40'lık nem oranının standartlara uygun olduğu görülmektedir.

Abede vd (1992) katkısız beyaz ekmeklerde yaptıkları çalışmada toplam nem miktarının %29.5-47.85, yağ miktarının %3.2-4.3, protein miktarının %8.2-9.3, kül miktarının ise %1.2-2.1 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Sidhu vd (1999) ise kepekli ekmeklerdeki kül, protein ve yağ miktarının, sırasıyla, %2.3-3.1, %11.4-12.8 ve %3.1-4.2 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.1'de protein ve kül miktarları için verilen değerler yukarıda sözü edilen çalışmalarla karşılaştırıldığında kül oranlarının her iki ekmek tipi, protein oranının ise sadece kepekli ekmek için uyumlu olduğu, normal ekmek için belirlenen %12.2'lik protein miktarının ise Abede vd'nin (1992) belirlediklerinden yüksek olduğu

görülmektedir. Ancak Buğday Unu Tebliği'nde (Anonim 1999) ekmeklik unların protein miktarının en az %10.5 olması gerektiği bildirilmiştir. Dolayısıyla ekmekte belirlenen protein miktarının çok da fazla olmadığı söylenebilir. Dhingra ve Jood (2001) çalışmalarında kontrol örneği olarak kullandıkları normal ekmekte protein, kül ve yağ içeriğini, sırasıyla, $11.5 \pm 1.95\text{g}/100\text{g}$, $2.1 \pm 0.44\text{g}/100\text{g}$ ve $5.44 \pm 0.45\text{g}/100\text{g}$ olarak tayin etmişlerdir.

Bu tez çalışması ile yukarıda verilen çalışmaların bulgularında dikkat çeken en önemli fark belirlenen yağ oranlarının yüksekliğidir. Bu durum, ekmeklerde dilimlenmeyi kolaylaştırmak için bu araştırmalarda hamura ayrıca yağ ilave edildiği halde bu tez çalışmasında yağ ilave edilmemesinden kaynaklanmaktadır.

4.2. Ekmeklere Ait Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

4.2.1. Hammaddelerdeki sünme sporu sayısı

Üretilen ekmeklerdeki başlangıç spor yükünü belirlemek amacıyla hammaddelerde yapılan sünme spor sayımı sonuçları Çizelge 4.2.'de ve Şekil 4.1.'de verilmiştir.

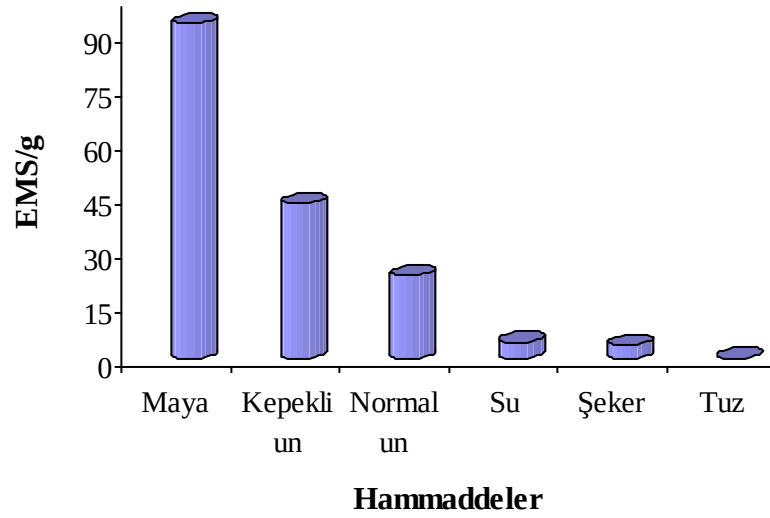
Ekmek yapımında kullanılan mayadaki sünme sporu sayısı 93EMS/g ($1.97 \log \text{kob/g}$) olarak bulunmuştur. Ekmek mayasında bulunmasına izin verilen sünme sporu sayısı kuru maddede en çok 200 adet/g'dır (Anonim 1992). Spor sayısının, standartlarda izin verilen sınırlar içinde, ancak uygun koşullar altında muhafaza sırasında üreyerek sünme hastalığını oluşturabilecek yoğunlukta olduğu görülmektedir.

Kepekli un, normal un, su, şeker ve tuzda belirlenen sünme sporu sayıları, sırasıyla, 43EMS/g, 23EMS/g, 4.3EMS/g 3.6EMS/g ve <3EMS/g'dır. Diğer çalışmalarda ulaşılan bulgularla karşılaştırmak üzere bu değerler logaritmik olarak ifade edildiğinde, sırasıyla, $1.63 \log \text{kob/g}$, $1.36 \log \text{kob/g}$, $0.63 \log \text{kob/g}$, $0.56 \log \text{kob/g}$, $<0.48 \log \text{kob/g}$ değerleri elde edilir.

Bailey ve von Holy (1993) maya, un ve sudaki spor sayısını, sırasıyla, 5.15 log kob/g, 2.69 log kob/g ve 1 log kob/g, Volavsek vd (1992) analiz ettikleri un örneklerinde spor yükünü 1-3 log kob/g, Rosenkvist ve Hansen (1995) un, kepek ve mayadaki spor sayısını, sırasıyla, 3.4 kob/g, 12.4 kob/g ve 0.6 kob/g olarak tespit etmişlerdir. Ekmeklerin yapımında kullanılan normal unun spor yükü (1.36 log kob/g) Volavsek vd'nin (1992) çalışmasıyla uyum içindedir. Bailey ve von Holy'nin (1993) çalışması ile karşılaştırıldığında kullandığımız hammaddelerin spor yükünün düşük olduğu görülmektedir. Ancak ekmeklerde sünme hastalığının oluşmasında daha önemli olan faktör, ekmeklerin bakteri gelişimini tetikleyecek ortamlarda muhafaza edilmesi sonucu mevcut sporların çimlenerek bakteri sayısının hastalığı oluşturacak sınırlara kadar ulaşmasıdır. Nitekim Rosenkvist ve Hansen (1995) başlangıç spor yükü düşük un kullanmalarına rağmen laboratuvar koşullarında ürettikleri ekmeklerdeki *Bacillus* sayısını oldukça yüksek bulduklarını ifade etmişlerdir.

Çizelge 4.2. Hammaddelerdeki sünme sporu sayımı sonuçları

Örnek	1. tüp	2. tüp	3. tüp	1. tüp	2. tüp	3. tüp	1. tüp	2. tüp	3. tüp	Sonuç
Su	1			0.1			0.01			4.3 EMS/g
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Normal un	0.1			0.01			0.001			23 EMS/g
	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Kepekli un	0.1			0.01			0.001			43 EMS/g
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Maya	0.1			0.01			0.001			93 EMS/g
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Tuz	0.1			0.01			0.001			< 3 EMS/g
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Şeker	0.1			0.01			0.001			3.6 EMS/g
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	



Şekil 4.1. Ekmek hammaddelerinin sünme sporu yükü

4.2.2. Normal ve kepekli ekmeklerdeki toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısına muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi

İçme suyu ve çiğ süt dışındaki gıda maddelerinde, toplam koloni sayısının anlamı çeşitli yönlerden sınırlandırılmıştır ve genellikle ciddi bir tartışma söz konusudur. Çünkü koloni sayısının yüksek olması, hiçbir şekilde mutlaka sağlık açısından tehlike oluşturduğu anlamını taşımaz. Buna karşın az sayıda koloni içeren bir gıda maddesi de hiçbir zaman hijyenik açıdan daha az tehlikeli olarak değerlendirilmemelidir. Ancak bütün bu değerlendirmelere rağmen, toplam koloni sayısının belirli bir indikatör fonksiyonuna sahip olduğu kabul edilmektedir. Bu değer; kaliteli olarak bilinen bir hammadde hakkında, olası bir kontaminasyon, hijyenik açıdan hatalı bir üretim veya proses ya da depolama sırasında süre ve sıcaklığın yeterli olup olmadığı hakkında önemli ipuçları vermektedir (Sekin ve Karagözlü 2004).

4, 25, 37 ve 45°C’de 7 gün boyunca muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait logaritmik değerlere dönüştürülmüş TMAB sayım sonuçları Çizelge 4.3.’de verilmiştir.

25, 37 ve 45°C’de muhafaza edilen normal ve kepekli ekmeklerde benzer olarak, 1. günde TMAB sayısında ani bir artış olduğu görülmektedir. Bu ani artış, muhafazanın 0. ve 1. günleri arasında bakterilerin logaritmik gelişme evresinde olduklarının bir kanıtıdır.

Düşük sıcaklık derecelerinde mikroorganizma faaliyeti durur. Bu durumu etkileyen iki faktör vardır. Birincisi, organizmadaki bireysel enzimlerin reaksiyon hızının yavaşlaması, ikincisi ise düşük sıcaklık derecelerinin sitoplazmik membranın akışkanlığını azaltması sonucu taşıma mekanizmasının engellenmesidir (Anonim 2003). Çizelge 4.3.’de 4°C’ye ait veriler incelendiğinde bakteri çoğalmasının durduğu, zamanla ortam koşulları olumsuzlaştıkça bakteri ölümünün gerçekleşmesi sonucu TMAB sayısının azaldığı görülmektedir.

TS 5000 Ekmek Standardı’nda ekmeklerde bulunmasına müsaade edilen mezofilik aerobik bakteri sayısı en fazla 1.0×10^7 kob/g’dır. Anonim’e (2001) göre ise bu değer 1.0×10^5 kob/g’dır. Logaritmik olarak ifade edildiğinde bu değerler 5 ve 7’ye tekabül etmektedir. Çizelge 4.3.’deki sonuçlara bakıldığında her iki ekmek tipi için de, 4°C’de muhafaza sırasında TMAB sayısının izin verilen sınırlarda olduğu, 25°C’de muhafazanın ikinci, 37 ve 45°C’de ise muhafazanın birinci günlerinde sınır değerini aştığı görülmektedir. Anonim (2001) baz alındığında 25°C’de de muhafazanın birinci gününde sınır değeri aşılmıştır. Bu sonucun muhtemel nedeni, hammaddelerin başlangıç yükünün fazlalığı ve ekmeklerin bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarında muhafaza edilmiş olmasıdır.

Yapıcı ve Barut (2003) piyasadan topladıkları ekmeklerdeki ortalama TMAB sayısını ilkbahar aylarında 5.6×10^4 kob/g, yaz aylarında ise 5.5×10^4 kob/g olarak tespit ederek, iklim koşullarının bakteri yükünü etkilemediğini bildirmişlerdir. Logaritmik ölçekte yaklaşık 4.7 log kob/g’a denk gelen bu değerlerin, ekmekler satın alındığı gün analize tabi tutulduğu düşünüldüğünde, bu tez çalışmasında 0. günde tespit edilen TMAB değerlerinden çok yüksek olduğu açıktır. Ancak sözü geçen çalışmada, incelenen ekmek örneklerinin fırınlarda açık olarak tüketime sunulan ürünler arasından seçilmiş olması

bu durumu açıklamaktadır. Ayrıca örnekler laboratuvara getirilinceye kadar geçen sürenin de göz ardı edilmemesi gerekir.

Çizelge 4.3. Farklı sıcaklık derecelerinde muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait TMAB sayımı sonuçları

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek (log kob/g)	Kepekli Ekmek (log kob/g)
4	0	2.458 ± 0.003	2.285 ± 0.084
	1	2.344 ± 0.036	1.702 ± 0.228
	2	2.180 ± 0.050	1.349 ± 0.049
	3	2.268 ± 0.065	1.087 ± 0.089
	4	2.024 ± 0.121	1.149 ± 0.150
	5	2.097 ± 0.000	0.848 ± 0.152
	6	1.649 ± 0.349	T.E.
25	0	1.148 ± 0.151	1.924 ± 0.115
	1	5.444 ± 0.232	5.130 ± 0.251
	2	7.247 ± 0.212	7.034 ± 0.003
	3	8.028 ± 0.046	8.102 ± 0.066
	4	8.515 ± 0.021	8.761 ± 0.058
	5	8.712 ± 0.140	9.431 ± 0.164
	6	8.856 ± 0.106	9.827 ± 0.046
37	0	2.455 ± 0.176	2.915 ± 0.115
	1	7.313 ± 0.357	8.935 ± 0.035
	2	8.004 ± 0.168	9.510 ± 0.000
	3	8.640 ± 0.234	9.755 ± 0.045
	4	9.393 ± 0.039	9.545 ± 0.075
	5	9.506 ± 0.067	9.645 ± 0.065
	6	9.584 ± 0.071	8.945 ± 0.425
45	0	0.698 ± 0.000	3.666 ± 0.143
	1	7.623 ± 0.075	7.851 ± 0.204
	2	9.140 ± 0.037	8.946 ± 0.504
	3	9.329 ± 0.002	9.250 ± 0.587
	4	9.260 ± 0.028	9.353 ± 0.032
	5	9.459 ± 0.007	9.108 ± 0.158
	6	9.662 ± 0.086	9.676 ± 0.253

T.E. : Tespit edilemedi

Normal ve kepekli ekmeklerin TMAB sayımlarına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.4.'de verilmiştir. TMAB sayısının değişimi üzerine etkisi bakımından sıcaklık dereceleri ve muhafaza süreleri arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar ($p < 0.01$) olduğu, ancak bu değişimin ekmek tipinden bağımsız olduğu Çizelge 4.4.'den görülmektedir. Ayrıca, TMAB sayısındaki değişimi sıcaklık x ekmek tipi, sıcaklık x

muhafaza süresi ve sıcaklık x ekmek tipi x muhafaza süresi arasındaki interaksiyonlar önemli düzeyde ($p<0.01$) etkilerken, ekmek tipi x muhafaza süresi arasındaki interaksiyonun bu değişim üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.4. Normal ve kepekli ekmeklerin TMAB sayımlarına ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	254.0440031	4163.89**
Ekmek Tipi (B)	1	0.0208450	0.34
Muhafaza Süresi (C)	6	43.4745785	712.57**
A x B	3	2.5819168	42.32**
A x C	18	8.1665134	133.85**
B x C	6	0.0716467	1.17
A x B x C	18	0.3716318	6.09**
Hata	54	0.061011	

(**) $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin TMAB sayımı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları incelendiğinde sıcaklık derecesi ve muhafaza süresine bağlı olarak normal ve kepekli ekmeklerin TMAB sayımı ortalamaları arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar ($p<0.05$) olduğu görülmektedir. Farklı sıcaklık derecelerindeki TMAB sayımı ortalamalarına bakıldığında, sıcaklık derecesi arttıkça ekmeklerde tespit edilen TMAB sayısının da arttığı açıktır. Muhafaza süresi baz alındığında ise süre uzadıkça TMAB sayısının da arttığı ancak muhafazanın 4. ve 5. günleri arasında toplam canlı sayısı bakımından herhangi bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.

Ekmeklerdeki TMAB sayısı ortalaması 45°C'de 8.485 log kob/g iken muhafazanın 6. günündeki TMAB sayısı ortalaması 7.828 log kob/g olarak belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.5.) Sonuçlar, ekmeklerde sıcaklık derecesine bağlı olarak TMAB sayısında meydana gelen artışın, muhafaza süresinin neden olduğu artıştan daha fazla olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.5. Normal ve kepekli ekmeklerin TMAB sayımı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Sıcaklık	45°C	37°C	25°C	4°C
	8.485 ^a ± 0.350 (N=27)	8.180 ^b ± 0.454 (N=28)	7.013 ^c ± 0.498 (N=28)	1.773 ^d ± 0.108 (N=27)
Süre	6	5	4	3
	7.828 ^a ± 0.863 (N=15)	7.389 ^b ± 0.889 (N=16)	7.299 ^b ± 0.859 (N=16)	7.033 ^c ± 0.816 (N=16)
	2	1	0	
	6.685 ^d ± 0.767 (N=16)	5.798 ^e ± 0.641 (N=16)	2.513 ^f ± 0.218 (N=15)	

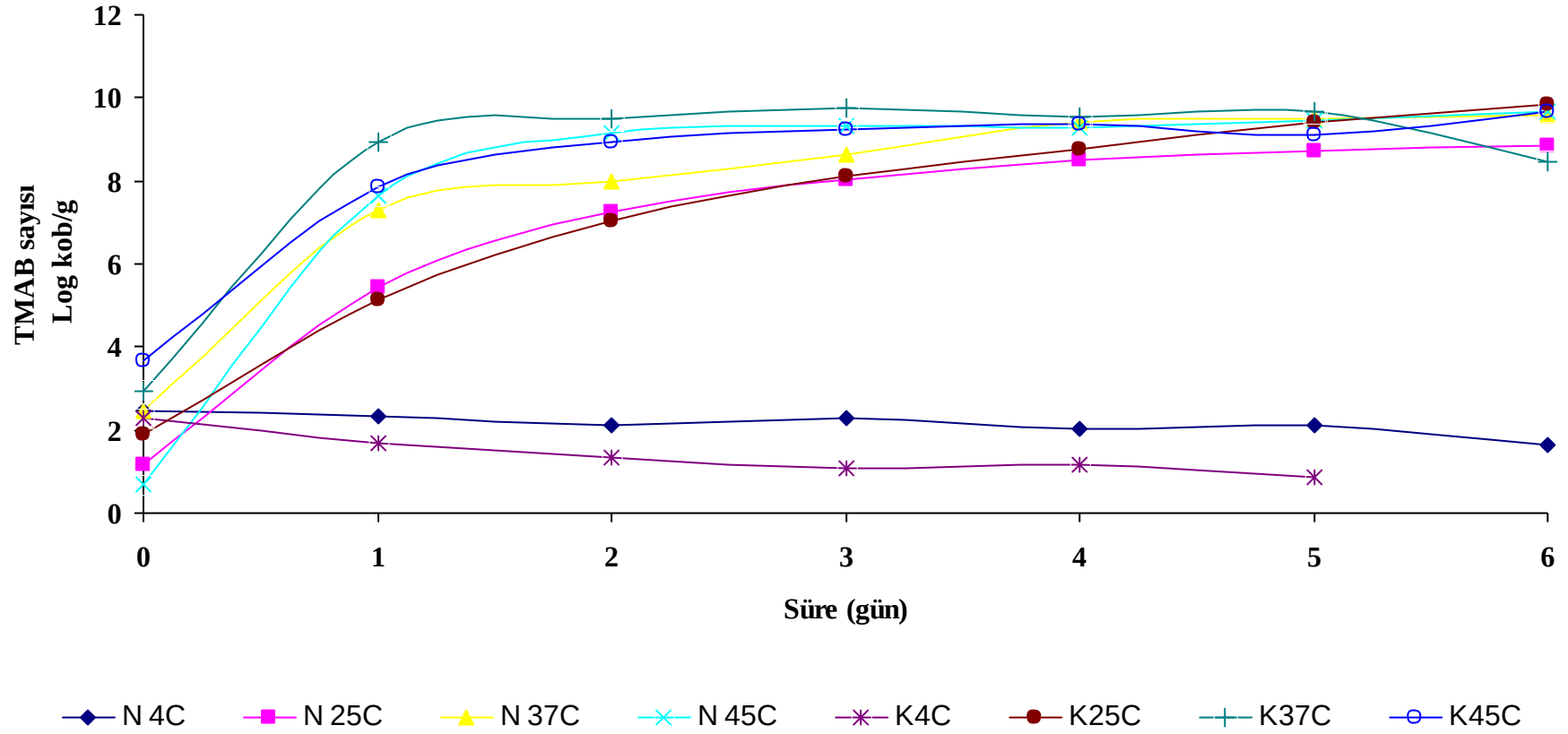
Değişik harfler, ortalamaların $p < 0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Normal ve kepekli ekmeklerdeki TMAB'lere ait gelişme eğrileri Şekil 4.2.'de verilmiştir.

4.2.3. Normal ve kepekli ekmeklerdeki *Bacillus* sayısına muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi

Ekmekler yüksek sıcaklıkta pişirildikleri için hammaddeler ile birlikte gelen vejetatif bakteri hücreleri tahrip olur. Spor oluşturarak olumsuz koşullarda canlılıklarını devam ettirebilme yeteneğine sahip olan *Bacillus* türleri, fırın sıcaklığına dayanabilirler. Dolayısıyla taze pişmiş ekmekte vejetatif *Bacillus* hücrelerine rastlanmaması gerektiği düşünülebilir. Ancak ekmeklerde 0. günde yapılan analizler bunun aksini göstermektedir. *Bacillus* varlığının, analizler yapılmadan önce ekmeklerin soğutulması sırasında, su aktivitesinin de elverişli olması sebebiyle, sporların çimlenmek için uygun ortamı bulmuş olmalarından veya besi ortamına ekimden sonra bu sporların çimlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4, 25, 37 ve 45°C'de 7 gün boyunca muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait *Bacillus* sayım sonuçları Çizelge 4.6.'da verilmiştir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.2. Normal ve kepekli ekmeklerdeki TMAB'lere ait gelişme eğrileri

Çizelge 4.6. Farklı sıcaklık derecelerinde muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait *Bacillus* sayım sonuçları

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek (log kob/g)	Kepekli Ekmek (log kob/g)
4	0	1.493 ± 0.319	2.309 ± 0.010
	1	2.249 ± 0.122	1.940 ± 0.014
	2	2.077 ± 0.036	1.360 ± 0.185
	3	2.154 ± 0.008	T.E.
	4	1.846 ± 0.106	0.698 ± 0.001
	5	2.211 ± 0.151	0.697 ± 0.001
	6	1.149 ± 0.151	T.E.
25	0	0.696 ± 0.001	0.696 ± 0.001
	1	4.995 ± 0.228	5.140 ± 0.183
	2	7.122 ± 0.232	7.068 ± 0.035
	3	8.052 ± 0.071	8.163 ± 0.027
	4	8.540 ± 0.022	9.319 ± 0.652
	5	8.638 ± 0.234	9.547 ± 0.078
	6	8.728 ± 0.187	9.695 ± 0.022
37	0	2.087 ± 0.357	2.766 ± 0.186
	1	7.375 ± 0.286	9.028 ± 0.044
	2	8.032 ± 0.215	9.405 ± 0.026
	3	8.613 ± 0.221	9.645 ± 0.012
	4	9.277 ± 0.026	9.384 ± 0.176
	5	9.400 ± 0.080	9.556 ± 0.065
	6	9.456 ± 0.026	8.879 ± 0.593
45	0	0.937 ± 0.239	3.384 ± 0.054
	1	7.554 ± 0.062	7.852 ± 0.019
	2	8.888 ± 0.007	8.861 ± 0.470
	3	9.239 ± 0.033	9.101 ± 0.428
	4	9.090 ± 0.154	9.168 ± 0.043
	5	9.429 ± 0.018	9.179 ± 0.089
	6	9.611 ± 0.133	9.640 ± 0.332

T.E. : Tespit edilemedi

Rosenkvist ve Hansen (1995) yaz aylarındaki oda sıcaklığını temsil etmesi bakımından 25-30°C’de 2 gün muhafaza ettikleri, koruyucu madde veya ekşi maya içermeyen normal, kepekli ve laboratuvar koşullarında pişirilmiş normal ekmeklerdeki *Bacillus* sayısını, sırasıyla, 6.2 log kob/g, 5.4 log kob/g ve 7.3 log kob/g olarak belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında 25°C’de muhafaza edilmiş olan her iki ekmek tipi için yaklaşık 7 log kob/g olarak tespit edilen bu değer, Rosenkvist ve Hansen’nin (1995) laboratuvar koşullarında üretilmiş normal ekmek için tespit ettikleri değer ile uyum içindedir.

Sorokulova vd (2003) 37°C’de muhafaza ettikleri ekmeklerdeki *Bacillus* sayısını pişirmenin hemen ardından, 24, 36, ve 48 saat sonra tespit etmişlerdir. Farklı un örnekleri ile laboratuvar koşullarında pişirilmiş ekmekler için belirtilen sürelerle göre tespit ettikleri en düşük ve en yüksek değerler, sırasıyla 7×10^2 ve 1.3×10^4 kob/g, 3×10^3 ve 2×10^4 kob/g, 2×10^4 ve 8×10^5 kob/g, 4.1×10^5 ve 7.2×10^6 kob/g’dır. Bu tez çalışmasında 37°C’de muhafaza edilen normal ve kepekli ekmek için 0, 24 ve 48. saatlerde belirlenen değerler ise sırasıyla, onluk sayma sisteminde, 1.2×10^2 ve 5.8×10^2 kob/g, 2.3×10^7 ve 1.1×10^9 kob/g, 1.1×10^8 ve 2.5×10^9 kob/g olarak bulunmuştur. 0. gün değerleri birbirine çok yakın iken bu tez çalışmasında 1. ve 2. günlerde belirlenen değerler yukarıda sözü edilen çalışmadaki değerlerden çok yüksektir. Bu durum, hamur formülasyonunun farklılığına ve muhafaza sırasında bakteri gelişimi için oluşan daha uygun koşullara (besin maddeleri, a_w , inhibitör veya aktivatör maddeler v.b.) bağlanabilir.

Bu tez çalışmasında, görsel olarak sünme hastalığının *Bacillus* sayısı yaklaşık 4×10^8 kob/g’a ulaştığı zaman oluştuğu ancak *Bacillus* sayısı yaklaşık 10^7 kob/g’a ulaştığı zaman kötü koku oluşumu ile birlikte sünmenin başladığı belirlenmiştir. Çizelge 4.6. bu bilgi ışığında incelendiğinde normal ekmeklerde 25°C’de sünme 2. günde başlarken, 37 ve 45°C’de 1. günde başladığı; söz konusu kepekli ekmek olduğunda ise 25°C’de yine 2. günde, 37°C’de 24 saatten önce, 45°C’de ise 1. günde başladığı görülmektedir. Sünme hastalığının görsel olarak oluşumu açısından bakıldığında ise normal ekmek için 25°C’de 4. günde, 37°C’de 3. günde, 45°C’de ise 2. günde; kepekli ekmek için 25°C’de 3-4. gün arasında, 37°C’de 1. günde, 45°C’de ise 2. günde hastalığın belirgin hale geldiği anlaşılmaktadır. 37°C’de muhafaza edilmiş normal ekmeklerde muhafaza süresi boyunca sünme hastalığının gelişimi Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Şekil 4.4.’de ise sünme hastalığı ile birlikte ekmek içinde oluşan kahverengimsi ve ipliksi yapı görülmektedir.

Thompson vd (1998) hastalığın, görsel olarak, 30°C’de muhafaza sırasında 96 saat (4 gün) sonra oluştuğunu tespit etmiş ve hastalığı (-) sünme yok, ($\pm$) şüpheli sünme, (+) az sünme, (++) orta derecede sünme, (+++) önemli derecede sünme, (+++++) ileri derecede sünme ve (++++++) oldukça fazla sünme şeklinde derecelendirmişlerdir.



a) 0. gün



b) 1. gün



c) 2. gün



d) 3. gün



e) 4. gün



f) 5. gün



g) 6. gün

Şekil 4.3. 37°C’de muhafaza edilen normal ekmeklerde sünme hastalığının gelişimi



a)



b)

Şekil 4.4. Sünme hastalığı sırasında ekmek içinde oluşan kahverengimsi ve ipliksi yapı

Çizelge 4.7.'de normal ve kepekli ekmeklerin *Bacillus* sayımlarına ait varyans analizi sonuçları verilmiştir. Çizelgeye göre sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresi ile bunlar arasındaki interaksyonlar ekmeklerdeki *Bacillus* sayısını istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.01$) etkilemektedir.

Çizelge 4.7. Normal ve kepekli ekmeklerin *Bacillus* sayımlarına ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	250.9625004	3211.94 ^{**}
Ekmek Tipi (B)	1	0.9083640	11.63 ^{**}
Muhafaza Süresi (C)	6	57.2984044	733.33 ^{**}
A x B	3	1.8414829	23.57 ^{**}
A x C	18	9.1204393	116.73 ^{**}
B x C	6	0.6449191	8.25 ^{**}
A x B x C	18	0.5303610	6.79 ^{**}
Hata	54	0.078134	

(^{**}) $P < 0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin *Bacillus* sayısı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarından görüldüğü üzere normal ve kepekli ekmeklerin *Bacillus* sayısı ortalamaları sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresinden

önemli düzeyde ($p<0.05$) etkilenmektedir. Çizelgeye göre sıcaklık derecesi arttıkça ekmeklerin *Bacillus* yükünün de arttığı gözlenmiştir. Her ne kadar bakterinin optimum gelişme sıcaklığı olması sebebiyle 37°C'deki *Bacillus* sayımı ortalaması (8.076 log kob/g) 45°C'dekinden (7.994 log kob/g) fazla olsa da istatistiki olarak, bu farkın önemli ($p<0.05$) olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.8.'e göre kepekli ekmekteki *Bacillus* sayımı ortalamasının normal ekmektekinden daha yüksek olması, kepekli unda başlangıç spor yükünün yüksek olması ile ilişkilidir (Bkz. Çizelge 4.2.). Kepekli un ile yapılan ekmeklerin *Bacillus* yükünün daha fazla olması, toprak kökenli olan *Bacillus* türlerinin buğdayın kabuk tabakasında bulunma olasılığının çok daha fazla olmasının doğal bir sonucudur. Normal un üretiminde buğdayın kabuk tabakası uzaklaştırılırken, ürünün mikroorganizma yükü de büyük ölçüde azaltılmaktadır.

Normal ve kepekli ekmeklerin *Bacillus* sayımı ortalamaları muhafaza süresi açısından incelendiğinde; bakteri sayısının muhafazanın dördüncü gününe kadar artıp, sonra azaldığı dikkati çekmektedir. Ancak istatistiki olarak %5 önem seviyesinde bu azalışın anlamsız olduğu, aslında 4., 5. ve 6. günlerdeki *Bacillus* sayımı ortalamaları arasında hiçbir fark olmadığı anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.8. Normal ve kepekli ekmeklerin *Bacillus* sayımı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Sıcaklık	37°C	45°C	25°C	4°C
	8.076 ^a ± 0.463 (N=28)	7.994 ^a ± 0.481 (N=28)	7.074 ^b ± 0.519 (N=27)	1.632 ^c ± 0.117 (N=27)
Ekmek Tipi	Kepekli	Normal		
	6.321 ^a ± 0.484 (N=55)	6.134 ^b ± 0.454 (N=55)		
Süre	4	5	6	3
	7.514 ^a ± 0.815 (N=15)	7.359 ^a ± 0.889 (N=16)	7.323 ^a ± 0.913 (N=16)	6.975 ^b ± 0.832 (N=16)
	2	1	0	
	6.595 ^c ± 0.757 (N=16)	5.766 ^d ± 0.639 (N=16)	1.869 ^e ± 0.253 (N=15)	

Değişik harfler, ortalamaların $p<0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Deneme desenindeki temel varyasyon kaynakları olan sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresi kendi aralarında karşılaştırıldığında ise *Bacillus* sayımı ortalamasının en yüksek olduğu faktörün sıcaklık derecesi (8.076 log kob/g) olduğu, bunu sırasıyla, muhafaza süresi (7.514 log kob/g) ve ekmek tipinin (6.321 log kob/g) izlediği Çizelge 4.8.'den görülmektedir.

Şekil 4.5'de *Bacillus*'lara ait gelişme eğrileri verilmiştir. Bu eğrilerin TMAB eğrileri ile benzer eğilim göstermesi, bakteri sayım sonuçlarının birbirine çok yakın olması, fırın sıcaklığına spor oluşturarak dayanması nedeniyle, TMAB'yi oluşturan bakterilerin büyük çoğunluğunu *Bacillus* türlerinin oluşturduğunu göstermektedir. Nitekim TMAB sayısı ile *Bacillus* sayısı arasında, istatistiki olarak, pozitif yönlü güçlü bir ilişki olduğu belirlenmiş ve R^2 değeri normal ve kepekli ekmekler için sırasıyla, 0.984 ve 0.810 olarak hesaplanmıştır. Kepekli ekmek için hesaplanan R^2 değerinin nispeten daha düşük olmasının, 4°C'de muhafaza edilen ekmeklerde *Bacillus* sayımlarına ilişkin tespit edilemeyen iki adet veri olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

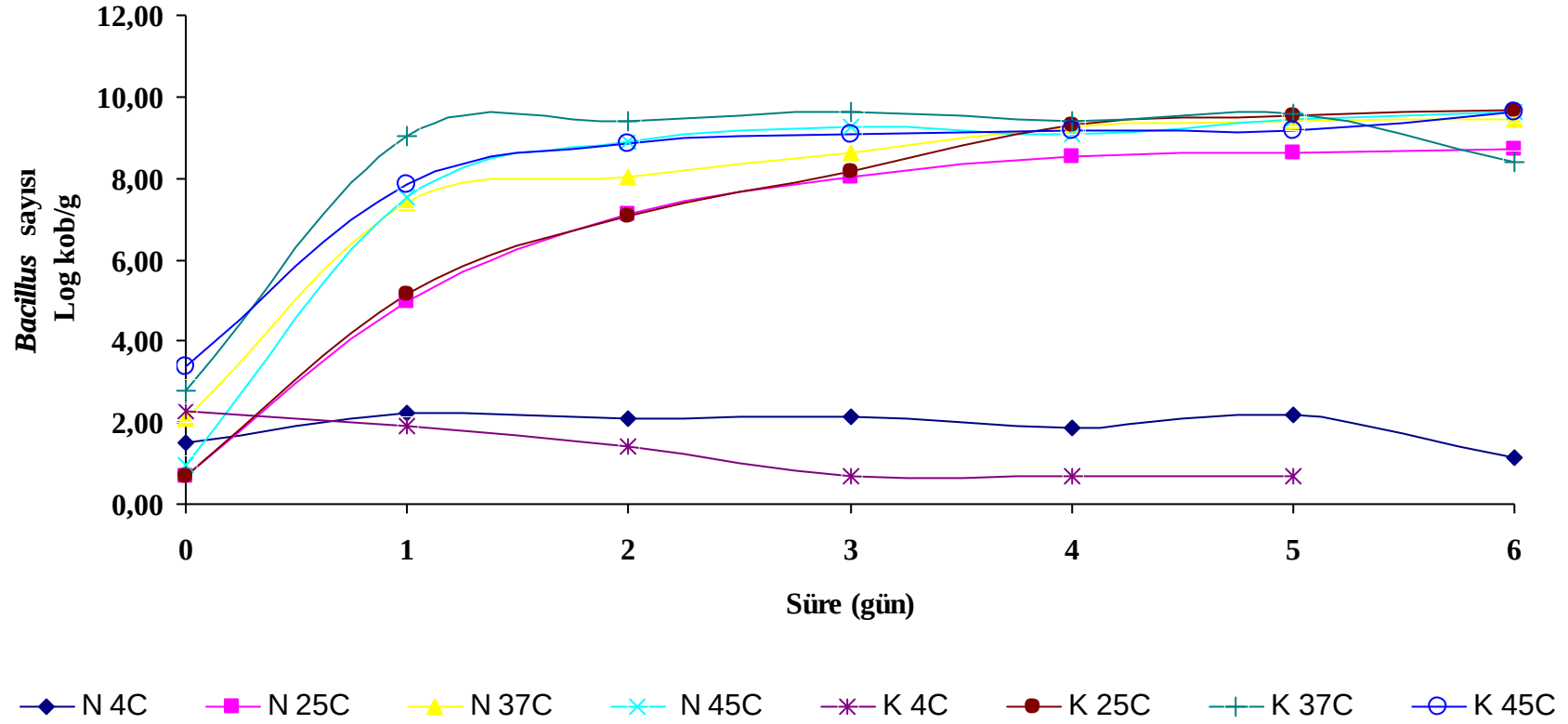
Şekil 4.5. incelendiğinde 25°C, 37°C ve 45°C'de muhafaza edilen her iki ekmek örneği için de tipik mikroorganizma gelişim eğrileri elde edildiği görülmektedir. Ancak ölüm evresini de içermesi bakımından, 37°C'de muhafaza edilen kepekli ekmek için elde edilen eğri, tipik mikroorganizma gelişim eğrisini daha iyi yansıtmaktadır. 37°C'de elde edilen gelişme eğrilerinin tipik mikroorganizma gelişim eğrilerine daha yakın olması, bu sıcaklığın bakterinin, buna bağlı olarak da sünme hastalığının gelişmesi için, optimum sıcaklık derecesi olduğunu göstermektedir. Leuschner vd (1998) de yarı-pişmiş ve tekrar-fırınlanmış, sodalı esmer ekmekte sünme gelişimini inceledikleri bir çalışmada *Bacillus* türlerinin en hızlı geliştiği sıcaklık derecesinin 37°C olduğunu bulmuşlardır. Bu tez çalışmasının sonuçları ile yukarıda atıfta bulunulan çalışma sonuçları birbirini destekler niteliktedir.

Şekil 4.5.'e bakıldığında 45°C'de muhafaza edilen kepekli ve normal ekmek için başlangıç yükü, 37°C'de bekletilen ekmeklere göre daha fazla olmasına rağmen, bakteriyel yükteki artış daha azdır. Kepekli ekmek için 37°C'de 5. günden sonra ölüm fazı başlarken, 45°C'de 6. günde bile ölüm fazının başlamadığı görülmektedir. Bu farklılığı 37°C'nin bakterinin en

hızlı geliştiği sıcaklık derecesi olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 37°C’de gelişme daha hızlı olduğu için muhtemelen ortamdaki besin maddelerinin tükenmesi, ortamda metabolitlerin birikmesi gibi olumsuz koşullar da daha hızlı oluşmakta ve yaşlanan bakteri hücreleri 45°C’ye göre daha erken ölmektedir. 45°C’de bakterilerin daha yavaş gelişmesi ve ölüm evresine daha geç geçmesi ise optimum gelişme sıcaklığından uzaklaşma sonucu bakteri metabolizmasının yavaşlaması ile izah edilebilir. Aynı durumun normal ekmek için söz konusu olmaması, yani 37°C’de ölüm fazının başlamamış olması, kepekli ekmeğin başlangıç *Bacillus* yükünün daha fazla olmasına bağlı olarak, ortamdaki besin için yarışan bakteri sayısının fazlalığı nedeniyle oluşan metabolitlerin de fazla olmasıyla ilişkilendirilebilir.

25°C’de normal ve kepekli ekmek için bakteri sayısı 3. güne kadar neredeyse birbirinin aynıken 3. günden sonra kepekli ekmekte az da olsa bir artış gerçekleşmiştir. Bu sıcaklıkta bakteri gelişimi nispeten daha yavaş gerçekleşmiş ve durgun faz, her iki ekmek tipi için de 4. günde başlamıştır. Bu durum 25°C’de 6 günlük muhafaza süresinin bakterinin gelişme evresini tamamlaması için yeterli olmadığını düşündürmektedir.

4°C’de muhafaza sırasında, kepekli ekmekte 3. günden sonra bakteri gelişiminin tamamen durduğu, normal ekmekte ise 5. günden sonra belirgin bir azalma olduğu görülmektedir. 25°C ve 4°C’de görülen bu gelişme biçimleri, yine muhafaza sıcaklığının bakterinin optimum gelişme sıcaklığından uzaklaşılması ve metabolik aktivitesinin düşmesi ile açıklanabilir. 4°C zaten mikroorganizma gelişmesinin sınırlandığı sıcaklık derecesi aralığındadır. Bu sıcaklıkta bakterilerin çoğalması zaten beklenmez. Leuschner vd (1998) de 4°C’de muhafaza edilen kısmi pişmiş ekmeklerde *Bacillus* çoğalmasının engellendiğini belirlemişlerdir. Mevcut literatür bilgileri bu tez çalışmasının bu bulgularını destekler niteliktedir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.5. Normal ve kepekli ekmeklerdeki *Bacillus*'lara ait gelişme eğrileri

4.2.4. Normal ve kepekli ekmeklerde yapılan küf sayımı sonuçları

Dichloran Rose Bengal Agar (DRBC) ve Patato Dextrose Agar'a (PDA) paralelli olarak yapılan ekim sonucunda ortamlarda gelişme olmadığı için maya-küf sayısı tespit edilememiştir. Örneklerde küf bulunmamasının nedeni, ekmeklerde yapılacak analizleri olumsuz etkilememesi için pişirilmeden önce ekmek hamurlarının yüzeyine %40'luk sodyum propiyonat/propiyonik asit karışımının püskürtülmesi ve kontaminasyon olmadan ekmeklerin paketlenmesi, mayanın bulunmama nedeni ise yüksek sıcaklıkta pişirme sırasında maya hücrelerinin tahrip olmasıdır.

