

# FARKLI DEPOLAMA KOŞULLARINDA NORMAL VE KEPEKLİ EKMEKLERİN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ, SU AKTİVİTESİ VE SÜNME DURUMUNUN DEĞİŞİMİ

Muharrem Certel\*, Fundagül Erem, Barçın Karakaş

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Geliş tarihi / Received: 16.04.2008

Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 15.11.2008

Kabul tarihi / Accepted: 25.11.2008

## Özet

Bu çalışmada laboratuvar koşullarında pişirilmiş normal ve kepekli ekmekler, üretimden sonra 7 gün süreyle 4 farklı depolama koşulunda (4, 25, 37 ve 45 °C) muhafaza edilmiştir. Her 24 saatte bir ekmeklerde toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısı, küf sayısı ve sünme (rope) gelişimini takip etmek üzere *Bacillus* sayısı ve ekmeklerin su aktiviteleri ( $a_w$ ) belirlenmiştir. Ekmeklerin başlangıç *Bacillus* sporu yükünü belirlemek için ekmek hammaddelerinde sünme spor sayımı yapılmıştır. Üretilen ekmekleri analitik olarak tanımlamak için 0. günde ekmeklerin toplam nem, ham protein, ham yağ, ham lif, toplam kül ve zedelenmemiş nişasta miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, hammaddelerden spor yükü en fazla olan unsurun maya olduğunu, ekmeklerdeki TMAB sayısının muhafaza süresi ve sıcaklığından önemli düzeyde ( $P<0.01$ ) etkilendiğini, *Bacillus* sayısının bunlara ilaveten ekmek tipinden de etkilendiğini ( $P<0.01$ ), küf gelişiminin ise olmadığını göstermiştir. Ayrıca sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresinin ( $P<0.01$ )  $a_w$  değerini istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ekmek, sünme, *Bacillus*, TMAB, küf,  $a_w$

## VARIATION OF MICROBIOLOGICAL PROPERTIES, WATER ACTIVITY AND ROPINESS OF WHITE AND WHOLE MEAL BREADS UNDER DIFFERENT STORAGE CONDITIONS

### Abstract

In this study, white and whole meal breads baked at laboratory conditions were stored at 4, 25, 37 and 45 °C for 7 days. Total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) counts, mold and *Bacillus* counts were carried out on these breads at 24 hours intervals. Water activity of the crumb was also determined at the same intervals. *Bacillus* counts were performed to investigate the development of rope spoilage. Rope spore counts of the raw materials were determined as indicators of the initial load of *Bacillus* spores in the breads. The moisture, crude protein, crude fat, crude fiber, total ash and non-damaged starch composition of the breads were also determined at day 0 in order to identify the breads analytically. Results showed that, among the raw materials, yeast was the ingredient with the highest load of *Bacillus* spores. It was found that TMAB count was significantly ( $P<0.01$ ) affected by the storage time and temperature. In addition to storage time and temperature, bread type also had a significant ( $P<0.01$ ) effect on *Bacillus* counts. The results indicated no symptoms of mold growth. It was determined that temperature, bread type and storage time ( $P<0.01$ ) had a statistically significant effect on  $a_w$  values.

**Keywords:** Bread, rope, *Bacillus*, TMAB, mold,  $a_w$

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ certel@akdeniz.edu.tr, ☎ (+90) 242 310 2427, 📠 (+90) 242 227 4564

## GİRİŞ

Tüketici açısından bir gıda maddesini duyuşal olarak kabul edilemez hale getiren herhangi bir değişim, bozulma olarak karakterize edilir. Bozulma fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal olmak üzere üç şekilde meydana gelebilir (1). Fırın ürünlerinde fiziksel ve kimyasal bozulmalar da görülmekle birlikte, raf ömrünü kısaltan ve ekonomik kayıplara sebep olan başlıca etmenlerden birisi mikrobiyal kaynaklı bozulmalardır (2). Fırın ürünleri, bakteri sporlarının imhasına yönelik son bir işlem görmezler ve genellikle spor oluşturan mezofilik aerobik bakteriler tarafından kolayca bozulabilen riskli gıdalar değildir. Ancak, gerek üretim gerekse tüketim sırasında yapılan yanlış uygulamalar bu tür gıdaları riskli hale getirmektedir.

Ülkemizde karbonhidrat ve protein kaynağı olarak insan beslenmesinde birincil öneme sahip olan ekmek, yüksek su aktivitesi (0.96-0.98) ve pH değeri (5.6-5.8) nedeniyle mikroorganizma gelişmesi için uygun bir ortamdır (3). Ekmek başta olmak üzere fırın ürünlerinde mikrobiyal bozulmaların çoğunu küflenme ve sünme oluşturmaktadır (4). 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. Pişirme 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 (5).

