

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selçuk ARSLAN

***Lactobacillus rhamnosus* 'UN SÜNME (ROPE) HASTALIĞI ETKENİ OLAN
Bacillus CİNSİ BAKTERİLER ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİNİN
UNLARDA ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Lactobacillus rhamnosus* 'UN ROPE (SÜNME) HASTALIĞI ETKENİ OLAN
BACİLLUS CİNSİ BAKTERİLER ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİNİN
UNLARDA ARAŞTIRILMASI**

Selçuk ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 07.12.2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
DANIŞMAN

.....
Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
ÜYE

.....
Yrd. Doç.Dr. Sertaç ÖZER
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2009YL12

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Lactobacillus rhamnosus*'un ROPE (SÜNME) HASTALIĞI ETKENİ OLAN
Bacillus CİNSİ BAKTERİLER ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİNİN
UNLARDA ARAŞTIRILMASI**

Selçuk ARSLAN

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİMDALI**

Danışman: Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Yıl: 2010, Sayfa: 43

Jüri : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Yrd. Doç. Dr. Sertaç ÖZER

Yapılan bu çalışmada, 13 farklı ekmeklik undan, 20 *Bacillus* spp. izole edilmiş ve bu izolatların sünme etkeni olup, olmadıkları araştırılmıştır. Daha sonra, probiyotik özellikte olan *Lactobacillus rhamnosus*'un, söz konusu *Bacillus* izolatları üzerine inhibisyon etkisi, invitro olarak agar difüzyon ve sıvı ortamda incelenmiştir. İnhibisyon etki, *L. rhamnosus*'a ait 24 ve 48 saatlik hücre ve süpernatantında araştırılmıştır. Ayrıca *L. rhamnosus*'un *Bacillus subtilis* üzerine antibakteriyel etkisi, ekmeklik undan elde edilen hamurda incelenmiştir.

Sonuç olarak, araştırmada kullanılan unlardan yapılan rope sayımında, en fazla kontaminasyon, fırınlarından alınan unlarda gözlenirken, en az kontaminasyon organik unlarda gözlenmiştir. *L. rhamnosus*'un *Bacillus* spp. üzerine inhibisyon etkisi ise sıvı ortamda, 20 izolattan 6 tanesinde gözlenmiştir. Agar difüzyon metodu ile belirlenen yöntemde, 24 saatlik inkübasyon sonunda süpernatantın inhibisyon etkisi, 5 *Bacillus* izolatında, *L. rhamnosus* hücrelerine ise, 4 *Bacillus* izolatı direnç göstermiştir. Süpernatantın 48 saatlik inkübasyonunda direnç gösteren izolata sayısı 6'ya çıkmış, hücrede ise, izolatların hepsi duyarlı olmuştur. *B. subtilis* ilave edilen hamurda 24 saat sonucunda, *B. subtilis* sayısı, $1,3 \times 10^4$ kob/g'dan $>1 \times 10^9$ kob/g'a yükselirken, *B. subtilis* ve *L. rhamnosus* ile beraber yapılan ekimde 24 saat sonucunda $2,9 \times 10^4$ kob/g olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *L. rhamnosus*, *Bacillus* spp., rop sporu, ekmeklik un,

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

A RESEARCHING ABOUT INHIBITORY EFFECT OF *Lactobacillus rhamnosus*, WHICH IS EFFICIENT OF ROPE DISEASE, ON BACTERIUMS OF *BACILLUS* GENUS IN FLOUR MEDIUM.

Selçuk ARSLAN

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

Supervisor: Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Year: 2010, Page: 43

Jury : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Assoc. Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Asst. Prof. Sertaç ÖZER

In this study, 20 *Bacillus* spp. have been isolated from 13 different bread flour and whether they were rope factor has been investigated and then inhibitory effect of *Lactobacillus rhamnosus*, which have probiotic properties, on *Bacillus* isolates has been examined as invitro both in agar diffusion and in liquid medium. Inhibition influence has been researched in cell and supernatant of *L. rhamnosus* for 24 and 48 hours. In addition, antibacterial influence of *L. rhamnosus* on *Bacillus subtilis*. has been studied in bread flour dough.