4.3. Ekmeklere Ait Fiziksel Analiz Sonuçları

4.3.1. Su aktivitesi ölçüm sonuçları

Gıdaların pek çok önemli özelliği, özellikle de mikrobiyal gelişmeye karşı hassasiyetleri gıdada mevcut su ile ilgilidir. Fakat bir gıdanın su içeriğinin, tek başına kararlılık üzerindeki en önemli etken olduğu söylenemez (Coulter 1996). Mikroorganizmaların gelişmeleri ve yaşama yeteneği, gıdaların mutlak nem içeriğinden çok kullanılabilir veya aktif su içeriğine bağlıdır. Bütün mikroorganizmalar 1.0 ile 0.98 a_w değerlerinde, çoğalma yeteneklerinde herhangi bir azalma olmaksızın gelişebilirler. 0.90 a_w değerinde ise mikroorganizmaların çoğunun gelişmesi engellenir. Mikroorganizmaların gelişmeleri 0.90 a_w değerinden 0.60 a_w değerine indikçe yavaşlar; 0.60'ın altındaki a_w değerlerinde ise hiçbir gelişme mümkün değildir (Seki ve Karagözlü 2004).

Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı su aktivitesi ölçüm sonuçları Çizelge 4.9.'da verilmiştir. Mikroorganizmaların gelişmeleri için uygun su aktivitesi değerleri göz önünde bulundurularak bu çizelge incelendiğinde deneme ekmeklerinin su aktivitesi değerlerinin mikroorganizma gelişimi için oldukça uygun bölgede (0.9'un üzerinde) olduğu görülmektedir. Bu da ekmeklerin bakteri gelişimine uygun sıcaklıklarda muhafaza edilmesi halinde kolayca sünüp, bozulabileceğine işaret etmektedir. Kirschner ve von Holy (1989) de ekmek iç neminin yüksek olmasının

sünme gelişimini destekleyeceğini ifade etmiş ve su aktivitesinin bakterinin çoğalma, metabolik aktivite ve yüksek sıcaklığa dayanımını etkilediğini belirtmişlerdir. Pepe vd (2003) ise depolama sırasında pH, su aktivitesi ve sıcaklık derecesinin sporların çimlenmesi ve çimlenen hücrelerin gelişmesinde önemli rol oynadığını ve 0.95'in üzerindeki su aktivitesi değerinin sünme hastalığını tetiklediğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.9. Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı su aktivitesi ölçüm sonuçları ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek	Kepekli Ekmek
4	0	0.979 $\pm$ 0.006	0.970 $\pm$ 0.024
	1	0.980 $\pm$ 0.006	0.992 $\pm$ 0.002
	2	0.994 $\pm$ 0.001	0.985 $\pm$ 0.005
	3	0.999 $\pm$ 0.000	0.978 $\pm$ 0.001
	4	0.997 $\pm$ 0.002	0.983 $\pm$ 0.000
	5	0.997 $\pm$ 0.002	0.972 $\pm$ 0.004
	6	0.997 $\pm$ 0.002	0.965 $\pm$ 0.003
25	0	0.979 $\pm$ 0.011	0.948 $\pm$ 0.006
	1	0.996 $\pm$ 0.003	0.965 $\pm$ 0.005
	2	0.982 $\pm$ 0.006	0.963 $\pm$ 0.005
	3	0.980 $\pm$ 0.011	0.971 $\pm$ 0.002
	4	0.989 $\pm$ 0.006	0.967 $\pm$ 0.005
	5	0.988 $\pm$ 0.004	0.956 $\pm$ 0.002
	6	0.971 $\pm$ 0.000	0.961 $\pm$ 0.004
37	0	0.979 $\pm$ 0.011	0.989 $\pm$ 0.007
	1	0.996 $\pm$ 0.003	0.996 $\pm$ 0.004
	2	0.982 $\pm$ 0.006	0.982 $\pm$ 0.001
	3	0.980 $\pm$ 0.011	0.975 $\pm$ 0.010
	4	0.989 $\pm$ 0.006	0.971 $\pm$ 0.009
	5	0.988 $\pm$ 0.004	0.964 $\pm$ 0.001
	6	0.971 $\pm$ 0.000	0.967 $\pm$ 0.006
45	0	0.997 $\pm$ 0.002	0.964 $\pm$ 0.012
	1	0.998 $\pm$ 0.002	0.978 $\pm$ 0.003
	2	0.997 $\pm$ 0.002	0.963 $\pm$ 0.001
	3	0.990 $\pm$ 0.008	0.955 $\pm$ 0.002
	4	0.990 $\pm$ 0.008	0.966 $\pm$ 0.001
	5	0.990 $\pm$ 0.001	0.974 $\pm$ 0.004
	6	0.972 $\pm$ 0.001	0.973 $\pm$ 0.007

Çizelge 4.10.'da normal ve kepekli ekmeklerin su aktivitesi ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü üzere sıcaklık derecesi, ekmek tipi

($p<0.01$) ve muhafaza süresi ($p<0.05$) su aktivitesi değerini istatistiki olarak önemli düzeyde etkilerken, bunların ikili interaksiyonları su aktivitesi değerini etkilememiş ancak üçlü interaksiyonun etkisi istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur.

Çizelge 4.10. Normal ve kepekli ekmeklerin su aktivitesi ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	0.00114137	17.55 ^{**}
Ekmek Tipi (B)	1	0.01035651	159.22 ^{**}
Muhafaza Süresi (C)	6	0.00027692	4.26 [*]
A x B	3	0.00011568	1.78
A x C	18	0.00010657	1.64
B x C	6	0.00008345	1.28
A x B x C	18	0.00015617	2.40 ^{**}
Hata	54	0.00006504	

(^{**}) $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin su aktivitesi ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Normal ve kepekli ekmeklerin su aktivitesi ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

	37°C	4°C	45°C	25°C
Sıcaklık	0.987 ^a ±0.003 (N=28)	0.985 ^a ±0.002 (N=28)	0.979 ^b ±0.003 (N=28)	0.972 ^c ±0.003 (N=28)
Ekmek Tipi	Normal 0.990 ^a ±0.001 (N=56)	Kepekli 0.971 ^b ±0.002 (N=56)		
Süre	1 0.988 ^a ±0.003 (N=15)	2 0.983 ^{ab} ±0.004 (N=16)	4 0.982 ^{ab} ±0.003 (N=16)	3 0.980 ^{bc} ±0.004 (N=16)
	5 0.979 ^{bc} ±0.004 (N=16)	0 0.978 ^{bc} ±0.005 (N=16)	6 0.975 ^c ±0.003 (N=15)	

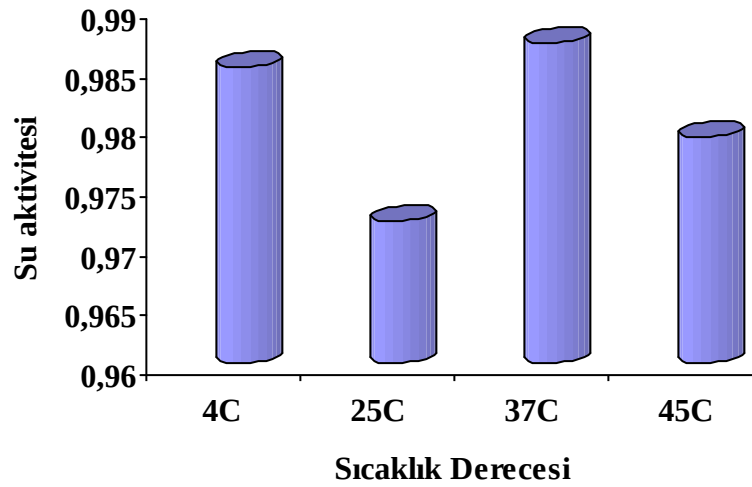
Değişik harfler, ortalamaların $p<0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.11. incelendiğinde sıcaklık dereceleri açısından istatistiki olarak farklılık ($p<0.05$) arz eden üç ayrı grup (4°C ve 37°C, 45°C, 25°C) oluştuğu, 4°C ve 37°C'nin su

aktivitesi değeri üzerine aynı etkiyi gösterdiği anlaşılmaktadır. Ayrıca su aktivitesi ortalamasının en yüksek olduğu sıcaklık derecelerinin 4°C ve 37°C, en düşük olduğu sıcaklık derecesinin ise 25°C olduğu görülmektedir. Şekil 4.6.'da sıcaklık derecesi ile su aktivitesi arasındaki ilişki görülmektedir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarından, farklı ekmek tiplerinin su aktivitesi ortalamalarının istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) düzeyde farklı olduğu ve normal ekmeğin su aktivitesi ortalamasının (0.990) kepekli ekmeğe ait ortalamadan (0.971) daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu durumun kepekli ekmeğin su bağlama kapasitesinin daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.11'deki Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları muhafaza süresinin ekmeklerin su aktivitesi ortalamasını etkilemediğini, istatistiki olarak günler arasında bir farklılık ($p<0.05$) olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.6. Normal ve kepekli ekmeklerin su aktivitesi değerinin sıcaklık etkisiyle değişimi

4.4. Normal ve Kepekli Ekmeklerdeki Tekstürel (Yapısal) Değişimlere Muhafaza Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi

4.4.1. Ekmeklerde sertlik ölçümüne ait sonuçlar

Farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen normal ve kepekli ekmeklerde yapılan ekmek içi sertlik ölçümüne ait sonuçlar Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı sertlik ölçüm sonuçları ($\bar{X} \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek (g)	Kepekli Ekmek (g)
4	0	451.990 $\pm$ 24.268	536.012 $\pm$ 43.564
	1	676.646 $\pm$ 4.942	588.956 $\pm$ 43.687
	2	738.626 $\pm$ 3.384	1065.068 $\pm$ 30.800
	3	773.726 $\pm$ 71.013	1006.357 $\pm$ 90.781
	4	723.556 $\pm$ 109.837	1018.693 $\pm$ 100.873
	5	880.273 $\pm$ 70.907	1193.180 $\pm$ 35.028
	6	920.134 $\pm$ 97.392	1020.808 $\pm$ 103.331
25	0	482.742 $\pm$ 48.550	444.906 $\pm$ 7.465
	1	523.230 $\pm$ 0.837	561.438 $\pm$ 15.436
	2	528.571 $\pm$ 70.925	502.534 $\pm$ 18.589
	3	471.645 $\pm$ 10.655	509.431 $\pm$ 42.820
	4	506.993 $\pm$ 9.493	501.488 $\pm$ 34.285
	5	399.121 $\pm$ 12.766	835.731 $\pm$ 9.764
	6	356.363 $\pm$ 31.125	815.163 $\pm$ 44.267
37	0	307.214 $\pm$ 12.872	488.743 $\pm$ 17.489
	1	409.171 $\pm$ 15.500	240.926 $\pm$ 38.834
	2	315.746 $\pm$ 5.950	199.208 $\pm$ 12.443
	3	291.199 $\pm$ 25.497	178.389 $\pm$ 2.640
	4	240.675 $\pm$ 7.359	167.765 $\pm$ 24.967
	5	210.457 $\pm$ 6.042	239.674 $\pm$ 9.777
	6	170.011 $\pm$ 0.983	199.007 $\pm$ 20.609
45	0	455.750 $\pm$ 30.786	424.950 $\pm$ 25.844
	1	474.376 $\pm$ 20.582	469.562 $\pm$ 21.112
	2	341.608 $\pm$ 3.957	546.322 $\pm$ 62.377
	3	339.552 $\pm$ 5.908	606.147 $\pm$ 57.463
	4	259.383 $\pm$ 1.057	669.813 $\pm$ 61.169
	5	295.112 $\pm$ 20.450	288.768 $\pm$ 24.382
	6	275.949 $\pm$ 30.796	420.381 $\pm$ 71.588

Tekstür Analiz cihazında sertlik, birinci sıkıştırma anında elde edilen maksimum kuvvet olarak belirlendiğinden, sertlik değeri de bir kuvvet birimi olan gram (g) cinsinden ölçülmüştür.

Normal ve kepekli ekmeklerde sertlik ölçümüne ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.13’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, normal ve kepekli ekmeklerin sertlik değeri sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresine istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) düzeyde bağlıdır. Ayrıca sıcaklık x ekmek tipi, sıcaklık x muhafaza süresi, ekmek tipi x muhafaza süresi ve sıcaklık x ekmek tipi x muhafaza süresi arasındaki interaksiyonların da sertlik değeri üzerinde önemli ($p<0.01$) etkisinin olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.13. Normal ve kepekli ekmeklerin sertlik ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	1602977.030	418.62 ^{**}
Ekmek Tipi (B)	1	301867.036	78.83 ^{**}
Muhafaza Süresi (C)	6	15213.003	3.97 ^{**}
A x B	3	61830.528	16.15 ^{**}
A x C	18	63055.323	16.47 ^{**}
B x C	6	30391.771	7.94 ^{**}
A x B x C	18	28094.603	7.34 ^{**}
Hata	56	3829.167	

(^{**}) $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin sertlik değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.14’de, muhafaza süresi boyunca ekmeklerin sertlik değerinde meydana gelen değişimin grafiği ise Şekil 4.7.’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. incelendiğinde normal ve kepekli ekmeklerin sertlik değeri ortalamalarının sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresinden önemli düzeyde ($p<0.05$) etkilendiği görülmektedir.

Ekmeklerde bayatlama hızının sıcaklıkla ters orantılı olduğu, dolayısıyla düşük sıcaklıklarda bayatlamanın daha hızlı olacağı ve bayatlama hızının maksimum olduğu sıcaklığın 4°C olduğu bilinmektedir. Ekmek bayatlaması da kabuğun yumuşaması ve

ekmek içinin sertleşmesi olarak karakterize edilir (Gray ve Bemiller 2003, Cauvain 2004). Bu tez çalışması sonuçları ile yukarıda verilen literatür birbirini destekler niteliktedir. Nitekim sertlik değerlerindeki artış eğiliminin 4°C’de muhafaza edilen ekmeklerde (828.14g) daha fazla olduğu ve bunu sırasıyla 25°C, 45°C ve 37°C’nin izlediği görülmektedir. Ekmeklerde bayatlamamanın 4°C’de daha hızlı olacağı göz önünde bulundurulduğunda bu sıcaklıkta bekletilen normal ve kepekli ekmeklerde muhafaza süresi boyunca sertlikte meydana gelen, yaklaşık, sırasıyla %49 ve %52’lik artışın normal olduğu düşünülmektedir. Patel vd (2005) de benzer olarak depolama süresince ekmek içi sertliğinin arttığını bulmuşlardır. Bu literatür sonucu, tez çalışmasında elde edilen bulgu ile uyum içindedir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma testi sonuçları kepekli ekmeklerin sertlik değeri ortalamasının (561.68g) normal ekmeğinkinden (457.85g) fazla olduğunu göstermektedir. Kepekli ekmeklerin su aktivitesi ortalamasının daha düşük olması (Bkz. Çizelge 4.11.) bu durumun nedenini kısmen açıklamaktadır. Ekmek içinin su bağlama özelliğinin düşük olması, ekmek içinde su kaybına bağlı olarak, ekmeğin daha sert bir hal almasına neden olmuştur. Nitekim Czuchajowska ve Pomeranz (1989) ekmek kabuğuna yakın kısımlarda su aktivitesi ve nem içeriğindeki değişimlerin ekmek bayatlaması dolayısıyla da sertleşmesini etkilediğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.14’e göre muhafaza süresi boyunca günler arasında, 0. gün dışında, ekmeklerin sertlik değeri ortalamaları açısından herhangi bir farklılık yoktur. 0. gün değerleri ise diğer günlere göre daha düşük bulunmuştur. Yani, istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.05$) farklıdır. Bu durum, taze ekmeklerin daha yumuşak olmasının doğal bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Ekmeklerde sertlik sıcaklığa bağlı olarak önemli ölçüde değişim göstermiştir. En sert ekmekler 4°C’de, en yumuşak ekmekler ise 37°C’de muhafaza edilen ekmekler olmuştur. 25 ve 45°C’de muhafaza edilen ekmekler 4°C’de muhafaza edilenden yumuşak, 37°C’de muhafaza edilenden ise sert bulunmuştur. Burada ilginç olan sonuç 37°C’de muhafaza edilen ekmeklerin 45°C’de muhafaza edilenden daha yumuşak olmasıdır. Aslında bu durum 37°C’nin ekmeklerin sünmesi için ideal sıcaklık olması

nedeniyle sünmesi sonucu sıvılaşmasından kaynaklanmaktadır. Gerçek bir yumuşaklık değildir.

Çizelge 4.14.’den kepekli ekmeklerin normal ekmeklere göre önemli ölçüde sert olduğu görülmektedir. Muhafaza süresine bağlı olarak ekmek sertliğinin 0., 1. ve 5. günler farklı olduğu, depolamayla sertliğin arttığı, sünmenin başlayıp geliştiği günler olan 2., 3., 4. ve 6. günler ise aynı düzeyde ve 1. gün ile 5. gün arasındaki değerlerde olduğu görülmektedir. Beşinci gün değerlerinin farklılığı, muhtemelen sıcaklık ve ekmek tipi ile ilgili verilerin de ortalamaya dahil edilmesinden doğan bir tesir karışmasına bağlanabilir.

Çizelge 4.14. Normal ve kepekli ekmeklerin sertlik değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

	4°C	25°C	45°C	37°C
Sıcaklık	828.14 ^a ±43.09 (N=28)	530.50 ^b ±25.94 (N=28)	419.12 ^c ±24.79 (N=28)	261.30 ^d ±17.78 (N=28)
Ekmek Tipi	Kepekli 561.68 ^a ±39.56 (N=56)	Normal 457.85 ^b ±27.34 (N=56)		
Süre	5 542.79 ^a ±90.33 (N=16)	2 528.17 ^{ab} ±66.68 (N=16)	6 522.23 ^{ab} ±84.13 (N=16)	3 522.06 ^{ab} ±66.56 (N=16)
	4 511.05 ^{ab} ±71.32 (N=16)	1 493.04 ^b ±32.25 (N=16)	0 449.04 ^c ±17.80 (N=16)	

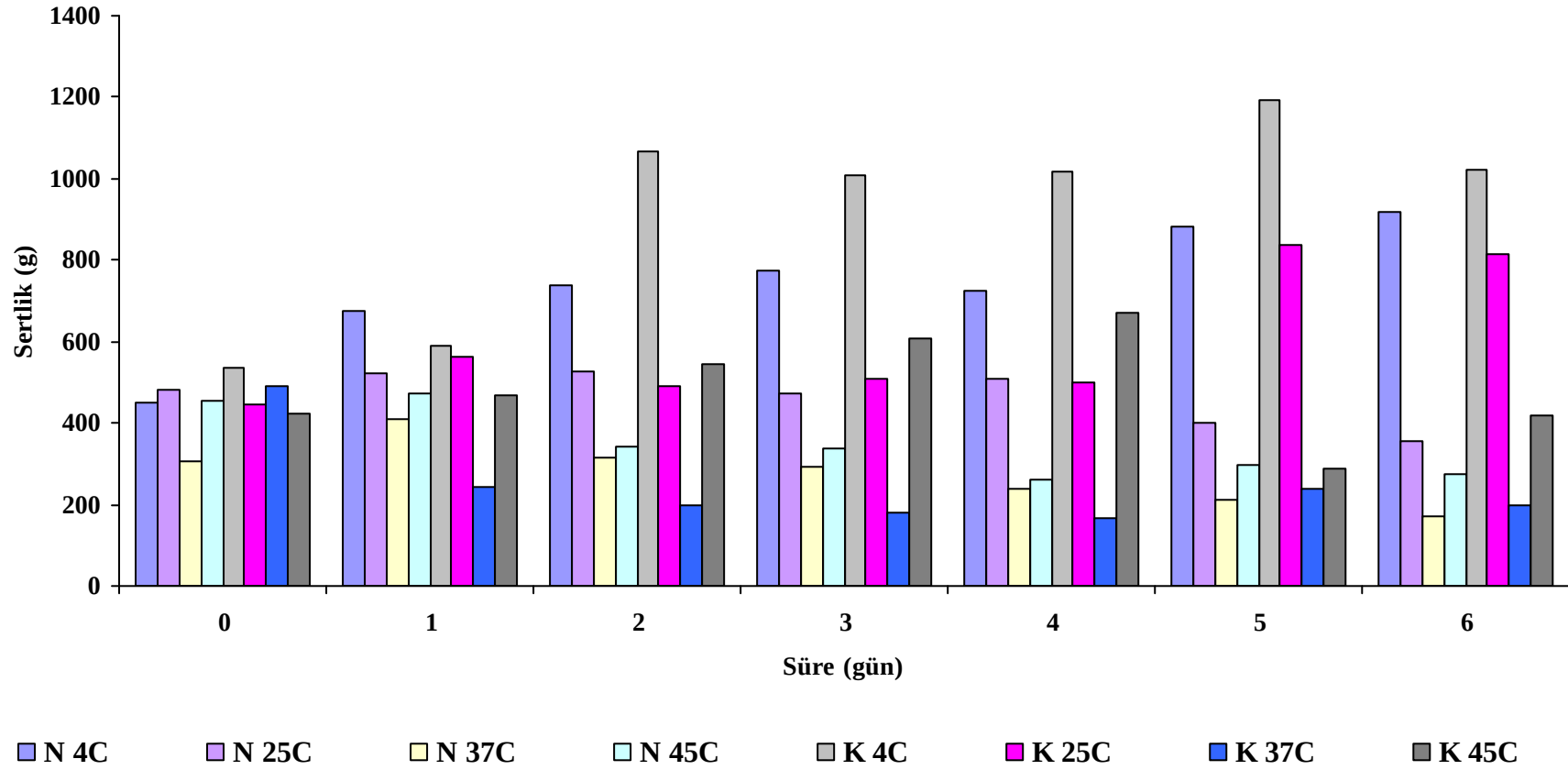
Değişik harfler, ortalamaların p<0.05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Aşağıdaki grafikten de (Şekil 4.7) anlaşılabacağı üzere 4°C’de muhafaza edilen ekmeklerde nişasta retrogradasyonunun fazlalığı ve bakteri faaliyetinin durması nedeniyle kepekli ekmekte daha fazla olmak üzere her iki ekmekte de ekmek içi sertliği artmıştır. 25°C’de muhafaza edilen kepekli ekmeklerde sıcaklığın bakteri gelişimi için optimum sıcaklığın altında kalması sonucu, ekmek içi sertleşmesi 5. güne kadar, 4°C’ye göre daha düşük düzeyde olacak şekilde artmış, 5. günden sonra ekmek içinin sünmesi ile birlikte düşmeye başlamıştır. Ancak normal ekmeklerde, daha farklı olarak, ilk gün gözlenen artıştan sonra muhafaza süresince ekmek içi sertliğinde bir azalma meydana

gelmiştir. Bu durum, normal ekmeklerin su aktivitesi değerinin daha yüksek olmasından veya zayıf bir olasılık da olsa deneysel bir hatadan kaynaklanmış olabilir.

Bacillus gelişiminin optimum olduğu 37°C’de, normal ve kepekli ekmeklerin ekmek içi sertliğindeki azalış eğiliminin, sünme ile birlikte ekmek içinde meydana gelen sıvılaşmanın bir sonucu olduğu düşünülebilir.

45°C’de muhafaza edilen kepekli ekmeklerde ekmek içi sertliğinde yüksek sıcaklık nedeniyle su kaybı sonucu başlangıçta bir artış gözlenmiş, 4. günden sonra sünmenin ilerlemesi sonucu belirgin şekilde azalma gerçekleşmiştir. Normal ekmeklerde ise ilk gün gözlenen hafif bir artıştan sonra, yine su aktivitesinin etkisiyle, düzenli bir azalış eğilimi gözlenmiştir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.7. Normal ve kepekli ekmeklerdeki sertlik değişimi

4.4.2. Ekmeklerde adezif yapışkanlık ölçümüne ait sonuçlar

Farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen normal ve kepekli ekmeklerin ekmek içinde ölçülen adezif yapışkanlık değerlerine ait bulgular Çizelge 4.15.'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı adezif yapışkanlık ölçüm sonuçları ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek	Kepekli Ekmek
4	0	-24.292 $\pm$ 11.550	-20.277 $\pm$ 1.886
	1	-34.536 $\pm$ 3.882	-31.256 $\pm$ 0.310
	2	-40.830 $\pm$ 7.365	-49.311 $\pm$ 0.960
	3	-44.269 $\pm$ 12.671	-58.583 $\pm$ 3.567
	4	-48.611 $\pm$ 5.812	-60.210 $\pm$ 7.193
	5	-52.805 $\pm$ 7.934	-64.857 $\pm$ 9.183
	6	-49.301 $\pm$ 1.619	-66.392 $\pm$ 9.517
25	0	-19.123 $\pm$ 0.580	-8.356 $\pm$ 3.408
	1	-27.194 $\pm$ 1.845	-25.207 $\pm$ 3.664
	2	-30.433 $\pm$ 7.645	-19.137 $\pm$ 1.996
	3	-28.377 $\pm$ 1.963	-19.685 $\pm$ 3.297
	4	-39.815 $\pm$ 2.253	-45.784 $\pm$ 14.956
	5	-37.361 $\pm$ 3.633	-54.035 $\pm$ 3.527
	6	-64.627 $\pm$ 8.864	-91.373 $\pm$ 36.890
37	0	-3.592 $\pm$ 0.180	-24.513 $\pm$ 1.006
	1	-18.228 $\pm$ 0.704	-105.792 $\pm$ 43.956
	2	-27.771 $\pm$ 2.641	-150.574 $\pm$ 5.371
	3	-46.373 $\pm$ 5.482	-167.960 $\pm$ 12.615
	4	-47.967 $\pm$ 1.865	-200.199 $\pm$ 38.040
	5	-51.086 $\pm$ 0.795	-205.777 $\pm$ 14.096
	6	-41.397 $\pm$ 5.797	-224.296 $\pm$ 7.981
45	0	-36.234 $\pm$ 3.343	-19.256 $\pm$ 0.144
	1	-56.510 $\pm$ 0.997	-22.101 $\pm$ 0.756
	2	-66.413 $\pm$ 0.543	-43.573 $\pm$ 13.087
	3	-105.339 $\pm$ 6.813	-45.368 $\pm$ 7.054
	4	-83.368 $\pm$ 24.362	-64.869 $\pm$ 10.134
	5	-52.289 $\pm$ 15.328	-77.735 $\pm$ 0.511
	6	-45.443 $\pm$ 2.204	-72.424 $\pm$ 8.959

Sonuçların negatif değerli olması, Tekstür Profil Analizi cihazında adezif yapışkanlığın, birinci sıkıştırmanın sonunda ölçülmesi nedeniyle grafiğin, eksenin alt tarafında kalmasından kaynaklanmaktadır. Bir başka ifade ile ekmeklerin yapışkanlıkları artmakta, bunun sonucu olarak da ilk sıkıştırma kuvveti ile probun geri

çekilmesi sırasında ekmek içi tarafından uygulanan tutulma kuvveti arasında negatif bir fark oluşmaktadır.

Normal koşullarda adezif yapışkanlık ölçümünün, ekmek için uygun olmadığı bildirilmektedir (Anonymous 2001). Ancak sünme gelişimi ile birlikte ekmek içi yapısında meydana gelen değişim, bu parametrenin de ölçülebilir hale gelmesini sağlamaktadır. Bakteri tarafından hidrolize uğratan ekmek içinde viskoz ve yapışkan bir yapı oluşmakta, bu yapı sayesinde de bu parametre sünmüş ekmekte ölçülebilir hale gelmektedir.

Normal ve kepekli ekmeklerde adezif yapışkanlık ölçümüne ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.16.'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre, normal ve kepekli ekmeklerin adezif yapışkanlık değeri üzerine sıcaklık, ekmek tipi ve muhafaza süresi ile bunlar arasındaki tüm interaksiyonların istatistiki olarak önemli etkisinin ($p<0.01$) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.16. Normal ve kepekli ekmeklerin adezif yapışkanlık ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	17739.95717	64.43**
Ekmek Tipi (B)	1	23740.80806	86.23**
Muhafaza Süresi (C)	6	7900.70361	28.70**
A x B	3	26545.18067	96.41**
A x C	18	1140.58378	4.14**
B x C	6	2178.94750	7.91**
A x B x C	18	645.05456	2.34**
Hata	56	275.3238	

(**) $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin adezif yapışkanlık ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.17.'de verilmiştir. Varyasyon kaynakları olan sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresinin ekmeklerin adezif yapışkanlık değerini önemli düzeyde ($p<0.05$) etkilediği çizelgeden görülmektedir.

Adezif yapışkanlık değeri ortalaması üzerine sıcaklık derecesinin etkisi incelendiğinde tüm sıcaklık derecelerinin etkilerinin birbirinden önemli düzeyde ($p<0.05$) farklı ve 37°C’de muhafaza edilen ekmeklerde ortalama değerin (93.966) en yüksek olduğu görülmektedir. 37°C için saptanan ortalama değer diğer sıcaklıklarda elde edilenlerin yaklaşık 2-3 katı kadardır. Bu da yine 37°C’nin bakterinin optimum sıcaklık derecesi olması nedeniyle kepekli ekmekte daha fazla olmak üzere ekmek içindeki sivilaşmanın dolayısıyla da yapışkanlığın daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır. 4°C ve 25°C’de elde edilen ortalama değerlerin düşüklüğü de bakteriyel faaliyetin daha az olmasının doğal bir sonucudur. 45°C’de ise 4°C ve 25°C’ye göre daha yüksek olmakla birlikte bakterinin optimum çalışma sıcaklığından, bir başka ifade ile optimum enzimatik hidroliz koşullarından uzaklaşıldığı için 37°C’dekine göre oldukça düşük bir değer elde edilmiştir.

Çizelge 4.17. ekmek tipinin adezif yapışkanlık üzerine etkisi bakımından incelendiğinde kepekli ekmekte meydana gelen yapışkanlığın (72.828) normal ekmektekinin (43.699) neredeyse 2 katı kadar olduğu görülmektedir. Bu durum kepekli ekmeğin *Bacillus* yüküne ait ortalamanın normal ekmektekinden daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Bkz. Çizelge 4.8.). Bakteri yükünün daha fazla olması nedeniyle ekmek içinde meydana gelen mikrobiyal aktivitenin doğal sonucu olarak, yapışkanlık da daha fazla olmaktadır.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre muhafaza süresi boyunca adezif yapışkanlık değerinin günlere göre düzenli bir artış eğiliminde olduğu görülmektedir. Ancak 2, 3, 4, 5 ve 6. günler arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz seviyededir. Dolayısıyla muhafaza süresi açısından adezif yapışkanlık değeri için 0, 1 ve 2-3-4-5-6. günler olmak üzere üç farklı grup oluşmuştur.

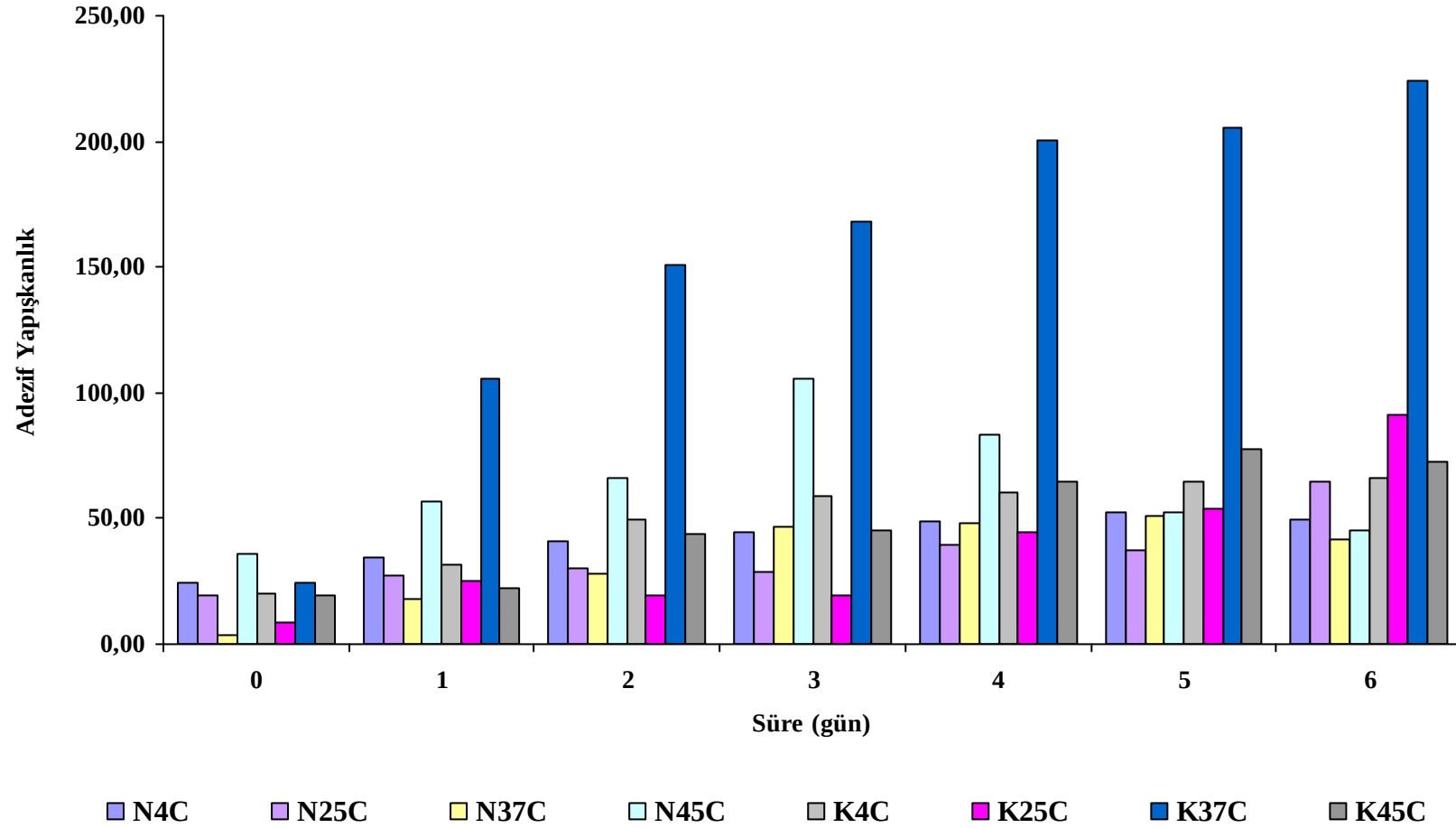
Muhafaza süresi (81.906) ve ekmek tipine (72.818) oranla, adezif yapışkanlık değerinde sıcaklığın (93.966) meydana getirdiği artışın daha fazla olması, bakterinin enzimatik faaliyetinin bir göstergesi olarak kabul edilebilecek adezif yapışkanlık değerinin sıcaklığa bağımlılığının daha fazla olduğunun bir kanıtı olarak kabul edilebilir.

Çizelge 4.17. Normal ve kepekli ekmeklerin adezif yapışkanlık ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

	37°C	45°C	4°C	25°C
Sıcaklık	93.966 ^a ±15.05 (N=28)	56.494 ^b ± 4.794 (N=28)	46.109 ^c ±3.010 (N=28)	36.465 ^d ±4.601 (N=28)
Ekmek Tipi	Kepekli 72.818 ^a ±8.362 (N=56)	Normal 43.699 ^b ±2.879 (N=56)		
Süre	6 81.906 ^a ±14.92 (N=16)	5 74.493 ^{ab} ±13.31 (N=16)	4 73.853 ^{ab} ±13.55 (N=16)	3 64.494 ^{bc} ±12.01 (N=16)
	2 53.505 ^c ±10.23 (N=16)	1 40.103 ^d ± 8.09 (N=16)	0 19.455 ^e ± 2.69 (N=16)	

Değişik harfler, ortalamaların p<0.05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Şekil 4.8.'de muhafaza süresi boyunca ekmeklerin adezif yapışkanlık değerinde meydana gelen değişimin grafiği verilmiştir. Grafiğin, *Bacillus yükü* doğrultusunda şekillendiği (Bkz. Çizelge 4.6. ve Şekil 4.5.) ve genellikle artış eğiliminde olduğu görülmektedir. *Bacillus* türlerinin amilaz ve proteaz salgılayarak ekmek içini sıvılaştırma eğiliminin bir sonucu olan bu artışın 37°C'de bekletilen kepekli ekmeklerde çok daha fazla olması, bakterinin gelişmesi için en uygun sıcaklık derecesinin 37°C olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. 37°C'de muhafaza edilmiş normal ekmekler için de adezif yapışkanlık değerinde bir artış söz konusudur. Ancak bu artış eğiliminin daha düşük olması, bakterinin gelişmesi için kepekli ekmeğin daha uygun bir besi ortamı olduğunun kanıtı olarak düşünülebilir. 4°C'de muhafaza edilmiş her iki ekmek tipi için de adezif yapışkanlıkta artış gerçekleşmiştir. Fakat bu artış, ekmekte gözle görülür bir yapışkanlığa neden olacak boyutta değildir. 25°C'de muhafaza edilmiş normal ekmeklerde 6. günde ani bir artış gözlenirken, kepekli ekmeklerde bu ani artış 4. günde başlamış, 6. günde ise 5. gün elde edilen değer yaklaşık 2 katı kadar seviyeye ulaşmıştır. Bu durum da yine sünmenin gelişimi ile ilişkilendirilebilir. Adezif yapışkanlık değeri açısından 45°C'de muhafaza edilmiş normal ekmeklerde bir çan eğrisinin olduğu Şekil 4.8.'den görülmektedir. Bu oluşumun muhtemel nedeni, bakterinin 45°C'de enzim faaliyetinin zamanla artıp 3. günde optimuma ulaşması ve bundan sonra da tekrar azalması olabilir. Aynı durumun kepekli ekmekte gözlenmemesi substrat konsantrasyonunun sınırlayıcı etkisinden kaynaklanabilir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.8. Normal ve kepekli ekmeklerde adezif yapışkanlıktaki değişim

4.4.3. Ekmeklerde kohezif yapışkanlık ölçümüne ait sonuçlar

Farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen normal ve kepekli ekmeklerin içinde ölçülen kohezif yapışkanlık değerleri bulguları Çizelge 4.18.'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı kohezif yapışkanlık ölçüm sonuçları ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek	Kepekli Ekmek
4	0	0.562 ± 0.002	0.562 ± 0.011
	1	0.342 ± 0.007	0.359 ± 0.002
	2	0.317 ± 0.003	0.308 ± 0.011
	3	0.309 ± 0.032	0.316 ± 0.009
	4	0.283 ± 0.014	0.288 ± 0.005
	5	0.275 ± 0.009	0.283 ± 0.001
	6	0.257 ± 0.001	0.266 ± 0.000
25	0	0.542 ± 0.007	0.622 ± 0.031
	1	0.414 ± 0.018	0.469 ± 0.002
	2	0.390 ± 0.016	0.410 ± 0.012
	3	0.340 ± 0.007	0.389 ± 0.009
	4	0.319 ± 0.004	0.375 ± 0.004
	5	0.305 ± 0.011	0.318 ± 0.005
	6	0.299 ± 0.036	0.345 ± 0.015
37	0	0.665 ± 0.023	0.529 ± 0.004
	1	0.530 ± 0.037	0.463 ± 0.030
	2	0.461 ± 0.012	0.477 ± 0.000
	3	0.424 ± 0.007	0.499 ± 0.015
	4	0.429 ± 0.024	0.597 ± 0.000
	5	0.423 ± 0.044	0.601 ± 0.072
	6	0.401 ± 0.022	0.582 ± 0.014
45	0	0.463 ± 0.008	0.571 ± 0.027
	1	0.447 ± 0.021	0.523 ± 0.011
	2	0.461 ± 0.011	0.534 ± 0.019
	3	0.473 ± 0.026	0.479 ± 0.019
	4	0.460 ± 0.003	0.466 ± 0.047
	5	0.447 ± 0.013	0.403 ± 0.007
	6	0.433 ± 0.003	0.399 ± 0.028

Kohezif yapışkanlık, tekstür analiz cihazında ikinci sıkıştırma anında elde edilen pozitif kuvvet alanının, birinci sıkıştırmada elde edilen pozitif kuvvet alanına oranlanması ile elde

edilen bir değer olması nedeniyle birimsizdir. Duyusal anlamda ürünün deformasyon miktarı, fiziksel anlamda ise iç bağların kuvveti hakkında bilgi verir (Szczesniak 1998).