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* olmakla birlikte, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* ve *B. cereus* türleri de hastalığa sebep olabilmektedir (6). Bu bakteriler toprak kökenlidir. Ekmeğe bulaştıktan sonra uygun olmayan üretim koşullarında sayıları artar (1). Pişirme işlemi sırasında, hastalık etmeni bakterilerin vejetatif formlarının çoğu ölürken, özellikle ekmek merkezine yakın kısımlarda sıcaklığın 100 °C'nin altında kalması sonucu bu bakteriler spor oluşturarak canlılıklarını sürdürürler (7). Sünme etmeni bakterilerin gelişimi 36-48 saat içinde gerçekleşir ve karakteristik olarak olgun meyvemsi ağır bir koku oluşumu ile birlikte ekmek için yumuşak, lifli, yapışkan, kahverengi ve benekli bir kitle halini alır. Ekmek koparıldığında uzun ve sakızimsı lifler gözlenir (2, 8). Duyusal nedenlerle böyle bir ürünün tüketilemeyeceği düşünölmekle birlikte, ürünle

yüksek miktarlarda spor (~10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> spor/g) tüketilmesi durumunda bulantı, kusma, ishal, baş ağrısı gibi belirtilerle, gıda zehirlenme vakaları görölebilir (1).

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 olur (9). Ayrıca 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 (10, 11). Bu çalışmada iki tip ekmekte pişirme sonrası 7 gün boyunca farklı sıcaklıklarda TMAB, küf, *Bacillus* sp. sayısı, a<sub>w</sub> değerleri ve ekmeklerin sünme durumları takip edilmiştir. Çalışmada 4 °C soğukta depolama koşullarını, 25 °C oda koşullarını, 45 °C yaz aylarında Antalya bölgesinde bulunan ekmek satış ortamlarını, 37°C ise *Bacillus* türlerinin optimum geliştiği sıcaklık derecesini temsil ettiği için seçilmiştir. Pratikte, 7 gün boyunca bu koşullarda ekmeği depolamak söz konusu değildir. Ancak çalışmanın temel amacı sünme hastalığının takip edilerek ekmekte meydana getirdiği değişimleri incelemek olduğundan süre uzun tutulmuş, bu süre içinde bakterinin ölüm fazına geçip geçmediği gözlenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Araştırmada kullanılan deneme ekmeklerinin üretiminde materyal olarak, ticari ekmeklik, kepekli ve tip 650 buğday unları; çözünür kuru maya; ticari rafine yemeklik tuz, ticari kristal şeker ve şehir şebekesinden alınan içme suyu kullanılmıştır.

### Yöntem

#### Hammaddelerde sünme sporu sayımı

Sünme sporu sayımı için Anonim'in (12) metodu kullanılmış, hammaddelerin spor yükü göz önünde bulundurularak her bir hamur unsuru için uygun dilüsyonlar hazırlanarak yapılmıştır. Numunelerin her 1g ya da ml'sindeki sünme sporu sayısı, En Muhtemel Sayı (EMS) çizelgesinden (12) ve Anonymous'dan (13) faydalanılarak tespit edilmiştir.

#### Ekmek pişirme yöntemi

Deneme ekmeklerinin üretimi için Elgün ve ark.'ın (14) kullandığı ekmek pişirme yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Her bir analiz setinde 3 kg un, 45 g tuz, 60 g kristal toz şeker, 75 g çözünür kuru maya önce 2 dakika karıştırılmış, 1950 g şebeke suyu ile 10

dakika yoğrulmuştur. Hamur 340 g'lık 15 parçaya bölünmüş, yuvarlak yapılarak kepekli olanlar 40, normal ekmek hamurları 30 dakika ana fermentasyona tabi tutulmuş, gazı çıkarılıp tekrar şekillendirilmiş, her iki tip hamur 30 dakika son fermentasyon işleminden sonra 200 °C'de 20 dakika pişirilmiştir. Yüzeysel küf gelişimini engellemek için fırına verilmeden önce hamur üzerine %40'lık sodyum propiyonat/propiyonik asit karışımı püskürtülmüş, 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 yerleştirilmiştir. 7'şer gün süreyle iki tekerrürlü sürdürülecek şekilde, ekmek pişirme denemeleri tekrarlanmıştır.

#### Ekmeklerin bazı besin öğelerine ait analizler

Deneme ekmeklerinde ilk gün nem, ham yağ (14), protein (15), kül (16), ham lif (17) ve nişasta analizleri (18) yapılmış, sonuçlar kuru madde üzerinden % olarak ifade edilmiştir.