In conclusion, during the counting of rope in flour has been used in study, maximum contamination was seen in oven flour, minimum contamination also was seen in organical flour *L. rhamnosus*'s inhibition impression on *Bacillus* ssp. has been seen on 6 of the 20 isolates in liquid medium. 5 isolates have resisted to supernatant and 4 isolates have also resisted to *L. rhamnosus* at the end of 24-hour- incubation in system was determined basis agar diffusion method. Standing isolates have risen to 6 and all isolates in cell have been sensitived at the end of 48-hour supernatant incubation. It is thought In dough added only *B. subtilis* at the end of 24 hours, the amount of *B. subtilis* was risen from $1,3 \times 10^4$ CFU/g to 1×10^9 CFU/g on the other hand, 24 hours later starting the addition of *L. rhamnosus* and *Bacillus* spp. to dough, count of *B. subtilis* was $2,9 \times 10^4$ CFU/g

Key Words: *L. rhamnosus*, *Bacillus* spp., rope spor, bread flour,

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince ve yaptığım çalışmada bilgi ve deneyimleriyle bana ışık tutan, yardımları ve anlayışıyla bana örnek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında sık sık bilgi alışverişinde bulunduğum ve tezimin her aşamasında gereken özveriye ve yardımları esirgemeyen başta Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN, Dr. İ.Halil KILINÇ, Arş. Gör Çiğdem ÖZDEMİR, Kimyager Mustafa ARSLAN, Biyolog (Polis Memuru) Hüseyin AVCI, Uzman Biyolog Mehmet YARAN ve Gıda Mühendisi İbrahim İBRAHİMOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İhtiyacım dâhilindeki, tam teşekküllü çalışma ortamını sağlayan ŞÖLEN Çikolata Gıda San. ve Tic. A.Ş.'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli annem Güngör ARSLAN, babam Hasan Hüseyin ARSLAN, eşim Münire ARSLAN ve çok sevdiğim kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Laktik Asit Bakterileri	4
1.1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antibakteriyel Özellikleri.....	5
1.1.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ‘un Taksonomik Özellikleri ve Gıda	
Mikrobiyolojisi Açısından Önemi	6
1.2. Sünme (Rope) Hastalığı.....	7
1.2.1. <i>Bacillus subtilis</i> ’in Genel Özellikleri	11
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	13
2.1. Sünme Hastalığı ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	13
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antagonistik Etkileri ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar.....	14
2.3. Sünme Hastalığını Önlemeye Yönelik Yapılan Çalışmalar	15
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan Un Örnekleri ve Mikroorganizmalar.....	17
3.1.2. Besiyeri ve Çözeltiler	17
3.1.3. Alet ve Ekipmanlar.....	17
3.2 Metot... ..	18
3.2.1. Un Örneklerinden <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin İzolasyonu	18
3.2.2. Un Örneklerinde Sünme (Rope) Varlığının Belirlenmesi	19
3.2.3. <i>L. rhamnosus</i> ’un <i>Bacillus</i> İzolatları Üzerine Antibakteriyel	
Etkisinin Belirlenmesi.....	19

3.2.3.1	Agar Difüzyon Yöntemi ile <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi.....	20
3.2.3.2	Sıvı besiyerinde ile <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi.....	20
3.2.3.3	Ekmek Hamurunda <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi.....	21
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	23
4.1.	Un Örneklerinden <i>Bacillus</i> 'ların Varlığı ve İzolasyonu	23
4.2.	Un Örneklerinde Sünme Etkeni Sporların Varlığı	24
4.3.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> İzolatları Üzerine Antibakteriyel..... Etkisi	25
4.3.1.	Agar Kuyu Difüzyon Yöntemiyle <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkisi	25
4.3.2.	Sıvı Ortamda <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> İzolatları Antibakteriyel Etkisi	29
4.3.3.	Ekmek Hamurunca <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>B. subtilis</i> Üzerine Antibakteriyel Etkisi	30
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	33
6.	KAYNAKLAR	35
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Unlu gıdalarda nişastanın hidrolizine neden olan bakteriler ve ürettikleri enzimler	9
Çizelge 1.2. Renklendiriciler ve tatlandırıcılar dışındaki gıda katkı maddeleri tebliği.....	9
Çizelge 3.1. Un örnekleri ve kodları.....	18
Çizelge 3.2. İnhibisyon yeteneğinin değerlendirilmesinde kullanılan Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminde zon çapları	20
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> izolatlarının elde edildiği un örnekleri.....	23
Çizelge 4.2. Un örneklerinde belirlenen rope sporu sayım sonuçları.....	24
Çizelge 4.3. <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> izolatları üzerine inhibisyon etkisi (Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi)	28
Çizelge 4.4. <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> spp. üzerine inhibisyon etkisi (Sıvı Besiyerinde).	29
Çizelge 4.5. Ekmek hamurunda, <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>B. subtilis</i> üzerine inhibisyon etkisi	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Sünme hastalıklı ve normal görünümlü ekmeç	8
Şekil 4.1. <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> izolatları üzerine inhibitör etkisi (24. Saat)...	26
Şekil 4.2. <i>L. rhamnosus</i> 'un <i>Bacillus</i> izolatları üzerine antibakteriyel etkisi (48. saat)	26
Şekil 4.3. <i>L. rhamnosus</i> 'un, O3-1 izolatı üzerine antibakteriyel etkisi	27
Şekil 4.4. <i>L. rhamnosus</i> 'un, O1-2 izolatı üzerine antibakteriyel etkisi	27
Şekil 4.5. <i>L. rhamnosus</i> 'un ÖZ-P-1 izolatı üzerine antibakteriyel etkisi	27
Şekil 4.6. <i>L. rhamnosus</i> 'un, ÖZ-P-2 izolatı üzerine antibakteriyel etkisi	27
Şekil 4.7 <i>L. rhamnosus</i> 'un, Tİ-F-2 izolatı üzerine antibakteriyel etkisi.....	27
Şekil 4.8. <i>L. rhamnosus</i> 'un, BE-F-2 izolatı üzerine antibakteriyel etkisi	27
Şekil 4.9. Ekmeç hamurunda, <i>L. rhamnosus</i> 'un, <i>Bacillus subtilis</i> üzerine inhibisyon etkisi	31

