



PROBİYOTİK *Alkalihalobacillus clausii* SPORU İÇEREN KEK ÜRETİMİ

Gökçe Ersoy¹, Sultan Arslan Tontul^{1*}, Mustafa Erbaş²

¹Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya, Türkiye

²Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş / Received: 27.10.2022; Kabul / Accepted: 13.12.2022; Online baskı / Published online: 16.12.2022

Ersoy, G., Arslan-Tontul, S., Erbaş, M. (2023). Probiyotik *A.clausii* sporu içeren kek üretimi. GIDA (2023) 48 (1) 16-24 doi: 10.15237/gida.GD22105

Ersoy, G., Arslan-Tontul, S., Erbaş, M. (2023). Cake production with probiotic *A.clausii* spores. GIDA (2023) 48 (1) 16-24 doi: 10.15237/gida.GD22105

ÖZ

Son yıllarda *Bacillus* bakterisi sporlarına olan ilgi, probiyotik özellikleri nedeniyle hızla artmıştır. Bu çalışmada *A. clausii* sporları kullanılarak probiyotik özellikte kek üretimi amaçlanmıştır. Fırınlama işlemi normal şartlarda, mikrodalga ve buhar destekli olarak uygulanmıştır. Üretilen keklerin probiyotik spor canlılığı pişirme sonunda, in vitro sindirim şartlarında ve depolama sırasında takip edilmiştir. Kek örneklerinin pişirme sonrasında probiyotik spor içeriğinin 5.74-5.88 log kob/g aralığında olduğu ve canlılığın yaklaşık %79 oranında korunduğu tespit edilmiştir. Mide ve bağırsak sindirimi sonucunda kek örneklerinin *A. clausii* sayısının sırasıyla 5.89-6.06 log kob/g ve 6.06-6.27 log kob/g seviyesinde olduğu tespit edilmiş ve probiyotik sporların gastrointestinal şartlara karşı oldukça direnç gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan depolama testleri sonucunda ise bakteriyel sporların depolama sırasında da oldukça stabil halde kaldıkları ve başlangıç seviyelerini korudukları belirlenmiştir. Buzdolabı sıcaklığında depolanan örneklerde daha yüksek bakteriyel spor canlılığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus*, spor, probiyotik, kek

CAKE PRODUCTION WITH PROBIOTIC *Alkalihalobacillus clausii* SPORES

ABSTRACT

In recent years, interest in *Bacillus* spores has increased due to their probiotic properties. This study, it was aimed to produce probiotic cakes by using *A. clausii* spores. In the baking process; under normal conditions, microwave and steam-assisted baking were applied. The probiotic spore viability was researched after baking, in vitro digestion test, and storage. It was determined that the probiotic spore content of the cake samples after baking was in the range of 5.74-5.88 log cfu/g and the spores preserved their viability at a rate of 79%. As a result of the gastric and intestinal digestion, the number of *A. clausii* in the cake samples was determined to be 5.89-6.06 log cfu/g and 6.06-6.27 log cfu/g, respectively. As can be seen from these results, the probiotic spores showed high resistance to gastrointestinal conditions and almost preserved viability before the test. Additionally, it was determined that the bacterial spores remained quite stable during storage and kept the initial level. The viability of bacterial spores stored at room temperature was higher than that stored at room temperature.

Keywords: *Bacillus*, spore, probiotic, cake

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉: sultan.arslan@selcuk.edu.tr

☎: (+90) 332 223 2937

☎: (+90) 332 241 0108

Gökçe Ersoy; ORCID no: 0000-0003-3771-427X

Sultan Arslan Tontul; ORCID no: 0000-0003-1557-7948

Mustafa Erbaş; ORCID no: 0000-0002-9485-2356

GİRİŞ

Probiyotik mikroorganizmalar sağlığa faydalı etkileri nedeniyle uzun süredir fonksiyonel ürün geliştirme çalışmalarının ilgi odağı haline gelmiştir. Probiyotik mikroorganizmalar, Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre yeterli miktarda canlı olarak vücuda alındığında sağlığı koruyucu ve geliştirici bazı etkiler gösteren mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır. Bilinçli gıda tüketicileri, antibiyotik kullanımını sınırlandıran, daha az işlem görmüş, güvenli ve ucuz alternatif gıda arayışı içerisinde. Bu anlamda probiyotik mikroorganizmalar, bu amaçla uzun yıllardır kullanılan güvenli bir yöntem olması nedeniyle öne çıkmaktadır. Probiyotik ürün pazarı, tüketicilerin sağlıklı yaşam bilincinin artması, sindirim bozuklukları ve metabolik bozuklukların beslenme şartlarının düzenlenmesi ile kontrol altına alınabileceğinin anlaşılması gibi nedenlerle hızla büyümektedir. Bu pazarın 2023 yılına kadar %7 oranında genişleyeceği ve pazar payının yaklaşık 39.2 milyar dolara ulaşacağı öngörülmektedir. Ürün geliştirme çalışmalarında kullanılan probiyotikler; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, maya, spor oluşturan bakteriler ve diğerleri olmak üzere beş sınıfa ayrılmaktadır. Ancak bu sınıfların arasında spor oluşturan *Bacillus* türleri, global nutrasötik pazarında önemli yer tutmaktadır. Bunun en büyük nedeni ise spor oluşturma yeteneğinin sağladığı üstün dayanıklılıktan ileri gelmektedir. Proses sırasında stabilizasyonun yüksek olması *Bacillus* sporlarını yeni fonksiyonel gıda formülasyonlarının geliştirilmesi için iyi bir aday haline getirmiştir (Elshaghabe vd., 2017).