Normal ve kepekli ekmeklerde kohezif yapışkanlık ölçümüne ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.19.'da verilmiştir. Sonuçlar, normal ve kepekli ekmeklerin kohezif yapışkanlık değeri üzerine sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresinin istatistiki olarak önemli düzeyde ($p<0.01$) etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca sıcaklık x ekmek tipi, sıcaklık x muhafaza süresi ve sıcaklık x ekmek tipi x muhafaza süresi arasındaki interaksiyonların ekmeklerin kohezif yapışkanlık değeri üzerine önemli etkisinin ($p<0.01$) olduğu saptanırken, ekmek tipi x muhafaza süresi arasındaki interaksiyonun bu değerin değişimi üzerine istatistiki olarak önemli düzeyde etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Normal ve kepekli ekmeklerin kohezif yapışkanlık ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	0.15784482	193.59 ^{**}
Ekmek Tipi (B)	1	0.03308594	40.58 ^{**}
Muhafaza Süresi (C)	6	0.06757318	82.88 ^{**}
A x B	3	0.00384322	4.71 ^{**}
A x C	18	0.00783101	9.60 ^{**}
B x C	6	0.00108354	1.33
A x B x C	18	0.00637852	7.82 ^{**}
Hata	56	0.00081535	

(^{**}) $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin kohezif yapışkanlık değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.20.'de verilmiştir.

Ekmeklerin kohezif yapışkanlık değeri üzerine denemede uygulanan farklı sıcaklık derecelerinin $p<0.05$ seviyesinde farklı etkiler gösterdiği, dolayısıyla sıcaklık dereceleri arasında istatistiki olarak önemli düzeyde farklılık olduğu Çizelge 4.20.'de görülmektedir. 37°C dışında, sıcaklık derecesi arttıkça kohezif yapışkanlık değerine ait ortalamanın da arttığı

anlaşılmaktadır. En yüksek ortalamanın 37°C’de muhafaza edilmiş ekmeklere ait olması ise yine bu sıcaklığın, bakterinin optimum gelişme sıcaklığı olmasından kaynaklanmaktadır.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre kepekli ekmeğin kohezif yapışkanlık değerine ait ortalamanın daha yüksek olması, muhafaza boyunca bu tip ekmeklerde meydana gelen deformasyonun çok daha fazla olduğunun bir kanıtı olmaktadır. Dolayısıyla sünme hastalığının gelişimi ile birlikte kepekli ekmeklerin iç bağ kuvvetinin normal ekmeklere göre daha fazla zayıfladığı söylenebilir.

Çizelge 4.20.’ye göre; kohezif yapışkanlık değeri açısından 0. ve 1. günler arasında $p < 0.05$ önem seviyesinde farklılık varken; 2., 3. ve 4. günler istatistiki olarak 0. ve 1. günden farklı olmakla birlikte kendi aralarında fark içermemektedirler. Yine aynı şekilde kohezif yapışkanlık değeri açısından 5. ve 6. günler istatistiki olarak diğer günlere göre farklı, ancak kendi aralarında aynı etkiyi göstermektedirler. Carr ve Tadini (2003) maya ve bitkisel yağ ilave edilmiş ekmeklerin, Carr ve Tadini (2006) depolama süresince kısmi pişmiş dondurulmuş ekmeklerin, Wang vd (2002) farklı tipte lif ilave edilmiş ekmeklerin kohezif yapışkanlık değerindeki değişimin istatistiki olarak önemsiz olduğunu belirlemişlerdir.

Çizelge 4.20. Normal ve kepekli ekmeklerin kohezif yapışkanlık ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Sıcaklık	37°C	45°C	25°C	4°C
	$0.506^a \pm 0.016$ (N=28)	$0.468^b \pm 0.010$ (N=28)	$0.395^c \pm 0.018$ (N=28)	$0.337^d \pm 0.019$ (N=28)
Ekmek Tipi	Kepekli	Normal		
	$0.444^a \pm 0.015$ (N=56)	$0.409^b \pm 0.013$ (N=56)		
Süre	0	1	2	3
	$0.564^a \pm 0.015$ (N=16)	$0.443^b \pm 0.017$ (N=16)	$0.420^c \pm 0.019$ (N=16)	$0.404^c \pm 0.019$ (N=16)
	4	5	6	
	$0.402^c \pm 0.026$ (N=16)	$0.382^d \pm 0.028$ (N=16)	$0.373^d \pm 0.026$ (N=16)	

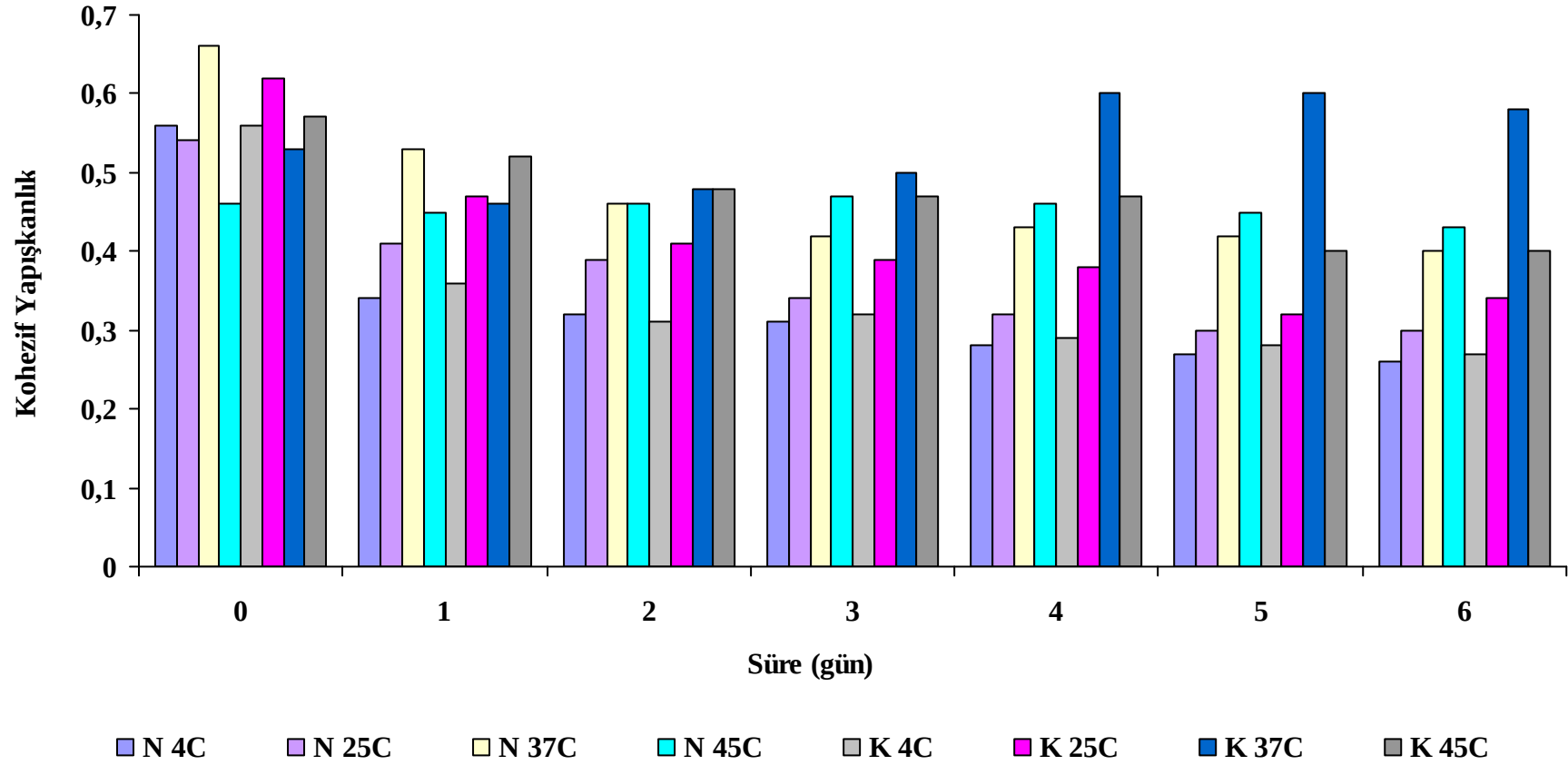
Değişik harfler, ortalamaların $p < 0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Bu bağlamda, Çizelge 4.18. ve muhafaza süresi boyunca ekmeklerin kohezif yapışkanlık değerinde meydana gelen değişimin grafiğinin gösterildiği Şekil 4.9. incelendiğinde 4°C’de muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait kohezif yapışkanlık değerleri sonuçlarının birbirine çok yakın olduğu, sürekli bir azalış gerçekleştiği ancak bu azalışın yalnızca 1. günde belirgin olduğu görülmektedir. Bu azalış, 4°C’de mikroorganizma gelişmesinin olmaması nedeniyle ekmeklerde sünme olmaması, bilakis bayatlama sonucu ekmek içinin kuru kırılğan bir yapı almasından kaynaklanmaktadır.

25°C’de muhafaza edilmiş ekmeklere ait sonuçlara bakıldığında (Şekil 4.9.), 4°C’de elde edilmiş grafikler ile benzer eğilim gösterdiği ancak değerlerin biraz daha yüksek olduğu göze çarpmaktadır. 25°C’de ekmek içi muhafaza sıcaklığı bakteri optimum gelişme sıcaklığından uzak olduğu için sünme geç gelişmekte, bu arada ekmek içi bayatlama nedeniyle kısmen kuru ve kırılğan bir yapı kazanmakta, dolayısıyla yapışkanlık değeri azalmaktadır. 4°C’de elde edilen grafiklere göre tek farklılık kepekli ekmeklerde 6. günde bir artış gözlenmiş olmasıdır. Bu durum da kepekli ekmeklerdeki sünmenin 6. günde artık belirginleşmesi ile birlikte ekmek içi bağlarında meydana gelen zayıflamadan kaynaklanmaktadır.

Şekil 4.9.’da 45°C’de muhafaza edilmiş ekmeklere ait grafiklerin 4°C ve 25°C’deki grafiklere göre biraz daha farklı olduğu görülmektedir. İlk gün gerçekleşen azalıştan sonra hafif bir artış gözlenmiş, bu artış 3. günde de devam etmiş, bundan sonra ise çok az olmakla birlikte sürekli bir azalış gerçekleşmiştir. Her iki ekmek tipi için de durum, aynı şekilde seyretmiştir. 45°C’de ise ekmek içi hızlı sündüğü halde yüksek sıcaklık nedeniyle kohezif yapışkanlık pek bir artış gösteremeyip, çok az düşmektedir. Bu durum sıcaklığın viskozite üzerindeki düşürücü etkisi, ekmek içinin yüksek sıcaklık nedeniyle daha yumuşak kalması, sünme sonucu oluşan ipliksi yapının daha bir akışkanlık kazanmasına dayandırılabilir.

37°C’de muhafaza edilen kepekli ekmeklerde kohezif yapışkanlığın artış eğiliminde olduğu Şekil 4.9.’da görülmektedir. Bu da 37°C’de sünmenin optimum gelişmesiyle birlikte nişasta ve proteinlerin parçalanması nedeniyle iç bağların kuvvetinin azaldığını dolayısıyla kohezif yapışkanlık değerinin arttığını göstermektedir. Normal ekmeklerde bu değer azalması ise sünme etkisi ile bayatlama etkisinin rekabetine dayandırılabilir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.9. Normal ve kepekli ekmeklerde kohezif yapışkanlıktaki değişim

4.4.4. Ekmeklerde elastikiyet ölçümüne ait sonuçlar

Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı elastikiyet ölçüm sonuçları Çizelge 4.21.'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı elastikiyet ölçüm sonuçları ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek	Kepekli Ekmek
4	0	0.806 $\pm$ 0.021	0.763 $\pm$ 0.002
	1	0.953 $\pm$ 0.002	0.845 $\pm$ 0.008
	2	0.935 $\pm$ 0.029	0.956 $\pm$ 0.019
	3	0.928 $\pm$ 0.017	0.917 $\pm$ 0.022
	4	0.965 $\pm$ 0.014	0.972 $\pm$ 0.031
	5	1.091 $\pm$ 0.107	0.950 $\pm$ 0.009
	6	0.964 $\pm$ 0.020	0.951 $\pm$ 0.002
25	0	0.942 $\pm$ 0.002	0.899 $\pm$ 0.006
	1	1.076 $\pm$ 0.045	0.924 $\pm$ 0.021
	2	1.124 $\pm$ 0.187	0.887 $\pm$ 0.053
	3	0.938 $\pm$ 0.003	0.874 $\pm$ 0.056
	4	0.951 $\pm$ 0.015	0.798 $\pm$ 0.041
	5	0.962 $\pm$ 0.036	0.911 $\pm$ 0.022
	6	0.884 $\pm$ 0.082	0.814 $\pm$ 0.024
37	0	0.909 $\pm$ 0.007	0.735 $\pm$ 0.008
	1	0.886 $\pm$ 0.029	0.849 $\pm$ 0.020
	2	0.847 $\pm$ 0.036	0.915 $\pm$ 0.053
	3	0.946 $\pm$ 0.018	0.941 $\pm$ 0.007
	4	0.934 $\pm$ 0.003	0.969 $\pm$ 0.012
	5	0.924 $\pm$ 0.008	1.044 $\pm$ 0.112
	6	0.927 $\pm$ 0.036	0.981 $\pm$ 0.012
45	0	0.700 $\pm$ 0.028	0.761 $\pm$ 0.020
	1	0.758 $\pm$ 0.020	0.832 $\pm$ 0.032
	2	0.862 $\pm$ 0.003	0.867 $\pm$ 0.049
	3	0.801 $\pm$ 0.018	0.876 $\pm$ 0.020
	4	0.876 $\pm$ 0.033	0.929 $\pm$ 0.032
	5	0.890 $\pm$ 0.014	0.816 $\pm$ 0.022
	6	0.865 $\pm$ 0.031	0.859 $\pm$ 0.067

Normal ve kepekli ekmeklerde elastikiyet ölçümüne ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.22.'de verilmiştir. Ekmeklerin elastikiyet değeri üzerine etkisi bakımından sıcaklık ve muhafaza süresinin %1, ekmek tipinin ise %5 önem seviyesinde istatistiki olarak önemli olduğu görülmektedir. Bununla birlikte sıcaklık x ekmek tipi ve sıcaklık x

muhafaza süresi arasındaki interaksiyon istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) bulunurken, ekmek tipi x muhafaza süresi arasındaki interaksiyon ile varyasyon kaynakları arasındaki üçlü interaksiyonun ekmeklerin elastikiyet değeri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.22. Normal ve kepekli ekmeklerin elastikiyet ölçümlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	0.05568032	15.00**
Ekmek Tipi (B)	1	0.02351901	6.34*
Muhafaza Süresi (C)	6	0.02925812	7.88**
A x B	3	0.02626201	7.07**
A x C	18	0.01095096	2.95**
B x C	6	0.00175670	0.47
A x B x C	18	0.00641956	1.73
Hata	56	0.00371249	

(*) $P<0.05$ seviyesinde, (**) $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin elastikiyet ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.23.'de, muhafaza süresi boyunca ekmeklerin elastikiyet değerinde meydana gelen değişimin grafiği Şekil 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.23.'e göre sıcaklık derecesi arttıkça ekmeklerin elastikiyet değeri ortalamaları azalmaktadır. Ancak sonuçlar istatistiki olarak incelendiğinde, $p<0.05$ önem seviyesinde 4°C, 25°C ve 37°C'de muhafaza edilmiş ekmeklere ait elastikiyet ölçümleri arasında hiçbir farklılık olmadığı anlaşılmaktadır. Bu üç sıcaklık derecesi, elastikiyet üzerine aynı etkiyi göstermiştir. 45°C'de muhafaza edilmiş ekmeklerde ise elastikiyet değeri ortalamasının daha düşük olduğu görülmektedir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları, ekmek tipleri arasında elastikiyet değeri açısından istatistiki olarak $p<0.05$ önem seviyesinde farklılık olduğunu ve normal ekmekteki elastikiyet ölçümüne ait ortalamanın (0.916) kepekli ekmekteki (0.887) göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Elastikiyet, ürünün ilk sıkıştırma esnasında deforme olduktan sonra geri dönüşünün ne kadar iyi olduğuyla ilgili bir değerdir. dolayısı ile ürünün eski halini alma yeteneği hakkında bilgi verir. Bu durumda sünme

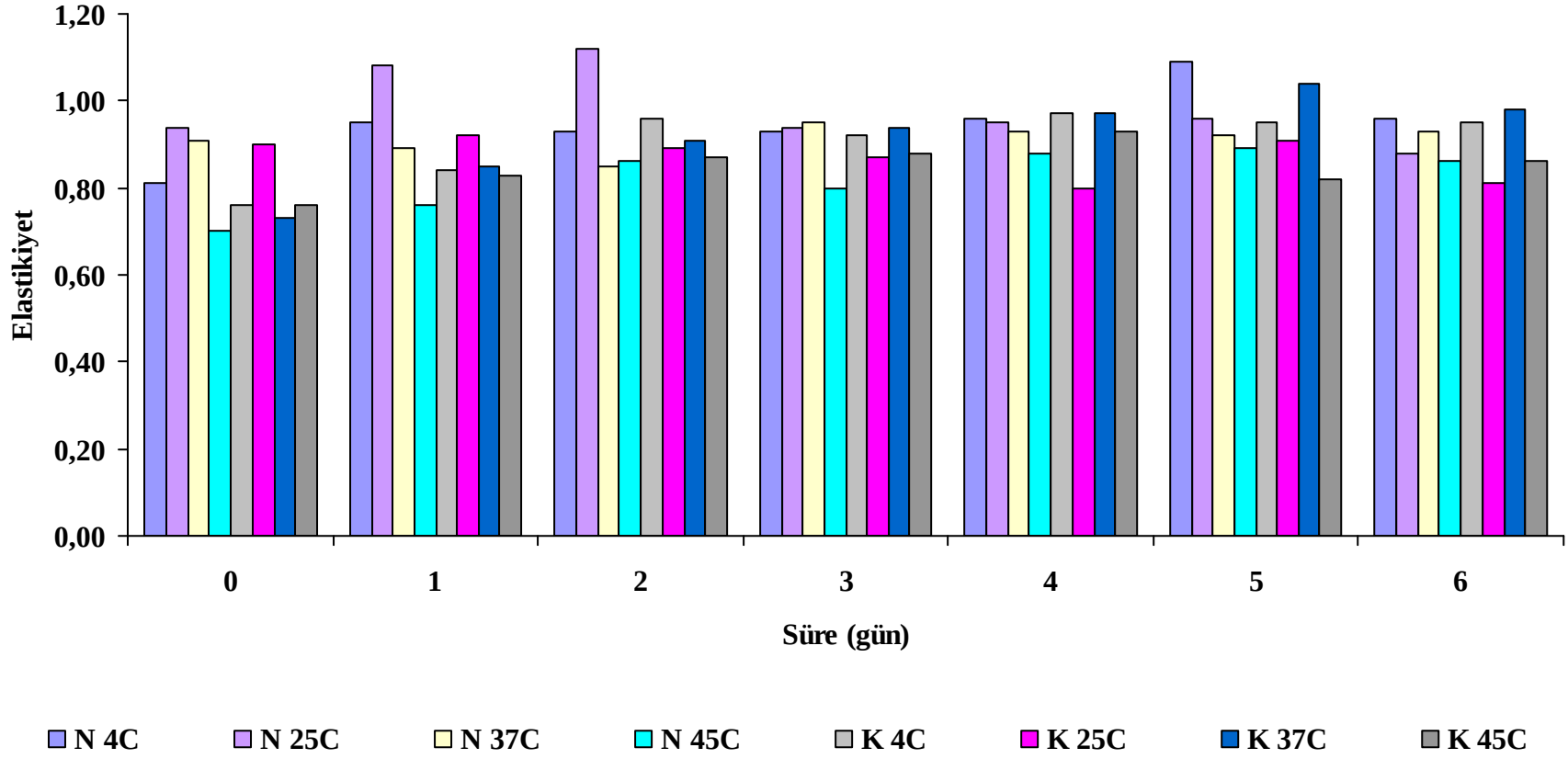
ile birlikte normal ekmeğin kepekli ekmeğe göre elastikiyetini daha iyi koruduğundan söz edilebilir. Ayrıca Wang vd (2002) farklı tipte lif katkılamanın ekmeklerin elastikiyet değerini azalttığını saptamışlardır. Shah vd (2006) de ekmek hamurlarını ksilanazla katkılamanın elastikiyet değerini etkilemediğini belirlemiş, kontrol örneklerinde elastikiyet değerini 0.84, ksilanazlı ekmeklerde ise 0.79 olduğunu bulmuşlardır.

Çizelge 4.23.'de muhafaza süresi dikkate alındığında, ekmeklerin elastikiyet ölçümü ortalamaları açısından iki farklı grup oluştuğu gözlenmiştir. 1, 2, 3, 4, 5 ve 6. günler arasında istatistiki olarak herhangi bir farklılığın olmadığı, 0. gün değerinin ise bunlardan farklı ($p<0.05$) ve daha düşük olduğu anlaşılmaktadır. 1-6. günler arasında elastikiyet değeri açısından istatistiki olarak bir farklılık olmasa da bu günler arasındaki değişimin belirli bir düzen içinde olmaması her gün yeni bir ekmeğin analize alınmasından kaynaklanmaktadır. Günler arasında istatistiki olarak farklılık olmadığı Şekil 4.10.'da da görülmektedir. Carr vd (2006) kısmi pişmiş dondurulmuş ekmeklerin elastikiyet değerinin 7 günlük depolama süresi boyunca istatistiki olarak değişmediğini saptarken, kısmi pişmiş ekmekleri 9 aya kadar depolayan Vuluçevic vd (2004) ise 4 hafta depolama sonunda elastikiyeti, önemli ölçüde bozulan bir parametre olarak belirlemişlerdir. Carr ve Tadini (2003) maya ve bitkisel yağların kısmi pişmiş dondurulmuş ekmeklerin fiziksel ve tekstürel özellikleri üzerindeki etkisini belirledikleri çalışmada, farklı miktarlarda maya ve bitkisel yağ ilavesinin elastikiyet değerini önemli düzeyde etkilemediğini belirlemişlerdir.

Çizelge 4.23. Normal ve kepekli ekmeklerin elastikiyet ölçümü ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

	4°C	25°C	37°C	45°C
Sıcaklık	0.928 ^a ± 0.016 (N=28)	0.927 ^a ± 0.020 (N=28)	0.915 ^a ± 0.015 (N=28)	0.835 ^b ± 0.013 (N=28)
Ekmek Tipi	Normal 0.916 ^a ± 0.014 (N=56)	Kepekli 0.887 ^b ± 0.011 (N=56)		
Süre	5 0.948 ^a ± 0.026 (N=16)	4 0.924 ^{ab} ± 0.016 (N=16)	2 0.924 ^{ab} ± 0.029 (N=16)	6 0.905 ^{ab} ± 0.018 (N=16)
	3 0.902 ^{ab} ± 0.014 (N=16)	1 0.890 ^b ± 0.024 (N=16)	0 0.814 ^c ± 0.022 (N=16)	

Değişik harfler, ortalamaların $p<0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.10. Normal ve kepekli ekmeklerdeki elastikiyet ölçüm sonuçları

4.4.5. Ekmeklerde zamksılık analizine ait sonuçlar

Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı zamksılık analizi sonuçları Çizelge 4.24.'de verilmiştir.

Çizelge 4.24. Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı zamksılık analizi sonuçları ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek	Kepekli Ekmek
4	0	254.869 $\pm$ 12.350	301.067 $\pm$ 29.953
	1	231.082 $\pm$ 3.693	211.431 $\pm$ 15.055
	2	234.343 $\pm$ 3.680	331.720 $\pm$ 18.691
	3	241.739 $\pm$ 46.601	320.383 $\pm$ 37.318
	4	205.731 $\pm$ 40.136	294.359 $\pm$ 33.025
	5	242.443 $\pm$ 28.134	339.003 $\pm$ 10.911
	6	237.035 $\pm$ 24.163	273.016 $\pm$ 26.210
25	0	263.567 $\pm$ 30.650	276.264 $\pm$ 9.155
	1	217.531 $\pm$ 9.600	263.733 $\pm$ 10.987
	2	205.482 $\pm$ 19.554	201.082 $\pm$ 7.161
	3	161.164 $\pm$ 0.112	198.685 $\pm$ 20.899
	4	162.306 $\pm$ 0.616	189.014 $\pm$ 16.304
	5	122.044 $\pm$ 7.442	266.283 $\pm$ 6.944
	6	117.273 $\pm$ 14.423	281.703 $\pm$ 28.003
37	0	204.859 $\pm$ 15.510	258.706 $\pm$ 7.810
	1	218.040 $\pm$ 22.930	112.377 $\pm$ 25.265
	2	145.632 $\pm$ 1.331	94.800 $\pm$ 5.503
	3	123.114 $\pm$ 13.899	87.798 $\pm$ 5.703
	4	103.900 $\pm$ 2.167	100.243 $\pm$ 14.778
	5	88.590 $\pm$ 7.417	137.724 $\pm$ 3.964
	6	71.647 $\pm$ 2.303	116.575 $\pm$ 9.400
45	0	210.246 $\pm$ 10.094	242.716 $\pm$ 26.035
	1	213.917 $\pm$ 18.593	245.645 $\pm$ 15.361
	2	157.307 $\pm$ 6.042	292.638 $\pm$ 43.654
	3	159.264 $\pm$ 4.835	289.286 $\pm$ 16.454
	4	119.499 $\pm$ 1.702	310.030 $\pm$ 3.519
	5	129.326 $\pm$ 3.517	116.360 $\pm$ 9.460
	6	122.705 $\pm$ 14.787	164.735 $\pm$ 17.820

Zamksılık fiziksel anlamda yarı katı bir gıda maddesini yutmaya hazır hale getirmek amacıyla parçalamak için gerekli enerji, duyuusal anlamda ise yarı katı gıdanın çiğnenmeye karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanır (Szczeniak 1998).

Ekmekte tekstür ölçümü ile ilgili yapılmış çalışmalarda zamksılık analizine rastlanmamıştır. Bunun nedeni, sertlik x kohezif yapışkanlık olarak hesaplanan zamksılık değerinin, yalnızca yarı katı gıdalara uygulanabilir olmasıdır (Szczeniak 1998, Anonymous 2007). Ancak muhafaza süresi boyunca *Bacillus* faaliyeti nedeniyle sünmüş olan ekmeklerde, tekstür ölçümünde kullanılabilecek bir parametre olarak düşünülmüştür. Bu durumda 4°C’de muhafaza edilmiş olan ekmeklerde zamksılık ölçüm sonuçları çok anlamlı değildir. Çünkü bu sıcaklıkta, ekmeklerde sünme gerçekleşmediği için ekmek içinde bir sıvılaşma söz konusu olmamaktadır.

Normal ve kepekli ekmeklerde zamksılık değerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.25’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde ekmeklerin zamksılık değeri üzerine her üç temel varyasyon kaynağının yanı sıra bunların aralarındaki interaksiyonların da istatistiki olarak önemli düzeyde ($p<0.01$) etkisi olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.25. Normal ve kepekli ekmeklerin zamksılık değerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	82577.7730	116.01 ^{**}
Ekmek Tipi (B)	1	65351.7100	91.81 ^{**}
Muhafaza Süresi (C)	6	11286.6664	15.86 ^{**}
A x B	3	9932.4216	13.95 ^{**}
A x C	18	4538.5730	6.38 ^{**}
B x C	6	3687.9397	5.18 ^{**}
A x B x C	18	3862.3206	5.43 ^{**}
Hata	56		

(**) $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin zamksılık değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.26.’da verilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları, zamksılık değeri ortalamasının 4°C’de muhafaza edilmiş ekmeklerde (265.59) en yüksek, sünmenin optimum olduğu 37°C’de muhafaza edilmiş ekmeklerde (133.14) ise en düşük olduğunu göstermektedir. Ancak 4°C’de muhafaza sırasında ekmekler katı hallerini koruduklarından bu sıcaklıktaki zamksılık değerinin bir anlamı olmamaktadır. 25°C (209.01) ve 45°C’de (198.12)

muhafaza edilmiş ekmeklerin zamksılık değeri ortalamaları arasında ise istatistiki olarak herhangi bir farklılığın olmadığı görülmektedir. Bu iki sıcaklık derecesinin zamksılık değeri üzerine etkisi aynıdır.

Daha önce de bildirildiği gibi zamksılık, sertlik x kohezif yapışkanlık olarak belirlenir. Bu durumda kepekli ekmeğin sertlik (Bkz. Çizelge 4.14.) ve kohezif yapışkanlık (Bkz. Çizelge 4.20.) değerlerinin daha yüksek olması, Çizelge 4.26.'ya göre kepekli ekmeğin zamksılık değeri ortalamasının (225.62) normal ekmeğe göre (177.31) daha yüksek olmasının nedenini de açıklamaktadır. Bu sonucu etkileyen temel faktörler yine ekmeklerin başlangıç *Bacillus* yükü ve su aktivitesi olmaktadır. Kepekli ekmeğin su aktivitesinin daha düşük olması muhafaza süresince daha sert kalmasına, bu da zamksılık değerinin yükselmesine neden olmaktadır. Zamksılık değerinin yüksek olması da kepekli ekmeğin çiğnenmeye karşı gösterdiği direncin daha fazla olması ve ekmeği parçalamak için daha fazla enerji harcanması gerektiği anlamına gelmektedir.

Zamksılık, yarı katı gıdalara uygulanabilir bir parametre olmasına rağmen Shah vd (2006) ksılanaz ile katkıladıkları ekmeklerde zamksılık ölçümü yapmışlardır. Sertliğin dört kattan fazla azaldığını, kohezif yapışkanlığın arttığını, elastikiyet ve zamksılığın ise azaldığını belirlemişlerdir. Ksılanaz içermeyen ekmeklerde zamksılık 9.33 iken, ksılanaz katkılı ekmeklerde bu değer 6.42'ye düşmüştür. Literatürde bildirilen değerlerin bu tez çalışmasında bulunan değerlere göre çok düşük olmasının nedeni, bu tez çalışmasında sertlik gram olarak ölçülürken Shah vd'nin (2006) çalışmasında Newton cinsinden ölçülmüş olmasıdır. Selülaz, ksılanaz ve β -glukanazın ekmek tekstürü üzerindeki etkisini inceleyen Haros vd (2002) de sertlik, zamksılık ve çiğnenebilirliğin azaldığını saptamışlardır.

Çizelge 4.26. muhafaza süresi açısından incelendiğinde 0. günde zamksılık değerine ait ortalama en yüksek iken (265.59) zamanla sürekli azalmıştır. Ancak istatistiki olarak %5 önem seviyesinde 1. günden 6. güne kadarki zaman dilimi içinde zamksılık değerinde önemli düzeyde bir değişim gözlenmemiştir. Yani istatistiki olarak bu süre içindeki azalış göz ardı edilebilecek kadar azdır. Fakat 0. gün değeri diğer günlerden önemli seviyede ($p<0.05$) farklıdır.

Çizelge 4.26. Normal ve kepekli ekmeklerin zamksılık değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

	4°C	25°C	45°C	37°C
Sıcaklık	265.59 ^a ± 9.72 (N=28)	209.01 ^b ± 10.74 (N=28)	198.12 ^b ± 13.24 (N=28)	133.14 ^c ± 10.60 (N=28)
Ekmek Tipi	Kepekli 225.62 ^a ± 10.99 (N=56)	Normal 177.31 ^b ± 7.78 (N=56)		
Süre	0 251.54 ^a ± 9.30 (N=16)	1 214.22 ^b ± 11.67 (N=16)	2 207.88 ^b ± 19.42 (N=16)	3 197.68 ^{bc} ± 20.49 (N=16)
	4 185.64 ^{cd} ± 20.37 (N=16)	5 180.22 ^{cd} ± 21.97 (N=16)	6 173.09 ^d ± 19.10 (N=16)	

Değişik harfler, ortalamaların p<0.05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Şekil 4.11.'de normal ve kepekli ekmeklerde tekstür ölçümüne ait resimler gösterilmiştir.

Şekil 4.12.'de muhafaza süresi boyunca ekmeklerin zamksılığında meydana gelen değişimin grafiği verilmiştir. Buna göre 25°C'de muhafaza edilen normal ekmeklerin zamksılığında 3. güne kadar gözlenen sürekli azalmanın 4. günde sabit kaldığı, 5. gün tekrar azaldığı ve sabitlendiği; muhafaza süresi sonunda normal ekmeklerin zamksılık değerinin yaklaşık %55 azaldığı görülmektedir. Kepekli ekmeklerde ise durum biraz daha farklı seyretmiştir. 4. güne kadar gözlenen sürekli azalma, 5. günde yerini artışa bırakmıştır. Bunun nedeni de kepekli ekmeğin sertlik değerinde 5. günde meydana gelen ani artıştır. Muhtemeldir ki bu durumun sebebi, farklı bayatlama ve sünme olgusu, bir tesir karışması veya deneysel hata da olabilir.

37°C'de muhafaza edilen kepekli ekmeklerde hesaplanan zamksılık değerleri ilk gün keskin bir düşüşle yarıdan aşağıya inmiş, diğer 4 gün boyunca hemen hemen aynı düzeyde sabit kalmış, 5. günde çok hafif artmış, 6. günde tekrar azalmıştır. Normal ekmekte ise muhafaza süresi boyunca sürekli bir azalma olduğu ve 2. günde azalmanın en bariz olduğu gözlenmiştir. Kepekli ekmeğin zamksılık değerindeki toplam azalma yaklaşık %55 iken normal ekmeğin zamksılık değerindeki azalma yaklaşık % 65'tir.

45°C’de muhafaza sırasında ise kepekli ekmeklerin zamksılığı ilk 4 gün artmış, 5. günde keskin bir düşüş göstermiş, 6. gün ise hafif bir yükselme göstermiştir. Normal ekmeklerde ise zamksılık değerinde tutarsız bir değişim söz konusudur. Bu durum sertlik ve kohezif yapışkanlığa bağlı olarak ortaya çıkan bir değişim olduğu için, her iki parametrenin değişimi üzerinde etkili olan, bakteri çoğalması, metabolik aktivitesi ve bayatlama üzerine etkili faktörler ve sünme sonucu oluşan hidrolizatın karakteristikleri ile sıcaklığın birlikte değerlendirilmesiyle açıklanabilecek oldukça kompleks bir olaydır. 4°C’de muhafaza edilmiş ekmeklerde zamksılık ölçümü bir anlam ifade etmediğinden grafikte sadece değişimi göstermek amacıyla verilmiş, açıklama yapmaya gerek duyulmamıştır.



a) Kepekli ekmek



b) Normal ekmek

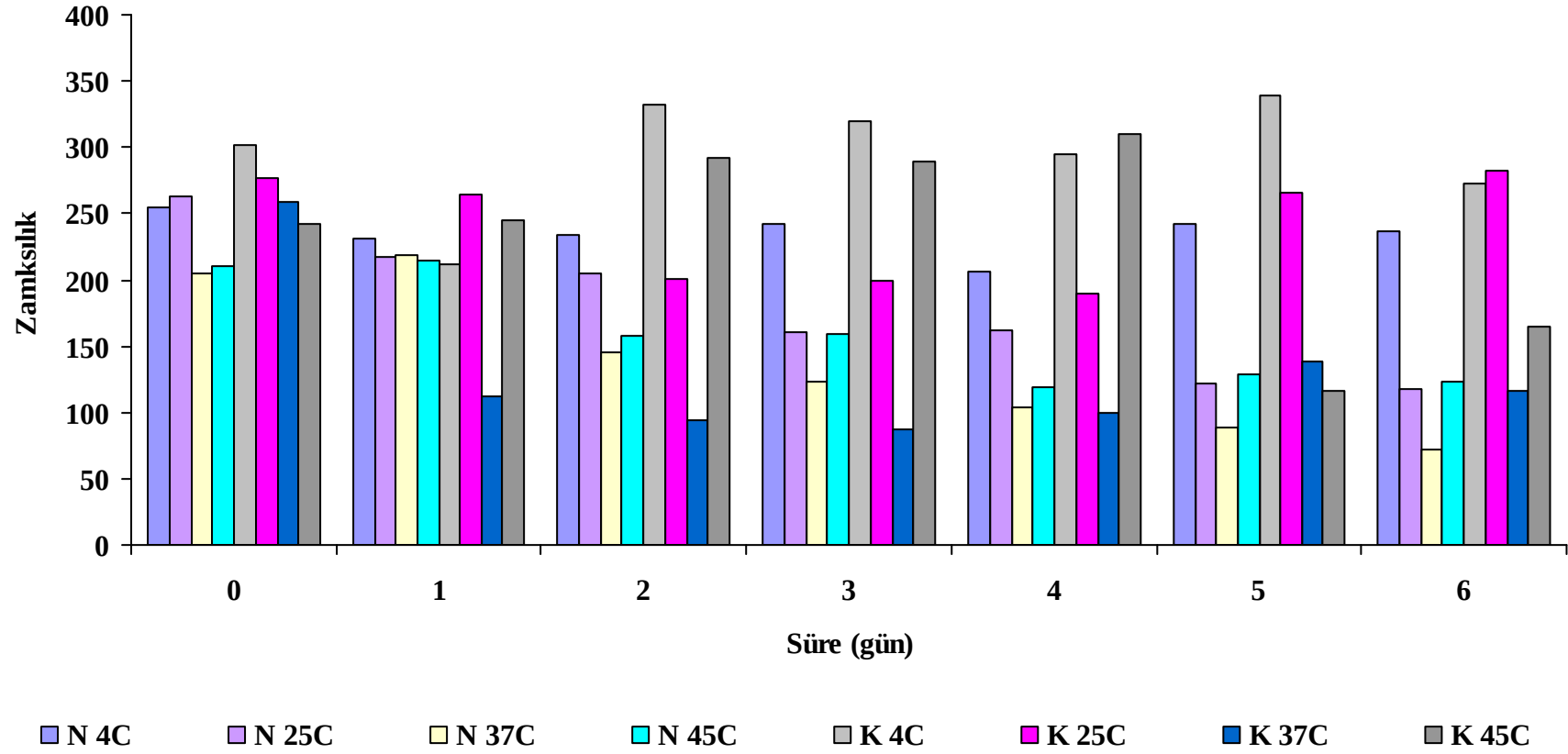


a) Kepekli ekmek



b) Normal ekmek

Şekil 4.11. Normal ve kepekli ekmeklerde tekstür ölçümü



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.12. Normal ve kepekli ekmeklerdeki zamksılık analizi sonuçları

4.4.6. Ekmeklerde çiğnenebilirlik analizine ait sonuçlar

Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı çiğnenebilirlik analizi sonuçları Çizelge 4.27.'de verilmiştir.

Çizelge 4.27. Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı çiğnenebilirlik analizi sonuçları ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek	Kepekli Ekmek
4	0	205.937 $\pm$ 4.479	229.457 $\pm$ 21.340
	1	220.463 $\pm$ 4.126	178.550 $\pm$ 10.995
	2	218.879 $\pm$ 9.891	317.448 $\pm$ 24.356
	3	223.666 $\pm$ 39.564	291.566 $\pm$ 26.356
	4	198.267 $\pm$ 35.875	286.885 $\pm$ 43.872
	5	255.216 $\pm$ 44.693	321.888 $\pm$ 8.377
	6	227.625 $\pm$ 18.896	260.547 $\pm$ 25.202
25	0	247.715 $\pm$ 28.871	249.876 $\pm$ 11.132
	1	233.312 $\pm$ 22.429	243.132 $\pm$ 3.415
	2	232.772 $\pm$ 58.759	177.255 $\pm$ 4.440
	3	150.674 $\pm$ 1.316	174.695 $\pm$ 28.480
	4	154.207 $\pm$ 3.282	152.208 $\pm$ 6.093
	5	117.483 $\pm$ 11.410	243.286 $\pm$ 0.051
	6	113.626 $\pm$ 14.606	228.719 $\pm$ 16.111
37	0	186.364 $\pm$ 15.545	190.535 $\pm$ 4.766
	1	193.570 $\pm$ 14.117	95.929 $\pm$ 22.815
	2	122.506 $\pm$ 4.849	87.565 $\pm$ 9.768
	3	115.870 $\pm$ 10.695	83.121 $\pm$ 4.877
	4	97.375 $\pm$ 2.102	97.362 $\pm$ 15.612
	5	81.547 $\pm$ 7.095	143.389 $\pm$ 19.490
	6	65.987 $\pm$ 5.563	114.422 $\pm$ 8.092
45	0	146.530 $\pm$ 1.261	184.523 $\pm$ 24.006
	1	161.751 $\pm$ 18.927	204.892 $\pm$ 21.272
	2	135.135 $\pm$ 5.863	256.033 $\pm$ 52.415
	3	127.249 $\pm$ 7.328	253.264 $\pm$ 20.040
	4	106.118 $\pm$ 6.665	287.448 $\pm$ 13.932
	5	115.451 $\pm$ 5.143	91.320 $\pm$ 11.683
	6	107.621 $\pm$ 12.354	140.564 $\pm$ 4.281

Çiğnenebilirlik fiziksel anlamda katı bir gıda maddesini yutmaya hazır hale getirmek amacıyla parçalamak için gerekli enerji, duyuusal anlamda ise saniyede bir çiğneme olacak şekilde gıdanın çiğnenebilmesi için gerekli çiğneme sayısı ve gıdanın

konsistensini çiğnemeye uygun hale getirebilmek için uygulanan sabit orandaki kuvvet olarak tanımlanır (Szczesniak 1998), elastikiyet x zamksılık olarak hesaplanır (Anonymous 2007).