1. GİRİŞ

Un kaynaklı birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik sorunlar, önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Gerek, ekme ve gerekse, diğer fırın ürünleri, 0,96–0,98 gibi yüksek su aktivitesi ve 5,2–5,8 pH değerine sahip olmaları nedeniyle, mikroorganizma gelişmesi için uygun ortamlar oluşturmaktadırlar. Bu ürünlerde, sıklıkla karşılaşılan sorunların başında, küf kontaminasyonu ve sünme (rope) oluşumu gelmektedir (Jenson, 1998).

Ekmelerde meydana gelen ve özellikle yaz aylarında ortaya çıkan sünme hastalığı, bazı sporlu bakteriler tarafından gerçekleştirilen ve özellikle sıcak ve nem oranı yüksek olan yaz aylarında önemli bir problemdir. Bu bakterilerin oluşturduğu sporlar, ekmelerin fırında pişirilmesi sırasında, ekme içi sıcaklığı 100°C'yi geçmemesinden dolayı, ölmekte ve ekme için yaklaşık 40 dereceye soğumasından sonra, tekrar vejetatif hale dönerek, hızla çoğalmaktadırlar (Vangöl, 2006).

Sünme, üründe genellikle sporlarının ısıya daha dirençli olmasından dolayı başta, *Bacillus mesentericus* olmak üzere, birçok *Bacillus* türlerinin üründe gelişmesiyle ortaya çıkmaktadır (ICMSF, 1998; Jenson, 1998; Adams ve Moss, 1995, Rosenquist ve Hansen, 1995). Bu türler, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* ve *B. cereus*'dur. (Thompson ve ark. 1998, Holy, 1994; Rosenquist ve Hansen, 1995). *Bacillus subtilis* sporlarına, unda ve nadiren de ekme yapımında kullanılan mayada rastlanmaktadır (Jenson, 1998).

Bacillus cinsi bakteriler, genelde toprak kökenlidirler. Hasat öncesi ve sonrası buğday tanesinin dış kısmında bulunmaktadırlar. Bu bakterilerin sporları, özellikle büyük somun ekmeklerinin, orta noktalarındaki pişirme sıcaklığına dayanabilmektedir. Ekmekler soğutulduktan sonra, çimlenerek 0.95 su aktivitesi düzeyinde kolayca gelişebilmektedir. Pişirme sonucu, ortamda kalan spor sayısı, başlangıçtaki spor sayısına ve pişirme koşullarına bağlı olup, ılıman iklimlerde, doğal ve katkı ilave edilmeyen ekmelerde, daha yüksek sayılarda olmaktadır (Anonymous, 2008b).