B. clausii, gram pozitif, spor oluşturabilen ve fakültatif alkalifilik, çubuk şekilli bir bakteridir. Bu bakterinin karakteristik özellikleri içerisinde; katalaz ve oksidaz üretebilme, jelatin ve nişasta polimerini hidrolize edebilme, nitrat indirgeme, 30-50°C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilme ve %10 seviyesine kadar NaCl konsantrasyonunu tolere edebilme sayılabilmektedir. Spor oluşturma yeteneği, bu bakterilere eşsiz bir dayanım kazandırmaktadır. Oluşan bu spor formlar, gastrik sistemin zorlu ve yüksek asitli ortamında korunarak intestinal sisteme kadar ulaşabilmekte ve probiyotik etkilerini gösterebilmektedir

(Sanders vd., 2003; Mingmongkolchai ve Panbangred, 2017).

A. clausii probiyotik bakterisinin üstün fonksiyonel özellikleri, spor oluşturma yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Probiyotik etki özellikle vejetatif hücrelerde görülmekle birlikte bazı kaynaklarda sporların da bu tür fonksiyonel etkiler gösterebildiği bildirilmektedir (Spinosa vd., 2000). Ancak spor formlar midenin düşük asitliğinden ve sindirim enzimlerinden etkilenmediğinden kolayca asıl etki bölgesi olan kolona ulaşmakta ve burada vejetatif forma dönüşerek probiyotik etki göstermektedirler. Sindirim sisteminin ekstrem şartlarına karşı vejetatif hücrelerin dayanıksız, spor formların ise oldukça dayanıklı olduğu bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada *Bacillus* sporlarının pH 2.5 ortamında 6 saat kalabildiği ve %0.3'e kadar safra tuzunu tolere edebildiği belirtilmiştir. Birçok çalışma, *Bacillus* sporlarının intestinal sistemde vejetatif forma dönüşerek faydalı etkiler (antimikrobiyel, patojenlere karşı besin rekabeti, bağışıklık düzenleyici, kısa zincirli yağ asidi, K ve B grubu vitamin üretimi) gösterdiğini rapor etmektedir (Hong vd., 2005; Elshaghabe vd., 2017; Mingmongkolchai ve Panbangred, 2017). Ayrıca spor formlar yüksek sıcaklıklara dayanabildiklerinden ısl işlem prosesi ile üretilen gıda formülasyonlarında da etkilenmeden canlılıklarını koruyabilecekleri düşünülmektedir.

Güvenli olmaları ve uzun süredir kullanımları *Bacillus* sporlarını fonksiyonel gıda geliştirme çalışmalarında iyi bir probiyotik mikroorganizma adayı haline getirmiştir. Probiyotik etkileri çeşitli çalışmalarla tespit edilmiş olan, insan ve hayvanların tüketiminde kullanılan *Bacillus* türleri *B. cereus*, *B. clausii*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* ve *B. pumilus* olup *A. clausii* türü, diyarenin tedavisinde halihazırda kullanılan bir preparat olarak etkili bir yöntem olması ile ön plana çıkmaktadır (Sanders vd., 2003; Patrone vd., 2016; Mingmongkolchai ve Panbangred, 2017). Yapılan bir çalışmada *A. clausii* hücrelerinin kolayca Caco-2 hücrelerine tutunarak, *Clostridium difficile* toksinlerini inaktive ettiği bildirilmiştir (Elshaghabe vd., 2017). Yayımlanan bir *in vivo* çalışmada ise *B. clausii*'nin sindirim mikrobiyotasını

iyileştirdiği ve bağışıklık sistemini düzenleyen CD4+T hücrelerinin sentezini arttırdığı rapor edilmiştir (Hong vd., 2005). Tüm bunlara ilaveten, *A. clausii* hücrelerinin kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli olması nedeniyle antibiyotik tedavisi ile birlikte kullanılması da çok büyük bir avantaj sağlamaktadır (Elshaghabee vd., 2017). Diğer yürütülen in vivo ve in vitro çalışmalar da *A. clausii* hücrelerinin probiyotik özelliklerini desteklemektedir (Muscettola vd., 1991, 1992; Kosak vd., 1998; Di Caro vd., 2005).