Çiğnenebilirlik, yalnızca katı gıdalara uygulanabilen bir parametre olması nedeniyle sünme hastalığı ile birlikte sınılaşıarak yarı katı hale geçen ekmeklerde ölçümünün bilimsel olarak uygun olmadığı düşünölebilir. Ancak zamksılık verileri ile benzerlik arz etmesinden dolayı sünme hastalığı ile birlikte ekmek içi yapısında meydana gelen değışimlerin açıklanmasında kullanılıp kullanılamayacağını test edilmesi bakımından denemeye dahil edilmiştir.

Normal ve kepekli ekmeklerde çiğnenebilirlik değeriine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.28.'de verilmiştir. Çizelgeye göre ekmeklerin çiğnenebilirlik değeri; sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresi ile sıcaklık derecesi x ekmek tipi, sıcaklık derecesi x muhafaza süresi, ekmek tipi x muhafaza süresi ile bunlar arasındaki üçlü interaksiyonlar tarafından istatistiki olarak önemli düzeyde ($p<0.01$) etkilenmektedir.

Çizelge 4.28. Normal ve kepekli ekmeklerin çiğnenebilirlik değeriine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	77720.7271	92.77**
Ekmek Tipi (B)	1	37373.2591	44.6**
Muhafaza Süresi (C)	6	4223.2590	5.04**
A x B	3	8129.2891	9.70**
A x C	18	5176.3457	6.18**
B x C	6	3789.2882	4.52**
A x B x C	18	3595.6804	4.29**
Hata	56	837.7944	

(**) $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin çiğnenebilirlik değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.29.'da verilmiştir.

Çizelge 4.29. incelendiğinde her bir sıcaklık derecesinin çiğnenebilirlik üzerindeki etkisinin istatistiki olarak önemli düzeyde ($p<0.05$) farklı olduğu görölmektedir.

Sıcaklık derecesine bağlı olarak sünmenin gerçekleşme seviyesine göre çiğnenebilirlik değerleri azalmış, sünmenin optimum olduğu 37°C’de en düşük değere (119.68) ulaşmıştır. Dolayısıyla sadece sünmüş ekmekte yapılan değerlendirme bir anlam ifade etmeyebilir. Ancak bu tez çalışmasında olduğu gibi muhafaza süresi boyunca düzenli olarak yani hem sağlam hem de hastalıklı ekmeklerde yapılan ölçümlerle birlikte, sonuçlar arasında bir karşılaştırma yapmak mümkün olabileceğinden çiğnenebilirlik verilerinin, sünme hastalığının ekmek içinde meydana getirdiği değişimin açıklanmasında kullanılabileceği düşünülmektedir.

Ekmek tipinin çiğnenebilirlik değerini istatistiki olarak farklı seviyelerde ($p<0.05$) etkilediği Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarında gösterilmiştir. Zamksılık x elastikiyet olarak hesaplanması nedeniyle bu testlerde yapılan açıklamalar çiğnenebilirlik için de geçerlidir. Kepekli ekmeğin elastikiyet (Bkz. Çizelge 4.23.) değeri normal ekmeğe göre daha düşük olsa da sertlik (Bkz. Çizelge 4.14.) ve kohezif yapışkanlık (Bkz. Çizelge 4.20.) dolayısıyla da zamksılık (Bkz. Çizelge 4.26.) değerinin yüksekliği çiğnenebilirlik değerinin de yüksek olmasına neden olmuştur.

Çizelge 4.29. Normal ve kepekli ekmeklerin çiğnenebilirlik değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Sıcaklık	4°C	25°C	45°C	37°C
	245.46 ^a ± 9.71 (N=28)	194.21 ^b ± 10.25 (N=28)	165.56 ^c ± 12.19 (N=28)	119.68 ^d ± 8.27 (N=28)
Ekmek Tipi	Kepekli	Normal		
	199.50 ^a ± 10.17 (N=56)	162.96 ^b ± 7.90 (N=56)		
Süre	0	2	1	3
	205.12 ^a ± 9.62 (N=16)	193.45 ^{ab} ± 20.10 (N=16)	191.45 ^{ab} ± 12.18 (N=16)	177.51 ^{bc} ± 18.37 (N=16)
	4	5	6	
	172.48 ^{bc} ± 19.82 (N=16)	171.20 ^{bc} ± 22.16 (N=16)	157.39 ^c ± 17.62 (N=16)	

Değişik harfler, ortalamaların $p<0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.29. muhafaza süresi açısından incelendiğinde, sünme ile birlikte çiğnenebilirlik değerlerinde bir azalma olduğu görülmektedir. Ancak istatistiki olarak %5 önem seviyesinde ara günler arasında çiğnenebilirlik değeri açısından bir farklılığın

olmadığı, 0. ve 6. günler arasında ise önemli seviyede ($p<0.05$) farklılık olduğu anlaşılmaktadır.

Çiğnenebilirlik parametresi ile zamksılık parametresi her iki tip ekmekte de neredeyse aynı değerler zannedilecek kadar birbirine yakın ve paralel bulunmuştur. Sayısal değer olarak birbirlerinin aynısı olmasalar da muhafaza süresi boyunca grafiklerin eğilimi (artma-azalma düzeni) neredeyse birbirinin aynıdır. Dolayısıyla zamksılık için yapılan açıklamalara benzer şekilde sünme ile çiğnenebilirlik arasındaki ilişkiyi de tanımlamak mümkündür.

Muhafaza süresi boyunca ekmeklerin çiğnenebilirliğinde meydana gelen değişimin grafiğinin verildiği Şekil 4.13.'e göre 4°C'de muhafaza edilen kepekli ekmeklerin çiğnenebilirlik özelliği ilk gün azalmış, 2. gün yaklaşık %80 artmış, 3. ve 4. günde azalan değer, 5. gün tekrar artmış, 6. gün ise azalmıştır.

Normal ekmekte muhafaza süresi boyunca düzenli bir artış ya da azalış eğilimi gözlenmemekle birlikte 6 gün muhafaza sonunda ekmeklerin çiğnenebilirlik değerinde 0. güne göre yaklaşık %10'luk bir artış gerçekleşmiştir. 25°C'de muhafaza edilen kepekli ekmeklerde çiğnenebilirlik değerinde 4. güne kadar süren sürekli azalış, 5. günde yerini artışa bırakmış, 6. gün bu değer yeniden azalmıştır. Normal ekmeklerde ise çiğnenebilirliği 3. güne kadar sürekli azalmış, 4. gün çok hafif arttıktan sonra tekrar azalışa geçmiştir. 37°C'de muhafaza edilen kepekli ekmeklerde çiğnenebilirlikte 4. güne kadar düzenli olmamakla birlikte bir azalma, 4. ve 5. günlerde çok az artma, 6. günde ise tekrar azalma görülmüştür. Normal ekmeklerde ise ilk gün gözlenen çok az bir artıştan sonra sürekli bir azalma gerçekleşmiştir. 45°C'de muhafaza edilen kepekli ekmeklerde ise 4. güne kadar çok düzenli olmamakla birlikte hafif bir artış, 5. günde keskin bir düşüş ile yaklaşık %68'lik bir azalma, 6. günde ise hafif bir tekrar artış meydana gelmiştir. Normal ekmeklerde ise ilk gün çok az artan çiğnenebilirlik değeri, 4. güne kadar sürekli azalmış, sonra yine çok az bir artıştan sonra azalışa geçmiştir. Bu olay oldukça kompleks olup, zamksılık parametresinde olduğu gibi açıklanabilir. Gambaro vd (2006), depolama süresince ekmeklerin çiğnenebilirliğinin önemli düzeyde arttığını, Carr vd (2006) ise kısmi pişmiş dondurulmuş ekmeklerde çiğnenebilirliğin 4.

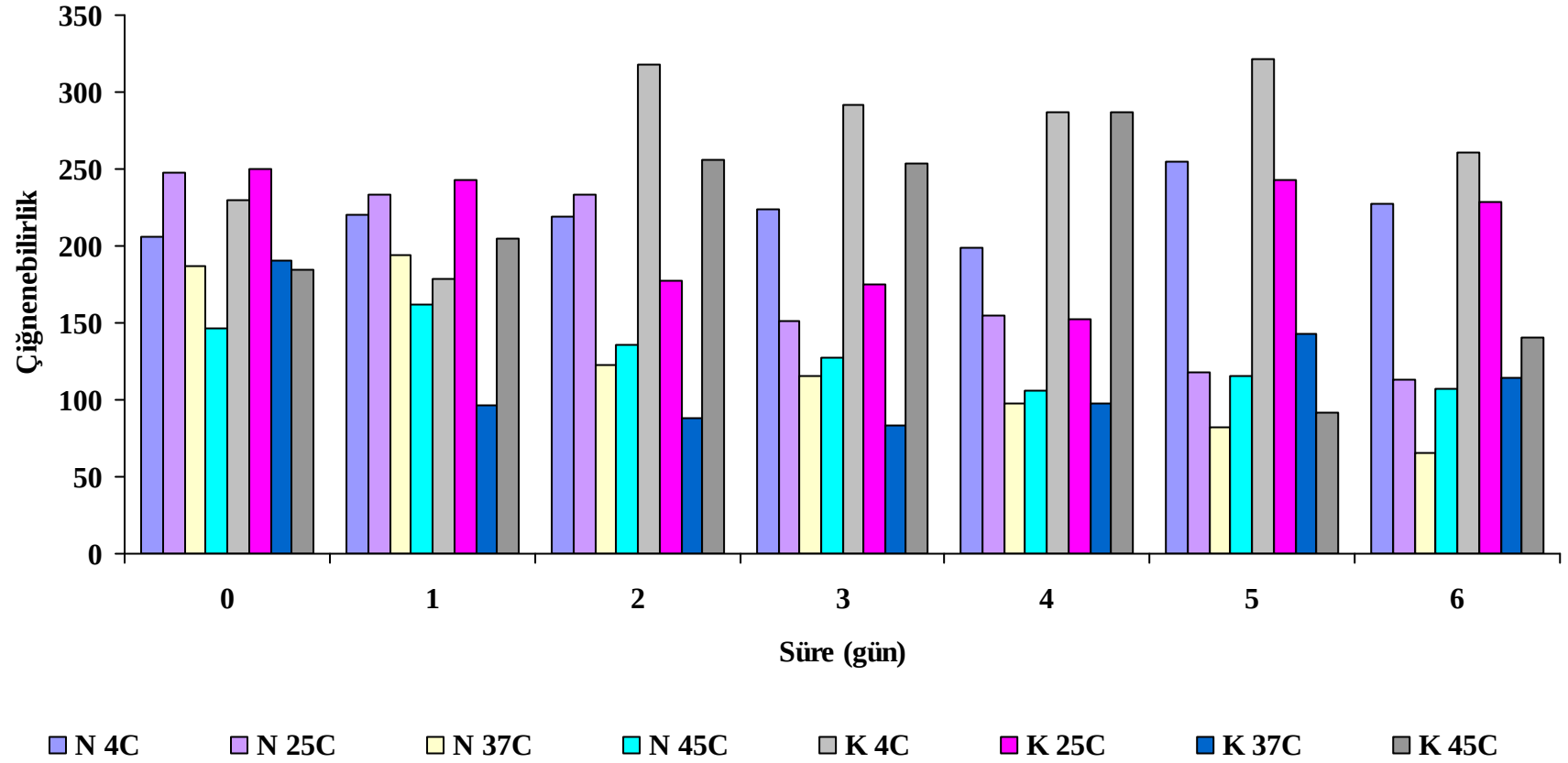
güne kadar azalıp sonra arttığını belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında 4°C'ye ait olan bulgular Gambaro vd (2006) tarafından bildirilen sonuçlara benzerlik göstermektedir. Diğer bulgular ise tamamen sünme ile meydana gelen sıvılaştırma etkisi ile bayatlama sonucu oluşan sertlik ve kırılganlık arasındaki değişim ve ilişkilerle açıklanabilir.

4.4.7. Ekmeklerde esneklik ölçümüne ait sonuçlar

Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı esneklik analizi sonuçları Çizelge 4.30.'da verilmiştir.

Çizelge 4.30. Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı esneklik ölçüm sonuçları ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek	Kepekli Ekmek
4	0	0.251 $\pm$ 0.015	0.233 $\pm$ 0.015
	1	0.109 $\pm$ 0.001	0.110 $\pm$ 0.005
	2	0.096 $\pm$ 0.002	0.095 $\pm$ 0.003
	3	0.091 $\pm$ 0.008	0.092 $\pm$ 0.008
	4	0.076 $\pm$ 0.004	0.086 $\pm$ 0.000
	5	0.080 $\pm$ 0.001	0.082 $\pm$ 0.003
	6	0.078 $\pm$ 0.003	0.079 $\pm$ 0.002
25	0	0.254 $\pm$ 0.001	0.288 $\pm$ 0.030
	1	0.150 $\pm$ 0.006	0.177 $\pm$ 0.005
	2	0.141 $\pm$ 0.009	0.140 $\pm$ 0.002
	3	0.111 $\pm$ 0.001	0.130 $\pm$ 0.008
	4	0.100 $\pm$ 0.001	0.114 $\pm$ 0.005
	5	0.090 $\pm$ 0.005	0.093 $\pm$ 0.003
	6	0.078 $\pm$ 0.009	0.092 $\pm$ 0.001
37	0	0.329 $\pm$ 0.016	0.209 $\pm$ 0.006
	1	0.215 $\pm$ 0.024	0.093 $\pm$ 0.006
	2	0.138 $\pm$ 0.001	0.056 $\pm$ 0.001
	3	0.106 $\pm$ 0.011	0.053 $\pm$ 0.003
	4	0.111 $\pm$ 0.004	0.050 $\pm$ 0.002
	5	0.097 $\pm$ 0.022	0.042 $\pm$ 0.001
	6	0.101 $\pm$ 0.004	0.047 $\pm$ 0.002
45	0	0.163 $\pm$ 0.006	0.240 $\pm$ 0.019
	1	0.140 $\pm$ 0.008	0.207 $\pm$ 0.013
	2	0.141 $\pm$ 0.004	0.208 $\pm$ 0.024
	3	0.117 $\pm$ 0.004	0.170 $\pm$ 0.012
	4	0.108 $\pm$ 0.015	0.159 $\pm$ 0.023
	5	0.123 $\pm$ 0.009	0.083 $\pm$ 0.004
	6	0.131 $\pm$ 0.009	0.099 $\pm$ 0.004



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.13. Normal ve kepekli ekmeklerdeki çiğnenebilirlik analizi sonuçları

Normal ve kepekli ekmeklerde esneklik değerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.31.'de verilmiştir. Buna göre ekmeklerin esneklik değeri sıcaklık derecesi ve muhafaza süresine bağlı olarak istatistiki olarak %1 önem seviyesinde, ekmek tipine bağlı olarak ise %5 önem seviyesinde farklılık arz etmektedir. Temel varyasyon kaynakları arasındaki interaksiyonlara bakıldığında, ekmek tipi x muhafaza süresi arasındaki interaksiyonun ekmeklerin esneklik değerini etkilemediği, ancak diğer tüm interaksiyonların ekmeklerin esneklik değeri üzerine önemli düzeyde ($p<0.01$) etkisi olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.31. Normal ve kepekli ekmeklerin esneklik değerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	0.00901558	43.41 ^{**}
Ekmek Tipi (B)	1	0.00137901	6.64 [*]
Muhafaza Süresi (C)	6	0.05015980	241.52 ^{**}
A x B	3	0.01711865	82.43 ^{**}
A x C	18	0.00204034	9.82 ^{**}
B x C	6	0.00042159	2.03
A x B x C	18	0.00106787	5.14 ^{**}
Hata	56	0.00020769	

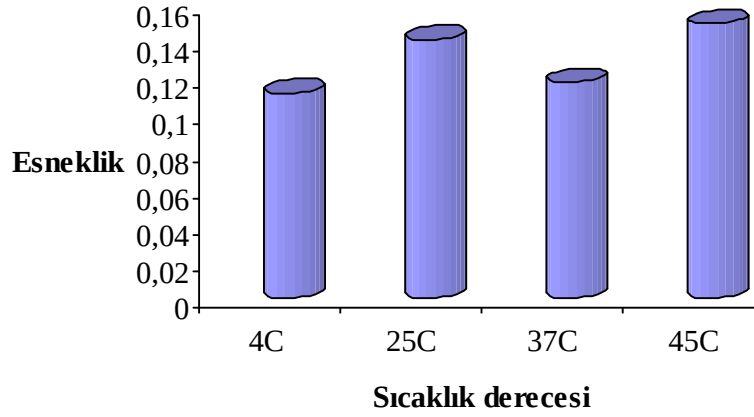
(^{*}) $P<0.05$ seviyesinde,

(^{**}) $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin esneklik değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.32.'de verilmiştir.

Çizelge 4.32. sıcaklık derecesinin esneklik değeri ortalaması üzerine etkisi bakımından incelenirse muhafaza sıcaklıklarından 4°C ve 37°C'nin istatistiki olarak aynı etkiyi gösterdiği, aralarında farklılık olmadığı; diğer sıcaklık derecelerinin ise etki düzeylerinin önemli seviyede ($p<0.05$) farklı olduğu görülür. 4°C'de muhafaza sırasında hızla bayatlama ile sertleşerek esnekliğini kaybeden ekmekler, 37°C'de muhafaza sırasında ise sünme ile yapışkan bir hal alması nedeniyle esnekliğini yitirmiştir. Sünme hastalığının gelişimi ile azalmakla birlikte esneklik değerine ait ortalamanın en iyi korunduğu muhafaza sıcaklığı 45°C'dir. 25°C'de esnekliğin azalmasının da yine bayatlamının etkisi ile sertliğin artmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bayatlama 4°C'ye göre nisbeten daha yavaş olduğundan esneklik değeri de 4°C'de

muhafaza edilmiş ekmeklere ait değerlere göre biraz daha yüksek kalmıştır. Şekil 4.14.'de ekmeklerin muhafaza sıcaklıklarına ait esneklik değeri ortalamaları verilmiştir.



Şekil 4.14. Ekmeklerin muhafaza sıcaklıklarına ait esneklik değeri ortalamaları

Çizelge 4.32.'deki Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ekmeklerin esneklik değeri ortalamaları kepekli ve normal ekmekte istatistiki olarak farklıdır ($p<0.05$). Normal ekmeklere ait esneklik değeri ortalamasının (0.133), kepekli ekmeklere ait ortalamadan (0.126) daha yüksek olduğu görülmektedir. Nitekim Wang vd (2002) de ekmek hamuruna farklı tipte lif ilavesinin esneklik değerini azalttığını belirlerken; Haros vd (2002) ekmeklere ksilanaz ilavesinin esnekliği artırdığını, selüloz ve glukanaaz ilavesinin ise esnekliği çok fazla değiştirmedğini belirlemişlerdir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında ekmek tiplerine bağlı olarak belirlenen esneklik değerlerinin yukarıda sözü geçen çalışmalar ile uyum içinde olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.32.'ye göre muhafaza süresinin ekmeklerin esneklik değeri ortalaması üzerindeki etkisi istatistiksel olarak incelendiğinde 5 grubun oluştuğu; 3. ile 4., 5. ile de 6. gün arasında herhangi bir farklılık olmadığı, diğer günler arasında önemli farklılıklar ($p<0.05$) olduğu, muhafaza süresi boyunca esneklik değerine ait ortalamanın azaldığı görülmektedir. Son yıllarda ekmeklerin tazeliğinin belirlenmesi için esneklik değerinden de yararlanıldığı bildirilmektedir (Leake 2007). Bu tez çalışmasının bulguları ile verilen literatür bulgularının uyumlu olduğu görülmektedir.

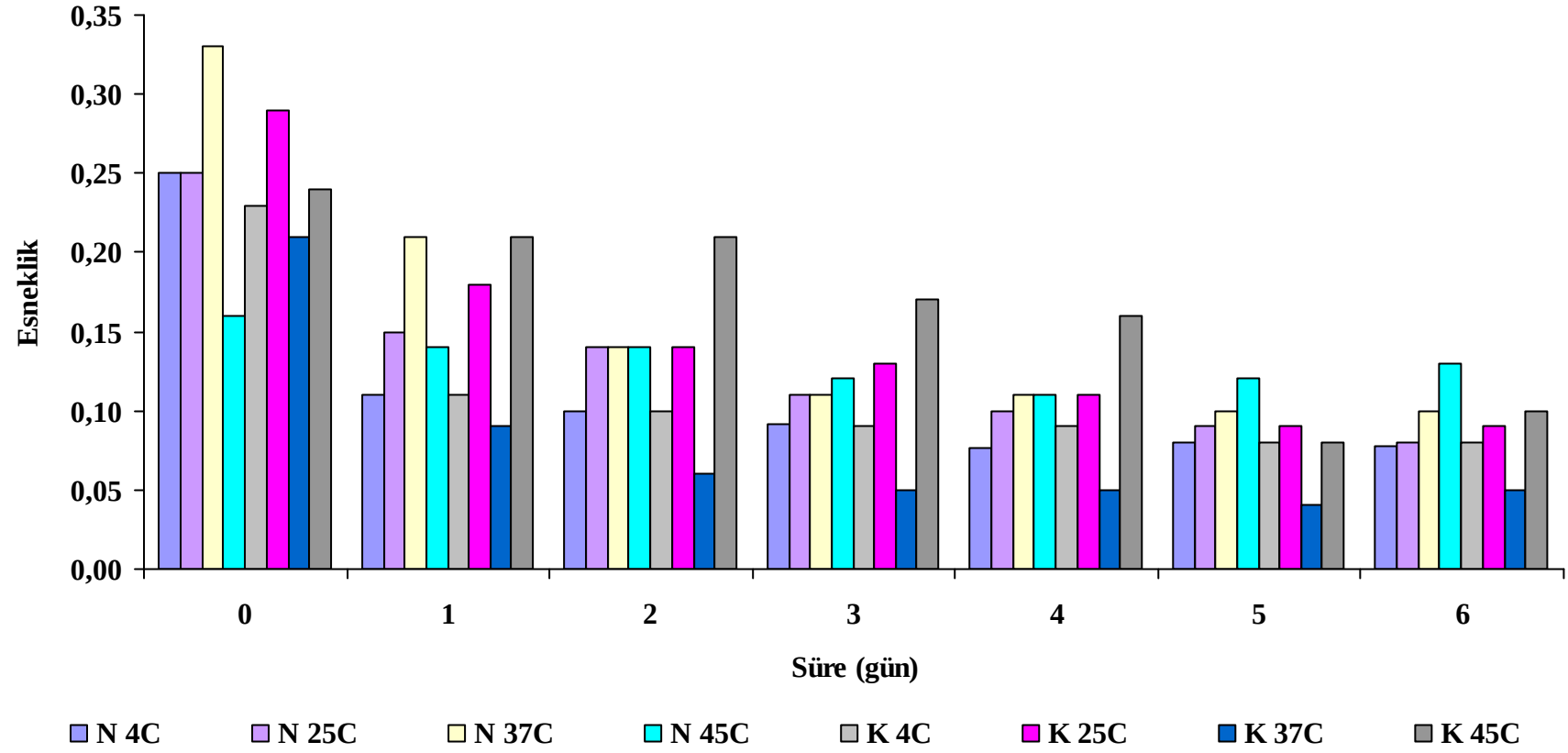
Çizelge 4.32. Normal ve kepekli ekmeklerin esneklik değeri ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

	45°C	25°C	37°C	4°C
Sıcaklık	0.149 ^a ± 0.009 (N=28)	0.140 ^b ± 0.012 (N=28)	0.117 ^c ± 0.015 (N=28)	0.111 ^c ± 0.011 (N=28)
Ekmek Tipi	Normal 0.133 ^a ± 0.008 (N=56)	Kepekli 0.126 ^b ± 0.009 (N=56)		
Süre	0 0.246 ^a ± 0.013 (N=16)	1 0.150 ^b ± 0.011 (N=16)	2 0.127 ^c ± 0.011 (N=16)	3 0.109 ^d ± 0.008 (N=16)
	4 0.100 ^d ± 0.008 (N=16)	6 0.088 ^e ± 0.006 (N=16)	5 0.086 ^e ± 0.006 (N=16)	

Değişik harfler, ortalamaların p<0.05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Şekil 4.15.'de muhafaza süresi boyunca ekmeklerin esneklik değerinde meydana gelen değişimin grafiği verilmiştir. Grafiğe bakılırsa her iki ekmek tipi için de bütün sıcaklık derecelerinde muhafaza sırasında, ürünün sıkıştırma sonrası eski halini alabilmesinin bir göstergesi olan esneklik değerinin, azalma eğiliminde olduğu görülür.

Şekil 4.15'e göre 4°C, 25°C ve 37°C'de muhafaza edilen ekmeklerde esneklik değeri düzenli ve hızla azalıp sabitlenirken, 45°C'de muhafaza edilen ekmeklerde ise azalma daha düzensiz geçekleşmektedir. 45°C'de ilk gün meydana gelen azalma ekmek tipine göre yaklaşık %13-14 iken diğer sıcaklık derecelerinde ilk gün gözlenen azalma, en fazla 37°C'de muhafaza edilmiş ekmeklerde olmak üzere, yaklaşık %40-60 arasında değişmiştir. Muhafazanın ilk günü ile son günü arasındaki azalma, yani toplamda meydana gelen azalma incelendiğinde ilk sırayı %77'lik azalma ile 37°C'de muhafaza edilmiş kepekli ekmek alırken, son sırayı %19'luk oran ile 45°C'de muhafaza edilmiş normal ekmek almıştır. Bu farklı durumu, ekmek içindeki suyun yüzeye ve kilitli muhafaza poşeti içine çıkması, sünmenin daha hızlı seyretmesi ve ekmek bayatlaması ile açıklamak mümkündür. Sünme hastalığı ekmeğin merkezinde başlayıp geliştiğinden merkez kısmında sünme, buna bağlı olarak da yumuşama daha fazla olmaktadır. Ancak sıcaklığın yüksek olması merkezdeki suyun yüzeye transferine neden olduğundan, su kaybı az da olsa bir kurumaya neden olmaktadır. Yumuşama ve kuruma arasındaki dengelenmeyle birlikte esneklikte çok az bir değişim söz konusu olmaktadır.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.15. Normal ve kepekli ekmeklerdeki esneklik analizi sonuçları

4.5. Normal ve Kepekli Ekmeklerin Toplam İndirgen Şeker, Toplam Serbest Amino Asit ve Kalıntı Protein Miktarları Üzerine Muhafaza Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi

Ekmekte sünme hastalığı, vejetatif hale geçen *Bacillus* hücrelerinin amilaz ve proteaz salgılayarak nişasta ve proteinleri parçalaması ile başlar. Parçalanmış bu moleküllerin ya da bunların parçalanması sonucu oluşan yeni bileşiklerin, sünme hastalığının gelişiminin takibinde indikatör olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen ekmeklerin, muhafaza süresi boyunca toplam indirgen şeker, toplam serbest amino asit ve kalıntı protein miktarlarında meydana gelen değişim incelenmiştir.

Ekmeklerin muhafazası sırasında sünme hastalığının gelişimi ile birlikte nişastanın ve proteinin parçalanması sonucu toplam indirgen şeker ve toplam serbest amino asit miktarında sürekli bir artış, kalıntı protein miktarında ise sürekli bir azalış olması beklenir. Ancak elde edilen sonuçlar, muhafaza sıcaklığına ve bu bileşiklerin birbirleri ile olan etkileşimlerine bağlı olarak, ayrı ayrı olmak üzere, çok farklı bir profil sergilemektedir.

Yapılan analiz sonuçları incelendiğinde normal ve kepekli ekmeklerin toplam indirgen şeker, toplam serbest amino asit ve kalıntı protein miktarlarına ait standart hataların yüksekliği dikkati çekmektedir. Sonuçlardaki bu heterojen değişim; sünme ile birlikte ekmek içinde meydana gelen heterojen yapının örneklemeyi güçleştirmesine bağlanabilir. Ayrıca muhafaza süresi boyunca her gün analizler için yeni bir ekmek kullanılıyor olması da bu sonucu az da olsa etkilemektedir.

4.5.1. Ekmeklerin toplam indirgen şeker analizine ait sonuçlar

Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı toplam indirgen şeker miktarı analizi sonuçları Çizelge 4.33.'de verilmiştir.

Çizelge 4.33. Normal ve kepekli ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarı üzerine muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek (mg/kg)	Kepekli Ekmek (mg/kg)
4	0	35934.437 $\pm$ 1118.394	43776.734 $\pm$ 1625.349
	1	37901.034 $\pm$ 1108.478	39704.511 $\pm$ 335.091
	2	37128.967 $\pm$ 1978.969	41855.046 $\pm$ 272.839
	3	38531.616 $\pm$ 2710.289	36741.874 $\pm$ 2574.156
	4	37197.770 $\pm$ 941.788	40206.221 $\pm$ 1258.462
	5	37450.867 $\pm$ 2678.288	39063.138 $\pm$ 97.699
	6	38977.574 $\pm$ 2513.091	39668.935 $\pm$ 159.922
25	0	38807.257 $\pm$ 448.979	57645.042 $\pm$ 1396.833
	1	34037.074 $\pm$ 389.183	59276.689 $\pm$ 24.142
	2	53642.490 $\pm$ 10748.504	65119.230 $\pm$ 10254.180
	3	185866.973 $\pm$ 9661.283	80707.550 $\pm$ 6613.803
	4	196182.708 $\pm$ 3520.965	166573.518 $\pm$ 3925.388
	5	155841.260 $\pm$ 9948.116	125590.537 $\pm$ 24325.888
	6	176667.188 $\pm$ 6442.218	86402.462 $\pm$ 5821.445
37	0	39156.907 $\pm$ 503.278	30588.921 $\pm$ 236.165
	1	124216.434 $\pm$ 66212.318	223589.930 $\pm$ 24754.868
	2	220339.964 $\pm$ 7960.305	166522.499 $\pm$ 3914.923
	3	255083.704 $\pm$ 3944.232	146455.501 $\pm$ 8515.186
	4	223581.080 $\pm$ 6033.151	157483.525 $\pm$ 18557.174
	5	187328.287 $\pm$ 8345.312	164394.785 $\pm$ 2798.670
	6	182746.713 $\pm$ 13799.708	136115.008 $\pm$ 27265.183
45	0	37473.665 $\pm$ 1571.721	52719.949 $\pm$ 297.825
	1	82333.594 $\pm$ 207.692	94327.965 $\pm$ 11114.685
	2	203676.429 $\pm$ 3436.717	116454.972 $\pm$ 22363.530
	3	176425.918 $\pm$ 13500.268	157809.607 $\pm$ 17637.350
	4	194103.727 $\pm$ 30271.519	139911.535 $\pm$ 937.372
	5	212113.964 $\pm$ 8083.361	93241.030 $\pm$ 1164.870
	6	208141.876 $\pm$ 2127.557	11914.986 $\pm$ 2453.751

Normal ve kepekli ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.34.'de verilmiştir. Ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarının deneme desenindeki varyasyon kaynakları olan sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresi ile bunlar arasındaki tüm interaksiyonlardan önemli ölçüde ($p < 0.01$) etkilendiği çizelgeden görülmektedir.

Çizelge 4.34. Normal ve kepekli ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarına ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	74939746989	85.36 ^{**}
Ekmek Tipi (B)	1	16455418720	18.74 ^{**}
Muhafaza Süresi (C)	6	23054884417	26.26 ^{**}
A x B	3	6211085170.5	7.07 ^{**}
A x C	18	6503274666.7	7.41 ^{**}
B x C	6	6317781211.8	7.20 ^{**}
A x B x C	18	2793712273.2	3.18 ^{**}
Hata	56	877962722.58	

(**) P<0.01 seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.35’de verilmiştir.

Çizelge 4.35. Normal ve kepekli ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Sıcaklık	37°C	45°C	
	161257.38 ^a ±12809.04 (N=28)	127189.23 ^b ±12701.84 (N=28)	
Ekmek Tipi	25°C	4°C	
	117185.77 ^b ±15500.16 (N=28)	38867.05 ^c ± 507.58 (N=28)	
Süre	Normal	Kepekli	
	123246.05 ^a ±10836.35 (N=56)	99003.66 ^b ± 9440.974 (N=56)	
Süre	4	3	5
	159292.93 ^a ±23908.72 (N=16)	134702.84 ^b ±18711.71 (N=16)	131205.12 ^{bc} ±16156.32 (N=16)
	2	6	1
	113092.45 ^{bc} ±18273.34 (N=16)	110644.39 ^c ± 18511.60 (N=16)	86923.40 ^d ±16698.42 (N=16)
Süre	0		
	42012.86 ^e ± 2193.78 (N=16)		

Değişik harfler, ortalamaların p<0.05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir

Çizelge 4.35.’e göre istatistiki olarak 25°C ve 45°C’nin etkisi aynı olmak üzere, ekmeklerin toplam indirgen şeker miktarı üzerine muhafaza sıcaklık derecesinin etkisi bakımından önemli düzeyde (p<0.05) farklılıklar vardır. Ekmeklerde toplam indirgen

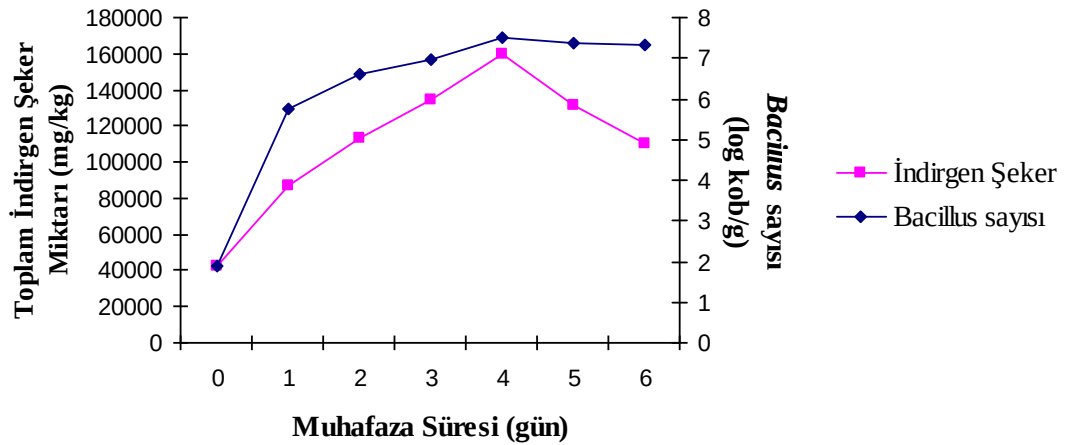
şeker miktarının en yüksek seviyeye (161257.38mg/kg) ulaştığı muhafaza sıcaklığının 37°C olduğu çizelgeden görülmektedir. Genel bir kural olarak enzim konsantrasyonu arttıkça enzim hızı da doğru orantılı bir şekilde artış gösterir (Temiz 1998). Dolayısıyla bu sıcaklıkta *Bacillus* türlerinin gelişimi optimum olduğundan bakteri sayısındaki artışa bağlı olarak salgılanan amilaz miktarı da fazla olmuş ve enzimatik olarak gerçekleşen parçalanma reaksiyonunun hız kazanması daha fazla indirgen şeker oluşumu ile sonuçlanmıştır. Enzim aktivitesi ile sıcaklık arasında çan eğrisi şeklinde bir ilişki olduğundan düşük sıcaklıklara doğru gidildikçe enzimlerin aktivitesi de giderek azalmaktadır (Temiz 1998). 4°C, ekmeklerde amilazın, nişastayı parçalayabilecek ölçüde aktivite gösterebilmesi için oldukça düşük bir sıcaklıktır. Bundan da önemlisi zaten bu sıcaklıkta bakterinin aktivite göstermesi söz konusu olmadığından amilaz salgılaması da mümkün değildir. Bu sebeple toplam indirgen şeker miktarının en düşük (38867.05 mg/kg) olduğu sıcaklık derecesi 4°C olmaktadır. 25°C ve 45°C'nin aynı etkiyi göstermesi de yine enzim aktivitesi-sıcaklık ilişkisinin çan eğrisi şeklinde olması ile açıklanabilir. Eğrinin maksimum noktası 37°C'ye denk geldiğinden 25°C ve 45°C, bu noktanın her iki yanında yaklaşık aynı hizada yer almaktadır. Dolayısıyla enzim aktivitesi bu iki sıcaklıkta aynı seviyede olmakta, nişasta parçalanması da yaklaşık aynı miktarda olmaktadır.

Çizelge 4.35.'deki Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre deneme ekmeklerinin toplam indirgen şeker miktarı üzerine farklı seviyede ($p<0.05$) etki gösterdiği, normal ekmeğe ait değer (117185.77mg/kg), kepekli ekmeğe ait değerden (99003.66mg/kg) yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, normal ekmeğin nişasta miktarının oransal olarak daha fazla olmasından kaynaklanmış olabilir. Enzimatik reaksiyonlarda belirli bir konsantrasyona kadar substrat miktarının artması enzim hızını artırmakta (Temiz 1998), buna bağlı olarak da reaksiyon ürünü fazla olmaktadır.

Çizelge 4.35. muhafaza süresi açısından incelendiğinde toplam indirgen şeker miktarının 4. güne kadar artıp sonra azaldığı, 2, 3, 5 ve 6. günlerin indirgen şeker miktarı üzerine etkisinin aynı olduğu, diğer günlerin etkisinin farklı seviyelerde ($p<0.05$) olduğu görülmektedir. Çok düzensiz bir değişim olduğu düşünülse de bakteri gelişimi, bakterinin enzim salgılaması, enzimin çalışma koşulları gibi faktörler göz

önünde bulundurulduğunda indirgen şeker miktarında gözlenen değişim çok doğal görülmektedir

Şekil 4.16.'da Çizelge 4.8.'deki değerlere göre *Bacillus* sayısı-muhafaza süresi ve Çizelge 4.35.'deki değerlere göre toplam indirgen şeker-muhafaza süresi grafikleri verilmiştir. Her iki grafiğin aslında benzer bir eğilimi olduğu görülmektedir. Her ikisinde de grafik 4. güne kadar artış gösterip sonra azalmıştır. Bu durum indirgen şeker miktarında gözlenen değişimin tamamen *Bacillus* sayısına bağlı olarak şekillendiğini göstermektedir. Şekil 4.16.'da *Bacillus* sayısındaki keskin artış ve azalışlar ise bakterinin enzim salgılama yeteneği, enzim-sıcaklık ilişkisi gibi faktörlere bağlanabilir. Ayrıca indirgen şeker miktarında 4. günden sonra gözlenen azalmanın, daha sonra da açıklanacağı üzere protein parçalanmasına bağlı olarak oransal gerçekleştiği düşünülmektedir. Çünkü tüm diğer koşulların sabit olduğu düşünülürse indirgen şeker miktarında 4. günden sonra azalan bir eğimle artış olması gerekirdi.



Şekil 4.16. *Bacillus* sayısı-toplam indirgen şeker miktarı-muhafaza süresi ilişkisi

Normal ve kepekli ekmeklerde toplam indirgen şeker miktarı değişimini gösteren grafik Şekil 4.17.'de verilmiştir.

Parametrelerdeki genel değişime bakıldığında, düzenli olmamakla birlikte başlangıçta değerlerin arttığı, sıcaklığa bağlı olarak bir süre sonra tekrar düştüğü görülmektedir. Bu durum ise sıcaklığa bağlı olarak bakterilerin protein ve karbonhidratları hidrolize ettiği,

daha sonra mikroorganizmaların hayat evrelerine bağılı olarak bu hidrolizatların bir kısmını kullandığı ve bunun sonucunda, özellikle denemenin son günlerine doğru indirgen şeker miktarlarının tekrar düştüğü görülmektedir. Bu durum, mikroorganizmaların denemenin sonlarına doğru ölüm evresine geldiğı, hidroliz yeteneklerinin azaldığı ancak yaşamlarını sürdürenlerin beslenme ihtiyaçlarını sürdürerek bu maddeleri kullanmış olmaları ile açıklanabilir.