#### Mikrobiyolojik analizler

Her bir ekmek örneğinin iç kısmından aseptik koşullarda 10 g tartılarak içinde 90 ml %0.85'lik fizyolojik tuzlu su bulunan steril poşete koyulmuş ve stomacher ile 5 dakika homojenize edilmiştir. Elde edilen 10<sup>-1</sup>'lik dilüsyondan 1 ml alınarak içinde 9 ml dilüsyon sıvısı bulunan tüpe ilave edilmiş, işlem aynı şekilde tekrarlanarak seri dilüsyonlar elde edilmiştir.

TMAB sayımı için hazırlanan dilüsyonlardan 1 ml alınarak Plate Count Agar'a paralelli olarak, dökme ekim yapılmış, Petri kapları 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır (19).

Bacillus sayımı için, hazırlanan dilüsyonlardan 1 ml alınarak Muller Hinton Agar'a paralelli olarak dökme ekim yapılmış, Petri kapları 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (7).

Küf sayımı için, hazırlanan dilüsyonlardan 0.1 ml alınarak Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar'a (DRBC) ve Patato Dextrose Agar'a (PDA) paralelli olarak, yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmış, Petri kapları 25 °C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır (20).

#### Su aktivitesi tayini

Ekmeklerin su aktivitesi değerleri Testo 650 su aktivitesi ölçme cihazı ile ölçülmüştür (21).

#### İstatistiksel değerlendirme

Deneme, faktöriyel düzenlenmiş ve analizler iki paralelli yürütülmüştür. SAS istatistik programı (SAS Institute Inc. 1996) kullanılarak analiz edilen parametrelerin değişim ve etkileri varyans analizleriyle test edilmiş, önemli bulunan varyasyon kaynaklarının etki düzeyleri ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile ortaya koyulmuştur.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

#### Ekmeklerin Bazı Bileşim Öğelerine Ait Sonuçlar

Normal ve kepekli ekmek için sırasıyla, toplam nem %40.750±0.590 ve 40.200±0.290; ham protein %12.150±0.560 ve 11.455±1.445; ham yağ %1.480±0.050 ve 0.960±0.020; ham lif %0.400±0.010 ve 2.660±0.130; toplam zedelenmemiş nişasta %4.305±0.215 ve 4.170±0.070; toplam kül ise %2.275±0.015 ve 2.710±0.010 olarak hesaplanmıştır.

#### Ekmeklere Ait Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

##### Hammaddelerdeki sünme sporu sayısı

Başlangıç spor yükü maya, kepekli un, normal un, su, şeker ve tuz için sırasıyla 93 EMS/g (1.97 log kob/g), 43 EMS/g (1.63 log kob/g), 23 EMS/g (1.36 log kob/g), 4.3 EMS/g (0.63 log kob/g), 3.6 EMS/g (0.56 log kob/g) ve <3 EMS/g (<0.48 log kob/g) olarak belirlenmiştir. Ekmek mayasında bulunmasına izin verilen sünme sporu sayısı kuru maddede en çok 200 adet/g'dır (12). Maya için tespit edilen spor sayısı, izin verilen limitin altında, ancak uygun koşullarda muhafaza sırasında üreyerek sünme hastalığını oluşturabilecek yoğunluktadır.

Bailey ve von Holy (22) maya, un ve sudaki spor sayısını, sırasıyla, 5.15 log kob/g, 2.69 log kob/g ve 1 log kob/g; Volavsek vd (7) un örneklerinde spor yükünü 1–3 log kob/g; Rosenkvist ve Hansen (23) un, kepek ve mayadaki spor sayısını, sırasıyla, 3.4 kob/g, 12.4 kob/g ve 0.6 kob/g olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ekmeklerin yapımında kullanılan normal unun spor yükü (1.36 log kob/g) Volavsek vd'nin (7) çalışmasıyla uyum içindedir. Bailey ve von Holy'nin (22) çalışması ile karşılaştırıldığında bu çalışmada kullanılan hammaddelerin spor yükünün düşük olduğu görülmektedir. Ancak ekmeklerde sünme hastalığının oluşmasında daha önemli olan faktör, ekmeklerin bakterisi gelişimini tetikleyecek ortamlarda muhafaza edilmesi sonucu mevcut sporların çimlenerek bakteri sayısının hastalığı oluşturacak sınırlara kadar ulaşmasıdır. Nitekim, Rosenkvist ve Hansen (23) başlangıç spor yükü düşük un kullanmalarına rağmen ürettikleri ekmeklerdeki *Bacillus* sayısını oldukça yüksek bulduklarını ifade etmişlerdir.

**Ekmeklerdeki TMAB sayısına muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi**

4, 25, 37 ve 45 °C'de 7 gün boyunca muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait logaritmik değerlere dönüştürülmüş TMAB sayısı sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir.