Her ne kadar probiyotik etkileri ile *Bacillus* türleri ilgi odağı olsa da bazı türlerinin (*B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*) patojen şüphesi, negatif bir algı ortaya çıkarmaktadır. Halbuki in vivo çalışmalarda patojen bu türler dışındaki *Bacillus* türlerinin herhangi bir toksik etkisi tespit edilmemiştir (Sanders vd., 2003). Patojen olmayan *Bacillus* türleri, çok uzun yıllardır gıda üretiminde GRAS nitelikteki birçok ekstraselüler enzim (amilaz, glukoamilaz, proteaz, pektinaz) üretiminde kullanılmaktadır. Enzim üretimi dışında *Bacillus* türleri; vitamin, karotenoid, antibiyotik ve antimikrobiyal (subtilin ve koagulin) maddeler gibi iyi bilinen ikincil metabolitleri de üretmektedirler. Günümüzde antibakteriyel maddelerin neredeyse yarısı *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir (Sanders vd., 2003; Bernardeau vd., 2017; Elshaghabee vd., 2017). Tüm bunlara ilaveten *Bacillus* türleri soya, keçiyoynuzu, mısır ve pirinç gibi hammaddelerin kullanıldığı geleneksel fermantasyonda sıkça rol alırlar. *Bacillus* fermentasyonu ile üretilen geleneksel gıdalardan en bilineni ise Japonya'da yaygın olarak tüketilen Natto isimli fermente bir gıdadır (Sanders vd., 2003; Elshaghabee vd., 2017).

Bu çalışmada *A. clausii* probiyotik sporlarının kek üretiminde kullanılması, farklı pişirme tekniklerinin spor canlılığı üzerine etkilerinin araştırılması ve üretilen keklerin in vitro sindirim şartlarında ve depolama sırasında probiyotik özelliklerindeki değişimlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan iyi kalitede kek hammaddeleri (un, kristal şeker, sıvı yağ, yumurta, kabartma tozu ve vanilya) yerel marketlerden temin edilmiştir. Araştırmada probiyotik olarak Enterogermina® ticari preparatının içerdiği *Alkalibacillus clausii* sporları kullanılmıştır (10⁸ kob/mL). In vitro sindirim çalışmalarında kullanılan sindirim enzimleri Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler ise Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Kek Üretimi

Kek miksinin hazırlanmasında Arslan-Tontul, vd. (2019) tarafından tarif edilen formülasyon kullanılmıştır. Bu amaçla 150 g un, 150 g kristal toz şeker, 150 g bütün yumurta, 150 g sıvı yağ, 1.5 g kabartma tozu ve 1.5 g vanilya tartılmış ve köpük hamur kıvamına gelene kadar mikser yardımı ile çırpılmıştır. Kek miksinden 150 g tartılarak içerisine 10⁷ kob/g olacak şekilde hazır süspansiyon halindeki *A. clausii* sporu ilave edilerek kısa süreli karıştırma uygulanmıştır. Spor ilave edilen kek miksleri, kalıplara 30 g ağırlığında tartılmış ve normal sıcak hava, mikrodalga destekli sıcak hava ve buhar destekli sıcak hava şartlarında pişirilmiştir. Pişirme şartları; normal üretim için 180°C'de 17 dk, kombine mikrodalga uygulaması için 180°C, 90 W ve 13 dk ve buhar uygulaması için ise 180°C, düşük düzeyde buhar ve 19 dk süre boyunca uygulanmıştır. Pişirme sonrasında ölçülen kek iç sıcaklıkları normal, mikrodalga ve buhar uygulaması için sırasıyla 87.8°C, 81.1°C ve 80.6°C olarak belirlenmiştir. Pişirme sonrasında kek örnekleri soğutulmuş, bütün halde bireysel kilitli polietilen poşetlere koyulmuş ve depolanmıştır. Depolama işlemi oda sıcaklığında 5 gün ve buzdolabı sıcaklığında ise 15 gün olarak yürütülmüştür.

A. clausii sayımı

Kek örnekleri öğütüldükten sonra 10 g tartılarak 90 mL steril ringer çözeltisi içerisinde homojenize edilmiştir. Bu süspansiyon ilk dilüsyon olarak kabul edilerek ileri dilüsyonların hazırlanmasında kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan örnek alınarak yayma plak yöntemine göre Mueller

Hinton Agar besiyerine ekimi yapılmıştır. Petriler 45°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra sayılmıştır (Patrone vd., 2016; Urdacı vd., 2004). *A. clausii* canlılık değeri ise pişirme öncesi hamurda tespit edilen vejetatif-spor hücre sayısının pişirme sonrasında tespit edilen sayıya oranlanması sonrasında % olarak hesaplanmıştır.