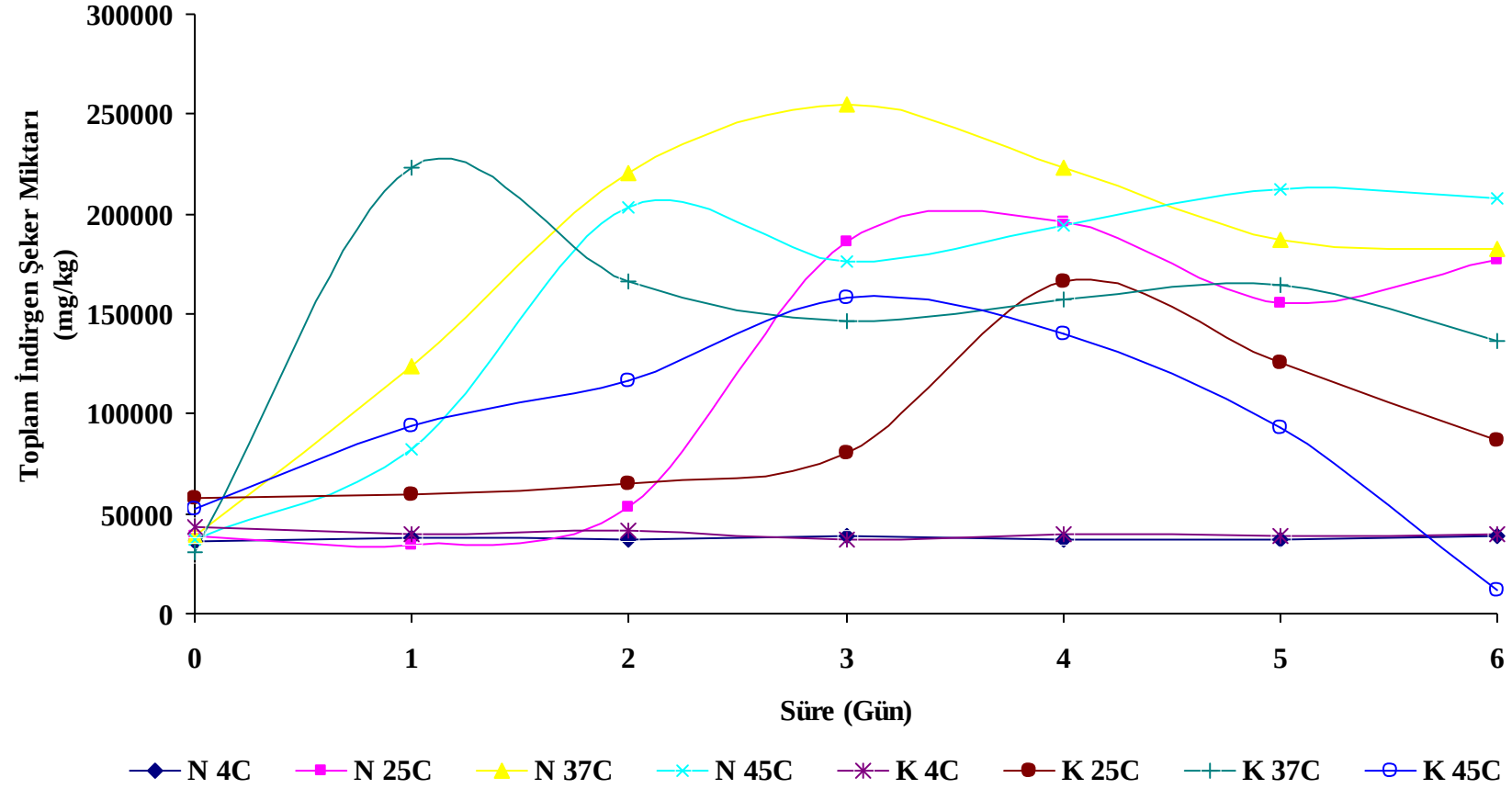
Şekil 4.17.'de 4°C'de muhafaza edilmiş hem normal hem de kepekli ekmeklerde toplam indirgen şeker miktarının muhafaza süresince değişmediğı görülmektedir. Bu sıcaklıkta sünme gerçekleşmediğı için toplam indirgen şeker miktarı da sabit kalmıştır. Bu durum 4°C'de mikroorganizmaların aktivitelerinin durmuş veya çok yavaşlamış olması ile izah edilebilir. Daha önce de belirtildiğı gibi aktivitesi yavaşlayan bakterinin enzim salgılama yeteneğinin azalması ve mevcut enzimin de düşük sıcaklıkta aktivitesinin yavaşlıyor olması indirgen şeker miktarının değişmeme nedenini açıklamaktadır. Çok dar sınırlar içinde gerçekleşen değişim (Bkz. Çizelge 4.33.) her gün farklı bir ekmek kullanılmasından kaynaklanmaktadır.

25°C'de sünme normal ekmeklerde 4. günde başlarken, kepekli ekmeklerde 3. ve 4. gün arasında başlamaktadır. Şekil 4.17.'de indirgen şeker miktarı normal ekmekler için 3. günde, kepekli ekmekler için ise 4. günde maksimum değere ulaşmıştır. Normal ekmeklerde sünme tam olarak başlamadan önce indirgen şeker miktarında gözlenen artış amilazın aktivitesine daha önce başlayıp nişastayı parçaladığının, buna bağılı olarak sünmenin gerçekleştiğinin göstergesidir. Kepekli ekmekte ise bakteri yükünün fazla olması enzim salgılanmasının da daha fazla olmasına dolayısıyla indirgen şeker miktarındaki artışın daha erken başlamasına neden olmaktadır. Her iki ekmekte de muhafazanın ilk günlerinde indirgen şeker miktarı sabit kalmış, sonra aniden artış göstermiştir. Ancak beklendiğı gibi, miktar artışı devam etmeyip azalmıştır. Bu durum nişasta parçalanmasının yanı sıra protein parçalanmasının da gerçekleşmesi ile indirgen şeker miktarında oransal olarak bir azalışa neden olmasından kaynaklanabileceğı gibi indirgen şekerleri mikroorganizmaların kullanmasından da kaynaklanabilir.

Sünme etmeni bakteriler için optimum gelişme sıcaklığı olan 37°C’de, Şekil 4.17.’de kepekli ekmeklerde görülen indirgen şeker miktarındaki hızlı artış, sünmenin birinci günden itibaren başladığının bir göstergesi olabilir. Bakteri yükü ve buna bağlı olarak enzim miktarının fazlalığı ayrıca enzim için optimum koşulların sağlanmış olması nedeni ile indirgen şeker miktarı hızla artmıştır. Ancak substrat miktarının daha az olması ve koşulların proteaz için de uygun olması nedeniyle 1. günden sonra indirgen şeker miktarında azalma başlamıştır. Normal ekmekteki değişim de yine benzer şekilde açıklanabilir. Bu ekmeklerde bakteri yükünün daha az olması nedeni ile indirgen şeker miktarı maksimuma 3. günde erişmiş, daha sonra azalmıştır. Her iki ekmekte de görülen azalma protein hidrolizi sonucu örnek içindeki seyreلمeden ve bakterilerin enerji ihtiyacı için serbest indirgen şekeri kullanmasından kaynaklanmış olabilir.

45°C’de muhafaza edilmiş normal ekmeklerde indirgen şeker miktarı 2. günde, kepekli ekmeklerde ise 3. günde maksimum değere ulaşmıştır. 37°C’de muhafaza edilmiş ekmeklere göre tam ters bir sonucun elde edilmesinin, yani kepekli ekmekteki artışın daha sonra gerçekleşmesinin nedeninin kepekli ekmekte bakteri yükü daha fazla da olsa enzimin optimum çalışma sıcaklığından uzaklaşılması sonucu, normal ekmeğe göre daha az olan substrat ile enzim etkileşmesinin daha uzun zaman almasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer sıcaklık derecelerinden farklı olarak kepekli ekmekte 3. günden sonra gözlenen sürekli azalış protein parçalanması ile birlikte açıklanabilecek bir olaydır.

Tüm sıcaklık derecelerinde toplam indirgen şeker miktarında gözlenen değişimin *Bacillus* yüküne dolayısıyla da sünme gelişimine paralel olarak şekillenmesi bu parametrenin sünme hastalığının takibinde indikatör olarak kullanılabileceğini göstermiştir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.17. Normal ve kepekli ekmeklerde toplam indirgen şeker miktarı değişimi

4.5.2. Ekmeklerin toplam serbest amino asit analizine ait sonuçlar

Çizelge 4.36.'da normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı toplam serbest amino asit analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.36. Normal ve kepekli ekmeklerin toplam serbest amino asit miktarı üzerine muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek (mg/kg)	Kepekli Ekmek (mg/kg)
4	0	1462.671 $\pm$ 27.949	1865.750 $\pm$ 86.112
	1	1367.885 $\pm$ 59.940	1935.062 $\pm$ 41.130
	2	1432.598 $\pm$ 48.541	1766.224 $\pm$ 35.206
	3	1314.040 $\pm$ 171.372	1658.068 $\pm$ 2.464
	4	1193.527 $\pm$ 101.661	1690.513 $\pm$ 65.360
	5	1119.779 $\pm$ 62.341	1730.866 $\pm$ 28.810
	6	1203.509 $\pm$ 60.135	2089.189 $\pm$ 219.728
25	0	1381.351 $\pm$ 8.051	1270.430 $\pm$ 47.436
	1	1499.063 $\pm$ 192.114	1185.518 $\pm$ 30.597
	2	1154.209 $\pm$ 57.191	1119.851 $\pm$ 19.275
	3	1315.423 $\pm$ 37.239	604.867 $\pm$ 8.909
	4	1547.283 $\pm$ 170.706	1356.801 $\pm$ 176.223
	5	2415.871 $\pm$ 77.555	1487.806 $\pm$ 4.141
	6	2046.062 $\pm$ 51.670	1805.081 $\pm$ 814.604
37	0	826.869 $\pm$ 14.387	2347.291 $\pm$ 40.466
	1	630.042 $\pm$ 59.193	3778.588 $\pm$ 3.762
	2	756.650 $\pm$ 40.934	9224.709 $\pm$ 181.253
	3	1068.406 $\pm$ 250.774	18066.204 $\pm$ 377.807
	4	1138.549 $\pm$ 40.076	22358.597 $\pm$ 358.556
	5	6869.242 $\pm$ 751.644	26440.408 $\pm$ 1651.323
	6	7736.957 $\pm$ 1557.951	20245.088 $\pm$ 1487.037
45	0	1324.131 $\pm$ 84.887	1836.231 $\pm$ 100.441
	1	1407.193 $\pm$ 82.805	1674.429 $\pm$ 54.554
	2	2577.186 $\pm$ 132.518	1532.857 $\pm$ 280.892
	3	7748.547 $\pm$ 444.951	2047.780 $\pm$ 31.366
	4	12314.367 $\pm$ 929.525	2436.858 $\pm$ 154.544
	5	14587.911 $\pm$ 2176.173	8522.962 $\pm$ 2150.345
	6	18358.377 $\pm$ 581.510	7561.317 $\pm$ 1713.123

Çizelge 4.37.'de normal ve kepekli ekmeklerin toplam serbest amino asit miktarına ait varyans analizi sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlar, ekmeklerin toplam serbest amino asit içeriğini sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresi ile bunlar arasındaki tüm interaksyonların önemli düzeyde ($p < 0.01$) etkilediğini göstermektedir.

Çizelge 4.37. Normal ve kepekli ekmeklerin toplam serbest amino asit miktarına ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	351494731	427.08 ^{**}
Ekmek Tipi (B)	1	95984160	116.62 ^{**}
Muhafaza Süresi (C)	6	115436565	140.26 ^{**}
A x B	3	351364954	426.92 ^{**}
A x C	18	38446057	46.71 ^{**}
B x C	6	5385774	6.54 ^{**}
A x B x C	18	26043232	31.64 ^{**}
Hata	56	823019	

(**) P<0.01 seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin toplam serbest amino asit miktarı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.38.'de verilmiştir.

Çizelge 4.38. Normal ve kepekli ekmeklerin toplam serbest amino asit miktarı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Sıcaklık	37°C	45°C	
	8677.685 ^a ± 1710.030 (N=28)	5995.010 ^b ± 1067.867 (N=28)	
	4°C	25°C	
	1559.263 ^c ± 58.836 (N=28)	1442.115 ^c ± 92.709 (N=28)	
Ekmek Tipi	Kepekli	Normal	
	5344.262 ^a ± 966.263 (N=56)	3492.775 ^b ± 614.945 (N=56)	
Süre	5	6	4
	7896.855 ^a ± 2156.017 (N=16)	7630.697 ^a ± 1870.817 (N=16)	5504.562 ^b ±1884.130 (N=16)
	3	2	1
	4227.917 ^c ± 1459.931 (N=16)	2445.535 ^d ± 675.219 (N=16)	1684.722 ^e ± 225.036 (N=16)
	0		
	1539.340 ^e ± 113.071 (N=16)		

Değişik harfler, ortalamaların p<0.05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.38.'e göre toplam serbest amino asit miktarı üzerine etkisi bakımından sıcaklık dereceleri arasında istatistiki olarak önemli düzeyde (p<0.05) farklılıklar vardır.

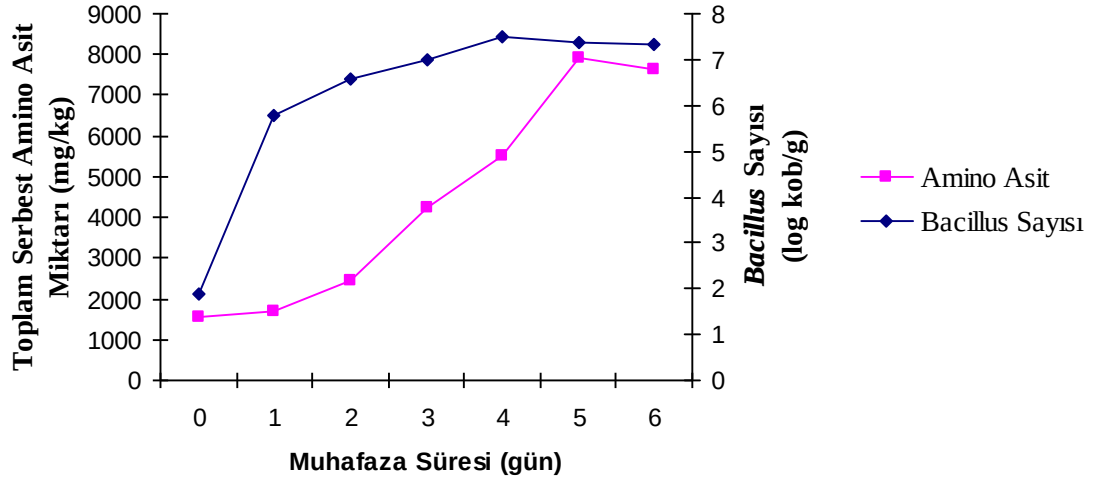
Ancak 4°C ile 25°C'deki ortalama değerler arasında çok az farklılıklar olsa da aslında aynı etkiye sahip oldukları, etkileri arasındaki farkın istatistiki olarak anlamsız olduğu görölmektedir. 37°C'de toplam serbest amino asit miktarı ortalaması (8677.685mg/kg) en yüksek değere ulaşmıştır. Serbest amino asitler ekmelerde bulunan *Bacillus* türlerinin proteaz salgılayarak proteinleri parçalaması ile oluştuğu için bu, beklenen bir sonuçtur. Çünkü bakterinin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık derecesidir. Farklı türlerde *Bacillus*'lardan elde edilen proteazların optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık derecelerinin, kullanılan substrata da bağlı olarak, 40-50°C arasında değiştii bildirilmiştir (Sierecka 1998, Yang vd 2000, Singh vd 2001). En düşük ortalama değer de yine beklendiği gibi 4°C ve 25°C'de elde edilmiştir. Enzimatik bir reaksiyon sonucu oluşması nedeniyle, toplam serbest amino asit miktarı ortalamasının sıcaklık ile değişimi, toplam indirgen şeker miktarının değişiminde yapılan yorumlar ile benzer şekilde açıklanabilir. Enzim-sıcaklık ilişkisinin çan eğrisi şeklinde olması nedeniyle optimum sıcaklıktan saptıkça oluşan reaksiyon ürünün de daha az olması doğaldır.

Toplam serbest amino asit miktarını ekmek tiplerinin farklı şekillerde ($p<0.05$) etkilediği; kepekli ekmeğe ait ortalama değerin (5344.262mg/kg), normal ekmeğe ait değerin (3492.775mg/kg) neredeyse 1.5 katı kadar olduğu Çizelge 4.38.'den görölmektedir. Kepek tabakasının protein içeriğinin (Sidhu vd 1999, Dexter ve Sarkar 2004) ve *Bacillus* yükünün daha fazla olması, kepekli ekmeğin daha çabuk sünmesi bu durumun nedenini açıklamaktadır. Hem enzim hem de substratın fazla miktarda olması, reaksiyonun meydana gelme olasılığını artırmıştır.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (Çizelge 4.38.), muhafaza süresinin toplam serbest amino asit miktarı üzerindeki etkisi bakımından incelenirse, 0-1 ve 5-6. günlerin etkisi aynı olmakla birlikte diğer günlerle karşılaştırıldığında istatistiki olarak tamamen farklı etki ($p<0.05$) gösterdiği görülür.

Şekil 4.18.'de Çizelge 4.8.'deki değerlere göre *Bacillus* sayısı-muhafaza süresi ve Çizelge 4.38.'deki değerlere göre toplam serbest amino asit-muhafaza süresi grafikleri verilmiştir. Muhafazanın 1. gününde *Bacillus* sayısı neredeyse 3 katına çıkarken, amino asit miktarında değişim olmaması (Şekil 4.18.), bakterinin proteaz salgılamasının

hemen başlamadığının göstergesi olabilir. Proteaz miktarı zamanla artmış ve 5. günde serbest amino asit miktarı maksimum değere ulaşmıştır. 6. gün aminoasit miktarında bir azalma söz konusudur. Ancak istatistiki olarak önemsiz olan bu azalışın, nişasta ve protein miktarındaki değişime bağlı nisbi bir azalış olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.18. *Bacillus* sayısı-toplam serbest amino asit miktarı-muhafaza süresi ilişkisi

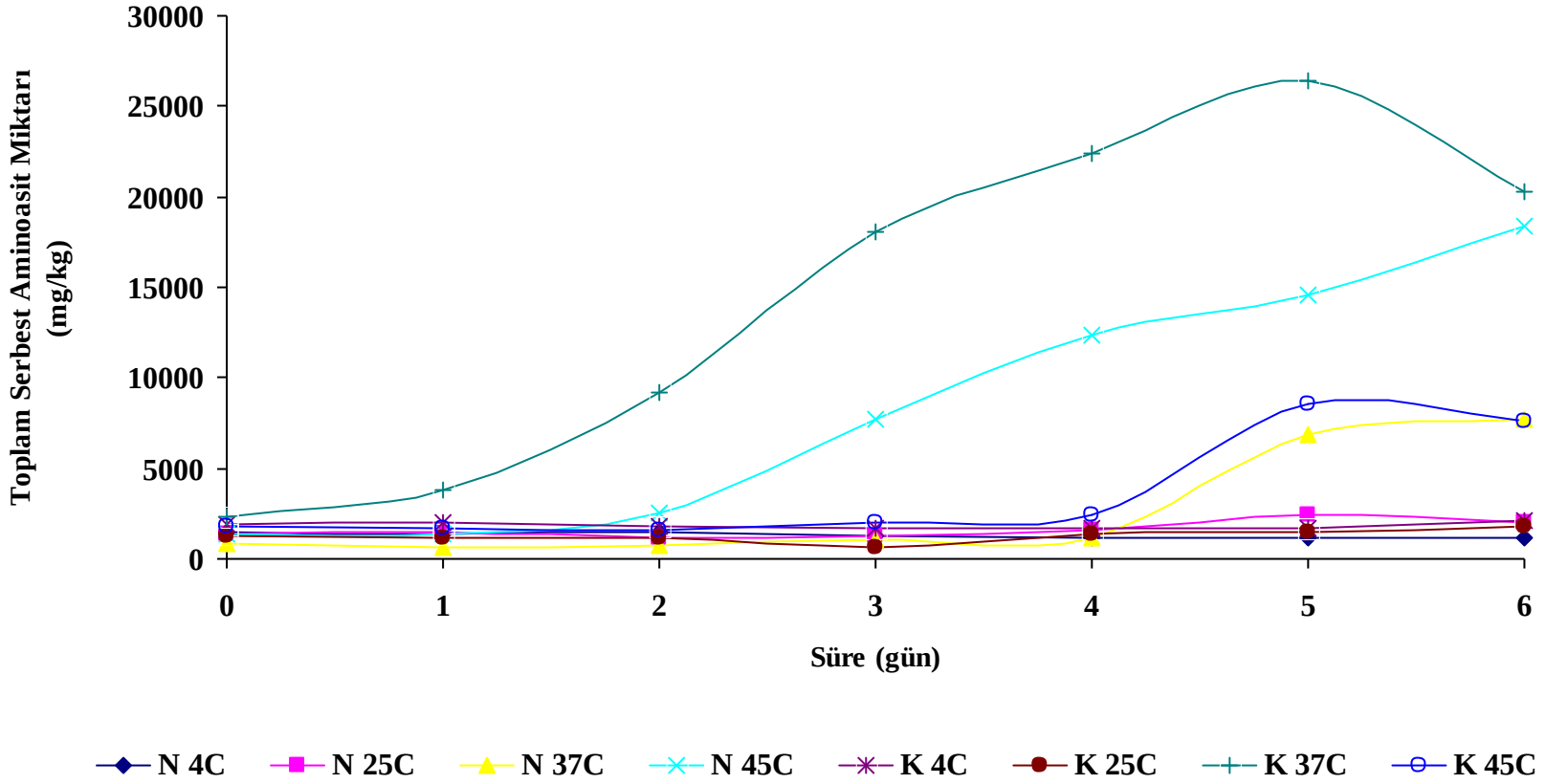
Şekil 4.19.'da normal ve kepekli ekmeklerde toplam serbest amino asit miktarının muhafaza süresine bağlı değişimini gösteren grafik verilmiştir. Grafikteki genel değişime bakıldığında, muhafazanın ilk günlerinde sabit olan serbest amino asit miktarının artışa geçtikten sonra azalma eğilimi gösterdiği görülmektedir. 4°C ve 25°C'de muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklerin serbest amino asit içeriğinde muhafaza süresince herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. 4°C zaten bakterinin faaliyet gösteremediği bir sıcaklık derecesi olduğundan elde edilen sonuç oldukça doğaldır. 25°C'de de herhangi bir değişimin olmaması, bu sıcaklıkta 7 günlük muhafaza süresince proteazın aktive olamadığının ve sünme hastalığının sadece amilaz tarafından nişastanın parçalanmasıyla oluştuğunun bir göstergesi olabilir.

37°C'de muhafaza edilmiş normal ekmekler ile 45°C'de muhafaza edilmiş kepekli ekmeklerde eğilim tamamen aynıdır (Şekil 4.19.). Başlangıçta sabit olan amino asit miktarı 4. günden sonra artmış, 5. günde tepe noktaya ulaşmıştır. Aralarındaki tek fark 45°C'de muhafaza edilmiş kepekli ekmeklerdeki amino asit miktarının biraz daha fazla olmasıdır.

37°C’de muhafaza edilmiş kepekli ekmeklerde proteaz aktivitesi 1. günden itibaren başlamış ve serbest amino asit miktarı da zamanla artarak 5. günde en üst seviyeye ulaşmıştır. 45°C’de muhafaza edilmiş normal ekmeklerde ise amino asit miktarındaki artış 2. günde başlamış ve muhafaza süresince sürekli artmıştır.

Serbest amino asit miktarında meydana gelen değişimi sadece proteaz etkisine bağlı olarak incelemek hata olur. Amilaz etkisi ile nişastanın parçalanması da bağlı olarak amino asit miktarındaki değişimi etkilemektedir. Şekil 4.17.’deki 37°C’de muhafaza edilmiş kepekli ekmeğe ait grafik incelendiğinde indirgen şeker miktarının 1. günde en üst değerine ulaşp sonra azaldığı, Şekil 4.19.’da aynı ekmeğe ait amino asit grafiğine bakıldığında ise başlangıçta sabit olan amino asit miktarının 1. günden sonra artışa geçtiği görülmektedir. Yine benzer şekilde 45°C’de muhafaza edilmiş normal ekmeğe ait indirgen şeker ve aminoasit grafikleri incelenirse, indirgen şeker miktarının 2. güne kadar artıp sonra azaldığı, aminoasit miktarının ise 2. güne kadar sabit kalıp sonra arttığı görülür. İki değişim arasındaki bu zıtlık, aslında aralarındaki uyumun bir göstergesi olarak düşünülebilir. İndirgen şeker miktarının artması sırasında amino asit miktarının sabit kalması, muhtemelen bakterinin amilaz aktivitesinin proteaz aktivitesine göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Bir süre sonra proteaz da baskın hale gelmekte, bu durumda amino asit miktarı artmaktadır. Amino asit miktarındaki artışa bağlı olarak da indirgen şeker miktarında nisbi bir azalış olmaktadır.

37°C’de muhafaza edilmiş normal ekmek ile 45°C’de muhafaza edilmiş kepekli ekmekte indirgen şeker ve amino asit miktarlarında gözlenen değişim biraz daha farklı şekilde açıklanabilir. Her ikisinde de indirgen şeker miktarı 3. güne kadar artıp sonra azalırken, amino asit miktarı 4. güne kadar sabit kalıp sonra artmıştır. Amino asit miktarı değişmeden indirgen şeker miktarının azalışa geçmesi, muhtemelen sözü geçen sıcaklık derecelerinde muhafaza edilmiş ekmeklerde *Bacillus* yükünün daha fazla ve ortam koşullarının daha uygun olması nedeniyle, mevcut besinin 3. günde tükenmesine ve üretilen indirgen şekeri bakterinin besin olarak kullanmasına bağlanabilir. 4. günden sonra proteazın da aktivite göstermesi ile amino asit oluşumuna bağlı nisbi bir azalış hem de indirgen şekerin besin olarak kullanılmasına bağlı azalış gerçekleşmiş olabilir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.19. Normal ve kepekli ekmeklerde toplam serbest amino asit miktarı değişimi

4.5.3. Ekmeklerin kalıntı protein analizine ait sonuçlar

Çizelge 4.39.'da normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı kalıntı protein analizi sonuçları verilmiştir. Elde edilen sonuçlar beklenilenden biraz farklı bir profil sergilemiş, muhafaza süresince azalacağı tahmin edilen kalıntı protein miktarı artış göstermiştir.

Çizelge 4.39. Normal ve kepekli ekmeklerin kalıntı protein miktarı üzerine muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi ($X \pm SE$)

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek (mg/kg)	Kepekli Ekmek (mg/kg)
4	0	890.411 $\pm$ 183.004	1257.993 $\pm$ 261.460
	1	689.084 $\pm$ 34.064	1224.042 $\pm$ 63.075
	2	749.245 $\pm$ 139.645	471.270 $\pm$ 6.349
	3	1010.414 $\pm$ 137.259	571.967 $\pm$ 40.662
	4	764.264 $\pm$ 0.752	1150.680 $\pm$ 50.812
	5	482.840 $\pm$ 0.149	519.822 $\pm$ 36.232
	6	692.187 $\pm$ 120.895	747.068 $\pm$ 36.007
25	0	753.029 $\pm$ 23.866	653.337 $\pm$ 16.767
	1	638.082 $\pm$ 62.739	835.219 $\pm$ 125.501
	2	647.373 $\pm$ 5.099	1289.712 $\pm$ 338.323
	3	811.310 $\pm$ 57.529	852.804 $\pm$ 50.089
	4	999.768 $\pm$ 26.653	2173.161 $\pm$ 15.805
	5	1088.386 $\pm$ 45.692	955.744 $\pm$ 130.047
	6	1272.294 $\pm$ 99.862	2288.094 $\pm$ 804.880
37	0	586.327 $\pm$ 48.213	999.463 $\pm$ 168.579
	1	486.240 $\pm$ 7.514	1987.636 $\pm$ 452.425
	2	782.710 $\pm$ 101.131	2711.069 $\pm$ 112.935
	3	1398.734 $\pm$ 163.160	3611.877 $\pm$ 642.214
	4	2123.035 $\pm$ 132.812	3193.447 $\pm$ 38.436
	5	2774.212 $\pm$ 134.121	3608.296 $\pm$ 13.850
	6	3232.032 $\pm$ 200.099	3883.450 $\pm$ 991.065
45	0	1340.787 $\pm$ 21.755	1047.213 $\pm$ 69.735
	1	1472.908 $\pm$ 78.111	738.869 $\pm$ 153.130
	2	1881.504 $\pm$ 110.446	589.535 $\pm$ 124.578
	3	2181.290 $\pm$ 17.163	851.732 $\pm$ 294.782
	4	1820.243 $\pm$ 313.040	935.221 $\pm$ 61.765
	5	2259.500 $\pm$ 258.390	2716.406 $\pm$ 194.673
	6	2247.147 $\pm$ 376.316	2775.585 $\pm$ 22.619

Muhafaza süresince kalıntı protein miktarında gözlenen artışın nedeninin analiz yönteminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Analizin prensibi, Bradford ayırıcı

içindeki Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının çözeltideki proteine bağlanması ve oluşan protein-boya kompleksinin boyanın maksimum absorpsiyonunu 465nm'den 595nm'ye kaydırmasına dayanmaktadır. Absorpsiyon miktarı da çözeltideki protein miktarı ile orantılı olduğundan protein miktarını belirlemek mümkün olmaktadır (Bradford 1976, Anonymous 2006). Ancak Bradford'un (1976) bildirdiğine göre ayıraç içindeki boyanın bazı temel amino asit ve aromatik amino asitlere bağlanma eğilimi de vardır. Dolayısıyla sünme hastalığı ile birlikte proteazlar tarafından protein parçalandıkça açığa amino asitler de çıkmakta ve ayıraç içindeki boya hem proteine hem de yeni oluşan amino asitlere bağlanmaktadır. Ancak protein miktarında gözlenen artışı sadece buna bağlamamak gerekir. Daha önce de ifade edildiği gibi ekmek içinde bakteri önce amilaz salgılayarak nişastayı parçalamakta, proteaz salgılanması daha sonra başlamaktadır. Nişasta parçalandıkça proteinin bütün içindeki payı artmakta ve miktarı daha fazla olarak tayin edilmektedir.

Normal ve kepekli ekmeklerin kalıntı protein miktarına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.40.'da verilmiştir. Buna göre ekmeklerin kalıntı protein miktarı üç temel varyasyon kaynağı ve bunlar arasındaki sıcaklık derecesi x ekmek tipi, sıcaklık derecesi x muhafaza süresi ve sıcaklık derecesi x ekmek tipi x muhafaza süresi interaksiyonlarına bağlı olarak istatistiki olarak önemli ($p < 0.01$) farklılıklar arz etmektedir. Yalnızca ekmek tipi x muhafaza süresi arasındaki interaksiyonun ekmeklerin kalıntı protein içeriğini istatistiki olarak etkilemediği görülmektedir.

Çizelge 4.40. Normal ve kepekli ekmeklerin kalıntı protein miktarına ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Sıcaklık (A)	3	11288568.14	97.53 ^{**}
Ekmek Tipi (B)	1	2620191.35	22.64 ^{**}
Muhafaza Süresi (C)	6	3174745.54	27.43 ^{**}
A x B	3	3662527.27	31.64 ^{**}
A x C	18	1114916.68	9.63 ^{**}
B x C	6	112311.88	0.97
A x B x C	18	449595.11	3.88 ^{**}
Hata	56	115746.7	

(^{**}) $P < 0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Normal ve kepekli ekmeklerin kalıntı protein miktarı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.41.'de verilmiştir.

Çizelge 4.41. Normal ve kepekli ekmeklerin kalıntı protein miktarı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Sıcaklık	37°C	45°C	
	2241.323 ^a ± 234.976 (N=28)	1632.710 ^b ± 141.650 (N=28)	
	25°C	4°C	
	1089.879 ^c ± 108.254 (N=28)	801.520 ^d ± 53.982 (N=28)	
Ekmek Tipi	Kepekli	Normal	
	1594.311 ^a ± 148.602 (N=56)	1288.405 ^b ± 100.654 (N=56)	
Süre	6	5	4
	2142.232 ^a ± 306.824 (N=16)	1800.650 ^b ± 288.762 (N=16)	1644.977 ^{bc} ± 204.134 (N=16)
	3	2	1
	1411.266 ^c ± 255.577 (N=16)	1140.302 ^d ± 193.616 (N=16)	1009.010 ^d ± 132.120 (N=16)
	0		
	941.070 ^d ± 74.175 (N=16)		

Değişik harfler, ortalamaların p<0.05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

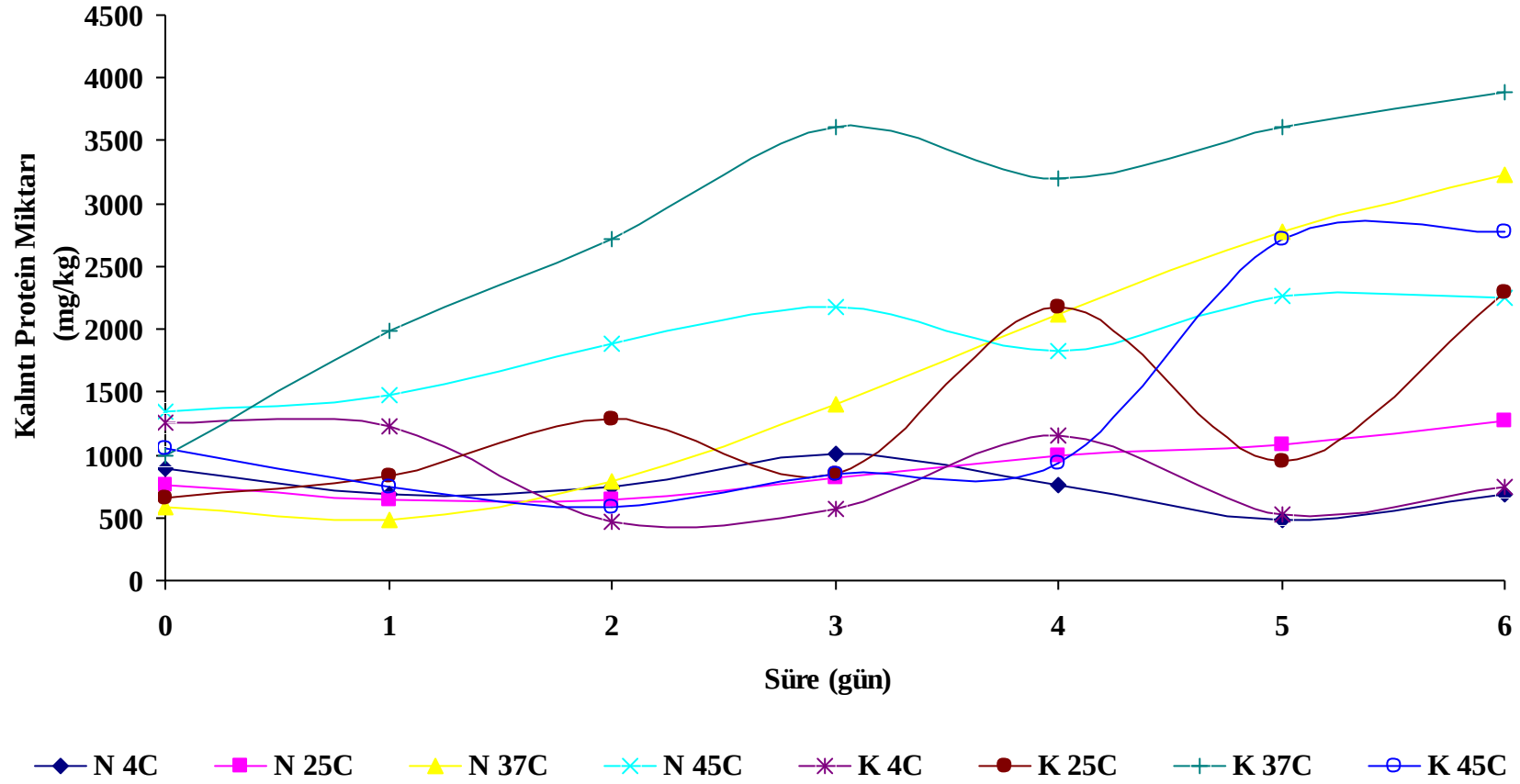
Çizelge 4.41.'den de anlaşılacağı üzere denemede kullanılan muhafaza sıcaklıkları kalıntı protein miktarı üzerine farklı etki (p<0.05) göstermektedir. Sıcaklık derecelerinin kalıntı protein miktarı üzerindeki etkileri sünme oluşturma potansiyellerine göre şekillenmiştir. 37°C'de muhafaza edilen ekmeklerin kalıntı protein miktarı 2241.323mg/kg olup diğer sıcaklıklarda muhafaza edilen ekmeklere ait değerlerden önemli düzeyde (p<0.05) yüksektir. Kalıntı protein miktarının en düşük (801.520mg/kg) olduğu sıcaklık derecesi ise 4°C olarak belirlenmiştir. Sünmenin fazla olduğu sıcaklık derecelerinde hem nişasta parçalanmasına bağlı nisbi artış hem de analiz yönteminin daha önce sözü edilen olumsuz özelliğine bağlı artış ile protein miktarı fazla olarak belirlenmiştir.

Ekmek tiplerinin kalıntı protein miktarı üzerindeki etki düzeyleri de istatistiki olarak önemli seviyede ($p<0.05$) farklı bulunmuştur (Çizelge 4.41.). Kepekli ekmeğin kalıntı protein miktarı ortalaması 1594.311mg/kg, normal ekmeğin kalıntı protein miktarı ortalaması ise 1288.405mg/kg olarak bulunmuştur. Kepekli ekmeğe ait değer istatistiki olarak önemli seviyede ($p<0.05$) yüksektir. Kepek tabakasının protein içeriğinin daha yüksek olması ve kepekli ekmeklerin daha hızlı ve çok sünmesi bu durumun nedenini açıklamaktadır.

Muhafaza süresinin kalıntı protein miktarı ortalaması üzerine etkisi bakımından Çizelge 4.41.'deki Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları incelendiğinde; aynı etkiye sahip günler olmakla birlikte istatistiki olarak farklı seviyede ($p<0.05$) etki gösterdikleri görülmektedir. 0., 1. ve 2. gün ile 3., 4. ve 5. günün etkileri kendi içlerinde aynı ancak diğer günlerle karşılaştırıldığında farklı ($p<0.05$) seviyelerdedir. Günlere ait kalıntı protein miktarı ortalamalarına bakıldığında, sünme ilerledikçe protein miktarının da arttığı anlaşılmaktadır. Bu durum da yine daha önce öne sürülen gerekçeler ile açıklanabilir.

Şekil 4.20.'de normal ve kepekli ekmeklerin kalıntı protein miktarlarındaki değişimi gösteren grafik verilmiştir.

45°C'de muhafaza edilen kepekli ekmeğe ait kalıntı protein (Şekil 4.20.) ve toplam serbest amino asit miktarında (Bkz. Şekil 4.19.) dördüncü güne kadar bir değişim gözlenmemesi o ana kadar proteaz aktivitesinin başlamamış olmasından kaynaklanabilir. 4. günden sonra kalıntı protein miktarının artmasının muhtemel sebebi amilaz faaliyetini engelleyebilecek bir ortam oluşması nedeniyle proteazın aktive olması, buna bağlı olarak da protein parçalanması gerçekleşmesine rağmen nişasta miktarının sabit kalması nedeniyle proteinin nisbi payının artması olabilir. Diğer sıcaklıklarda gözlenen dalgalanmaların ortamda bakterinin kullanabileceği amino asit varken onu kullanması, aksi halde proteinleri parçalayarak besin oluşturması sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 4.20. Normal ve kepekli ekmeklerde kalıntı protein miktarı değişimi

4.6. Sünme Etmeni *Bacillus* Türlerinin Tanılanması

4.6.1. Sünme etmeni *Bacillus* türlerinin tanılanmasına yönelik olarak yapılan biyokimyasal testlere ait sonuçlar

Çizelge 4.42.'de normal, Çizelge 4.43.'de ise kepekli ekmekten izole edilmiş türlere ait biyokimyasal test sonuçları verilmiştir. *Bacillus* türüne uygun oldukları düşünülerek 22'si normal, 19'u kepekli ekmekten izole edilen suşların tamamının Gram pozitif ve çubuk şeklinde oldukları tespit edilmiştir.