İyi temizlenmemiş buğdaylardan elde edilen unların, değirmenlerde unun elde edilmesi ve depolanması sırasında, bu bakterilerle kontamine olma riski yüksek olmaktadır. Ayrıca, ekme yapımında kullanılan un, maya gibi katkı maddeleri, su ve yetersiz hijyen koşullarından dolayı da, ekmeğe sünme sporlarının bulaşması söz konusu olabilmektedir (Aran ve Boyacıoğlu 2006). Sünme sporunun, çok zayıf alkali ortamda optimum gelişme özelliğine sahip olması nedeniyle, bu bakterinin inhibisyonu için, una veya ekme hamuruna, bazı asidik katkı maddeleri (Örneğin kalsiyum asetat, asedik asit, propiyonik asit, sorbik asit vb.) ilave edilmektedir.

Patojenlerin inhibisyonunda kullanılan ısıtma işlem uygulaması, katkı maddelerinin kullanımı gibi klasik yöntemlerin yanı sıra, modern işleme ve koruma yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen, özellikle son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talebi artmıştır. Bu amaçla kullanılan biyokoruyucular arasında, probiyotik özellikteki laktik asit bakterilerinin yanı sıra, ürettikleri metabolitleri kullanım alanı bulmaktadır.

Gıdalarda starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri (LAB), fermentatif metabolizmaları sonucunda laktik asit üreten, gram (+), bazı durumlarda pseudo-katalaz olmasına karşın, genelde katalaz(-), hareketsiz ve sporsuz bakterilerdir. Tüm laktik asit bakterileri, anaerobik olarak gelişirler, ancak birçoğu fakültatif anaerob veya mikroaerofiliktirler (Axelsson, 1998).

Laktik asit bakterileri grubunda, biyokimyasal ve ekolojik özellikleriyle birlikte, filogenetik olarak birbirine yakın olan "*Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella*" cinsleri yer almaktadır (Axelsson, 2004). *Bifidobacterium* cinsi bakteriler, filogenetik olarak diğer laktik asit bakterilerine benzememesine rağmen, biyokimyasal, fizyolojik ve ekolojik özelliklerinden dolayı, genellikle laktik asit bakterileri grubu içerisine dâhil edilmektedirler (Adams, 1999).

LAB, heksozlardan laktik asitin yanı sıra, cins ve tür özelliklerine bağlı olarak, asetik asit, CO₂, alkol ve bazı aroma maddeleri de üretmektedirler. Bu maddelerin üretimi sırasında, az da olsa gıdanın kalori değerinde bir değişim olmaktadır. Ayrıca, LAB, gıdanın bozulmasına neden olan mikroorganizmalar ve patojen mikroorganizmalar üzerine de, ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit,

laktoperoksidaz, diasetil ve bakteriyosinler gibi maddeler nedeniyle antagonistik etkiye sahiptirler. Bu nedenle, söz konusu bakteriler kullanılarak üretilen gıdalar, insan sağlığı açısından güvenilir gıdalar olarak kabul edilmektedirler (Spelhaug ve Harlander, 1989; Farias ve ark, 1994; Vescovo ve ark. 1997; Yang ve ark, 1997; Hayaloğlu ve Erginkaya, 2001).

Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin etki spektrumları, bazı türlerle sınırlı olup, daha çok gram (+) mikroorganizmalar üzerine antibakteriyal etki gösterirler. Biyokimyasal özellikleri ve etki spektrumları ise, bakteriyosin sentezleyen mikroorganizmalara (*Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* gibi) bağlı olarak farklılık göstermektedir. LAB'nin, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* ve *Salmonella* spp. gibi birçok patojen mikroorganizma üzerinde etkili olmaları nedeniyle, gıdalarda kullanım potansiyelleri söz konusudur. Bununla birlikte, gıdaların korunmasında diğer koruyucu maddeler veya diğer gıda muhafaza yöntemleri ile birlikte kullanılmalarıyla, daha etkili olduğu, çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Kurt ve Zorba, 2005).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, *Bacillus* spp'nin bazı türlerinin gıdalarda çok ciddi bozulmalara neden olduğunu göstermiştir. *Bacillus cereus*'un psikrotrof serotipleri ile kontamine olan süt ve ürünlerinin, halk sağlığı açısından risk taşıdığı, kontamine süt ve ürünlerinin soğukta muhafazası sırasında, psikrotrof serotiplerin üreyerek toksin oluşturdukları bildirilmiştir (Özdemir, 2003). *Bacillus* cinsi bakterilerin gıdalarda, özellikle unlu mamullerde inhibisyonu amacıyla, kalsiyum propiyonat, asetik asit, propiyonik asit gibi kimyasallar kullanılmaktadır (Rosenquist ve Hansen, 1998, Olimpia ve ark, 2002, Demir. 2006)