Düşük sıcaklık derecelerinde mikroorganizma faaliyetinin durmasını etkileyen iki faktörden biri, organizmadaki enzimlerin reaksiyon hızının yavaşlaması; diğeri ise düşük sıcaklıkta sitoplazmik membran akışkanlığının azalması sonucu taşıma mekanizmasının engellenmesidir (24). Çizelge 1'deki 4 °C'ye ait sonuçlar bakteri çoğalmasının durduğunu, zamanla ortam koşulları olumsuzlaştıkça bakteri ölümünün gerçekleşmesi ile TMAB sayısının azaldığını göstermektedir. Ekmeklerde bulunmasına müsaade edilen TMAB sayısı Anonim'e (25) göre  $1.0 \times 10^5$  kob/g, Anonim'e (26) göre ise  $1.0 \times 10^7$  kob/g'dır. Logaritmik olarak ifade edildiğinde bu değerler 5 ve 7'ye tekabül etmektedir. Çizelge 1'e göre 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 (25) baz alındığında 25 °C'de de muhafazanın birinci gününde sınır değeri aşılmıştır.

Yapıcı ve Barut (27) piyasadan topladıkları ekmeklerdeki ortalama TMAB sayısını ilkbahar aylarında  $5.6 \times 10^4$  kob/g, yaz aylarında ise  $5.5 \times 10^4$  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 çalışmada 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 1. Farklı sıcaklık derecelerinde muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait TMAB ve *Bacillus* sayısı ile  $a_w$  sonuçları

Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Normal Ekmek			Kepekli Ekmek		
		TMAB (log kob/g)	<i>Bacillus</i> (log kob/g)	$a_w$	TMAB (log kob/g)	<i>Bacillus</i> (log kob/g)	$a_w$
4	0	2.458	1.493	0.979	2.285	2.309	0.970
	1	2.344	2.249	0.980	1.702	1.940	0.992
	2	2.180	2.077	0.994	1.349	1.360	0.985
	3	2.268	2.154	0.999	1.087	T.E.	0.978
	4	2.024	1.846	0.997	1.149	0.698	0.983
	5	2.097	2.211	0.997	0.848	0.697	0.972
	6	1.649	1.149	0.997	T.E.	T.E.	0.965
25	0	1.148	0.696	0.979	1.924	0.696	0.948
	1	5.444	4.995	0.996	5.130	5.140	0.965
	2	7.247	7.122	0.982	7.034	7.068	0.963
	3	8.028	8.052	0.980	8.102	8.163	0.971
	4	8.515	8.540	0.989	8.761	9.319	0.967
	5	8.712	8.638	0.988	9.431	9.547	0.956
	6	8.856	8.728	0.971	9.827	9.695	0.961
37	0	2.455	2.087	0.979	2.915	2.766	0.989
	1	7.313	7.375	0.996	8.935	9.028	0.996
	2	8.004	8.032	0.982	9.510	9.405	0.982
	3	8.640	8.613	0.980	9.755	9.645	0.975
	4	9.393	9.277	0.989	9.545	9.384	0.971
	5	9.506	9.400	0.988	9.645	9.556	0.964
	6	9.584	9.456	0.971	8.945	8.879	0.967
45	0	0.698	0.937	0.997	3.666	3.384	0.964
	1	7.623	7.554	0.998	7.851	7.852	0.978
	2	9.140	8.888	0.997	8.946	8.861	0.963
	3	9.329	9.239	0.990	9.250	9.101	0.955
	4	9.260	9.090	0.990	9.353	9.168	0.966
	5	9.459	9.429	0.990	9.108	9.179	0.974
	6	9.662	9.611	0.972	9.676	9.640	0.973

T.E.: Tespit edilemedi

TMAB sayısının değişimi üzerine etkisi bakımından sıcaklık dereceleri ve muhafaza süreleri arasında önemli farklılıklar ( $P<0.01$ ) olduğu, ancak bu değişimin ekmek tipinden bağımsız olduğu belirlenmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları TMAB sayısı artışıyla, sıcaklığın süreden daha etkili ( $P<0.05$ ) olduğunu göstermiştir (Çizelge 2). Sıcaklık derecesi arttıkça ekmeklerde tespit edilen TMAB sayısı da artmıştır. Muhafaza süresi uzadıkça TMAB sayısı da artmış, ancak muhafazanın 4. ve 5. günleri arasında toplam canlı bakteri sayısı bakımından istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Bu da bakterilerin çoğalmasının 4. günden sonra durağan faza geçtiği şeklinde yorumlanabilir.