Nutrient Agar'da geliştirilen kültürler üzerinde yapılan testte K7 dışındaki tüm türler katalaz pozitif olarak belirlenmiştir. Katalaz negatif olarak belirlenen K7, Chocolate Agar üzerinde geliştirildikten sonra test tekrarlanmış ve bu kez pozitif sonuç elde edilmiştir.

İndol testi, mikroorganizmaların triptofan aminoasitini parçalayarak indol oluşturma yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılır. Genel olarak *Bacillus* türleri indol negatif canlılardır. Bu çalışmada da bu testin sonuçları, ekmeklerden izole edilen tüm türler için negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Negatif indol testi

Çizelge 4.42. Normal ekmekten izole edilen *Bacillus* türlerine ait biyokimyasal test sonuçları

İzolatlar	Gram Boyama	Katalaz	Anaerobik Gelişme	Voges Proskauer	Metil Red	D-Glukoz	L-Arabinoz	D-Ksiloz	D-Mannitol	Glukozdan gaz oluşumu	Kazein Hidrolizi	Jelatin Hidrolizi	Nişasta	Sitrat	Tirozin Degradasyonu	Fenilalanin Deaminasyonu	Egg Yolk	İndol Oluşumu	Dihidroksiaseton Oluşumu	pH 5.7'de Gelişme (Agar)	pH 5.7'de Gelişme (Broth)	5% NaCl	7% NaCl	10% NaCl	20°C	30°C	45°C	55°C	Lizozime Dayanıklılık
N1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	TE	+	TE	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	TE	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N5	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N6	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+
N7	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N8	+	+	-	-	-	+	+	+	d	-	+	+	TE	-	TE	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
N9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N10	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	TE	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N11	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N12	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N13	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N14	+	+	-	+	-	+	d	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N15	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N16	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N17	+	+	-	-	-	+	-	+	+	d	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	+
N18	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N19	+	+	+	+	-	+	+	+	+	d	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N20	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	TE	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
N21	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N22	+	+	-	-	-	a	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

a : Çok az gelişme d: Muhtemelen pozitif TE : Tespit edilemedi

Çizelge 4.43. Kepekli ekmekten izole edilen *Bacillus* türlerine ait biyokimyasal test sonuçları

İzolatlar	Gram Boyama	Katalaz	Anaerobik Gelişme	Voges Proskauer	Metil Red	D-Glukoz	L-Arabinoz	D-Ksiloz	D-Mannitol	Glukozdan gaz oluşumu	Kazein Hidrolizi	Jelatin Hidrolizi	Nişasta	Sitrat	Tirozin Degradasyonu	Fenilalanin Deaminasyonu	Egg Yolk	İndol Oluşumu	Dihidroksiaseton Oluşumu	pH 5.7'de Gelişme (Agar)	pH 5.7'de Gelişme (Broth)	5% NaCl	7% NaCl	10% NaCl	20°C	30°C	45°C	55°C	Lizozime Dayanıklılık
K1	+	+	-	+	-	TE	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	TE	+	-	-	+	-	TE	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
K3	+	+	+	-	-	TE	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
K4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-
K5	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
K6	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
K7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	TE	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
K8	+	+	-	-	-	d	-	+	+	d	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
K9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
K10	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	TE	-	+	+	TE	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K11	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	d	+	+	+	-	+
K12	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	d	+	+	d	+	+	+	-	+
K13	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
K14	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
K15	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
K16	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
K17	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K18	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
K19	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	+

d: Muhtemelen pozitif TE : Tespit edilemedi

Bacillus türlerinin çoğu fenilalanini fenilprüvik asite dönüştürecek enzim aktivitesine sahip değillerdir. Çizelge 4.42. ve Çizelge 4.43.'den de görüldüğü gibi izole edilen tüm türler bu test açısından negatif sonuç vermiştir.

Ekmeklerden izole edilen türlerin inkübasyon sıcaklıklarının belirlenmesi için yapılan testte 20°C, 30°C ve 45°C'de bütün türlerin gelişebildiği, 55°C'de ise gelişme gösteremeyen türler olduğu tespit edilmiştir. 55°C'de yaklaşık 16-18 saatlik inkübasyon süresince N7, N12, N14, N17, N18, N19, N20, N21, N22, K2, K3, K4, K5, K8, K11, K12, K15, K16, K18 ve K19 hiç gelişmezken; N2, N3, N6, N11, N15, K1, K13 ve K14 çok az, N1, N4, N5, N8, N9, N10, N13, N16, K6, K7, K9, K10 ve K17 ise iyi gelişme göstermişlerdir. İnkübasyon süresi biraz daha uzatıldığında (yaklaşık 20-22 saat) çok da farklı bir sonuçla karşılaşılınmamış, zaten gelişme gözlenmiş olan türlerde koloni sayısının çok az arttığı görülmüştür. Termofilik türler 55°C'de optimum olarak 12-16 saatte gelişebildiklerinden inkübasyon süresinin daha fazla uzatılmasının anlamlı olmayacağı düşünülmüştür. 30°C ile 45°C'de bütün türler 16-18 saatte gelişebilmişlerdir. 20°C'de ise ilk 16-18 saatlik inkübasyon sırasında N2, N3, N7, N15, K1, K12, K13, K15 ve K18 çok iyi gelişirken, inkübasyon süresi 24 ve 48 saate uzatıldığında diğer türlerde de gelişme olduğu gözlenmiştir.

Sodyum klorür (NaCl) içeren ortamda gelişme testi sonuçları, seçilen üç farklı tuz konsantrasyonunda (%5, %7 ve %10), inkübasyon süresi değişmek koşulu ile K9 dışındaki tüm türlerin gelişebildiğini göstermiştir. %5 NaCl içeren Nutrient Broth'da tüm türler yaklaşık 24 saat inkübasyon sonunda, %7 NaCl içeren Nutrient Broth'da ise N6 ve N20 48, diğer türler 24 saat inkübasyon sonunda gelişme göstermişlerdir. %10 tuz içeren ortamda ise gelişme farklı günlerde olmuş, bu nedenle inkübasyon 14 güne kadar uzatılmıştır. İlk 24 saat sonunda sadece N1, N10, N13, N16, K10 ve K18 izolatları pozitif olarak değerlendirilmiştir. N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N12, N14, N15, N17, N21, N22, K2, K3, K4, K7 ve K19 2 gün; N11, N18, N20 3 gün, K1, K13, K14, K15, K16, K17 ve standart *Bacillus subtilis* suşları 4 gün; N19 ve K12 5 gün; K8 6 gün; K11 ise 7 gün inkübasyondan sonra gelişme göstermiştir. K11, K12, K13 ve K14'de paralel olarak yapılan ekimlerden yalnızca birinin pozitif sonuç vermesi, bu konuda kesin karar verilmesini güçleştirmiştir. Ancak Sneath'e (1984) göre "suş ya da

hücrelerin %11-89'unun pozitif" olabileceğinin bildirilmesi ve Jock vd'nin (2002) yaptıkları çalışmada kendi izolatları için bu ifadeyi kullanmış olması nedeniyle ekmeklerden izole edilen bu türler, Çizelge 4.43.'de de görüldüğü gibi "muhtemelen pozitif" olarak ifade edilmiştir. Bu çalışmada tanılama ile ilgili olarak yapılmış diğer testlerde de aynı yol izlenmiştir.

MR-VP Broth'da geliştirilmiş kültürler üzerinde Metil Red ve Voges Proskauer testleri yapılmıştır. Metil Red testi sonuçlarına göre ilk etapta N1, N9, N10, N13, N19, K10 ve K17 pozitif olarak değerlendirilirken, 15dk sonra izolatların tamamının negatif reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Voges Proskauer testinde ise N1, N2, N9, N10, N13, N14, N15, N16, N19, N20, K1, K2, K9, K10 ve K17 pozitif, diğerleri negatif sonuç vermiştir. Şekil 4.22.'de pozitif ve negatif sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Pozitif ve negatif Voges-Proskauer testi sonuçları (1.tüp +, 2. tüp -)

Ekmeklerden izole edilmiş olan türlerin oksijen isteklerini belirlemek için Anaerobik Agar'a yapılan ekim sonucunda N1, N9, N10, N13, N16, N19, K2, K3, K7, K9, K10 ve K17 izolatlarının pozitif sonuç verdiği, diğer türlerin gelişemedikleri saptanmıştır. Dolayısıyla gelişme gösterebilen izolatların anaerobik türler oldukları anlaşılmaktadır. Kontrol olarak kullanılan standart *Bacillus subtilis* suşlarının söz konusu agarda gelişmemeleri sonuçların yorumlanmasını kolaylaştırmıştır.

pH 5.7’de gelişme testi brothda yapıldığı zaman N1, N2, N3, N4, N5, N9, N10, N12, N15, N16, N17, N19, N22, K1, K2, K3, K5, K9, K10, K15, K16, K17 ve K18, 1 gün; K13 ve K14, 2 gün; N6, N7, N11, N18, N21, K4 ve K19, 5 gün; N14 ve K12, 6 gün; N13, 7 gün inkübasyondan sonra gelişme gösterirken, N8, N20, K6, K7, K8 ve K11 için inkübasyona 14 gün daha devam edilmesine rağmen negatif sonuç elde edilmiştir. Bunun üzerine aynı test agarda da tekrarlanmış ve 24 saatlik inkübasyon sonunda tüm izolatların pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Sneath’e (1984) göre agar ya da brothdan birinde gelişme görülmesi pozitif değerlendirme için yeterli olduğundan tüm türler pozitif olarak kabul edilmiştir.

Karbonhidrat Fermentasyon Testi için D-glukoz, D-ksiloz, L-arabinoz ve D-mannitol kullanılarak, ekmeklerden izole edilen *Bacillus* cinsine ait türlerin bu karbonhidratları kullanarak asit ve gaz oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiştir. D-glukozu K1 ve K3 dışındaki tüm türler kullanarak asit oluşturmuş ancak gaz oluşumu sadece N16, N17, N19 ve K8 izolatlarının geliştirildiği besiyerlerinde görülmüştür. D-ksilozu tüm türlerin kullandığı tespit edilmiştir. L-arabinozu N7, N17, K3, K8, K11, K12, K13, K14, K15 ve K19 kullanamamıştır. N1, N2, N3, N6, N8, N9, N10, N12, N13, N16, N19, N20, K2, K6, K7, K9, K10 ve K17, 24 saat inkübasyondan sonra L-arabinozu kullanarak besiyeri rengini sarıya çevirirken; N11 ve K4, 7 gün; K1 ve K5, 8 gün; N22 ve K3, 9 gün; N4, N5, N14, N15, N18, N21, K16 ve K18, 10 gün inkübasyondan sonra pozitif sonuç vermişlerdir. D-mannitolde de yine farklı inkübasyon sürelerinde pozitif sonuca ulaşılmıştır. 24 saat sonra pozitif reaksiyon veren türler N1, N2, N3, N9, N10, N13, N16, N19, N20, K2, K6, K7, K9, K10 ve K17’dir. N4, N12, N15, N17, N21, K1, K3, K4 ve K16, 5 gün; N8, K5 ve K15, 7 gün; N6, N7, N11, N22, K8 ve K12, 8 gün; N5, N14 ve N22, 9 gün; K11, K12, K13, K14 ve K19 ise 10 gün inkübasyondan sonra gelişme göstermişlerdir. Mannitollü besiyerinde gelişme gösteremeyen tek izolat K18’dir. Her 4 karbonhidrat için de standart *Bacillus subtilis* suşu 24 saat inkübasyondan sonra pozitif sonuç vermiştir. Şekil 4.23.’de karbonhidrat fermentasyon testine ait pozitif ve negatif tüpler gösterilmiştir.



Şekil 4.23. Karbonhidrat fermentasyon testine ait pozitif ve negatif sonuçlar
(1. tüp +, 2. tüp -)

Nişasta Hidroliz Testi sonuçlarına göre N20 izolatının nişastayı parçalayamadığı tespit edilmiştir. Testin ayırımındaki güçlük nedeniyle N1, N8, N10 ve K2 hakkında net bir karar verilememiş, ancak diğer izolatların olumlu sonuç verdiği belirlenmiştir.

Bakterilerin sitratı karbon, amonyum tuzlarını da azot kaynağı olarak kullanabilme yeteneklerini belirlemek için yapılan sitrat testi sonuçlarına göre pozitif reaksiyon veren izolatlar N1, N2, N3, N4, N22, K2, K6, K7, K9 ve K10'dur. Bunlar arasından K6 ve K7 24 saat; N1, N2 ve K2 7 gün; N22, N3, N4, K9 ve K10 12 gün inkübasyondan sonra besiyeri rengini maviye dönüştürerek olumlu sonuç vermiştir.

Birçok *Bacillus* türünün dihidroksiaseton üretip üretemediği tespit edilememiş, geri kalanların da çoğunun negatif olduğu belirlenmiştir (Sneath 1984). Ancak bu çalışmada ekmeklerden izole edilen türlerin hepsinin pozitif reaksiyon vermesi analizden kaynaklanan bir hata olabileceği fikrini akla getirmektedir.

Çizelge 4.42. ve Çizelge 4.43.'de Kazein Hidrolizasyon Testi sonuçlarına bakıldığında N2 ve K10 izolatları için net bir karara varılamadığı; N3, N10, N19 ve K2 türlerinin negatif reaksiyon verdiği, geri kalan diğer izolatların ise kazeini kullanabildiği yani pozitif sonuç verdiği dolayısıyla proteaz salgılama yeteneğinde oldukları görülmektedir. Şekil 4.24.'de bu teste ait sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Pozitif ve negatif kazein hidrolizasyon testi sonuçları
(1. ve 2. petri +, 3. petri -)

Tirozin hidrolizasyon testi sonuçları N2, N3, N9, N11, N13, N16, N20, K1, K2, K6, K9 ve K17 izolatlarının tirozini parçalama yeteneğinde olmadığını; N1, N8, K7 ve K10 izolatlarının tespit edilemediğini, diğer türlerin pozitif sonuç verdiğini göstermektedir (Çizelge 4.42 ve Çizelge 4.43.).

Jelatin Hidrolizasyon Testi, mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinaz enzimi sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. Bu çalışmada test edilen izolatlardan N1, N9, N10, N13, K2, K9 ve K10'un söz konusu enzimi salgılayamadıkları tespit edilmiştir.

Yumurta sarısı testi ise lesitinaz enzim varlığının tespiti amacıyla yapılır. Bakteri bu enzime sahip ise yumurta sarısını parçalayarak besiyerinde gelişme gösterebilir. Çizelge 4.42. ve Çizelge 4.43.'e göre sadece N1, N2, N9, N10, N13, N16, N21, K2, K9, K10 ve K17 izolatları lesitinaz salgılama yeteneğindedir. Bu test için inkübasyon 14 güne kadar sürdürülmüştür. N1, N2, N16, K10 ve K17, 1 gün; N9, N10, N13, K2 ve K9, 2 gün; N21 ise 4 gün inkübasyondan sonra pozitif sonuç vermiştir.

Lizozim varlığında gelişme testi, sadece N20 ve K4 izolatları için negatif olarak sonuçlanmıştır. Bu testte de olumlu sonuç veren izolatların inkübasyon süreleri farklılık arz etmektedir. N2, N4, N7, N10, N11, N12, N15, N16, N19, N21, N22, K2, K3, K4, K7, K9, K10, K11, K13, K16, K17 ve K18 24 saat sonunda gelişme gösterirken; N1, N3, N5, N9, N13, N18, K14 ve K15 48 saat; N6, N8, N14, N17, K1, K5, K6, K8, K12 ve K19 ise 72 saat sonunda gelişebilmişlerdir.

4.6.2. Biyokimyasal testler ve API (Analitik Profil İndeksi) kitleri sonuçlarına göre izole edilen türlerin tanılanması

Bu tez çalışmasında, tanılama işleminin hem klasik yöntemlerle (biyokimyasal testler) hem de API kitleri ile yapılmasının nedeni, her iki yöntemle elde edilen sonuçları karşılaştırıp aralarında uyum olup olmadığını belirlemektir. Collins vd (1991) her iki yöntemin de çoğu zaman güvenilir olduğunu ancak bazı durumlarda ikisinin de hatalı sonuç verebileceğini bildirmiş; *Bacillus* türlerinin önemli ölçüde heterojen olması nedeniyle uygulanan biyokimyasal testlerin yeterince tekrarlanabilir olmadığını, anahtar çizelgeler ile tipik türlerin ayrımının kolay olduğunu ancak atipik ya da ara türlerin tanılanmasında zorluklarla karşılaşıldığını, bu durumlarda API kitlerinin daha güvenilir sonuç verdiğini ifade etmişlerdir. Fakat kendi yaptıkları çalışmada birinin diğerinden daha güvenilir olduğunu düşündürebilecek bir sonuç elde edemediklerini belirtmişlerdir. Nitekim yaptıkları çalışmada standart suşların bazılarının klasik yöntem bazılarının da API kitleri ile yanlış olarak tanılandığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda 22'si normal, 19'u kepekli ekmekten elde edilen toplam 41 izolat hem biyokimyasal testler hem de API kitleri ile tanılanmıştır. Biyokimyasal testlere göre tanılama, Çizelge 4.42. ve Çizelge 4.43.'de verilen test sonuçlarının Ek 3.'deki çizelge ile karşılaştırılarak en iyi uyum sağlayan türün belirlenmesi suretiyle yapılmıştır. Bu testlerde %100 uyum sağlamak söz konusu değildir. Dolayısıyla yapılan karşılaştırmada karşıt testler belirlenmiş, çalışmamızdaki testlerle karşıtlığı en az olan türün seçilmesi yoluna gidilmiştir. Çizelge 4.44.'de biyokimyasal testlerle yapılan tanılamada karşıtlık arz eden testler verilmiştir. API kitleri ile tanılama ise bilgisayar destekli olarak yapılmakta, yine biyokimyasal testlerdekine benzer bir yol izlenmekte, ancak program, olasılık hesabını yaparak test sonucunu belli bir % ile vermektedir. Bu % ölçüsünde de sonuçların yorumunu “mükemmel tanılama”, “çok iyi tanılama”, “iyi tanılama” ya da “kabul edilebilir profil” gibi 4 ana başlık altında yapmaktadır. Bunların dışında “cins bazında tanılama”, “güvenilir olmayan tanılama”, “şüpheli tanılama” ve “kabul edilemez profil” gibi seçenekler de mümkündür.

Çizelge 4.44. Biyokimyasal testlerle tanılamada karşılık arz eden testler

İzolatlar	Tür	Karşıt Testler
N1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Jelatin Hidrolizi, Yumurta Sarısı
N2	<i>Bacillus subtilis</i>	Yumurta Sarısı
N3	<i>Bacillus subtilis</i>	Kazein Hidrolizi
N4	<i>Bacillus subtilis</i>	Tirozin Degradasyonu
N5	<i>Bacillus megaterium</i>	-
N6	<i>Bacillus subtilis</i>	Tirozin Degradasyonu
N7	<i>Bacillus megaterium</i>	-
N8	<i>Bacillus megaterium</i>	-
N9	<i>Bacillus coagulans</i>	Yumurta Sarısı
N10	<i>Bacillus licheniformis</i>	Jelatin Hidrolizi, Kazein Hidrolizi
N11	<i>Bacillus subtilis</i>	Sitrat
N12	<i>Bacillus subtilis</i>	Tirozin Degradasyonu, Sitrat
N13	<i>Bacillus coagulans</i>	Yumurta Sarısı
N14	<i>Bacillus subtilis</i>	Tirozin Degradasyonu, Sitrat
N15	<i>Bacillus subtilis</i>	Tirozin Degradasyonu, Sitrat
N16	<i>Bacillus subtilis</i>	Yumurta Sarısı, Sitrat
N17	<i>Bacillus megaterium</i>	Sitrat
N18	<i>Bacillus megaterium</i>	Sitrat
N19	<i>Bacillus licheniformis</i>	Kazein Hidrolizi
N20	<i>Bacillus pumilus</i>	Sitrat
N21	<i>Bacillus subtilis</i>	Tirozin Degradasyonu, Sitrat
N22	<i>Bacillus subtilis</i>	Tirozin Degradasyonu
K1	<i>Bacillus subtilis</i>	Sitrat
K2	Tanılanamadı	*
K3	Tanılanamadı	*
K4	<i>Bacillus subtilis</i>	Voges-Proskauer, Sitrat
K5	<i>Bacillus subtilis</i>	Sitrat
K6	<i>Bacillus subtilis</i>	-
K7	<i>Bacillus licheniformis</i>	-
K8	<i>Bacillus megaterium</i>	Sitrat
K9	<i>Bacillus licheniformis</i>	Jelatin Hidrolizi
K10	<i>Bacillus licheniformis</i>	Jelatin Hidrolizi
K11	<i>Bacillus megaterium</i>	Sitrat
K12	<i>Bacillus megaterium</i>	Sitrat
K13	<i>Bacillus megaterium</i>	Sitrat
K14	<i>Bacillus megaterium</i>	Sitrat
K15	<i>Bacillus subtilis</i>	Sitrat
K16	<i>Bacillus subtilis</i>	Voges-Proskauer, Sitrat
K17	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sitrat
K18	<i>Bacillus subtilis</i>	Voges-Proskauer, Sitrat
K19	<i>Bacillus megaterium</i>	Sitrat

* Karşıt test çokluğu nedeniyle karar verilemedi

Bu çalışmada bazı izolatlar her iki yöntemle de aynı tür olarak belirlenirken, bazı izolatların tanılama sonuçları önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Çizelge 4.45.'de biyokimyasal testler ve API kitleri ile yapılan tanılama sonuçları verilmiştir.

Ekmeklerden elde edilen 41 izolattan 13 tanesi her iki yöntem ile de aynı tür olarak belirlenmiştir. Bunlardan 6'sı *B. licheniformis*, 4'ü *B. megaterium*, 2'si *B. subtilis*, 1'i *B. pumilus*'tur. Ancak biyokimyasal testler ile *B. megaterium* olduğu saptanan izolatlar, API kitleri yardımıyla "muhtemelen *B. megaterium*" olarak tanılanmıştır.

İzolatlardan 18 tanesinin tanısı yalnızca biyokimyasal testlerle yapılabilmiş, 1 tanesi (K3) ise ne biyokimyasal testlerle ne de API kitleri ile tanılanabilmiştir. Biyokimyasal testler yardımıyla API ile tanılanamayan bu 18 izolattan 11 tanesi *B. subtilis*, 6 tanesi *B. megaterium*, 1 tanesi *B. coagulans* olarak belirlenmiştir. Biyokimyasal testlerle *B. subtilis* (K1) ve *B. licheniformis* (K7) olarak tanılanan izolatlar ise API kitleri ile sadece cins bazında tanılanabilmiştir.

Bacillus türlerinin klasik yöntemlerle ayırt edilmesi, özellikle de tek bir karakter (test) açısından farklılık gösteren türlerde oldukça zordur. Örneğin *B. subtilis* ve *B. pumilus* sadece nişastayı hidrolize etme yetenekleri ile birbirlerinden ayrılırlar. Dolayısıyla bu testin yorumunda yapılabilecek bir hata tanılama sonucunu tamamen değiştirecektir (Collins vd 1991, Thompson vd 1993). Yine benzer olarak *B. subtilis* ve *B. licheniformis* anaerobik ortamda gelişme özelliklerine göre birbirlerinden ayırt edilirler. Yapılabilecek deneysel bir hata, örneğin, ekim ve inkübasyon sırasında anaerobik ortamın sağlanamaması, aerobik gelişmeye olanak tanır ve testin sonucu bu hata ile birlikte pozitif olarak belirlenir. Ayrıca bir suş mutasyon ya da plazmid kaybı ile anaerobik agarda gelişme yeteneği kazanabilir veya bu yeteneğini kaybedebilir (Collins vd 1991). Nitekim Collins vd (1991) yaptıkları araştırmada izole ettikleri 10 bakteri türünü biyokimyasal testler ile *B. subtilis*, API kitleri ile *B. licheniformis*; 10 tanesini de biyokimyasal testler ile *B. licheniformis*, API kitleri ile *B. subtilis* olarak tanılamışlardır.

Çizelge 4.45.'den de görüldüğü gibi suşlardan 2'si (N3 ve N6) biyokimyasal testler ile *B. subtilis* olarak tanılanırken, API kitleri ile *B. pumilus* olarak tanılanmıştır. Collins

vd (1991) de snm ekmek, ekmek hammaddeleri ve fırın ekipmanlarından elde ettikleri izolatlardan 9 tanesini biyokimyasal testler ile *B. subtilis*, API kitleri ile *B. pumilus* olarak tanılamışlardır.

Çizelge 4.45.'e göre N9 ve N13 biyokimyasal tetlerle *B. coagulans* olarak tanılanmasına rağmen, API kitleri ile N9 tanılanamamış, N13 ise *B. licheniformis* olarak tanılanmıştır. Bunun nedeni *B. coagulans*'ın Ek 3'de de görüldüğü gibi klasik yöntemlere dayalı pek çok test sonucunun %11-89 oranında pozitif (d) olmasıdır. Bu durumda sonuçlar pozitif olarak değeriendirildiğinde *B. licheniformis*'ten ayırt edilmesi oldukça zordur. Thompson vd'nin (1993) bildirdiğine göre Thompson (1992) de yayınlanmamış bir çalışmasında biyokimyasal testlerle yaptığı tanılamada *B. coagulans* ile *B. licheniformis*'i ayırt edememiştir.

Bacillus türlerinin klasik yöntemlerle tanılanmasında en çok sıkıntı yaratan iki tür *B. subtilis* ile *B. amyloliquefaciens*'dir. Hatta biyokimyasal testler ile bunların ayırt edilmesi imkansızdır. Bu türlerin API kitleri ile de net olarak ayırt edilemediğii, sadece inulinden asit oluşturma testi açısından farklılık gösterdikleri ve zincir uzunluklarının da birbirlerinden farklı olduğı bildirilmiştir (Logan ve Berkeley 1984). Fritze (2002) *B. amyloliquefaciens*'in *B. subtilis*'e göre laktozdan asit üretiminin daha hızlı, glukonat kullanımının ise daha yavaş olduğunu, iki türün ayırt edilmesinde sadece bu özelliklerden yararlanılabileceğini, ancak net bir ayırım için moleküler yöntemlere başvurulması gerektiğini bildirmiştir.

Çizelge 4.45.'den görüldüğü üzere biyokimyasal test sonuçlarında *B. amyloliquefaciens*'e rastlanmazken, API kitleri ile yapılan tanılama sonucunda söz konusu tür *B. subtilis* ile birlikte verilmiştir. Laktozdan asit üretimi ve glukonat kullanımı testlerinin Ek 6'da verilen sonuçlarına bakıldığında laktoz testinin yapıldığı 29 numaralı tüpün N2 ve K15 izolatları için pozitif, K6 izolatı için ise negatif; glukonat testinin ise (47 numaralı tp) 3 izolat için de negatif olarak değeriendirildiğii görülmektedir. Bu durumda N2 ve K15 izolatlarının laktozu daha erken kullanmış olması sebebiyle, bu izolatların *B. amyloliquefaciens*, K6 izolatının ise *B. subtilis* olduğı söylenebilir.

Çizelge 4.45. Biyokimyasal testler ve API kitleri ile yapılan tanılama sonuçları

İzolatlar	Biyokimyasal testler	API CH
N1	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N2	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
N3	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
N4	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N5	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
N6	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
N7	<i>Bacillus megaterium</i>	Muhtemelen <i>Bacillus megaterium</i>
N8	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N9	<i>Bacillus coagulans</i>	Tanılanamadı
N10	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N11	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N12	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N13	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N14	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N15	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N16	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N17	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
N18	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
N19	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N20	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
N21	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N22	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
K1	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
K2	Tanılanamadı	<i>Bacillus licheniformis</i>
K3	Tanılanamadı	Tanılanamadı
K4	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
K5	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
K6	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
K7	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
K8	<i>Bacillus megaterium</i>	Muhtemelen <i>Bacillus megaterium</i>
K9	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
K10	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
K11	<i>Bacillus megaterium</i>	Muhtemelen <i>Bacillus megaterium</i>
K12	<i>Bacillus megaterium</i>	Muhtemelen <i>Bacillus megaterium</i>
K13	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
K14	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
K15	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
K16	<i>Bacillus subtilis</i>	Muhtemelen <i>Bacillus thuringiensis</i>
K17	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
K18	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
K19	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı

Şekil 4.25.'de bazı izolatlara ait API 20 E ve API CH striplerinin inkübasyon öncesi ve sonrasındaki resimleri gösterilmiştir.



4.25.a) İnkübasyon öncesi API 20 E,



4.25.b) İnkübasyon sonrası API 20 E



4.25.c) İnkübasyon öncesi API CH



4.25.d) İnkübasyon sonrası API CH

Şekil 4.25. İnkübasyon öncesi ve sonrasında API 20 E ve API CH stripleri

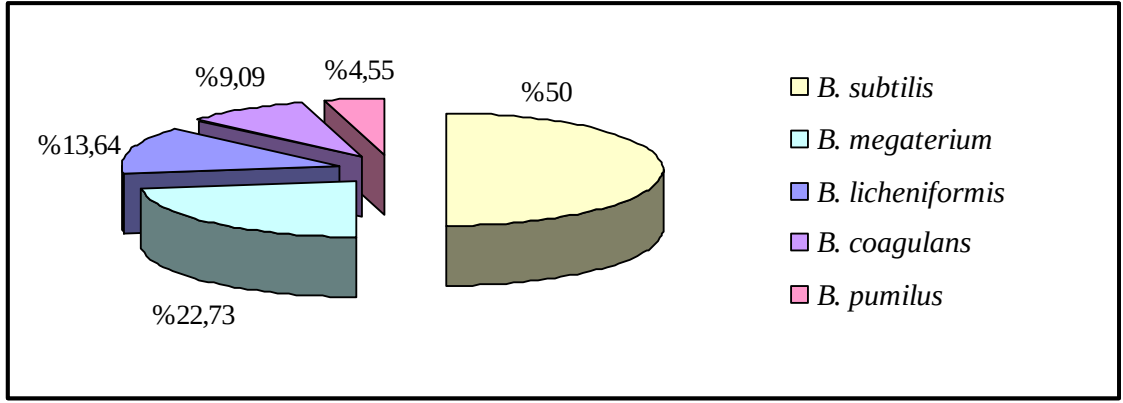
Şekil 4.26.'de biyokimyasal testler ile Şekil 4.27.'de ise API kitleri ile tanılaması yapılmış normal ekmekten elde edilen 22 izolatın % dağılımı verilmiştir. Dağılımlara bakıldığında her iki yöntem arasında göz ardı edilemeyecek derecede farklılık olduğu görülmektedir. Biyokimyasal testler ile yapılan tanılamada izolatların sayıca yarısı, yani %50'si *B. subtilis* olarak saptanırken, API kitleri ile yapılan tanılama sonucunda *B. subtilis/amyloliquefaciens*'in %4,55 oranında bulunduğu saptanmıştır. Bu durum, API kitleri ile izolatların yaklaşık %55'inin tanılanamamış olmasına karşın, aynı

izolatların çok büyük bir kısmının (Bkz. Çizelge 4.45.) klasik yöntemlerle *B. subtilis* olarak tanınmasından kaynaklanmaktadır.

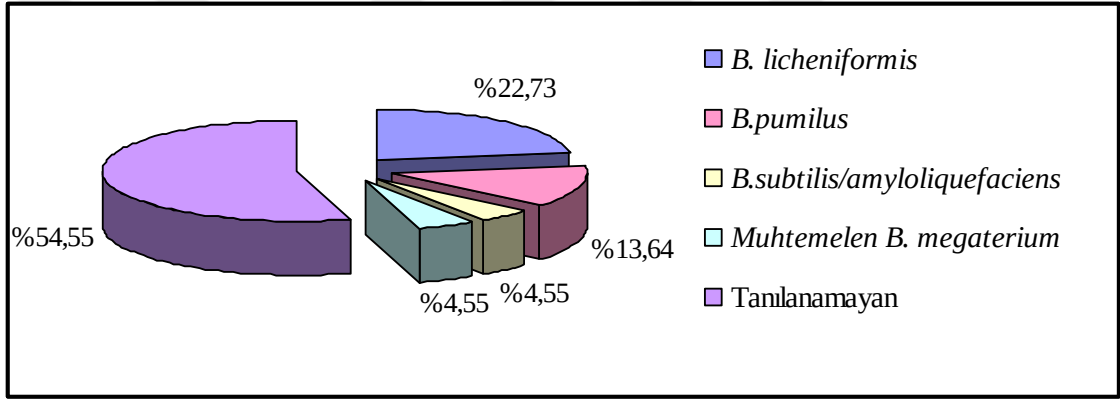
Pepe vd (2003) sünmüş ekmekten elde ettikleri 61 izolatın tamamını biyokimyasal testler ile *B. subtilis* olarak tanılamış, ancak moleküler yöntemleri kullandıklarında durumun böyle olmadığını, diğer türlerin de bulunduğunu belirlemişlerdir. Sorokulova vd (2003) ise sünmüş ekmekten izole ettikleri türleri klasik yöntemlerle tanılamış ve izolatların %50'sinin *B. licheniformis* olduğunu, bunun dışında *B. subtilis* ve *B. megaterium*'un bulunduğunu ancak *B. megaterium*'a test edilen ekmeklerden yalnızca birinde rastlandığını bildirmişlerdir. Rosenkvist ve Hansen (1995) buğday, ekmek hammaddeleri, normal ve sünmüş ekmekten *Bacillus* türlerini izole etmiş, klasik yöntemlerle *Bacillus* olduğunu doğruladıktan sonra API CH ile tanılamış ve sünmüş ekmekte sadece *B. subtilis* olduğunu belirlemişlerdir. Collins vd (1991) yaptıkları tanılamada, en çok bulunan türü hem biyokimyasal testler (%63.7) hem de API CH kitleri (%40.8) ile *B. subtilis* olarak belirlemişlerdir. Ayrıca API CH ile %17.4 oranında da *B. amyloliquefaciens* bulunduğunu saptamışlardır. Yapılmış olan bu çalışmalar da dikkate alındığında klasik testlerle ayırt etmenin zorluğunun göz ardı edilemeyeceği açıktır.

Daha önce belirtilen gerekçeler doğrultusunda N2 izolatının *B. amyloliquefaciens* olduğu düşünülürse, Şekil 4.27.'da %4.55 oranında *B. subtilis/amyloliquefacies* olarak gösterilen türün aslında sadece *B. amyloliquefaciens* olduğu anlaşılır.

B. megaterium açısından da durum *B. subtilis* ile benzerlik arz etmektedir. Şekil 4.26.'da %22.73 olarak görülen değer, Şekil 4.27.'de %4.55'dir. Daha önce de açıklandığı gibi klasik yöntemlerle *B. coagulans*'ı *B. licheniformis*'ten ayırt etmenin zorluğu nedeniyle, bu türe sadece Şekil 4.26.'da rastlanmaktadır. *B. licheniformis* ve *B. pumilus*'a bakıldığında ise tam ters bir durumla karşılaşmakta, Şekil 4.27.'deki %'lik dilimin daha fazla olduğu görülmektedir. Bu da yine biyokimyasal testlerle *B. subtilis*'i *B. licheniformis* ve *B. pumilus*'tan ayırt etmenin zorluğundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.26. Biyokimyasal testler ile tanılaması yapılmış normal ekmekten elde edilen izolatların % dağılımı



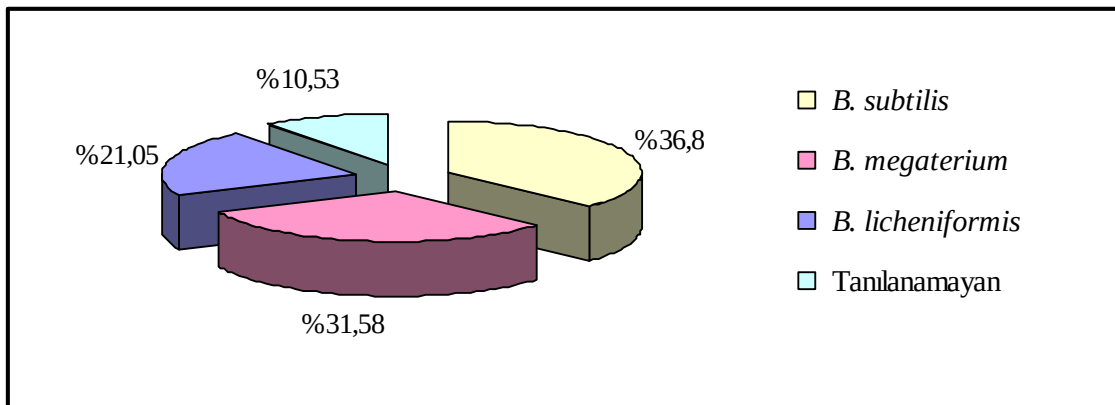
Şekil 4.27. API kitleri ile tanılaması yapılmış normal ekmekten elde edilen izolatların % dağılımı

Şekil 4.28.'de biyokimyasal testler ile Şekil 4.29.'da ise API kitleri ile tanılaması yapılmış kepekli ekmekten elde edilen 19 izolatın % dağılımı verilmiştir. Klasik yöntemlerle yapılan tanılama sonuçlarına göre baskın türün normal ekmekteki gibi *B. subtilis* (%36.84) olduğu, bunu sırasıyla *B. megaterium* (%31.58) ve *B. licheniformis*'in (%21.05) izlediği görülmektedir. Tanılanamayan izolatlar ise %10.53'lük dilimi oluşturmaktadır. Şekil 4.29. incelendiğinde tanılanamayan izolatların yine büyük bir %'yi oluşturduğu, baskın türün ise *B. licheniformis* (%21.05) olduğu görülmektedir. "Muhtemelen *B. megaterium*" olarak tanılanan türlerin %'si ise 15.79'dur. %10.53'lük kısım sadece cins bazında tanılanırken,

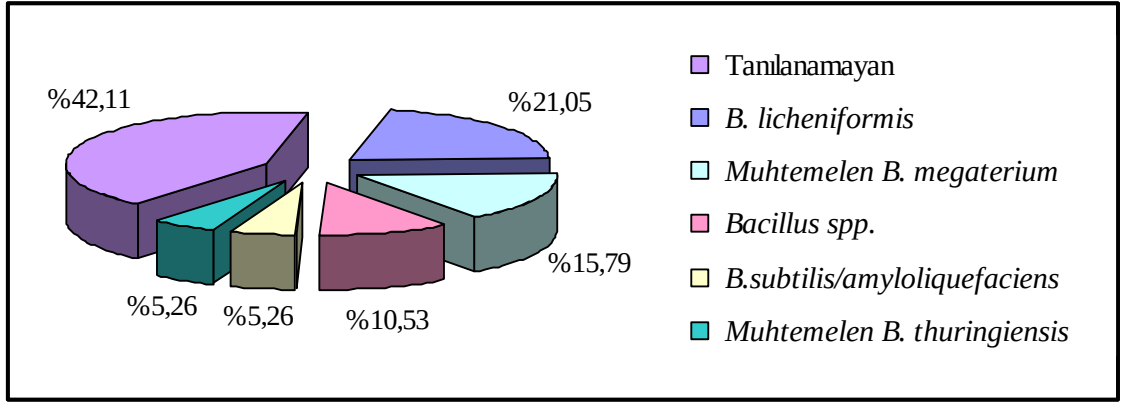
B. subtilis/amyloliquefaciens ve “muhtemelen *B. thuringiensis*” eşit oranlarda olup %5.26’lık dilime sahiptirler.

Pepe vd (2003) de sünmüş ekmekten izole ettiği türleri biyokimyasal testlerle tanımlarken tüm türleri *B. subtilis* olarak belirlemiş ancak moleküler yöntemlerle yaptığı tanılamada *B. thuringiensis*’in bulunduğunu da saptamışlardır. Bailey ve von Holy (1993) ise ekmek hammaddeleri, hamur, esmer ekmek ve gıda temas yüzeylerinden *Bacillus* türlerini izole etmiş, klasik yöntemlerle tanılamış ve esmer ekmekte bulunan türlerin *B. subtilis* (%58.7), *B. licheniformis* (%31), *B. pumilus* (%6.8) ve *B. megaterium* (%3.5) olduğunu belirlemişlerdir.