Yapılan birçok çalışma, LAB'nin *Bacillus* spp. sporları üzerine inhibitör etkisinin, kimyasallar kadar etkili olduğunu göstermiştir (Spelhaug ve Harlander, 1989; Rosenquist ve Ansen, 1998; Sameshima ve ark, 1998; Messens ve De vuyst 2002; Olimpia ve ark, 2002). *Lactobacillus rhamnosus* 'un farklı suşları birçok probiyotik üründe uzun zamandır kullanılmaktadır. En iyi bilinen suşu ise *L. rhamnosus* GG'dir (Gorbach ve Goldin, 1992; Alander ve ark, 1999). *L.*

rhamnosus'un bu özel suşunun birçok yararlı etkisi olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Majama ve ark, 1995; Huang ve ark, 2002).

Bu çalışmada, *L. rhamnosus*'un *Bacillus* spp. sporları üzerine inhibitör etkisinin; agar difüzyon, sıvı ortam ve ekmek hamuru içerisinde belirlemek ve halen ekmeklik unlarda sünme (rope) etkeni sporlara karşı ticari olarak kullanılan antimikrobiyal maddelere alternatif olarak LAB'ın kullanma olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Laktik Asit Bakterileri

Lactobacillus cinsi bakteriler, *Lactobacillaceae* familyasına aittir. *Lactobacillus* spp.'in çoğu basil, ancak bazı türleri koko-basil şeklindedir. Bu bakteriler, gelişebilmeleri için amino asit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar (Yetişmeyen, 1995).

Laktik asit bakterileri (LAB), sitokroma sahip olmayan, aerotolerant anaerob, asidi tolere edebilen, kuvvetli fermentatif olup şeker fermantasyonu sırasında başlıca son ürün olarak laktik asit üreten kok veya çubuk şeklinde bakterilerdir. Laktik asit bakterileri genellikle besin içeriği bakımından zengin olan ortamlarda, örneğin süt, et ve sebzelerde yoğun olarak bulunmaktadır.

Lactobacillus spp. 2–53°C'de (Optimum 30–40°C) gelişirler. Aynı zamanda bu bakteriler, % 1–3 oranında laktik asit oluşturarak, pH'yı 3,2–3,5'e kadar düşürürler. Bu nedenle, aside dayanıklıdırlar (Arda, 1985).

Laktik asit bakterileri içerisinde, biyokimyasal ve ekolojik özellikleriyle birlikte, filogenetik olarak birbirine yakın olan, "*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*" cinsleri yer almaktadır (Axelsson, 2004). *Bifidobacterium* cinsi bakteriler, filogenetik olarak diğer laktik asit bakterilerine benzememesine rağmen, biyokimyasal, fizyolojik ve ekolojik özelliklerinden dolayı, genellikle laktik asit bakterileri terimi içerisinde yer almaktadır (Adams, 1999).

Fermantasyon sonucu ana ürün olarak, laktik asit üretirler ve enerjilerini, substrat düzeyinde fosforilasyon ile sağlarlar. Karbonhidrat metabolizmaları göz önüne alındığında, homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Homofermentatif türler, glikozdan tamamen laktik asit oluştururken, heterofermentatif türler, laktik aside ek olarak, karbondioksit ve bazı diğer organik asitleri üretirler. Fenotipik özellikleri baz alınarak yapılan değerlendirmede ise, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Betabacterium* şeklinde üç alt gruba ayrılırlar. (Beasley, 2004; Gürsoy ve Kınık, 2005; Madigan ve Martinko, 2006).

Laktik asit bakterileri, gıdaların ve hafif alkollü içeceklerin üretiminde uzun yıllardır kullanılmakla birlikte, özellikle son yıllarda çok çeşitli fermente ürünlerin üretiminde rol oynayan en önemli endüstriyel mikroorganizmalar olarak bilinmektedirler (Batish ve ark, 1997; Ress, 1997).

1.1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özellikleri

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisinin; laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri maddelerden kaynaklandığı bilinmektedir. Bu olumlu özelliklerinden dolayı, birçok laktik asit bakterisi, gıda güvenliğinin sağlanması ve raf ömrünün uzatılmasının yanı sıra, intestinal enfeksiyonların ve bazı kanser tiplerinin kontrolü gibi medikal alanda da kullanılmaktadır (Gilliand, 1990; Lewus ve ark, 1991).