In vitro sindirim testi

A. clausii sporlarının in vitro sindirim sisteminde uğradığı değişimler Brodtkorb vd., (2019) tarafından tarif edilen INFOGEST protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. In vitro oral faz çözeltisi, 1.5 mM CaCl₂ ve 75 U/mL amilaz kullanılarak hazırlanmış ve çözeltinin son pH değeri 7'ye ayarlanmıştır. 2 g kek örneği ve 2 mL oral faz çözeltisi bir şişe içerisinde karıştırılmış ve 37 °C'de 2 dk süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 1 mL örnekleme yapılmıştır. In vitro mide çözeltisinin hazırlanmasında 0.15 mM CaCl₂, 2000 U/mL pepsin ve 60 U/mL lipaz kullanılmış ve çözelti pH değeri 0.1 N HCl ile 3'e ayarlanmıştır. 3 g kek-oral faz karışımı üzerine 3 mL gastrik çözelti ilave edilmiş ve 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 1 mL örnekleme yapılmıştır. In vitro bağırsak çözeltisinin hazırlanmasında ise, 10 mM safra tuzu, 0.6 mM CaCl₂ ve 100 U/mL pankreatin kullanılmış ve çözelti pH değeri 0.1 N NaOH ile 7'ye ayarlanmıştır. 5 g kek-gastrik faz karışımı üzerine 5 mL bağırsak çözeltisi ilave edilmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 1 mL örnekleme yapılmıştır. Simüle sindirim testi sırasında alınan örneklerde *A. clausii* sayımı yapılmıştır.

pH ve Titrasyon Asitliği

Pişirme sonrasında öğütülen kek örneklerinin pH değeri, örneğin 20 kat saf su ile homojenize edilmesinden sonra pH metre kullanılarak tespit edilmiştir. Titrasyon asitliği değeri ise pH ölçümü için homojenize edilen örneklerin fenolfitalein indikatöründe, 0.1 N NaOH çözeltisi ile titrasyonu sonucunda laktik asitin eşdeğerliği kullanılarak % olarak belirlenmiştir (AACC, 1999).

İstatistiksel Analizler

Kek üretimi iki tekerrürlü, analizler ise paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere

varyans analizi ve önemli bulunan faktörlere Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır. Tüm istatistik hesaplamalar SAS istatistik programı ile gerçekleştirilmiş olup değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde düzenlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kek Örneklerinin *A. clausii* Sayısı ve Pişirme Sonrası Canlılık Değerleri

Fırıncılık ürünlerinin probiyotik özellikte üretilmemelerinin önündeki en büyük engel, pişirme sırasında uygulanan yüksek sıcaklıktır. Çoğu probiyotik mikroorganizma (*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*) pişirme sıcaklıklarında inaktive olmaktadır. Bu tür ürünler ancak probiyotiklerin özel teknikler ile hazırlanan süspansiyonlarının pişirme sonrası ürünün yüzeyine püskürtülmesi veya farklı teknikler ile mikrokapsül haline getirildikten sonra formülasyona ilave edilmeleri ile üretilebilmektedir. Bu gereklilik ekstra bir maliyet getirmekle birlikte endüstriyel ölçekte uygulamaya uygun olmamaktadır. Ancak bakteriyel sporlar ısıtma, kurutma, dondurma, toksik kimyasallar ve ışınlamaya karşı oldukça dayanıklıdır. Sporların bu stabil özellikleri onları ısı işlem uygulanan prosesler için ilgi çekici hale getirmektedir. Bakteriyel sporların fırıncılık ürünlerinde kullanılmalarının en önemli avantajı herhangi ekstra bir teknik gerektirmeden üstün stabilizasyon özelliklerine sahip olmaları ve daha düşük maliyette doğal bir koruma imkânı sağlamalarıdır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada *A. clausii* probiyotik sporlarının kek üretiminde kullanım imkanları araştırılmıştır. Çizelge 1'de sunulduğu üzere pişirme sonrasında gerçekleştirilen sayımlara göre pişirme yönteminin kek örneklerinin *A. clausii* sayısında ve canlılığında istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Kek örneklerinin pişirme sonrasında probiyotik spor içeriği 5.74-5.88 log kob/g aralığında tespit edilmiştir. Her ne kadar üretilen keklerde probiyotik spor sayısı, limit olarak kabul edilen 10⁶ kob/g değerinin altında kalsa da canlılık oranları göz önünde bulundurulduğunda %79'dan fazla sporun pişirme sırasında canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. Kek miksi içerisine ilave edilen

başlangıç spor sayısının yüksek tutulması ile limit probiyotik mikroorganizma değerinin sağlanabileceği değerlendirilmiştir. Tüm bunlara ilaveten *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi probiyotik suşların fırın sıcaklığında canlılıklarını

tamamen kaybettiği bilinmektedir (Arslan-Tontul vd., 2019). Bu nedenle *A. clausii* sporlarının probiyotik özellikte kek üretimi için iyi bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 1. Kek örneklerinin pişirme sonrası *A. clausii* sayısı ve canlılığı
Table 1. *A. clausii* count and viability after baking of cake samples