Normal ve kepekli ekmekler arasında bir karşılaştırma yapıldığında kepekli ekmekte *B. pumilus*’un buna karşılık normal ekmekte de *B. thuringiensis*’in olmadığı görülür. Her iki tip ekmekte de baskın tür, biyokimyasal testlerle yapılan tanılamada *B. subtilis*, API kitleri ile yapılan tanılamada ise *B. licheniformis* olarak belirlenmiştir. Biyokimyasal testler sonucu, normal ve kepekli ekmekler için sırasıyla *B. megaterium* %22.73 ve %31.58, *B. licheniformis* %13.64 ve %21.05; API testi sonucuna göre ise *B. megaterium* %4.55 ve %15.79, *B. licheniformis* %22.73 ve %21.05 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Leuschner vd (1998) esmer ekmekten *B. subtilis* ve *B. licheniformis*’e ilaveten *B. pumilus*’u da izole etmişlerdir.



Şekil 4.28. Biyokimyasal testler ile tanılaması yapılmış kepekli ekmekten elde edilen izolatların % dağılımı



Şekil 4.29. API kitleri ile tanılaması yapılmış kepekli ekmekten elde edilen izolatların % dağılımı

4.7. Tanısı Yapılan *Bacillus* Türlerinin Sündürme Kapasitelerinin Doğrulanması

Ekmeklerden izole edilen türlerden gerçekten hangisi ya da hangilerinin sünme hastalığına neden olduğunu belirlemek için yapılan doğrulama testi sonuçları Çizelge 4.46.'da verilmiştir. Doğrulama testi için *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* ve *B. thuringiensis*'in ikili, üçlü, dörtlü ve beşli kombinasyonları piştikten sonra otoklavlanarak steril hale getirilen ekmek dilimlerine aşılınmış, ekmeklerde 37°C'de muhafaza sırasında sünme hastalığının oluşup oluşmadığı incelenmiştir.

Çizelge 4.46.'dan da görüldüğü üzere 24 saatlik muhafaza sonrasında ekmeklerin hiçbirinde görsel olarak sünme hastalığı oluşmamıştır. Ancak hastalığın belirtilerinden olan kötü koku oluşumu hissedilir düzeydedir. 2. gün bütün ekmeklerde sünme gözlenmesi test edilen tüm türlerin hastalığı oluşturduğunun göstergesidir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak sünmeye neden olan türleri Rosenkvist ve Hansen (1995) ile Leuschner vd (1998) sadece *B. subtilis*, Sorokulova vd (2003) *B. subtilis* ve *B. licheniformis* olarak belirlemişlerdir. Collins vd (1991) ise bir doğrulama testi yapmamış ancak yaptıkları çalışmada sünmüş ekmekte bulunma %'si en fazla olan türlerin (*B. subtilis* ve *B. licheniformis*) sünme etmeni en önemli türler olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer olarak Thompson vd (1998) sünmeye neden olan türleri *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* ve *B. pumilus* olarak belirlemiş, ayrıca *B. polymyxa*'nın sündürme kapasitesinin düşük

seviyede olduğunu saptamışlardır. Pepe vd (2003) ise sünmüş ekmekten izole ettikleri 61 *B. subtilis*'in 37'sinin sünme yaptığını belirlemişlerdir.

Çizelge 4.46.'da görülen ilave her bir “+” işareti sünmenin biraz daha ilerlemiş olduğunu göstermektedir. Çizelgede 2. güne ait sonuçlar incelendiğinde *B. licheniformis*'in tek başına sünme oluşturma potansiyeli düşük iken başka bir bakteri ile birlikte çalıştığında ekmeklerde oluşan sünmenin nispeten daha fazla olduğu görülür. Bu durumun muhtemel iki sebebi olabilir. Birincisi *B. licheniformis*'in adaptasyon sürecinin uzun olması nedeni ile sünme oluşturmalarının uzun zaman alması, ikincisi ise tek başına sündürme yeteneği az olmasına rağmen diğer türlerle sinerjistik etki göstermesidir. Çizelgede tam ters bir durum da söz konusudur. Şöyle ki örneğin *B. subtilis*'in tek başına sündürme yeteneği yüksek iken *B. licheniformis* ile kombine halde bulunduğu bu yeteneğinde azalma gözlenmiştir. Bu da *B. licheniformis*'in *B. subtilis*'in etkisini baskılayabileceğini düşündürmektedir.

Genel olarak *B. licheniformis*'in bulunduğu kombinasyonlarda sünmenin daha az olduğu, ancak *B. licheniformis* ile *B. megaterium* birlikte bulunduğu sünmenin nispeten daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, bu bakteri türleri arasındaki sinerjistik etkiye işaret sayılabilir.

B. thuringiensis'in sünme yaptığını bildiren bir çalışmaya rastlanmamasına rağmen bizim çalışmamızda bu bakterinin de sünme yaptığı belirlenmiştir. Farklılığın nedeni *B. cereus* alt grubu içinde yer alan (Pepe vd 2003) bu türün “muhtemelen *B. thuringiensis*” olarak tanılanması olabilir. Sünme yapabildiği bildirilen *B. cereus* (Thompson vd 1993) ile karışma, ihtimal dahilindedir. Şekil 4.30.'da her bir tür ve bunların beşli kombinasyonlarının doğrulama sonuçları gösterilmiştir.

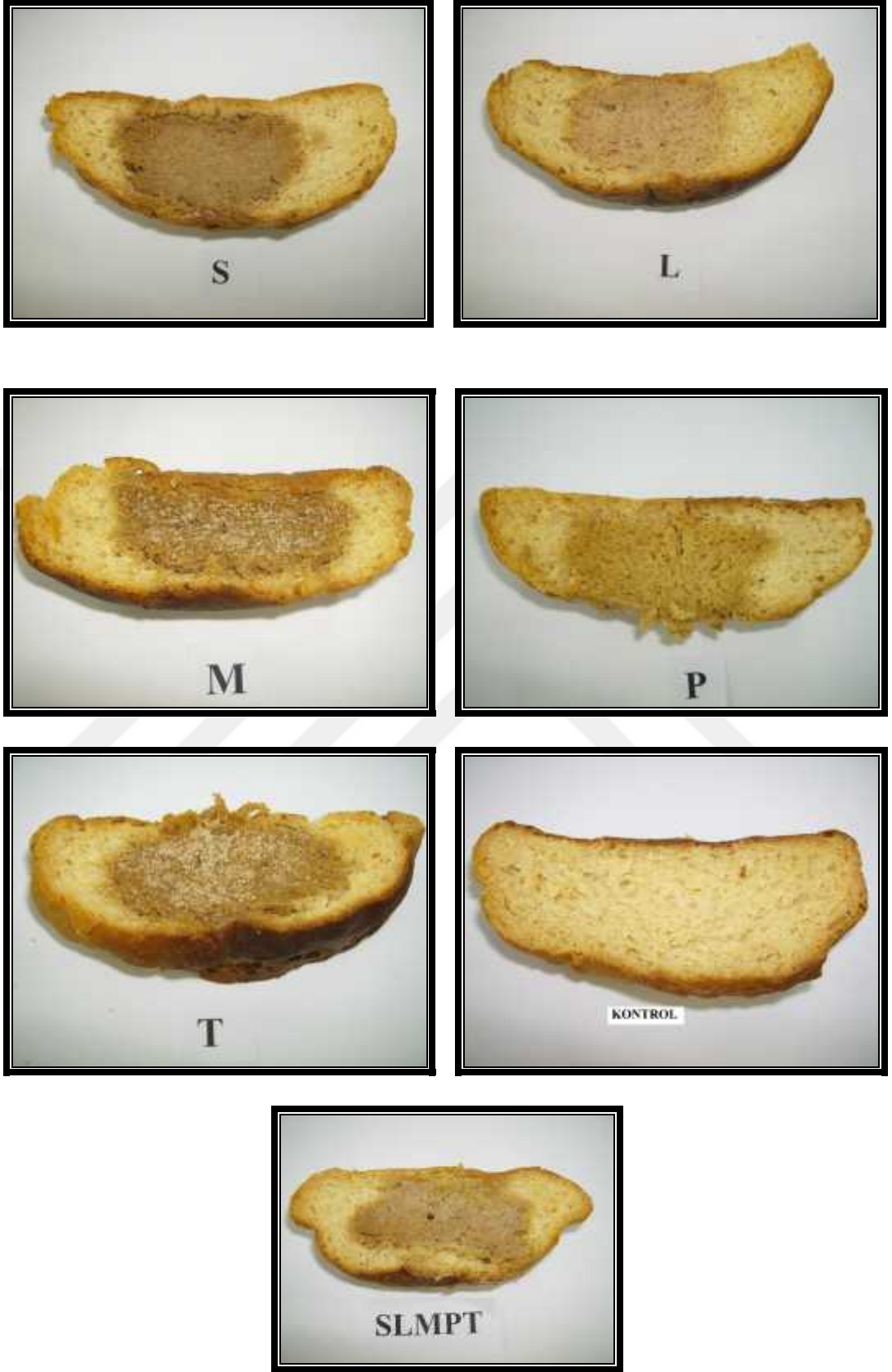
Çizelge 4.46.'ya göre muhafaza süresi uzatıldıkça sünme gelişimi de artmaktadır. Bir süre sonra ortamda bakterinin kullanabileceği besin biteceği ve bakterinin faaliyeti sonucu metabolitler oluşacağı için bakteri gelişimi duracak, bakteri ölüm fazına geçecektir. Ancak herhangi bir bakteriyel sayım yapılmadığından sadece görsel olarak yapılan inceleme ile sünme gelişiminin durup durmadığının ayrımını yapmanın zorluğu

nedeni ile ölüm fazının hangi gün başladığı konusunda net bir karar verilememiştir. Bu fazın her bir kombinasyon için farklı günlere denk gelmesi, yukarıda yapılmış olan açıklamalar da göz önünde bulundurulduğunda, oldukça doğaldır. Çizelgede “+” işaretlerinin artırılması ile gösterilen sünme gelişimi gerçeği en doğru şekilde yansıtacak şekilde verilmeye çalışılmıştır. 5. ve 6. gün arasındaki fark ayırt edilememiştir.

Çizelge 4.46. *Bacillus* türlerinin sündürme kapasitelerinin doğrulanması testi sonuçları

Bakteri Türleri	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün
S	-	++++	++++	++++	+++++	+++++
L	-	++	++++	++++	+++++	+++++
M	-	++++	+++++	+++++	+++++	+++++
P	-	++++	++++	++++	++++	++++
T	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
S + L	-	++	+++	+++	++++	++++
S + M	-	++++	++++	++++	++++	++++
S + P	-	++++	++++	++++	+++++	+++++
S + T	-	+++	+++	+++	+++	+++
L + M	-	++++	+++++	+++++	+++++	+++++
L + P	-	+++	+++	+++	+++	+++
L + T	-	++	+++	++++	+++++	+++++
M + P	-	++++	++++	++++	+++++	+++++
M + T	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
P + T	-	++++	++++	++++	+++++	+++++
S + L + M	-	++++	++++	++++	+++++	+++++
S + L + P	-	++++	++++	++++	+++++	+++++
S + L + T	-	+	++	+++	++++	++++
S + M + P	-	++	++	+++	++++	++++
S + M + T	-	++++	++++	+++++	+++++	+++++
S + P + T	-	+++	+++	+++	++++	++++
L + M + P	-	++	++++	+++	++++	++++
L + M + T	-	+++	++++	++++	+++++	+++++
L + P + T	-	+++	++++	++++	+++++	+++++
M + P + T	-	++++	+++++	+++++	+++++	+++++
S + L + M + P	-	++++	++++	++++	+++++	+++++
S + L + M + T	-	++	++	+++	++++	++++
S + M + P + T	-	++++	++++	++++	+++++	+++++
S + L + P + T	-	++	++	+++	++++	++++
L + M + P + T	-	++++	+++++	+++++	+++++	+++++
S + L + M + P + T	-	+++	+++	++++	+++++	+++++
Kontrol	-	-	-	-	-	-

S: *B. subtilis* L: *B. licheniformis* M: *B. megaterium* P: *B. pumilus* T: *B. thuringiensis*



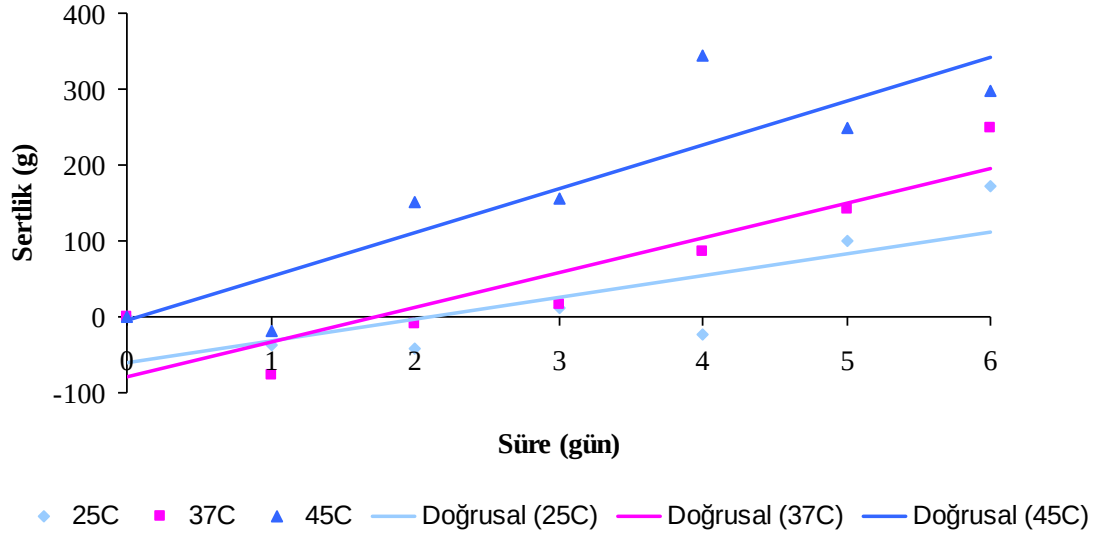
Şekil 4.30. *Bacillus* türlerinin sündürme kapasitelerinin doğrulanması
(S: *B. subtilis* L: *B. licheniformis* M: *B. megaterium* P: *B. pumilus* T: *B. thuringiensis*)

4.8. Sünme Hastalığının Matematiksel Olarak Modellenmesi

Bu tez çalışmasında sünme gelişiminin takibinde kullanılan tüm kimyasal ve tekstürel özelliklerdeki değişimler için sıcaklık derecesi ve muhafaza süresine bağlı olarak kinetik parametreler belirlenmeye çalışılmış, ancak bu özelliklerin neredeyse tamamının 0., 1. ya da 2. dereceden reaksiyonlara göre değişmediği görülmüştür. Bu durumun da ekmeklerde sünme ile birlikte oluşan heterojen yapıdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Tekstürel ölçümlerde heterojen yapı nedeniyle mümkün olduğunca fazla yerden ölçüm yapılarak bunların ortalaması alınmıştır. Kimyasal analizler için ise her ne kadar homojen örnek alınmaya çalışılsa da sünmenin ekmek içinin tamamında değil de belirli bölgelerinde olması örnek almayı zorlaştırmıştır. Kepekli ekmeklerde zaten heterojen olan yapının bir de sünmeyle birlikte değişmesi sonuçların daha uyumsuz olmasına neden olmuştur. Şu husus da göz önünde bulundurulmalıdır ki değişimi incelenen bütün özellikler aslında bakteriyel faaliyete bağlı olarak şekillenmektedir. Dolayısıyla bakteri gelişim eğrisinin lineer olmaması diğer parametrelerin de lineer olarak değişmeme nedenini açıklamaktadır. Şu an elimizde mevcut yazılımlar ile non-lineer regresyon analizi de yapılamadığı için değişimi izlenen tüm özellikler arasından sözü geçen reaksiyonlara (0., 1. ya da 2. dereceden) en iyi uyum sağlayan bazı özellikler için kinetik parametreler hesaplanmıştır. 4°C’de sünme hastalığı oluşmadığı için bu sıcaklıkta elde edilen veriler, sünme hastalığının modellenmesinde kullanılmamıştır.

4.8.1. Normal ekmeklerin sertlik değeri değişim kinetiğinin modellenmesi

Kinetik parametreleri hesaplanan özelliklerden biri normal ekmeklerdeki sertlik değişimidir. Ekmeklerin muhafaza sürelerine karşılık sertlik değerlerinin $(C-C_0/CC_0)$ olarak aritmetik skalaya işlenmesi sonucu doğrusal bir eğri elde edildiği için reaksiyonun 2. dereceden olduğuna karar verilmiştir (Şekil 4.31.). Burada C_0 başlangıç, C son değeri temsil etmektedir. Elde edilen doğruların eğimi hız sabitini vermektedir.



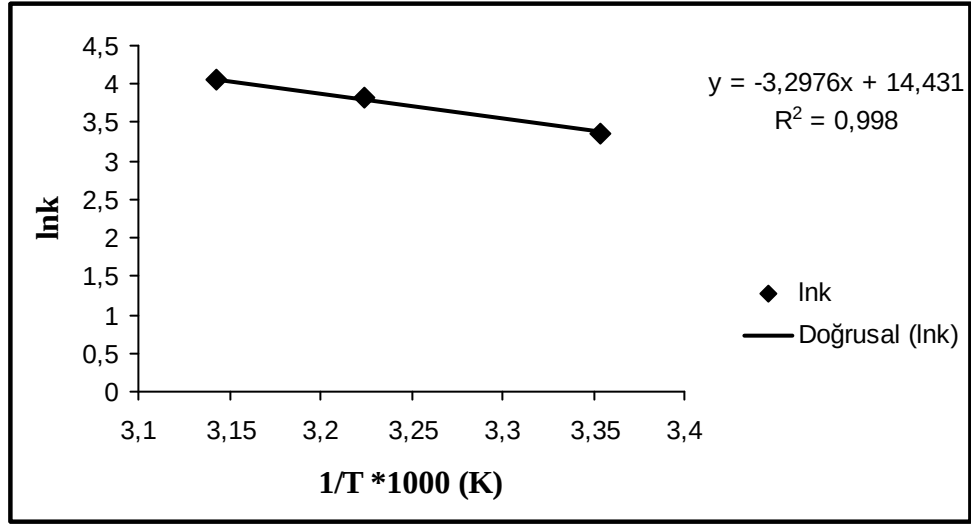
Şekil 4.31. Sertlik değeri değişimi için reaksiyon derecesinin belirlenmesi

Çizelge 4.47.'den de görüldüğü üzere 25°C, 37°C ve 45°C'de elde edilen reaksiyon hız sabitleri sırasıyla $28.906 \text{ g}^{-1}\text{gün}^{-1}$, $45.448 \text{ g}^{-1}\text{gün}^{-1}$ ve $57.699 \text{ g}^{-1}\text{gün}^{-1}$ 'dir. Sertlik değeri değişiminin sıcaklık derecesine önemli seviyede ($p < 0.01$) bağlı olduğu daha önce belirtilmişti. Çizelgeye göre sıcaklık derecesi arttıkça k değerleri azalan bir hızla artmaktadır. Hız sabitleri karşılaştırıldığında 45°C'de reaksiyonun 25°C'dekine göre 2 kat daha hızlı gerçekleştiği görülür. Yani sünme ile birlikte sertlik değerinde meydana gelen azalma 45°C'de 2 kat daha hızlıdır. 37°C'deki azalma hızı ise 25°C'ye göre 1.5 kat daha hızlıdır.

Çizelge 4.47. Sertlik değeri değişimine ait k değerleri

Sıcaklık derecesi (°C)	$k \text{ (g}^{-1}\text{gün}^{-1}\text{)}$	R^2
25	28.906	0.6053
37	45.448	0.8114
45	57.699	0.7930

Reaksiyon hızının sıcaklığa bağımlılığını belirlemek için k değerlerinin doğal logaritması ($\ln k$) alınarak sıcaklığın resiprokaline ($1/T$) karşı grafik edilmiş (Şekil 4.32.) ve Arrhenius eşitliğinden yararlanarak aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.



Şekil 4.32. Sertlik değeri için farklı sıcaklıklardaki hız sabitlerine bağlı olarak elde edilen Arhenius eğrisi

Elde edilen doğrunun eğimi E_a/R 'ye eşit olduğundan;

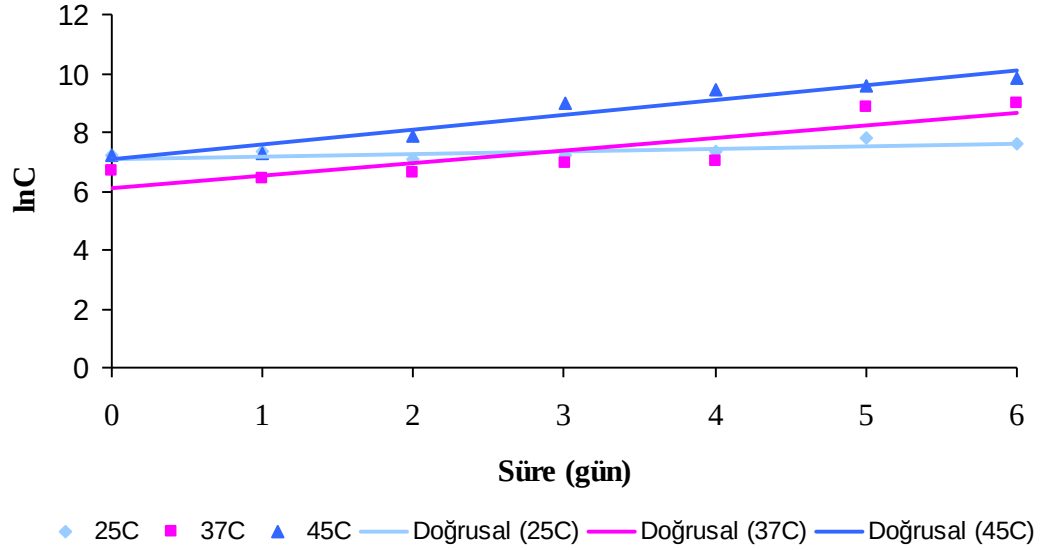
$$\frac{E_a}{R} = 3.2976 \cdot 1000$$

$$E_a = 3297.6 \text{ (}^\circ\text{K)} \cdot 8.314 \text{ j/mol}^\circ\text{K} = 27416.25 \text{ j/mol}$$

Buradan, reaksiyonun gerçekleşebilmesi için moleküllerin sahip olması gereken minimum enerji düzeyinin 27416.25j/mol olduğu anlaşılmaktadır. Hesaplanan aktivasyon enerjisinin yüksek olması, reaksiyonun sıcaklık değişimine çok duyarlı olduğunun göstergesidir. Yani sıcaklık derecesindeki küçük bir değişim sertlikte meydana gelen azalmayı hızlandıracaktır.

4.8.2. Normal ekmeklerde serbest amino asit oluşum kinetiğinin modellenmesi

Ekmeklerin muhafaza sürelerine karşılık serbest amino asit konsantrasyonlarının doğal logaritmalarının aritmetik skalaya yerleştirilmesi sonucu elde edilen doğrusal eğriye göre serbest amino asit oluşumunun 1. dereceden reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiği belirlenmiştir. Şekil 4.33.'de 3 farklı sıcaklık derecesinde (25, 37 ve 45°C) serbest amino asit miktarının doğal logaritmasının süreye karşı grafik edilmesiyle elde edilen eğriler gösterilmiştir.

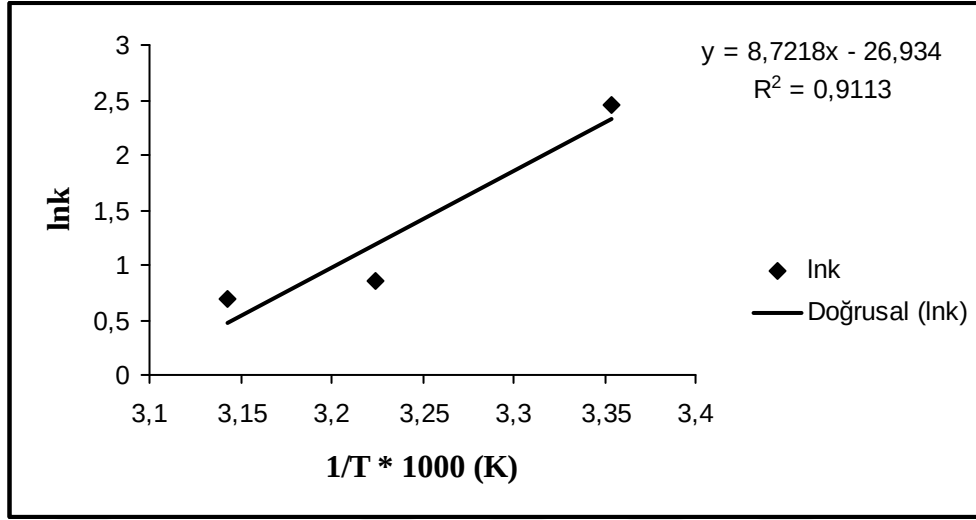


Şekil 4.33. Serbest amino asit konsantrasyonunun (C) doğal logaritmasının süreye karşı grafiği

Çizelge 4.48.'de Şekil 4.33.'de gösterilen doğrusal eğrilerin eğimlerinden elde edilen hız sabitleri ve bunlara ait korelasyon katsayıları gösterilmiştir. 25°C, 37°C ve 45°C'de elde edilen hız sabitleri (k) sırasıyla 0.0866 gün⁻¹, 0.4248 gün⁻¹ ve 0.5046 gün⁻¹'dir. Bu değerlere göre sıcaklık derecesi 25°C'den 37°C'ye çıktığında reaksiyonun hızında çok büyük bir artış gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Bu durumun nedeni 37°C'de sünme hastalığının optimum olarak gelişmesi ve bakterinin proteaz faaliyetine bağlı olarak açıklanabilir. 45°C'deki hız sabitine bakıldığında ise reaksiyonun hızının yine arttığı ancak artış oranının azaldığı görülür. Yani reaksiyonun hızı tamamen sünme oluşma potansiyeline göre şekillenmektedir.

Çizelge 4.48. Serbest amino asit konsantrasyonu değişimine ait k değerleri

Sıcaklık derecesi (°C)	k (gün ⁻¹)	R ²
25	0.0866	0.5249
37	0.4248	0.7486
45	0.5046	0.9350



Şekil 4.34. Serbest amino asit miktarı için farklı sıcaklıklardaki hız sabitlerine bağlı olarak elde edilen Arhenius eğrisi

Reaksiyon hız sabitlerinin doğal logaritmalarının $1/T$ 'ye karşı grafiği çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi (E_a/R) $8.7218 \cdot 1000$ olmaktadır. Buradan;

$$\frac{E_a}{R} = 8721.8 (^{\circ}\text{K})$$

$$E_a = 8721.8 (^{\circ}\text{K}) \cdot 8.314 \text{ j/mol}^{\circ}\text{K} = 72513.05 \text{ j/mol} \quad \text{elde edilir.}$$

Aktivasyon enerjisi değerinin oldukça yüksek bulunması reaksiyonun sıcaklığa bağımlılığının çok fazla olduğunun bir göstergesi olmaktadır. Dolayısıyla sıcaklığın çok az artması bile proteinlerin enzimatik olarak parçalanma, yani serbest amino asit oluşum reaksiyonunun hızının artmasına neden olur.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, ekmeklerde meydana gelen başlıca bozulmalardan olan sünme hastalığının, dört farklı sıcaklık derecesindeki (4, 25, 37 ve 45°C) gelişimi, normal ve kepekli ekmeklerde ayrı ayrı olmak üzere fiziksel, kimyasal, tekstürel ve mikrobiyolojik değişimlere bağlı olarak incelenmiş; ekmeklerden izole edilen *Bacillus* türleri hem klasik yöntemlerle hem de API test kitleri ile tanılanmıştır. Çalışmada kullanılan sıcaklıkların seçilme nedeni; 4°C'nin soğukta depolama koşullarını, 25°C'nin oda koşullarını, 45°C'nin yaz aylarında Antalya bölgesinde bulunan ekmek satış ortamlarını temsil etmesi, 37°C'nin ise *Bacillus* türlerinin optimum geliştiği sıcaklık derecesi olmasıdır. Tanılamanın iki farklı yöntemle yapılma nedeni ise karşılaştırma yapma imkanı sağlayarak en doğru sonuca hangi yöntemle ulaşılabileceğini belirlemektir.

Ekmeklerde bulunan sünme etmeni *Bacillus* türlerinin kaynağı temelde ekmek hammaddeleridir. Bu nedenle tüm hammaddelerde sünme sporu sayımı yapılmış ve spor yükü en yüksek olan kaynağın maya (93EMS/g) olduğu, bunu sırasıyla kepekli un (43EMS/g), normal un (23EMS/g), su (4.3EMS/g), şeker (3.6EMS/g) ve tuzun (<3EMS/g) izlediği saptanmıştır.

Yapılan istatistiksel analizler, sünme gelişiminin takibi için değişimi izlenen tüm mikrobiyolojik, kimyasal ve tekstürel özelliklerin sıcaklık derecesine önemli düzeyde ($p<0.01$) bağımlı olduğunu göstermiştir. TMAB sayımı dışındaki tüm özelliklerin ekmek tipinden de önemli düzeyde ($p<0.01$) etkilendiği saptanmıştır.

Araştırma sonuçları, katkı maddesi kullanmaksızın gerçekleştirilen ekmek üretiminde sünme hastalığının yalnızca 4°C'de muhafaza edilen ekmeklerde oluşmadığını, diğer sıcaklıklarda, sıcaklık derecesine bağlı olmakla birlikte farklı sürelerde hastalığın oluştuğunu göstermiştir. 4°C'de sünme gelişimi gözlenmemiştir ancak bu sıcaklıkta da ekmek bayatlamasının hızlı olması olumsuz bir özellik olarak göze çarpmaktadır.

Ekmeklerde sünme hastalığı kötü koku oluşumu ile başlamış, görsel olarak hastalığın hissedilir hale gelmesi biraz daha fazla zaman almıştır. Bu bağlamda 25°C’de her iki ekmek tipi için de 2. günde kokudaki değişim fark edilir düzeye ulaşırken, ekmeklerde hastalığın gözlemlendiği noktalardaki kahverengileşme ve sıvılaşma normal ekmekte 3. ve 4. gün arasında, kepekli ekmekte ise 4. günde gerçekleşmiştir. 37°C ve 45°C’de normal ekmekte koku oluşumu 1. gün içinde kendini gösterirken, görsel olarak 37°C’de 3. günde, 45°C’de 2. günde oluşmuştur. Kepekli ekmeklerde ise hastalığın daha kısa sürede oluştuğu tespit edilmiştir. 37°C’de koku değişimi bir günden daha kısa sürede, görüntüdeki değişim ise 1. günde; 45°C’de ise 1. günde koku değişimi, 2. günde ise görsel değişim gerçekleşmiştir.

Ekmeklerden izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanmasında hem klasik yöntemler hem de API test kitleri ile benzer sonuçlar elde edilen izolatlar olsa da genel olarak bakıldığında iki yöntemle ulaşılan sonuçlar arasında farklılıklar vardır. Bu durumun en önemli nedeni heterojen özelliklere sahip *Bacillus* türlerinin klasik yöntemlerle tanısının zor olmasıdır. Nitekim yapılan biyokimyasal testlerde pozitif sonucun kontrolü için bazı testlerde inkübasyon süresinin 14 güne kadar uzatılması, tanılama işleminin hassasiyetini azaltmaktadır.

Normal ekmekte biyokimyasal testlerle *B. subtilis* (%50), *B. megaterium* (%22.73), *B. licheniformis* (%13.64), *B. coagulans* (%9.09) ve *B. pumilus* (%4.55) olarak tanımlanan izolatlar, API test kitleri ile *B. licheniformis* (%22.73), *B. pumilus* (%13.64), *B. subtilis/amyloliquefaciens* (%4.55), muhtemelen *B. megaterium* (%4.55) ve kabul edilemez profil (%54.55) olarak tanımlanmıştır. Kepekli ekmekte ise biyokimyasal tanılama sonuçları *B. subtilis* (%36.8), *B. megaterium* (%31.58), *B. licheniformis* (%21.05) ve tanımlanamayan (%10.53) şeklindeyken, API test kitleri ile tanılama sonuçları *B. licheniformis* (%21.05), muhtemelen *B. megaterium* (%15.79), *Bacillus* spp. (%10.53), *B. subtilis/amyloliquefaciens* (%5.26), muhtemelen *B. thuringiensis* (%5.26) ve kabul edilemez profil (%42.11) şeklindedir.

Yapılan çalışmalar *B. subtilis* ile oldukça yakın ilişkili türler bulunduğunu; eskiden *B. subtilis* olarak tanımlanan pek çok türün *B. atropheus*, *B. mojavensis* ve *B. vallismortis*

olduğunun belirlendiğini; *B. subtilis*'in *B. subtilis* subsp. *subtilis* ve *B. subtilis* subsp. *spizizenii* olmak üzere iki alt gruba ayrıldığını göstermiştir (Nakamura vd 1989, Roberts vd 1994, Roberts vd 1996, Reva vd 2004). Bu türlerin biyokimyasal testlerle ayırt edilemediği gibi API veri tabanında da yer almaması, yapılan tanılamanın güvenilirliğini tehlikeye atmaktadır. Dolayısıyla bu tez çalışması ile sadece biyokimyasal testlerle değil, API test kitleri ile de yeterince doğru sonuç elde edilemeyebileceği görülmüştür. Nitekim bu sonuç daha önce yapılmış çalışmalarda da bildirilmiş, moleküler tekniklerle yapılacak tanılamamanın gerçeği daha iyi yansıtacağı öne sürülmüştür (Thompson vd 1993, Fritze 2002).

Ekmeklerde sünme, ekmek yapısında meydana getirdiği değişimler itibariyle pek çok kaynakta tarifi yapılan bir oluşumdur. Bu çalışma ile sünme hastalığı sonucu ekmeklerin yapısal özelliklerinde (sertlik, adezif ve kohezif yapışkanlık, zamksılık, çiğnenebilirlik, elastikiyet, esneklik) meydana gelen yapısal değişimler ilk kez incelenmiş olup bilim çevrelerince kullanılabilir bilimsel sayısal değerler ve uygulama esasları elde edilmiştir. Bu çalışma sünme gelişen ekmeklerde tekstür analizlerinin de sünme hızının tahmininde kullanılabileceğini göstermiştir.

Sünme hastalığının matematiksel olarak modellenmesinde hem tekstürel hem de kimyasal özelliklerdeki değişimlerin kullanılabileceği ancak kinetik parametrelerin bilinen lineer regresyon analizi ile belirlenmesinin pek mümkün olmadığı görülmüştür. Ancak 0., 1. ya da 2. dereceden reaksiyonlara en iyi uyum sağlayan özellikler (sertlik değişimi ve serbest amino asit oluşumu) baz alınarak 25°C, 37°C ve 45°C'de gerçekleşen reaksiyonlar için hesaplanan hız sabitlerine göre sıcaklık arttıkça reaksiyon hızının da azalan bir hızla arttığı tespit edilmiştir. Sünme ile birlikte ekmek içinde meydana gelen değişimlerin sıcaklığa bağımlılığının yüksek olduğu, sertlik değişimi için 27416.25j/mol, ve serbest amino asit oluşumu için 72513.05j/mol olarak hesaplanan aktivasyon enerjisi değerlerinden anlaşılmaktadır. Serbest amino asit oluşumu için belirlenen aktivasyon enerjisi değerinin daha da yüksek olması bu parametrenin sıcaklık değişimlerinden daha fazla etkilendiğini göstermektedir.

Bugüne kadar genellikle enzim üretme amaçlı veya biyoteknolojik amaçlar için kullanılan *Bacillus*'lar, topraktan veya tuzlu, sodalı ve benzer değişik su ortamlarından izole edilmiştir. Oysa bu çalışmada ekmeklerden izole edilerek, fırında 100°C'ye yakın sıcaklıklarda spor oluşturarak canlı kalabilen sünme etmeni bakteriler arasından enzim aktivitesine sahip olanları seçilerek sanayinin birçok alanında ihtiyaç duyulan enzimleri üretmenin mümkün olabileceğinin ihtimal dahilinde olduğu görülmüştür. Nitekim sanayinin birçok alanında, büyük ölçekli enzim üretiminde *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis*'ten önemli ölçüde yararlanıldığı bilinmektedir.

Ekmeklerde sünme etmeni bakterilerin biyokimyasal testler ve API kitleriyle tam olarak tanılanamayacağı, moleküler tekniklerle daha sağlıklı tanılamaların yapılabileceği, sünme sonucu oluşan yapıya ve kimyasal değişimlere göre sünmenin hızının ve değişim seyrinin matematiksel fonksiyonlarla tahmin edilebileceği, elde edilen izolatların enzim üretme özellikleri ve bu ürettikleri enzimlerin karakterize edilmelerinin, ileride bu yönde çalışmaların sürdürülmesinin gerektiği söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- ABEDE, A. A., AYOKO, G. A. and SINGH, K. 1992. Chemical composition and nutritive value of retail white bread in Zaria, Nigeria. *Food Chemistry*. 45: 323-326.
- ANONİM 1983. Gıda Maddeleri Muayene ve Analiz Yöntemleri Kitabı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Gıda İşleri Genel Müdürlüğü. Genel Yayın No: 65, Özel Yayın No: 62-105, Ankara, 794 ss.
- ANONİM 1987. TS 5000. “Ekmek” Standardı. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara, 15ss.
- ANONİM 1992. TS 3522. “Ekmek Mayası” Standardı. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara, 9ss.
- ANONİM 1996. TS 12000. “Ekmek-300 gram” Standardı. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara, 10ss.
- ANONİM 1999. Buğday Unu Tebliği. No:99/1. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara.
- ANONİM 2001. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği No. 19. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı, 13ss.
- ANONİM 2002. Türk Gıda Kodeksi. Ekmek ve Ekmek Çeşitleri Tebliği. No. 2002/13. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı, 3ss.
- ANONİM 2003. Factors that influence microbial growth. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume 2 (Supplement), Chapter 3, p21-32. (<http://members.ift.org/NR/rdonlyres/53386D1E-B381-4480-9475-7371683AC01B/0/crfsfssupn2p021032.pdf>)
- ANONİM 2005. Genel İdentifikasyon Testleri. (<http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210013601.pdf>)
- ANONYMOUS 1960. ICC (International Association for Cereal Chemistry). Standard No. 104: Method for the determination of ash in cereals and cereal products.
- ANONYMOUS 1976. ICC (International Association for Cereal Chemistry). Standard No. 123: Method for the determination of starch contents by hydrochloric acid dissolution.
- ANONYMOUS 1978. ICC (International Association for Cereal Chemistry). Standard No. 125: Method of determining the count of Aerobic Mesophilic Bacteria (Plate Count Method).