LAB “güvenli bakteriler” olarak kabul edilirler ve koruyucu kültür özelliği taşırlar. Laktik asit bakterilerinin antagonizması, diğer mikroorganizmalarla besin öğeleri için yarışarak ya da organik asitler (asetik, propiyonik ve laktik asit gibi), hidrojen peroksit, antimikrobiyal enzimler, diasetil ve bakteriyosinler gibi bir veya daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşikler üretmelerinden kaynaklanmaktadır (Devlieghere ve ark, 2004).

Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin etki spektrumları, bazı türlerle sınırlı olup, daha çok, Gr (+) bakteriler üzerine etkilidirler. Biyokimyasal özellikleri ve etki spektrumları, sentezleyen mikroorganizmalara bağlı olarak

farklılık göstermektedir. *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Staphylococcus* gibi birçok mikroorganizma tarafından sentezlenmeleriyle birlikte, gıdalarda daha çok laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen bakteriyosinler kullanılmaktadır. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* ve *Salmonella* spp. gibi birçok patojen bakteri üzerinde etkili olmaları nedeniyle, gıdalarda kullanım potansiyelleri oldukça artmıştır (Kurt ve Zorba, 2005).

Homofermentatif laktik asit bakterileri, heksozlardan laktik asit, cins ve tür özelliklerine bağlı olarak, asetik asit, CO₂, alkol ve bazı aroma maddeleri üretmektedirler. Bu maddelerin üretimi sırasında az da olsa, gıdanın kalori değerinde bir değişme olmaktadır. Ayrıca, gıda kalitesini bozan ve patojen mikroorganizmalar üzerine, ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin gibi maddeler ve laktoperoksidaz sistemi ile antagonistik etki gösterirler. Bu mikroorganizmalarla üretilen gıdalar, daha önce de belirtildiği üzere, insan sağlığı açısından güvenilir olarak kabul edilmektedirler (Spelhaug ve Harlander, 1989; Farias ve ark, 1994; Vescovo ve ark, 1997; Yang ve ark, 1997; Hayaloğlu ve Erginkaya, 2001).

1.1.2. *Lactobacillus rhamnosus*'un Taksonomik Özellikleri ve Gıda Mikrobiyolojisi Açısından Önemi

Lactobacillus rhamnosus GG, 1983 yılında insan dışkılarından izole edilmiş ve 1985 yılında ise patenti alınmıştır. *L. rhamnosus*, LAB içerisinde antibakteriyal etki gösteren fakültatif heterofermentatif (Grup II) özellikte olup, pentozları ve glukogonları fermente edebilme yeteneğine sahiptir (Hessle ve ark, 1999). *L. rhamnosus*'un sistematigi aşağıda verilmiştir (Morita ve ark, 2009).

Âlem	<i>Bacteria</i>
Bölüm	<i>Firmucutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Lactobacillales</i>
Cins	<i>Lactobacillus</i>
Tür	<i>L. rhamnosus</i>
Binominal ismi	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

L. rhamnosus, süt ürünlerinde çabuk üreyebilmekte ve ekstraselüler polisakkarit üretebilme yeteneğindedir (Anonymous, 2008a).

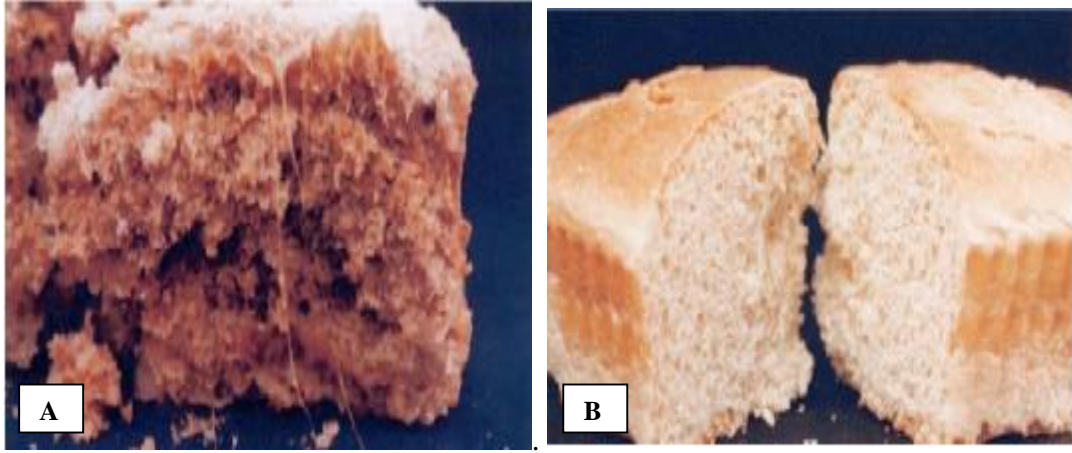
LAB'nin başında, *L. rhamnosus* GG (veya *Lactobacillus* GG) gelmektedir. Tufts Üniversitesi'nde Sherwood Gorbach ve Barry Goldin tarafından bulunduğu için "GG" eki kullanılmaktadır (Dorron ve ark, 2005).