Pişirme <i>Baking type</i>	<i>A. clausii</i> kob/g <i>A. clausii</i> cfu/g	Canlılık (%) <i>Viability (%)</i>
Normal <i>Control</i>	5.77 ± 0.13 ^a	80.26 ± 1.75 ^a
Mikrodalga <i>Microwave assisted</i>	5.88 ± 0.02 ^a	81.77 ± 0.33 ^a
Buhar <i>Steam assisted</i>	5.74 ± 0.04 ^a	79.81 ± 0.60 ^a

Bacillus sporlarının fonksiyonel gıda geliştirme çalışmalarında kullanımı ile ilgili her geçen gün yeni araştırmalar ortaya konulmaktadır. Ancak kek gibi fırıncılık ürünlerinde kullanımı ile ilgili oldukça kısıtlı çalışma tespit edilebilmiştir. Yapılan bir çalışmada farklı fırıncılık ürünlerinin üretimi sırasında pişirme şartlarının *Bacillus coagulans* sporlarının canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Probiyotik sporlar %5 oranında formülasyona ilave edilerek 8 farklı ürün üretimi (kurabiye, kek, ekme ve tost) gerçekleştirilmiştir. *B. coagulans* sayıları incelendiğinde ise canlılığın pişirme işleminden olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. Kasımpatı kurabiyeleri, yumurtalı pasta kekleri, pandispanya, sodalı kurabiyeler ve tostların *B. coagulans* sayısı ve canlılığı depolama süresi boyunca hem buzdolabı sıcaklığında hem de oda sıcaklığında azalmıştır (Jao vd., 2011). Almada-Erix vd. (2022) beyaz ekme ve tam buğday ekmeği üretiminde *B. coagulans* kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Çalışmada hamur yoğurma ve fermentasyon proseslerinin probiyotik spor canlılığını etkilemediği, ancak pişirme işleminin yaklaşık 2 logaritmik birimlik azalışa neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmada pişirme sonrası ekmeğin *B. coagulans* sayısının 5 log kob/g seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Soares vd. (2019) iki farklı *B. coagulans* suşunun farklı gıda ürünlerinin üretim prosesinde kullanımı ve canlılık takibini yaptıkları çalışmalarında ekmeğin pişirilmesi sonrasında farklı suşlar için

spor canlılığını 7.4 ve 6.0 log kob/g olarak rapor etmişlerdir.

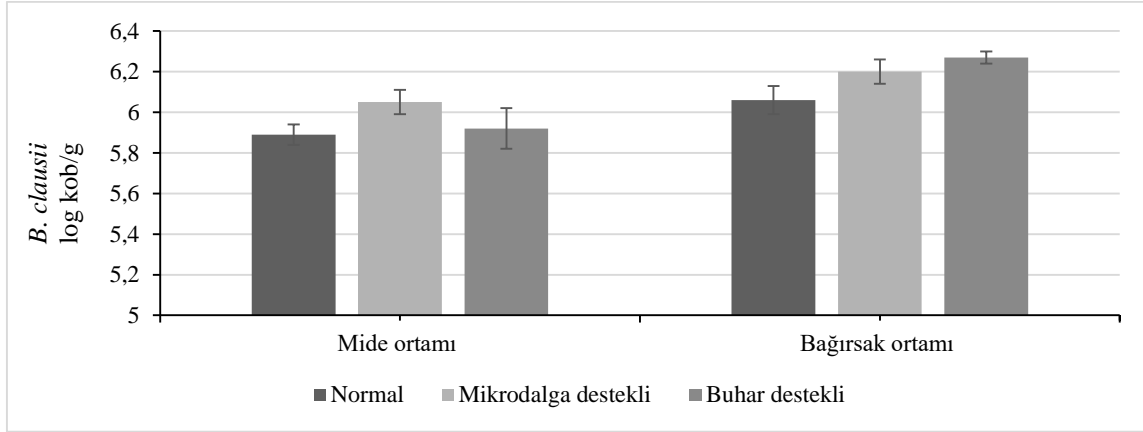
Kek örneklerinin içerdiği *A. clausii* Sporlarının In Vitro Sindirim Direnci

Kek örneklerinin *A. clausii* sayısı üzerinde pişirme tekniğinin bir etkisinin olmadığı tespit edilmiş olmakla birlikte temel farklılık in vitro sindirim testi sırasında görülmüştür (Şekil 1). Mide sindirimi sonucunda kek örneklerinin *A. clausii* sayısının 5.89-6.06 log kob/g seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. 2 saatlik mide testi sonunda mikrodalga destekli pişirme ortamının bakteriyel sporların direncini kısmen arttırdığı belirlenmiştir. Tüm bunlara ilaveten üretim sonrasında elde edilen spor canlılığının in vitro mide ortamında büyük oranda korunduğu ve *A. clausii* sporlarının kek formülasyonu içerisinde mide şartlarına oldukça dirençli olduğu tespit edilmiştir.