**Ekmeklerdeki *Bacillus* sayısına muhafaza sıcaklığı ve süresinin etkisi**

4, 25, 37 ve 45°C'de 7 gün boyunca muhafaza edilmiş normal ve kepekli ekmeklere ait *Bacillus* sayısı sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Rosenkvist ve Hansen (23) 25-30 °C'de 2 gün muhafaza ettikleri, koruyucu madde veya ekşi maya içermeyen normal ekmeklerdeki *Bacillus* sayısını 6.2 log kob/g, kepekli ekmeklerde 5.4 log kob/g ve laboratuvar koşullarında pişirilmiş normal ekmeklerde 7.3 log kob/g olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda 25 °C'de muhafaza edilen her iki tip ekmek için *Bacillus* sayısı yaklaşık 7 log kob/g olarak tespit edilmiştir ve Rosenkvist ve Hansen'nin (23) laboratuvar koşullarında ürettikleri normal ekmek için buldukları değer ile uyumludur.

Çizelge 2. Normal ve kepekli ekmeklerin TMAB sayısı, *Bacillus* sayısı ve su aktivitesi ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları\*

TMAB Sayısı Ortalamaları (log kob/g)	Sıcaklık	45°C	37°C	25°C	4°C
		8.485 <sup>a</sup> ± 0.350 (N=27)	8.180 <sup>b</sup> ± 0.454 (N=28)	7.013 <sup>c</sup> ± 0.498 (N=28)	1.773 <sup>d</sup> ± 0.108 (N=27)
	Süre	6	5	4	3
		7.828 <sup>a</sup> ± 0.863 (N=15)	7.389 <sup>b</sup> ± 0.889 (N=16)	7.299 <sup>b</sup> ± 0.859 (N=16)	7.033 <sup>c</sup> ± 0.816 (N=16)
2		1	0		
		6.685 <sup>d</sup> ± 0.767 (N=16)	5.798 <sup>e</sup> ± 0.641 (N=16)	2.513 <sup>f</sup> ± 0.218 (N=15)	
Bacillus Sayısı Ortalamaları (log kob/g)	Sıcaklık	37°C	45°C	25°C	4°C
		8.076 <sup>a</sup> ± 0.463 (N=28)	7.994 <sup>a</sup> ± 0.481 (N=28)	7.074 <sup>b</sup> ± 0.519 (N=27)	1.632 <sup>c</sup> ± 0.117 (N=27)
	Ekmek Tipi	Kepekli	Normal		
		6.321 <sup>a</sup> ± 0.484 (N=55)	6.134 <sup>b</sup> ± 0.454 (N=55)		
Süre	4	5	6	3	
	7.514 <sup>a</sup> ± 0.815 (N=15)	7.359 <sup>a</sup> ± 0.889 (N=16)	7.323 <sup>a</sup> ± 0.913 (N=16)	6.975 <sup>b</sup> ± 0.832 (N=16)	
	2	1	0		
		6.595 <sup>c</sup> ± 0.757 (N=16)	5.766 <sup>d</sup> ± 0.639 (N=16)	1.869 <sup>e</sup> ± 0.253 (N=15)	
Su Aktivitesi Ortalamaları	Sıcaklık	37°C	4°C	45°C	25°C
		0.987 <sup>a</sup> ± 0.003 (N=28)	0.985 <sup>a</sup> ± 0.002 (N=28)	0.979 <sup>b</sup> ± 0.003 (N=28)	0.972 <sup>c</sup> ± 0.003 (N=28)
	Ekmek Tipi	Normal	Kepekli		
		0.990 <sup>a</sup> ± 0.001 (N=56)	0.971 <sup>b</sup> ± 0.002 (N=56)		
Süre	1	2	4	3	
	0.988 <sup>a</sup> ± 0.003 (N=16)	0.983 <sup>ab</sup> ± 0.004 (N=16)	0.982 <sup>ab</sup> ± 0.003 (N=16)	0.980 <sup>bc</sup> ± 0.004 (N=16)	
	5	0	6		
		0.979 <sup>bc</sup> ± 0.004 (N=16)	0.978 <sup>bc</sup> ± 0.005 (N=16)	0.975 <sup>c</sup> ± 0.003 (N=16)	

\* Değişik harfler, ortalamaların  $P<0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir.