L. rhamnosus, 271 ticari üründe genellikle 5×10^7 kob/mL konsantrasyonunda kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu suşun, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* ve *Enterococcus faecium* gibi patojenlere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur (Jacobsen ve ark, 1999).

1.2. Sünme (Rope) Hastalığı

Sünme (rope), ekmeği etkileyen en önemli hastalıklardan biridir. Sünme İngilizce bir kelime olan rope'un Türkçe karşılığı ip, nemli veya yapışkan lif veya iplik olup, bu tanım, hastalığa maruz kalmış ekmeğin iç yapısını ifade etmektedir (Aran ve Boyacıoğlu, 2006).

Sünme hastalığı, üründe başlangıçta tatlı, olgun ananas veya kavunu andıran meyvemsi bir koku ile ortaya çıkmakta, genellikle 36–48 saat içinde koku yoğunlaşarak iç kısımda sünme şeklinde gözlenen bir yapı oluşmaktadır (Holy, 1994; ICMSF, 1998; Jenson, 1998). *Bacillus subtilis*, üründe sünme oluşumu yanında, ürünle birlikte yüksek miktarlarda (10^8 g) tüketilmesi durumunda da insanda, bulantı, kusma, ishal, baş ağrısı vb. belirtilerle ortaya çıkan gıda zehirlenme vakalarına da neden olabilmektedir (Adams ve Moss, 1995).



Şekil 1.1. A:Sünme Hastalıklı Ekmek, B: Normal Ekmek

Uygun hijyenik koşullarda üretilmeyen hamurlarda, yapım sırasında, sünme sporlarında artışlar gözlenmekte ve bu hamurlarla yapılan ekmeklerde de sünme hastalığı gözlenmektedir (Şekil 2.1). Bu bozulmada, un hücreleri parçalanarak, yapışkan viskoz bir yapı ortaya çıkmaktadır. Bu yapının nedeni ise, undaki nişasta ve proteinin hidrolizinin bir sonucudur (Forsythe ve Hayes, 1998). Unlu gıdalarda nişastanın hidrolizine neden olan bakteriler ve ürettikleri enzimler, Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Sünme oluşumu üzerinde etkili faktörler, başlıca 4 grup altında toplanmaktadır.

- a. Ekmeğin soğuma süresinin uzun oluşu veya 25°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda muhafazası,
- b. pH değerinin 5'in üzerinde olması,
- c. Başlangıç spor sayısının yüksekliği ve
- d. Ürünün nem içeriğinin yüksek olması.

Sünme oluşumu, ürün içinde nemin yüksek olduğu kısımlarda daha çok gözlenmektedir.

Çizelge 1.1. Unlu gıdalarda nişastanın hidrolizine neden olan bakteriler ve ürettikleri enzimler (Eichler 2001, Haki ve Rakshit 2003)

Enzim	Organizma	Enzim Özellikleri	
		Opt. Sıcaklık (°C)	Opt. pH
α-amilaz	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70	7,0
	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	6,0–6,5
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70–80	5,0–6,0
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	70	7,0
β-amilaz	<i>Bacillus circulans</i>	60	-
	<i>Bacillus var. mycoides</i>	50	-
	<i>Bacillus sp.</i>	50	7,5
Pullulanaz	<i>Bacillus sp.</i>	60	-

Un ve ekmek çeşitlerinde, sünme önleyici olarak kullanılan ve Türk Gıda Kodeksi tarafından kullanımına izin verilen katkı maddeleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Renklendiriciler ve tatlandırıcılar dışındaki gıda katkı maddeleri tebliği. Tebliğ No: 2008/22. (Anonymus, 2008c)

Ekmek (sadece buğday unu, su, maya veya kabartıcı ve tuzdan oluşan)	E 260 Asetik asit E 261 Potasyum asetat E 262 Sodyum asetatlar E 263 Kalsiyum asetat E 270 Laktik asit E 325 Sodyum laktat E 326 Potasyum laktat E 327 Kalsiyum laktat	QS
---	---	----

QS: Belirlenmemiş miktar/Quantum satis/QS: Herhangi bir en yüksek düzeyin belirtilmediği anlamındadır.