In vitro bağırsak testi sonuçlarına göre 2 saatlik test sonucunda *A. clausii* sayısının 6.06-6.27 log kob/g aralığında olduğu tespit edilmiştir. Test sonucunda pişirme yöntem farklılığının bakteriyel sporların canlılığını etkilediği ve normal pişirmeye kıyasla mikrodalga ve buhar destekli pişirme yönteminin *A. clausii* sporlarının direncini arttırdığı tespit edilmiştir. Tüm bunlara ilaveten kek örneklerinin *A. clausii* spor sayısının bağırsak simülasyonunda artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum temel nedeninin ise spor formların vejetatif hale geçmesinden kaynaklandığı

düşünülmüştür. Çalışmada gerçekleştirilen in vitro testler, kek formülasyonunun probiyotik sporların taşınması için iyi bir araç olduğu ve kek içerisinde bulunan *A. clausii* sporlarının gastrointestinal

sistemde canlılıklarını kaybetmeyip aksine vejetatif forma geçerek çoğalabildiklerini göstermesi açısından önemlidir.



Şekil 1. Kek içerisine ilave edilmiş *A. clausii* sporlarının in vitro sindirim testi sırasında canlılıkları
 Figure 1. The viability of *A. clausii* spor added to the cake samples during in vitro digestion test

Bacillus sporlarının sindirim şartlarına karşı dayanıklı olduğu çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Ancak farklı gıda formülasyonları içerisine ilave edilmiş sporların gastrointestinal sistemdeki davranışlarını inceleyen sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Pabon vd. (2022) probiyotik ekstrüde çerez üretimini amaçladıkları çalışmalarında *B. coagulans* probiyotik sporlarını kullanmışlar ve çerezlerde 6.74 log kob/g canlılık sayısı rapor etmişlerdir. Çerez formülasyonlarının in vitro sindirim şartlarında *B. coagulans* sporlarının canlılıkları üzerine etkileri araştırılmış ve 6 saatlik test süresi sonunda %70 oranında canlılık seviyesi bildirmişlerdir. Soares vd. (2019) peynir, meyve suyu ve ekmeğin sindirim şartlarında *B. coagulans* için taşıyıcılık potansiyellerini araştırmıştır. Çalışmada in vitro sindirim şartlarında bu gıda formülasyonlarının probiyotik sporların canlılıkları üzerine etkileri araştırılmış, peynir ve ekmeğin sindirim şartlarında %91'in üzerinde canlılığı korudukları belirlenmiştir. Marcial-Coba vd. (2019) meyve ve kuruyemiş barlarının üretiminde *B. coagulans* probiyotik sporlarını kullanmış ve bu gıdaları in vitro sindirim testlerine tabi tutarak canlılıklarını takip etmiştir. Araştırmada bar örnekleri içerisindeki probiyotik sporların test sırasında yalnızca 0.02

logaritmik birimlik azalış gösterdiği ve büyük oranda korunduğu tespit edilmiştir.

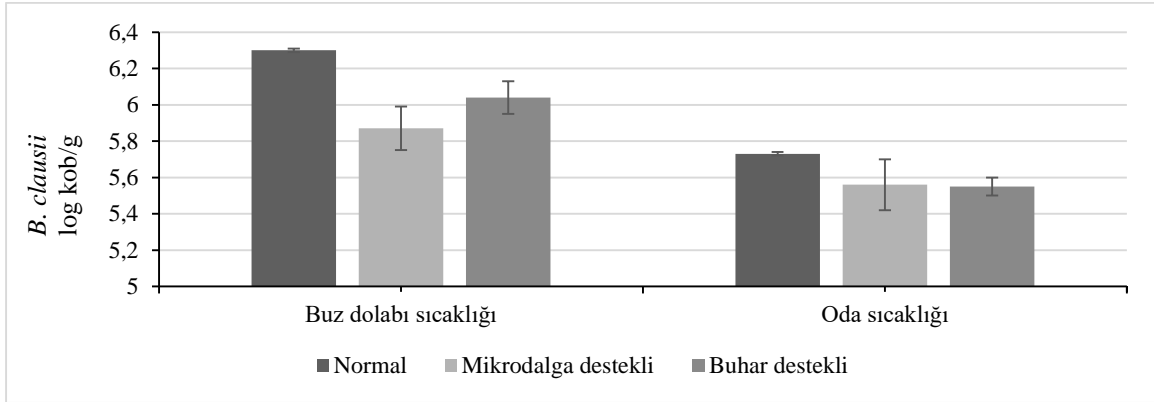
Kek örneklerinin içerdiği *A. clausii* Sporlarının Depolama Direnci