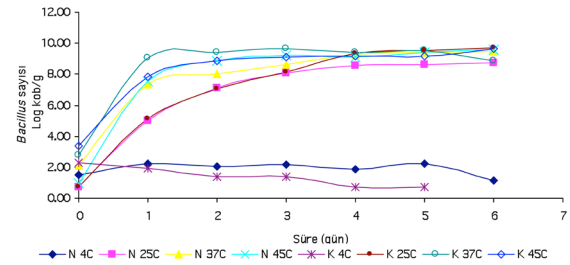
Sorokulova vd (6) 37 °C'de muhafaza ettikleri ekmeklerdeki *Bacillus* sayısını pişirmenin hemen ardından, 24, 36 ve 48 saat sonra tespit etmişlerdir. Laboratuvar koşullarında pişirilmiş ekmekler için pişirmenin hemen ardından, 24, 36 ve 48 saat sonra tespit ettikleri en düşük ve en yüksek *Bacillus* sayıları, sırasıyla,  $7 \times 10^2$  ve  $1.3 \times 10^4$  kob/g,  $3 \times 10^3$  ve  $2 \times 10^4$  kob/g,  $2 \times 10^4$  ve  $8 \times 10^5$  kob/g,  $4.1 \times 10^5$  ve  $7.2 \times 10^6$  kob/g'dır. Bizim çalışmamızda ise 37 °C'de muhafaza edilen normal ve kepekli ekmek için 0, 24 ve 48. saatlerde belirlenen değerler sırasıyla,  $1.2 \times 10^2$  ve  $5.8 \times 10^2$  kob/g,  $2.3 \times 10^7$  ve  $1.1 \times 10^9$  kob/g,  $1.1 \times 10^8$  ve  $2.5 \times 10^9$  kob/g olarak bulunmuştur. 0. gün değerleri birbirine çok yakın iken 1. ve 2. günlerde belirlenen değerler Sorokulova vd'nin (6) çalışmasındaki 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 vb.) bağlanabilir.

Bu çalışmada, görsel olarak sünme hastalığının *Bacillus* sayısı yaklaşık  $4 \times 10^8$  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 1. bu bilgi ışığında incelendiğinde normal ekmeklerde 25 °C'de sünme 2. günde başlarken, 37 ve 45 °C'de 1. günde başladı; 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.

Çalışmamızda sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresi ile bunlar arasındaki interaksiyonların ekmeklerdeki *Bacillus* sayısını önemli düzeyde ( $P < 0.01$ ) etkilediği belirlenmiş, ekmeklerin *Bacillus* sayısı ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. Ekmeklerin *Bacillus* sayısı ortalamaları sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresinden önemli düzeyde ( $P < 0.05$ ) etkilenmektedir. Sıcaklık derecesi arttıkça ekmeklerin *Bacillus* yükünün de arttığı gözlenmiştir. Her ne kadar bakterinin optimum gelişme sıcaklığı olması sebebiyle 37 °C'deki *Bacillus* sayısı ortalaması 45 °C'dekinden fazla olsa da istatistik olarak bu farkın önemli olmadığı belirlenmiştir. Çizelge 2'ye göre kepekli ekmekteki *Bacillus* sayısı ortalamasının normal ekmektekinden daha yüksek olması, kepekli unun başlangıç spor yükünün yüksek olması ile ilişkilidir. Kepekli un ile yapılan ekmeklerin *Bacillus* yükünün

daha fazla olması, toprak kökenli olan *Bacillus* türlerinin buğdayın kabuk tabakasında çok daha fazla bulunmasının doğal bir sonucudur. Ekmeklerin *Bacillus* sayısı ortalamaları muhafaza süresi açısından incelendiğinde; bakteri sayısının muhafazanın 4. gününe kadar artıp, sonra azaldığı dikkati çekmektedir. Ancak istatistik olarak 0.05 önem seviyesinde bu azalışın anlamsız olduğu, aslında 4., 5. ve 6. günlerdeki *Bacillus* sayısı ortalamaları arasında hiçbir fark olmadığı anlaşılmaktadır. Bu da bakteri çoğalmasının sünme gelişiminin tamamlandığı 4. günden itibaren durağan faza geçtiğini göstermektedir.

Şekil 1'de *Bacillus*'lara ait gelişme eğrileri incelendiğinde 25, 37 ve 45 °C'de muhafaza edilen her iki ekmek örneği için de tipik mikroorganizma gelişim eğrileri elde edildiği görülmektedir. Ölüm evresini de içermesi bakımından, 37 °C'de muhafaza edilen kepekli ekmek için elde edilen eğrinin, tipik mikroorganizma gelişim eğrisini daha iyi yansıtmaması bu sıcaklığın bakterinin, buna bağlı olarak da sünme hastalığının gelişmesi için, optimum sıcaklık derecesi olduğunu göstermektedir. Leuschner vd de (28) yarı-pişmiş ve tekrar-fırınlanmış, sodalı esmer ekmekte sünme gelişimini inceledikleri bir çalışmada *Bacillus* türlerinin en hızlı geliştiği sıcaklık derecesinin 37 °C olduğunu belirlemişlerdir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 1. Normal ve kepekli ekmeklerdeki *Bacillus*'lara ait gelişme eğrileri

Şekil 1'e bakıldığında 45 °C'de muhafaza edilen ekmekler için başlangıç yükü, 37 °C'de beklenen 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 farklılığın 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 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 aynıyken 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 uzaklaşması ve metabolik aktivitesinin düşmesi ile açıklanabilir. 4 °C mikroorganizma gelişmesinin sınırlandığı sıcaklık derecesi aralığındadır. Bu sıcaklıkta bakterilerin çoğalması zaten beklenmez. Leuschner vd de (28) 4 °C'de muhafaza edilen kısmi pişmiş ekmeklerde *Bacillus* çoğalmasının engellendiğini belirlemişlerdir.