- ANONYMOUS 1980a. ICC (International Association for Cereal Chemistry). Standard No. 105/1: Method for the determination of crude protein in cereals and cereal products for food and for feed.
- ANONYMOUS 1980b. ICC (International Association for Cereal Chemistry). Standard No. 134: Determination of the fungus germ count (plate count method) in cereals, cereal products and animal feed.
- ANONYMOUS 2001. SMS—Stable Micro Systems. Available at <http://www.stablemicrosystems.com>, captured in November 2001.
- ANONYMOUS 2002. API 50CH Manufacturer's Instruction.
- ANONYMOUS 2004. <http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>
- ANONYMOUS 2005. API 50CHB/E Medium Manufacturer's Instruction.
- ANONYMOUS 2006a. API 20E Manufacturer's Instruction.
- ANONYMOUS 2006b. Bradford Reagent. Product Information. Technical Bulletin.
- ANONYMOUS 2007. Practical Definitions of Standard TPA Terms Paraphrased From Dr. Malcolm Bourne's Food Texture and Viscosity. http://www.texturetechnologies.com/texture_profile_analysis.html
- ARAN, N. ve BOYACIOĞLU, M. H. 2005. Ekmek Hastalıkları-Rope. (<http://www.ekmekdunyasi.com/ekmekhastaliklari.htm>)
- ARENDT, E. K., RYAN, L. A. M. and BELLO, F. D. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*. 24: 165-174.
- ARDA, M. 2006. Bazı Önemli Biyokimyasal Testler (<http://www.mikrobiyoloji.org>)
- ARMERO, E. and COLLART, C. 1998. Crumb Firming Kinetics of Wheat Breads with Anti-staling Additives. *Journal of Cereal Science*. 28: 165-174.
- BAILEY, C. P. and von HOLY, A. 1993. Bacillus spore contamination associated with commercial bread manufacture. *Food Microbiology*. 10: 287-294.
- FRITZE, D. 2002. *Bacillus* Identification-Traditional Approaches. In: Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N. and Vos, P. (Editors), Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives, Blackwell Publishing, p 100-123. Cambridge.
- BRADFORD, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

- BRADY, P. L. and MAYER, S. M. 1985. Correlations of Sensory and Instrumental Measures of Bread Texture. *Cereal Chemistry*. 62 (1): 70-71.
- CARR, L. G. and TADINI, C. C. 2003. Influence of yeast and vegetable shortening on physical and textural parameters of frozen part baked French bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 36: 609-614.
- CARR, L. G., RODAS, M. A. B., TORRE, J. C. M. D. and TADINI, C. C. 2006. Physical, textural and sensory characteristics of 7-day frozen part-baked French bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 39: 540-547.
- CARSON, L. and SUN, X. S. 2001. Creep-recovery of bread and correlation to sensory measurement of textural attributes. *Cereal Chemistry*. 78 (1): 101-103.
- CAUVAIN, S. P. 2004. Improving the texture of bread. In: Kilcast, D. (Editor), *Texture in Food, Volume 2: Solid Foods*, GBR: Woodhead Publishing, Limited, p 432-450. Cambridge
- COLLINS, N. E., KIRSCHNER, L. A. M. and von HOLY, A. 1991. Characterization of *Bacillus* isolates from ropey bread, bakery equipment and raw materials. *South African Journal of Science*. 87: 62-66.
- CORSETTI, A., GOBBETTI, M., BALESTRIERI, F., PAOLETTI, F., RUSSI, L. and ROSSI, J. 1998. Sourdough Lactic Acid Bacteria Effects on Bread Firmness and Staling. *Journal of Food Science*. 63(2): 347-351.
- COULTATE, T. P. 1996. *Food: The Chemistry of its Components*. The Royal Society of Chemistry, p.320-338. Cambridge.
- CZUCHAJOWSKA, Z. and POMERANZ, Y. 1989. Differential Scanning Calorimetry, Water Activity, and Moisture Contents in Crumb Center and Near-Crust Zones of Bread During Storage. *Cereal Chemistry*. 66 (4): 305-309.
- DEXTER, J. E. and SARKAR, A. K. 2004. Dry Milling. In: C. Wrigley (Editor-in-chief), *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Ltd. p.363-375,
- DHINGRA, S. and JOOD, S. 2001. Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. *Food Chemistry*. 77: 479-488.
- DOĞAN, H. B., TÜKEL, Ç, ÇAKIR, İ. 2005. Rope Sporu.
(<http://www.mikrobiyoloji.org/dokgoster.asp?dosya=942121031>)
- DÜZGÜNEŞ, O., KESİCİ, T., KAVUNCU, O. ve GÜRBÜZ, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metodları (İstatistik Metodları II), Ank. Üniv. Zir. Fak. Yayınları No: 1021, Ankara, 214 ss.

- ELGÜN, A. ve ERTUGAY, Z. 2002. Tahıl İşleme Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Yayınları No. 718, Erzurum, 376 ss.
- ELGÜN, A., ERTUGAY, Z., CERTEL, M. ve KOTANCILAR, H. G. 2002. Tahıl ve Ürünlerinde Analitik Kalite Kontrolü Laboratuar Uygulama Kılavuzu. Atatürk Üniversitesi Yayın No. 867. Erzurum, 245 ss.
- ELLIS, W. O., OBUBUAFO, A. K., OFOSU-OKYERE, A., MARFO, E., K., OSEI-AGYEMANG and ODAME-DARKWAH, J., K. 1997. A survey of bread defects in Ghana. *Food Control*. 8: 77-82.
- ERBAS, M., ERTUGAY, M. F., ERBAS, M. O. and CERTEL, M. 2005. The effect of fermentation and storage on free amino acids of tarhana. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 56 (5): 349-358.
- ERRINGTON, J. 2003. Regulation of Endospore Formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. 1: 117-126.
- FEEHERRY, F. E., DOONA, C. J. and TAUB, I., A. 2003. Effect of Water Activity on the Growth Kinetics of *Staphylococcus aureus* in Ground Bread Crumb. *Journal of Food Science*. 68(3): 982-987.
- GAMBARO, A., GIMENEZ, A., ARES, G. and GILARDI, V. 2006. Influence of Enzymes on the Texture of Brown Pan Bread. *Journal of Texture Studies*. 37: 300-314.
- GIANNOU, V. and TZIA, C. 2007. Frozen dough bread: Quality and textural behaviour during prolonged storage-Prediction of final product characteristics. *Journal of Food Engineering*. 79: 929-934.
- GÖÇMEN, D. ve GÜRBÜZ, O. 2000. Fırıncılık Ürünlerinde Sünme ve Küf Oluşumunun Önlenmesinde Kimyasal Koruyucu ve Laktik Starter Kullanımı. *Dünya Gıda*. 8: 84-87.
- GRAY, J. A. and BEMILLER, J. N. 2003. Bread Staling: Molecular Basis and Control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 1-21.
- GÜL, H. ve ÖZÇELİK, S. 2000. Ekmeğin İnsan Beslenmesindeki Yeri ve Önemi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 4 (1): 78-90.
- GÜL, A., IŞIK, H., BAL, T. ve ÖZER, S. 2003. Bread Consumption and Waste of Households in Urban Area of Adana Province. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Food Science and Technology*. Volume 6, Issue 2.
- HAROS, M., ROSELL, C. M. and BENEDITO, C. 2002. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *European Food Research and Technology*. 215: 425-430.

- JEMLI, S., MESSAOUD, E. B., AYADI-ZOUARI, D., NAILI, B., KHEMAKHEM, B. and BEJAR, S. 2007. A β -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US 132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making. *Biochemical Engineering Journal*. 34: 44-50.
- JOCK, S., VOLKSCH, B., MANSVELT, L. and GEIDER, K. 2002. Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology Letters*. 211: 247-252.
- KARAOĞLU, M. M. 2002. Farklı sıcaklık ve sürelerde muhafaza edilen kısmi pişmiş ekmeklerin teknolojik ve mikrobiyolojik özellikleri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum (Doktora Tezi) 144ss.
- KATINA, K., SAURI, M., ALAKOMI, H. L. and MATTILA-SANDHOLM, T. 2002. Potential of Lactic Acid Bacteria to Inhibit Rope Spoilage in Wheat Sourdough Bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 35: 38-45.
- KATINA, K., HEINIO, R. L., AUTIO, K. and POUTANEN, K. 2006. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 39: 1189-1202.
- KILCAST, D. 2004. Measuring consumer perceptions of texture: an overview. In: D. Kilcast (Editor), *Texture in Food, Volume 2: Solid Foods*. GBR: Woodhead Publishing, Limited p 3-8. Cambridge,
- KIRSCHNER, L. A. M. and von HOLY, A. 1989. Rope spoilage of bread. *South African Journal of Science*. 85: 425-427.
- LEAKE, L. L. 2007. Texture and Viscosity Measurement. *Food Technology*. 61 (3): 62-65.
- LEGAN, J. D. 1993. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 32: 33-53.
- LOGAN, N. A. and BERKELEY, R. C. W. 1984. Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. *Journal of General Microbiology*. 130: 1871-1882.
- LEUSCHNER, R. G. K., O'CALLAGHAN, M. J. A. and ARENDT, E. K. 1998. *Bacilli* spoilage in part-baked and rebaked brown soda bread. *Journal of Food Science*. 63: 915-918.
- MARSHALL, D. G. and ODAME-DARKWAH, J. K. 1994. Mechanism of inhibited growth of *Bacillus pumilus* by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *International Journal of Food Microbiology*. 22: 11-22.
- MENTEŞ, Ö., ERCAN, R. ve AKÇELİK, M. 2005. Türkiye’de Üretilen Ekşi Hamurlardan İzole Edilen *Lactobacillus* Suşlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Gıda* 30 (3): 155-164.

- McKENNA, B. M. 2003. Texture in Food, Volume 1: Semi-solid Foods. GBR: Woodhead Publishing, Limited, p xv-xvi. Cambridge
- MILLER, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31 (3): 426-428.
- MIYAZAKI, M., MAEDA, T. and MORITA, N. 2004. Effect of various dextrin substitutions for wheat flour on dough properties and bread qualities. *Food Research International*. 37: 59-65.
- MOIR, A. 2003. Bacterial spore germination and protein mobility. *Trends in Microbiology*. 11: 452-454.
- NAKAMURA, L. K. 1989. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39: 295-300.
- NIELSEN, N. J., GRANBY, K., HEDEGAARD, R. V. and SKIBSTED, L. H. 2006. A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagines and reducing sugars in bread. *Analytica Chimica Acta*. 557: 211-220.
- NOBILE, M. A. D., MARTORIELLO, T., MOCCI, G. and NOTTE, E. L. 2003. Modeling the starch retrogradation kinetic of durum wheat bread. *Journal of Food Engineering*. 59: 123-128.
- ODAME-DARKWAH, J. K. and MARSHALL D. L. 1993. Interactive behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus pumilus* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *International Journal of Food Microbiology*. 19: 259-269.
- ÖZKAN, M. ve CEMEROĞLU, B. 2005. Isıl İşlem Sırasında Gıda Bileşenlerinin Parçalanma Kinetiği. B. Cemeroğlu (editör). Gıda Mühendisliğinde Temel İşlemler. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:29. Ankara. s.436-490.
- PATEL, B. K., WANISKA, R. D. and SEETHARAMAN, K. 2005. Impact of different baking processes on bread firmness and starch properties in breadcrumb. *Journal of Cereal Science*. 42: 173-184.
- PATERAS, I. M. C. (1999) Bread spoilage and staling. S. P. Cauvain, L. S. Young (Ed.) Technology of Breadmaking. Aspen Publishers, Inc. p. 240-261.
- PATTISON, T. L., LINDSAY, D. and von HOLY, A. 2004. Natural antimicrobials as potential replacements for calcium propionate in bread. *South African Journal of Science*. 100: 342-348.
- PEPE, O., BLAIOTTA, G., MOSCHETTI, G., GRECO, T. and VILLANI, F. 2003. Rope-Producing Strains of *Bacillus* spp. from Wheat Bread and Strategy for

- Their Control by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (49): 2321-2329.
- PIGGOT, P. J. and HILBERT, D. W. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*. 7: 579-586.
- PURLIS, E. and SALVADORI, V. O. 2007. Bread browning kinetics during baking. *Journal of Food Engineering*. 80: 1107-1115.
- REVA, O. N., DIXELIUS, C., MEIJER, J. and PRIEST, F. G. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology*. 48: 249-259.
- ROBERTS, M. S., NAKAMURA, L. K. and COHAN, F. M. 1994. *Bacillus mojaviensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 256-264.
- ROBERTS, M. S., NAKAMURA, L. K. and COHAN, F. M. 1996. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46: 470-475.
- ROSENKVIST, H. and HANSEN, A. 1995. Contamination profiles and characterization of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. *International Journal of Food Microbiology*. 26: 353-363.
- ROSENQUIST, H. and HANSEN, A. 1998. The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 621-631.
- SARIKAYA, R. 2004. *Cryptosporidium* Türlerinin Tanımlanmasında Yeni Bir Yaklaşım: Ribotiplendirme. Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi 5 (2): 13-26.
- SEKİN, Y. ve KARAGÖZLÜ, N. 2004. Gıda Mikrobiyolojisi. Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar. Literatür Yayınları:115. İstanbul, 358 ss.
- SETLOW, P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*. 6: 550-556.
- SHAH, A. R., SHAH, R. K. and MADAMWAR, D. 2006. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*. 97: 2047-2053.
- SIERECKA, J. K. 1998. Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*. *The International Journal of biochemistry and Cell Biology*. 30: 579-595.

- SINGH, J., BATRA, N. and SOBTI, R. C. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*. 36: 781-785.
- SIDHU, J. S., AL-HOOTI, S. N. and AL-SAQER, J. M. 1999. Effect of adding wheat bran and germ fractions on the chemical composition of high-fiber toast bread. *Food Chemistry*. 67: 365-371.
- SMITH, J. P., DAFIAS, D. P., EL-KHOURY, W., KOUKOUTSIS, J. and EL-KHOURY, A. 2004. Shelf life and safety concerns of bakery products – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44: 19-55.
- SNEATH, P. H. A. (1984). Endospore forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: Sneath, P. H. A (Editor), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Volume 2. Williams&Wilkins. P: 1104-1139. Baltimore. ABD.
- SOROKULOVA, I. B., REVA, O. N., SMIRNOV, V. V., LAPA, S. V. and URDACI, M. C. 2003. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and ropy bread. *Letters in Applied Microbiology*. 37: 169-173.
- SZCZESNIAK, A. S. 1998. Sensory Texture Profiling Historical and Scientific Perspectives. *Food Technology*. 52 (8): 54-57.
- TALAY, M. 1997. Ekmek Bilimi ve Teknolojisi. Ray Filmcilik Matbaacılık Organizasyon. İstanbul. ss. 5-120.
- TAUB, I. A., FEEHERRY, F. E., ROSS, E. W., KUSTIN, K. and DOONA, C. J. 2003. A Quasi-Chemical Kinetics Model for the Growth and Death of *Staphylococcus aureus* in Intermediate Moisture Bread. *Journal of Food Science*. 68(8): 2530-2537.
- TEMİZ, A. 1998. Enzimler. İçinde: İ. Saldamlı (Editör), Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Basımevi, ss. 259-336, Ankara.
- TEMİZ, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınları: 96. Ankara. 291ss.
- THOMPSON, J. M., DODD, C. E. R. and WAITES, W. M. 1993. Spoilage of Bread by *Bacillus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 32: 55-66.
- THOMPSON, J. M., WAITES, W. M. and DODD, C. E. R. 1998. Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 481-486.
- VANGÖL, Y. 1999. Ekmek Mevzuatı Teknolojisi. Hazırlık baskı: Tükemat A.Ş. 95 ss.

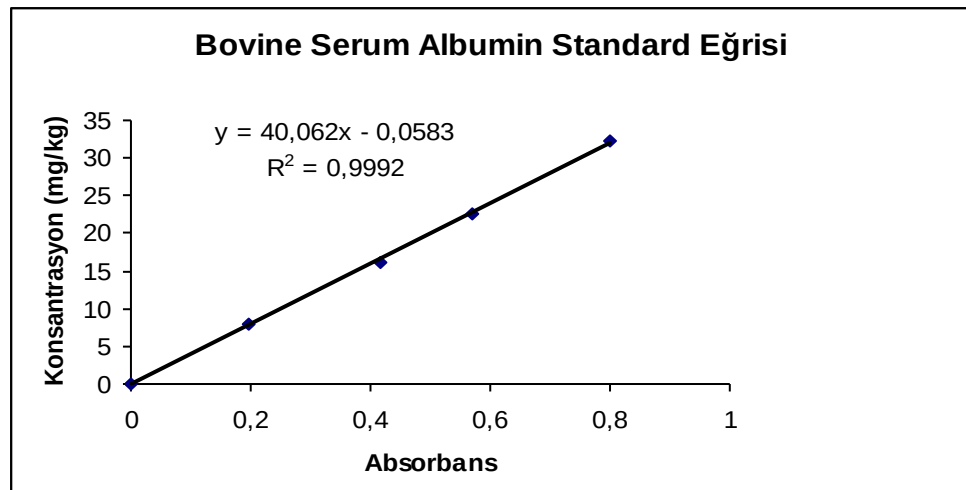
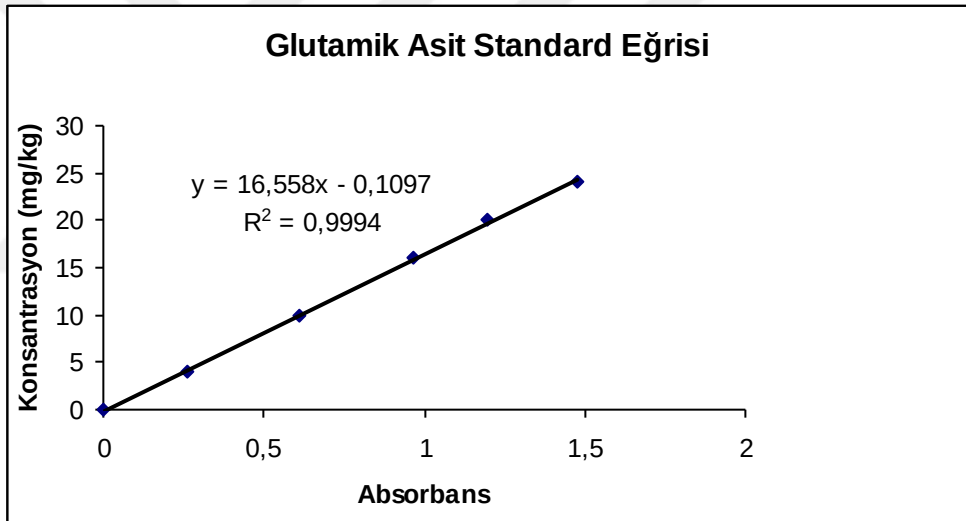
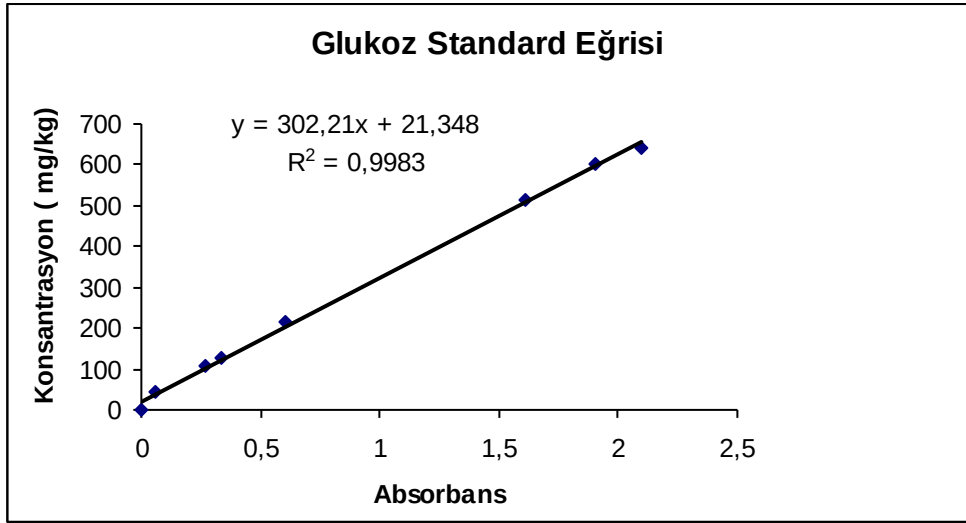
- VOLAVSEK, P. J. A., KIRSCHNER, L. A. M. and von HOLY, A. 1992. Accelerated methods to predict the rope-inducing potential of bread raw materials. *South African Journal of Science*. 88: 99-102.
- VOYSEY, P. A. 1989. Rope: a problem for bakers. *Journal of Applied Bacteriology*. 67: xxv-xxvi.
- VULUCEVIC, I. R., ABDEL-AAL, E. S. M., MITTAL, G. S. and LU, X. 2004. Quality and storage life of part-baked frozen breads. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 37 (2): 205-213.
- WANG, J., ROSELL, C. M. and BARBER, C. B. 2002. Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chemistry*. 79: 221-226.
- WANG, R., ZHOU, W. and ISABELLE, M. 2007. Comparison study of the effect of green tea extract (GTE) on the quality of bread by instrumental analysis and sensory evaluation. *Food Research International*. 40: 470-479.
- YANG, J. K., SHIH, I. L., TZENG, Y. M. and WANG, S. L. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 406-413.
- YAPICI, B. M. ve BARUT, N. B. 2003. Manisa'nın Salihli İlçesindeki Fırınlarda Üretilen Ekmeklerin Bazı Mikrobiyolojik Özellikleri. *Gıda*. 28: 77-83.
- YOKOYAMA, S. and HIRAMATSU, J. I. 2003. A Modified Ninhydrin Reagent Using Ascorbic Acid Instead of Potassium Cyanide. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95 (2): 204-205.

7. EKLER

EK 1. En Muhtemel Sayı (E.M.S) Çizelgesi (Anonymous 1992)

Pozitif Tüp Sayısı			EMS	Pozitif Tüp Sayısı			EMS
g veya ml	g veya ml	g veya ml	g veya ml	g veya ml	g veya ml	g veya ml	g veya ml
0.01	0.001	0.0001		0.01	0.001	0.0001	
0	0	1	30	2	1	3	340
0	0	2	60	2	2	0	200
0	0	3	90	2	2	1	300
0	1	0	30	2	2	2	350
0	1	1	60	2	2	3	400
0	1	2	90	2	3	0	300
0	1	1	120	2	3	1	350
0	2	0	60	2	3	2	400
0	2	1	90	2	3	3	530
0	2	2	120	3	0	0	250
0	2	3	160	3	0	1	400
0	3	0	90	3	0	2	650
0	3	1	130	3	0	3	950
0	3	2	160	3	1	0	450
0	3	3	190	3	1	1	750
1	0	0	40	3	1	2	1150
1	0	1	70	3	1	3	1600
1	0	2	110	3	2	0	95
1	0	3	150	3	2	1	1500
1	1	0	70	3	2	2	2000
1	1	1	110	3	2	3	3000
1	1	2	150	3	3	0	2500
1	1	0	190	3	3	1	4500
1	2	0	110	3	3	2	11000
1	2	1	150	3	3	3	11000+
1	2	2	200				
1	2	3	240				
1	3	0	160				
1	3	1	200				
1	3	2	240				
1	3	3	290				
2	0	0	90				
2	0	3	140				
2	0	2	200				
2	0	2	260				
2	1	0	150				
2	1	1	200				
2	1	2	300				

EK 2. Standart Eğriler



Ek 3. *Bacillus* türlerinin ayırt edici özellikleri

Özellikler	1. <i>B. subtilis</i>	2. <i>B. acidocaldarius</i>	3. <i>B. alcalophilus</i>	4. <i>B. alvei</i>	5. <i>B. anthracis</i>	6. <i>B. azotoformans</i>	7. <i>B. badius</i>	8. <i>B. brevis</i>	9. <i>B. cereus</i>	10. <i>B. circulans</i>	11. <i>B. coagulans</i>	12. <i>B. fastidious</i>	13. <i>B. firmus</i>	14. <i>B. globisporus</i>	15. <i>B. insolitus</i>	16. <i>B. larvae</i>	17. <i>B. laterosporus</i>
Hücre çapı > 1.0 µm	-	ND	-	-	+	-	v	-	+	-	-	+	-	-	v	-	-
Spor yuvarlaklığı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Sporangium şişmesi	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	v	-	-	+	-	+	+
Parasporal Kristaller	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	ND	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Anaerobik Gelişme	-	-	-	+	+	-	-	-	+	d	+	-	-	-	-	+	+
Voges-Proskauer Testi	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	NG	-	-	-	-	-
VP Broth'da pH																	
<6	d		ND	+	+	ND	-	-	+	+	+	NG	-	-	-	d	d
>7	-		ND	-	-	ND	+	+	-	-	-	NG	-	-	-	-	-
Asit Oluşumu																	
D-Glukoz	+	ND	+	+	+	-	-	d	+	+	+	NG	+	+	-	+	+
L-Arabinoz	+	ND	+	-	-	ND	-	-	-	+	d	NG	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	+	ND	+	-	-	-	-	-	-	+	d	NG	-	-	-	-	-

Devamı arkada

Ek 3.'ün Devamı

Özellikler	1. <i>B. subtilis</i>	2. <i>B. acidocaldarius</i>	3. <i>B. alcalophilus</i>	4. <i>B. alvei</i>	5. <i>B. anthracis</i>	6. <i>B. azotoformans</i>	7. <i>B. badius</i>	8. <i>B. brevis</i>	9. <i>B. cereus</i>	10. <i>B. circulans</i>	11. <i>B. coagulans</i>	12. <i>B. fastidious</i>	13. <i>B. firmus</i>	14. <i>B. globisporus</i>	15. <i>B. insolitus</i>	16. <i>B. larvae</i>	17. <i>B. laterosporus</i>
D-Mannitol	+	ND	+	-	-	-	-	d	-	+	d	NG	+	-	-	d	+
Glukozdan gaz oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidroliz:																	
Kazein	+	ND	+	+	+	ND	+	d	+	d	d	-	+	d	-	+	+
Jelatin	+	ND	+	+	+	-	ND	d	+	d	-	-	+	+	-	+	d
Nişasta	+	+	+	+	+	-	-	d	+	+	+	-	+	d	-	-	-
Sitrat Kullanımı	+	-	-	-	d	+	-	d	+	d	d	-	-	-	-	-	-
Propiyonat Kullanımı	+	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND
Tirozin	-	ND	-	d	d	-	+	+	+	-	-	-	d	-	-	-	+
Hidrolizasyonu																	
Fenilalanin	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	d	-	-
Deaminasyonu																	
Yumurta Sarısı	-	ND	ND	-	+	-	ND	-	+	-	-	-	-	ND	ND	ND	+
Reaksiyonu																	

Devamı arkada

Ek 3.'ün Devamı

Özellikler	1. <i>B. subtilis</i>	2. <i>B. acidocaldarius</i>	3. <i>B. alcalophilus</i>	4. <i>B. alvei</i>	5. <i>B. anthracis</i>	6. <i>B. azotoformans</i>	7. <i>B. badius</i>	8. <i>B. brevis</i>	9. <i>B. cereus</i>	10. <i>B. circulans</i>	11. <i>B. coagulans</i>	12. <i>B. fastidious</i>	13. <i>B. firmus</i>	14. <i>B. globisporus</i>	15. <i>B. insolitus</i>	16. <i>B. larvae</i>	17. <i>B. laterosporus</i>
Nitrat Redüksiyonu	+	ND	-	-	+	ND	-	d	+	d	d	-	d	d	-	d	+
İndol Üretimi	-	-	-	+	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	d
Dihidroksiaseton Üretimi	ND	ND	-	+	ND	-	-	-	ND	-	d	ND	-	-	-	-	-
NaCl ve KCl gereksinimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alantoin ve ürat gereksinimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
pH 6.8'de gelişme, (Nutrient Broth)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
pH 5.7'de gelişme	+	d	-	-	+	-	-	d	+	d	+	-	-	-	-	-	-
NaCl'de gelişme																	
%2	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	d	+	ND
%5	+	ND	-	d	+	-	+	-	ND	d	-	+	+	-	-	-	d
%7	+	ND	-	-	+	-	ND	-	d	d	-	-	+	-	-	-	-
%10	ND	ND	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	-

Devamı arkada

Ek 3.'ün Devamı

Özellikler	1. <i>B. subtilis</i>	2. <i>B. acidocaldarius</i>	3. <i>B. alcalophilus</i>	4. <i>B. alvei</i>	5. <i>B. anthracis</i>	6. <i>B. azotoformans</i>	7. <i>B. badius</i>	8. <i>B. brevis</i>	9. <i>B. cereus</i>	10. <i>B. circulans</i>	11. <i>B. coagulans</i>	12. <i>B. fastidious</i>	13. <i>B. firmus</i>	14. <i>B. globisporus</i>	15. <i>B. insolitus</i>	16. <i>B. larvae</i>	17. <i>B. laterosporus</i>
Gelişme sıcaklığı																	
5°C	-	-	ND	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
10 °C	d	-	ND	-	-	ND	-	-	d	d	-	+	d	+	+	-	-
30 °C	+	-	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	d	-	+	+
40 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	+	d
50 °C	d	+	-	-	-	-	+	d	-	-	+	-	-	-	-	-	-
55 °C	-	+	-	-	-	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-	-	-
65°C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lizozim varlığında gelişme	d	ND	-	+	+	-	-	d	+	d	-	ND	-	-	-	+	+
H ₂ + CO ₂ veya CO ile ototrof	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- , Suşların %90 ya da daha fazlası negatif
 + , Suşların %90 ya da daha fazlası pozitif
 v , Suş kararsızlığı
 d , Suşların %11-89'u pozitif
 ND , Veri yok

NG, Gelişme yok
 (-)^p, Çok az gaz kabarcığı oluşabilir

Devamı arkada

Ek 3.'ün Devamı

Özellikler	18. <i>B. lentimorbus</i>	19. <i>B. lentus</i>	20. <i>B. licheniformis</i>	21. <i>B. macerans</i>	22. <i>B. macquariensis</i>	23. <i>B. marinus</i>	24. <i>B. megaterium</i>	25. <i>B. mycoides</i>	26. <i>B. pantothenicus</i>	27. <i>B. pasteurii</i>	28. <i>B. polymyxa</i>	29. <i>B. popilliae</i>	30. <i>B. pumilus</i>	31. <i>B. schlegelii</i>	32. <i>B. sphaericus</i>	33. <i>B. stearothermophilus</i>	34. <i>B. thuringiensis</i>
Hücre çapı > 1.0 µm	-	-	-	-	-	v	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Spor yuvarlaklığı	-	-	-	-	-	+	v	-	v	+	-	-	-	+	+	-	-
Sporangium şişmesi	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Parasporal Kristaller	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	d
Katalaz	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+	+	+	d	+
Anaerobik Gelişme	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Voges-Proskauer Testi	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	d
VP Broth'da pH																	
<6	d	-	+	+	+	ND	d	+	+	ND	d	d	+	ND	-	+	+
>7	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND	+	-	-
Asit Oluşumu																	
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	-	-	+	+
L-Arabinoz	-	+	+	+	-	-	d	-	-	ND	+	-	+	-	-	d	-
D-Ksiloz	-	+	+	+	+	d	d	-	-	ND	+	-	+	-	-	d	-
D-Mannitol	-	+	+	+	+	-	d	-	-	ND	+	-	+	-	-	d	-

Devamı arkada

Ek 3.'ün Devamı

Özellikler		18. <i>B. lentimorbus</i>	19. <i>B. lentus</i>	20. <i>B. licheniformis</i>	21. <i>B. macerans</i>	22. <i>B. aquariensis</i>	23. <i>B. marinus</i>	24. <i>B. megaterium</i>	25. <i>B. mycoides</i>	26. <i>B. anthracis</i>	27. <i>B. pasteurii</i>	28. <i>B. polymyxa</i>	29. <i>B. popilliae</i>	30. <i>B. pumilus</i>	31. <i>B. schlegelii</i>	32. <i>B. sphaericus</i>	33. <i>B. stearothermophilus</i>	34. <i>B. thuringiensis</i>
Glukozdan gaz oluşumu	gaz	-	-	(-) ^p	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Hidroliz:																		
Kazein		-	d	+	-	-	d	+	+	d	d	+	-	+	-	d	d	+
Jelatin		-	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	d	+	+
Niştasta		-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
Sitrat Kullanımı		-	-	+	d	-	-	+	d	-	ND	-	-	+	-	d	d	+
Propiyonat Kullanımı		ND	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
Tirozin Hidrolizasyonu		-	-	-	-	-	ND	d	d	-	ND	-	-	-	-	-	-	d
Fenilalanin Deaminasyonu		-	d	-	-	-	ND	d	-	d	ND	-	-	-	ND	+	-	-
Yumurta Sarısı Reaksiyonu	Sarı	ND	-	-	-	ND	ND	-	d	-	-	-	ND	-	-	-	ND	d

Devamı arkada

Ek 3.'ün Devamı

Özellikler	18. <i>B. lentimorbus</i>	19. <i>B. lentus</i>	20. <i>B. licheniformis</i>	21. <i>B. macerans</i>	22. <i>B. macquariensis</i>	23. <i>B. marinus</i>	24. <i>B. megaterium</i>	25. <i>B. mycoides</i>	26. <i>B. pantothenicus</i>	27. <i>B. pasteurii</i>	28. <i>B. polymyxa</i>	29. <i>B. popilliae</i>	30. <i>B. pumilus</i>	31. <i>B. schlegelii</i>	32. <i>B. sphaericus</i>	33. <i>B. stearothermophilus</i>	34. <i>B. thuringiensis</i>
Nitrat Redüksiyonu	-	d	+	+	-	d	d	+	d	+	+	-	-	+	-	d	+
İndol Üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-
Dihidroksiaseton Üretimi	-	-	ND	-	-	ND	ND	ND	-	ND	+	-	ND	ND	-	-	ND
NaCl ve KCl gereksinimi	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alantoin ve ürat gereksinimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 6.8'de gelişme, (Nutrient Broth)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
pH 5.7'de gelişme	-	-	+	+	-	ND	d	+	-	-	+	-	+	-	d	-	+
NaCl'de gelişme																	
%2	-	ND	+	ND	+	+	ND	ND	+	+	ND	+	+	+	ND	ND	+
%5	-	ND	+	-	-	ND	ND	ND	+	+	-	-	+	-	d	d	+
%7	-	d	+	-	-	d	d	d	+	+	-	-	+	-	d	-	+

Devamı arkada

Ek 3.'ün Devamı

Özellikler	18. <i>B. lentimorbus</i>	19. <i>B.lentus</i>	20. <i>B. licheniformis</i>	21. <i>B. macerans</i>	22. <i>B. macquariensis</i>	23. <i>B. marinus</i>	24. <i>B. megaterium</i>	25. <i>B. mycoides</i>	26. <i>B. pantothenicus</i>	27. <i>B.pasteurii</i>	28. <i>B. polymyxa</i>	29. <i>B. popilliae</i>	30. <i>B. pumilus</i>	31. <i>B. schlegelii</i>	32. <i>B. sphaericus</i>	33. <i>B.stearothermophilus</i>	34. <i>B. thuringiensis</i>
%10	-	ND	ND	-	-	-	ND	ND	+	+	-	-	ND	-	-	-	ND
Gelişme sıcaklığı																	
5°C	-	ND	-	-	+	+	d	-	-	ND	d	-	-	-	-	-	-
10 °C	-	ND	-	d	+	+	+	d	-	ND	+	-	+	-	+	-	d
30 °C	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
40 °C	-	ND	+	+	-	-	d	d	+	d	+	-	+	-	d	+	+
50 °C	-	-	+	d	-	-	-	-	d	-	-	-	d	+	-	+	-
55 °C	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
65°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Lizozim varlığında gelişme	+	-	d	-	-	ND	-	+	-	ND	d	+	d	+	d	-	+
H ₂ + CO ₂ veya CO ile ototrof	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
-, Suşların %90 ya da daha fazlası negatif +, Suşların %90 ya da daha fazlası pozitif v, Suş kararsızlığı d, Suşların %11-89'u pozitif ND, Veri yok (-)^p, Çok az gaz kabarcığı oluşabilir NG, Gelişme yok																	

Ek 4. API 20 E strip okuma tablosu

Testler	Aktif içerikler	Miktar (mg/küp.)	Reaksiyonlar/ Enzimler	Sonuçlar	
				Negatif	Pozitif
ONPG	2-nitrofenil-βD-galaktopiranozid	0.223	β-galaktosidaz (Ortho Nitrofenil-βD Galaktopiranosidaz)	Renksiz	Sarı (1)
<u>ADH</u>	L-arjinin	1.9	Arjinin DiHidrolaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu (2)
<u>LDC</u>	L-lizin	1.9	Lizin Dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu (2)
<u>ODC</u>	L-ornithin	1.9	Ornithin Dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu (2)
<u>CIT</u>	Trisodium sitrat	0.756	CITrate (sitrat) kullanımı	Açık yeşil/Sarı	Mavi-yeşil/Mavi
<u>H₂S</u>	Sodium thiosülfat	0.075	H ₂ S üretimi	Renksiz/ Grimsi	Siyah çökelti/İnce çizgi
<u>URE</u>	Üre	0.76	UREaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu (2)
TDA	L-triptofan	0.38	Triptofan DeAminaz	Sarı	<u>TDA/hemen</u> Kırmızı kahverengi
IND	L-triptofan	0.19	INDol üretimi	<u>JAMES/hemen</u> Renksiz/ zayıf yeşil/sarı	Pembe
<u>VP</u>	Sodium pirüvat	1.9	Asetoin üretimi (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2/10dk</u> Renksiz	Pembe/kırmızı
<u>GEL</u>	Jelatin (sığır kaynaklı)	0.6	GELatinaz	Siyah pigment yaygın değil	Siyah pigment yaygın
GLU	D-glikoz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (GLUkoz) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı/grimsi sarı
MAN	D-mannitol	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (MANnitrol) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
INO	İnositol	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (INOsitrol) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
SOR	D-sorbitol	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (SORbitol) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
RHA	L-rhamnoz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (RHAmmoiz) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
SAC	D-sukroz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (SACcharoz) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
MEL	D-melibioz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (MELibioz) (4)	Mavi/mavi	Sarı
AMY	Amygdalin	0.57	Fermentasyon/oksidasyon (AMYgdalin) (4)	Mavi/mavi	Sarı
ARA	L-arabinoz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (ARABinoz) (4)	Mavi/mavi	Sarı
OX	(oksidaz test prospektüsüne bakınız)		Sitokrom-Oksidaz	(oksidaz test prospektüsüne bakınız)	

- (1) Çok açık sarı pozitif olarak düşünülmelidir.
- (2) 36-48 saat inkübasyondan sonra turuncu renk negatif kabul edilmelidir.
- (3) Okuma (küpülde) yapılır.
- (4) Fermentasyon tüpün alt kısmında başlarken, oksidasyon küpülde başlar.
- (5) 10 dakika sonra hafifçe pembe renk negatif kabul edilmelidir.

Ek 5. API CH striplerinin bileşimi

Tüp	Test	Etkin bileşenleri	QTY (mg/küpül)	Tüp	Test	Etkin bileşenleri	QTY (mg/küpül)
0		KONTROL	-	25	ESC	Eskulin Ferrik sitrat	1.16 0.152
1	GLY	Gliserol	1.64	26	SAL	Salisin	1.04
2	ERY	Eritritol	1.44	27	CEL	D-Sellobioz	1.32
3	DARA	D-Arabinoz	1.4	28	MAL	D-Maltoz	1.4
4	LARA	L-Arabinoz	1.4	29	LAC	D-Laktoz	1.4
5	RIB	D-Riboz	1.4	30	MEL	D-Melibioz	1.32
6	DXYL	D-Ksiloz	1.4	31	SAC	D-Sakkaroz (sükroz)	1.32
7	LXYL	L-Ksiloz	1.4	32	TRE	D-Trihaloz	1.32
8	ADO	D-Adoitol	1.36	33	INU	Inulin	1.28
9	MDX	Metil-βD-Ksilopiranozid	1.28	34	MLZ	D-Melezitoz	1.32
10	GAL	D-Galaktoz	1.4	35	RAF	D-Raffinoz	1.56
11	GLU	D-Glikoz	1.56	36	AMD	Amidon (nişasta)	1.28
12	FRU	D-Fruktoz	1.4	37	GLYG	Glikojen	1.28
13	MINE	D-Mannoz	1.4	38	XLT	Ksilitol	1.4
14	SBE	L-Sorboz	1.4	39	GEN	Gentiobioz	0.5
15	RHA	L-Ramnoz	1.36	40	TUR	D-Turanoz	1.32
16	DUL	Dulsitol	1.36	41	LYX	D-Liksoz	1.4
17	INO	Inositol	1.4	42	TAG	D-Tagatoz	1.4
18	MAN	D-Mannitol	1.36	43	DFUC	D-Fukoz	1.28
19	SOR	D-Sorbitol	1.36	44	LFUC	L-Fukoz	1.28
20	MDM	Metil-αD-Mannopiranozid	1.28	45	DARL	D-Arabitol	1.4
21	MDG	Metil-αD-Glukopiranozid	1.28	46	LARL	L-Arabitol	1.4
22	NAG	N-Asetilglukozamin	1.28	47	GNT	Potasyum Glukonat	1.84
23	AMY	Amigdalin	1.08	48	2KG	Potasyum 2-KetoGlukonat	2.12
24	ARB	Arbutin	1.08	49	5KG	Potasyum 5-KetoGlukonat	1.8

ÖZGEÇMİŞ

Fundagül EREM 1982 yılında Bitlis'in Ahlat ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bitlis'in Tatvan ilçesinde, lise öğrenimini ise Antalya'da tamamladı. 2000 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2004 yılında fakülte birincisi ve yüksek onur öğrencisi olarak, Gıda Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2005 yılının Ekim ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. Halen aynı kurumda görevine devam etmektedir.