Farklı sıcaklıklarda yürütülen depolama sırasında kek örneklerinin içerdiği *A. clausii* sporlarının canlılık değerlerinin oldukça önemli oranda korunduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Buzdolabı ve oda sıcaklığında depolama sırasında tespit edilen *A. clausii* sayısı sırası ile 5.87-6.30 log kob/g ve 5.55-5.73 log kob/g aralığında olup pişirme tekniğinin depolama stabilitesi üzerinde istatistiki olarak önemli bir etkisinin olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Deskriptif olarak ise normal şartlarda fırınlanan kek örneklerinin spor canlılığının diğer teknikler ile üretilen kek örneklerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca buzdolabı ortamında gerçekleştirilen depolamanın kısmen daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Probiyotik sporların farklı depolama koşullarında oldukça stabil kalabildikleri daha önce yürütülen çalışmalarda da ortaya konulmuştur. Yapılan bir çalışmada farklı formülasyona sahip gıdaların üretiminde *B. coagulans* MTCC 5856 kullanılarak bu ürünlere fonksiyonellik kazandırılması

amaçlanmıştır. Bu amaçla kahve, şekerleme, fıstık ezmesi, çilek reçeli, bitkisel yağ, elma suyu ve şeker şurubu içerisine üretim sonrasında probiyotik sporlar karıştırılarak canlılıkları takip edilmiştir. Sonuç olarak çikolatalı şekerleme, sıcak şekerleme sosları, fıstık ezmesi, çilek reçeli ve bitkisel yağ örneklerinde spor canlılığının 12 ay sonunda %95 seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca buzdolabında 6 aya kadar depolanan elma suyunda ve oda sıcaklığında 24 aya kadar depolanan konsantre glikoz şurubunda da *B. coagulans* sporlarının stabil kalabildiği belirlenmiştir (Majeed vd., 2016). Almada-Erix vd. (2022) ekmek üretiminde *B. coagulans* sporlarını kullanmış

ve 10 günlük depolama süresi sonunda bakteriyel sporların vejetatif forma geçmediğini ve stabil kaldığını rapor etmişlerdir. Marcial-Coba vd. (2019) *B. coagulans* BC4 içeren meyve ve kuruyemiş barlarını 25°C'de 45 gün süresince depolamış ve süre sonunda probiyotik sporların %86 canlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Soares vd. (2019) iki farklı *B. coagulans* suşunu ekmek üretiminde kullanmış ve ekmek örneklerini oda sıcaklığında 7 gün süre ile depolamışlardır. Suşlardan birisinde depolama sonucunda 0.1 log birimlik azalış (*B. coagulans* MTCC 5856) tespit edilirken diğerinde ise 0.7 log birimlik artış (*B. coagulans* GBI-306086) gözlenmiştir.



Şekil 2. Kek içerisine ilave edilmiş *A. clausii* sporlarının depolama sırasında canlılıkları
Figure 2. The viability of *A. clausii* spores added to the cake samples during storage

Kek örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri

Pişirme yönteminin probiyotik kek örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Örneklerin pH değeri 7.19-7.30 ve titrasyon asitliği değeri ise %0.49-0.60 aralığında değişim göstermiştir. Pişirme öncesinde kek miksi pH ve titrasyon asitliği değeri ise 7.3 ve %0.63 olarak tespit edilmiştir. Spor ilave edilmemiş kek miksinin pH ve asitlik değerlerinin pişirme sonrası kek örneklerinde tespit edilen değerler ile aynı olması, *A. clausii* hücrelerinin kek üretimi sırasında fermentatif aktivite göstermediğini ifade etmektedir. *Bacillus coagulans* içeren farklı fırıncılık ürünlerinin geliştirilmesinin amaçlandığı bir çalışmada probiyotik sporlar %5 oranında formülasyona ilave edilerek 8 farklı ürün üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim sonrası ürünler

iki farklı sıcaklıkta depolanmış ve örneklerin pH, titrasyon asitliği ve *B. coagulans* içeriği takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre pişirme işleminden sonra örneklerin pH değerinde bir miktar artış, titrasyon asitliği değerinde ise bir miktar azalış tespit edilmiştir. Bu değerlerin depolama süresince de sabit kaldığı gözlenmiştir. Bu durum fırın ürünlerindeki besinlerin *B. coagulans* tarafından kullanılmadığı ve ortamda organik asit üretiminin gerçekleşmediğini ortaya koymaktadır (Jao vd., 2011).