#### Normal ve kepekli ekmeklerde yapılan küf sayımı sonuçları

DRBC Agar ve PDA'ya yapılan ekim sonucunda gelişme olmadığı gözlenmiştir. Örneklerde küf bulunmamasının nedeni, ekmeklerde yapılacak analizleri olumsuz etkilememesi için pişirilmeden önce ekmek hamurlarının yüzeyine %40'lık sodyum propiyonat/propiyonik asit karışımının püskürtülmesi ve kontaminasyon olmadan ekmeklerin paketlenmesi, mayanın bulunmama nedeni ise yüksek sıcaklıkta pişirme sırasında maya hücrelerinin tahrip olmasıdır.

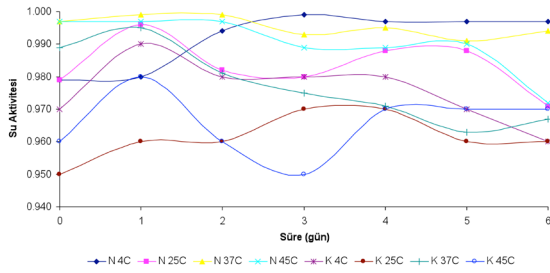
#### Su aktivitesi sonuçları

Normal ve kepekli ekmeklerin muhafaza sıcaklık ve süresine bağlı su aktivitesi değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Mikroorganizmaların gelişmeleri için uygun  $a_w$  değerleri göz önünde bulundurularak bu çizelge incelendiğinde deneme ekmeklerinin  $a_w$  değerlerinin mikroorganizma gelişimi için oldukça uygun bölgede (0.9'un üzerinde) olduğu görülmektedir. Bu da ek-

meklerin bakteri gelişimine uygun sıcaklıklarda muhafaza edilmesi halinde kolayca sünüp, bozulabileceğine işaret etmektedir. Kirschner ve von Holy (9) 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 (29) 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.

Varyans analizi sonuçlarına göre sıcaklık derecesi, ekmek tipi ve muhafaza süresinin ( $P<0.01$ ) su aktivitesini önemli düzeyde etkilediği, ikili interaksiyonların su aktivitesini etkilemediği, üçlü interaksiyonun etkisinin ise önemli ( $P<0.01$ ) olduğu bulunmuştur.

Çizelge 2'deki Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarından sıcaklık dereceleri arasında farklılık ( $P<0.05$ ) arz eden üç ayrı grup (4 °C ve 37 °C, 45 °C, 25 °C) olduğu, 4 °C ve 37 °C'nin  $a_w$  değeri üzerine aynı etkiyi gösterdiği anlaşılmaktadır. Ayrıca su aktivitesi ortalamasının en yüksek olduğu sıcaklık derecesinin 4 °C ve 37 °C, en düşük olduğu sıcaklık derecesinin ise 25 °C olduğu görülmektedir. 37 °C'de  $a_w$  değerinin yüksek olarak belirlenmesi, sünme ile birlikte ekmek içinde meydana gelen yoğun metabolik aktivite sonucu açığa çıkan metabolik su ile 4 °C'de belirlenen yüksek  $a_w$  değeri ise sünme gelişiminin olmaması ve mikroorganizma faaliyetinin durdurulmuş olması nedeniyle ekmeğin orijinal başlangıç su aktivitesi değerini muhafaza etmesi, ekmeklerin ambalajlı olarak depolanması sonucu önemli düzeyde nem kaybına uğramaması ile açıklanabilir. 25 °C'de muhtemelen bayatlama ile serbest kalan su doğrudan hidrolizde kullanılmış, ancak bakteri solunumu sonucu yeterince serbest su oluşmadığı için  $a_w$  değeri nispeten daha düşük olarak belirlenmiştir. Çizelge 2 incelenirse bu farkların sayısal değer olarak %1 civarında olduğu, çok yüksek olmadığı da görülmektedir. Farklı ekmek tiplerinin su aktivitesi ortalamalarının önemli ( $P<0.05$ ) düzeyde farklı olduğu ve normal ekmekte su aktivitesi ortalamasının (0.990) kepekli ekmeğe ait ortalamadan (0.971) daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durumun kepekli ekmeğin su bağlama kapasitesinin daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ekmeklerin su aktivitesinin 1. gün artması bayatlamaya, 2. günden itibaren düşmesi ise sünme sırasında oluşan hidrolizde suyun kullanılmasına bağlanabilir. Normal ve kepekli ekmeklerde depolama süresi boyunca su aktivitesinde meydana gelen değişim Şekil 2'de gösterilmiştir.



N: Normal ekmek K: Kepekli ekmek

Şekil 2. Normal ve kepekli ekmeklerde depolama süresi boyunca su aktivitesinin değişimi

## KAYNAKLAR

1. Smith JP, Dafias DP, El-Khoury W, Koukoutsis J, El-Khoury A. 2004. Shelf life and safety concerns of bakery products - A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44: 19-55.
2. Pateras IMC. 1999. Bread spoilage and staling. *Technology of Breadmaking*. SP Cauvain and LS Young (eds.) Aspen Publishers Inc. pp. 240-261,
3. Aran N, Boyacıoğlu MH. 2005. Ekmek Hastalıkları-Rope. (<http://www.ekmekdunyasi.com/ekmekhastaliklari.htm>)
4. Ellis WO, Obubuafo AK, Ofosu-Okyere A, Marfo, EK, Osei-Agyemang K, Odame-Darkwah JK. 1997. A survey of bread defects in Ghana. *Food Control*, 8: 77-82.
5. Legan JD. 1993. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *Int Biodeter Biodegr*, 32: 33-53.
6. Sorokulova IB, Reva ON, Smirnov VV, Lapa SV, Urdaci MC. 2003. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rOPY bread. *Lett Appl Microbiol*, 37: 169-173.
7. Volavsek PJA, Kirschner LAM, von Holy A. 1992. Accelerated methods to predict the rope-inducing potential of bread raw materials. *S Afr J Sci*, 88: 99-102.
8. Voysey PA. 1989. Rope: a problem for bakers. *J Appl Bacteriol*, 67: xxv-xxvi.
9. Kirschner LAM, von Holy A. 1989. Rope spoilage of bread. *S Afr J Sci*, 85: 425-427.
10. Thompson JM, Waites WM, Dodd CER. 1998. Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. *J Appl Microbiol*, 85: 481-486.
11. Pattison TL, Lindsay D, von Holy A. 2004. Natural antimicrobials as potential replacements for calcium propionate in bread. *S Afr J Sci*, 100: 342-348.
12. Anon 1992. TS 3522. "Ekmek Mayası" Standardı. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara, 9ss.
13. Anon 2004. <http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>
14. Elgün A, Certel M, Ertugay Z, Kotancılar G. 2002. *Tahıl ve Ürünlerinde Analitik Kalite Kontrolü ve Laboratuvar Uygulama Klavuzu*. Atatürk Üniversitesi Yayınları No. 867, Erzurum, 245 s.
15. Anon 1980. 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.
16. Anon 1960. ICC (International Association for Cereal Chemistry). Standard No. 104: Method for the determination of ash in cereals and cereal products.
17. Anon 1983. Gıda Maddeleri Muayene ve Analiz Yöntemleri Kitabı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Gıda İşleri Genel Müdürlüğü. 65: 62-105, Ankara, 794 s.
18. Anon 1976. ICC (International Association for Cereal Chemistry). Standard No. 123: Method for the determination of starch contents by hydrochloric acid dissolution.
19. Anon 1978. ICC (International Association for Cereal Chemistry). Standard No. 125: Method of determining the count of Aerobic Mesophilic Bacteria (Plate Count Method).
20. Anon 1980. 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.
21. Miyazaki M, Maeda T, Morita N. 2004. Effect of various dextrin substitutions for wheat flour on dough properties and bread qualities. *Food Res Int*, 37: 59-65.
22. Bailey CP, von Holy A. 1993. *Bacillus* spore contamination associated with commercial bread manufacture. *Food Microbiol*, 10: 287-294.
23. Rosenkvist H, Hansen A. 1995. Contamination profiles and characterization of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. *Int J Food Microbiol*, 26: 353-363.
24. Anon 2003. Factors that influence microbial growth. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume 2 (Supplement), Chapter 3, pp 21-32.
25. Anon 2001. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği No. 19. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı, 13 s.
26. Anon 1987. TS 5000. "Ekmek" Standardı. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara, 15 s.
27. Yapıcı BM, Barut NB. 2003. Manisa'nın Salihli İlçesindeki Fırınlarda Üretilen Ekmeklerin Bazı Mikrobiyolojik Özellikleri. *Gıda*, 28: 77-83.
28. Leuschner RGK, O'Callaghan MJA, Arendt EK. 1998. *Bacilli* spoilage in part-baked and rebaked brown soda bread. *J Food Sci*, 63: 915-918.
29. Pepe O, Blaiotta G, Moschetti G, Greco T, Villani F. 2003. Rope-Producing strains of *Bacillus* spp. from Wheat Bread and Strategy for Their Control by Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 69 (49): 2321-2329.