SONUÇ

Bu araştırma ile *A. clausii* sporları kullanılarak probiyotik özellikle kek üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Yürütülen analizler sonucunda kekin pişirilmesi sırasında *A. clausii* sporlarının canlılığının yaklaşık %79'dan fazlasının korunduğu belirlenmiştir. Pişirme

yöntemlerindeki farklılığın ise bakteriyel sporların canlılığı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Yine yapılan in vitro sindirim testlerinde kekin bakteriyel sporların gastrointestinal sistemde taşınması için iyi bir araç olduğu ve intestinal ortamda bir miktar sporun vejetatif forma geçebildiği belirlenmiştir. Kek örneklerinin depolanması sırasında *A. clausii* sporlarının büyük oranda stabil kaldığı ve kekin depolanması için oda sıcaklığı şartlarının da uygulanabileceği sonucuna varılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda probiyotik özellikte fırıncılık ürünlerinin üretiminde *A. clausii* sporlarının kullanılabilirliği ve endüstriyel üretim hattında ekstra bir altyapı gerektirmeyerek mevcut şartlara adapte edilebileceği kanaatine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmaya verdikleri destek nedeniyle Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje no: 20401135) teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makalede yazarların, diğer kişilerin ve kurumların arasında herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını beyan ederiz.

YAZAR KATKILARI

Tüm yazarlar makalenin yapılmasında, yazılmasında ve yayınlanmasında eşit katkı sağlamışlardır.

KAYNAKLAR

AACC, (1999). AACC International Method 02-52.01, 02-31.01 and 44-15.02. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, Minnesota, USA.

Almada-Erix, C. N., Almada, C. N., Pedrosa, G. T. S., Biachi, J. P., Bonatto, M. S., Schiele, M., Sant'Ana, A. S. (2022). Bread as probiotic carriers: Resistance of *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 spores through processing steps. *Food Res Int*, 155, 111040.

Arslan-Tontul, S., Erbas, M, Gorgulu A. (2019). The use of probiotic-loaded single- and double-layered microcapsules in cake production. *Probiotics Antimicro*, 11: 840-849.

Bernardeau, M., Lehtinen, M. J., Forssten, S. D., Nurminen, P. (2017). Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *J Food Sci Tech*, 54:2570–2584

Brodkorb A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carriere, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B, Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., M'enard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*, 14: 991-1014.

Di Caro, S., Tao, H., Grillo, A., Franceschi, F., Elia, C., Zocco, M. A. (2005). *Bacillus clausii* effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis. *Eur J Gastroen Hepat*, 17: 951–960.

Elshaghabee, F.M.F., Rokana, N., Gulhane, R.D., Sharma, C., Panwar, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front Microbiol*, 8:1-15.

FAO 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organisation of the United Nations and World Health Organisation Working Group Report. Roma. FAO.

Hong, H. A., Duc, L. H., Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 29:813–835.

Jao, C. J., Huangb, S. L., Wu, S. C., Chiang, H. K. (2011). The study on SFLAB GanedenBC30 viability on baking products during storage. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11), 1601–1609s.

Kosak, T., Maeda, T., Nakada, Y., Yukawa, M., and Tanaka, S. (1998). Effect of *Bacillus subtilis* spore administration on activation of macrophages and natural killer cells in mice. *Vet Microbiol*, 60: 215–225.

- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., Ali, F. (2016). Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods. *Int J Food Sci Technol*, 51:894–901.
- Marcial-Coba, M. S., Pjaca, A. S., Andersen, C. J., Knochel, S., Nielsen, D. S. (2019). Dried date paste as carrier of the proposed probiotic *Bacillus coagulans* BC4 and viability assessment during storage and simulated gastric passage. *LWT Food Sci Technol*, 99: 197-201.
- Mingmongkolchai, S., Panbangred, W. (2017). *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *J Appl Microbiol*, 24:1334-1346.
- Muscettola, M., Grasso, G., Blach-Olszewska, Z., Migliaccio, P., Borghesi Nicoletti, C., Giarratan, M. (1992). Effects of *Bacillus subtilis* spores on interferon production. *Pharmacol Res*, 26: 176–177.
- Muscettola, M., Grasso, G., Migliaccio, P., Gallo, V. C. (1991). Plasma interferon-like activity in rabbits after oral administration of *Bacillus subtilis* spores. *J Chemotherapy*, 3: 130–132
- Pabon, K. S. M., Concha, J. L. H., Duque, J. F. S. (2022). Quinoa extruded snacks with probiotics: Physicochemical and sensory properties. *Front Sus Food Syst*, 6, 935425.
- Patrone, V., Molinari, P., Morelli, L. (2016). Microbiological and molecular characterization of commercially available probiotics containing *Bacillus clausii* from India and Pakistan. *Int J Food Microbiol*, 237: 92-97.
- Sanders, M. E., Morelli, L., Tompkins, T. A. (2003). Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Compr Rev Food Sci F*, 2:101-110.
- Soares, M. B., Martinez, R. C., Pereira, E. P., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S., Sant'Ana, A. S. (2019). The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food Res Int*, 125: 108542.
- Spinosa, M. R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., Oggioni, M. R. (2000). On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res Microbiol*, 151: 361-368.
- Urdaci, N. C., Bressollier, P., Pinchuk, I. (2004). *Bacillus clausii* probiotic strains antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol*, 38: 86-90.