Yapılan bir araştırmada, *B. subtilis* sporlarını, 10^6 g düzeyinde içeren hamura, %0,1 v/w (un ağırlığı üzerinden) oranında propiyonik veya asetik asit ilavesi ile sünme oluşumunun engellenebildiği saptanmıştır (Rosenquist ve Hansen, 1998;

Thompson ve ark. 1998) yaptıkları çalışmada, sirkenin, sünme oluşumunun önlenmesinde kalsiyum propiyonattan daha etkili olduğu belirlemişlerdir.

Kalsiyum asetat (E 263), asetik asitin kalsiyum tuzu, doğal bir asit, birçok meyvenin içerisinde bulunmaktadır. Söz konusu asit, fermantasyonla üretilmesinden dolayı hemen hemen tüm fermente ürünlerde rastlanmaktadır. Ticari olarak şeker, melas veya alkolden bakteriyel fermantasyon ile veya asetaldehitten kimyasal sentez ile elde edilmektedir. Asetatlar, ayrıca koruyucu ve tampon olarak kullanılırlar. Kalsiyum asetat, özellikle ekmek ve fırında pişirilen ürünlerde, bazı spor oluşturan organizmalara karşı kullanılmaktadır. Yan etkileri yoktur, asetatlar tüm vücut hücreleri için normal bileşenlerdir. Yalnızca (çok nadiren) sirkeyi tolere edemeyen insanlar tarafından tüketilememektedir. Kabul edilebilir günlük alım miktarı ise, limitsizdir (Anonymous, 2009a).

Ekmek ve fırın ürünlerinde en yaygın kullanılan koruyucu maddeler arasında, propiyonatlar yer almaktadır. Ancak, yüksek miktarlarda kullanılmadıkça etkinlikleri sınırlı olmakta, belli düzeylerin üzerinde ürüne ilave edilmeleri durumunda da, duyuşal niteliklerde olumsuzluklara neden olabilmekte ve maya aktivitesini etkileyebilmektedirler. Uygulamada, genellikle sodyum propiyonat, diğer fırın ürünlerine, kalsiyum propiyonat ise, ekmeğe ilave edilmektedir. Propiyonatlar, ürüne hamur hazırlama aşamasında katılmakta, kullanılan konsantrasyon ürünün özelliklerine ve hedeflenen depolama süresine bağılı olarak değışmektedir. Genel olarak kullanılan dozlar %0,1 ile 0,3 (un ağırlığı üzerinden) arasında değışmektedir. Duyusal nedenlerle, ekmeklerde propiyonik asit kullanımı da tercih edilebilmektedir. Propiyonik asit, disosiasyon katsayısının düşük olması nedeniyle geniş bir pH aralığında etkin olmakta, küf gelişiminin yansıra, rop etkeni başlıca bakterilerden olan *Bacillus mesentericus*'un gelişimini kontrol altına alabilmektedir (Luck ve Jager, 1997).

Ekmeklerin, üretim ve depolama sırasında sünme oluşumunu önlemek için genelde aşağıda belirtilen işlemler uygulanmakta veya uygulanması önerilmektedir.

1. Kullanılan tüm alet ve ekipmanlar, dezenfektanlı kaynar su ile yıkanması ve hatta gerekirse tekne, kazan, tava gibi hamurun direkt temas ettiği yüzeyler alkol dökülerek dezenfekte edilmesi,

2. Hamur yapılırken hamur suyuna sirke ve sirke asiti (asetik asit) ilave edilmesi (100 kg. una 0,5 litre sirke),
3. Hamurun, mümkün oldukça soğuk yoğrulması ve kuvvetli bir hamur fermantasyonunun uygulanması ve
4. Ekmekler fırından çıktıktan sonra hemen tavalardan alınarak, serin yerde hızla soğutulması.

1.2.1. *Bacillus subtilis*'in Genel Özellikleri

Bacillus subtilis, 1872 yılında Ferdinand Cohn ve öğrencisi Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Hareketli, sporları oval ve subterminal olup, kapsülsüzdür ve ön zenginleştirme yapılmayan besiyerinde rahatlıkla üreyebilme özelliğine sahiptir. Toprak kökenli bir bakteri olup, mezofiliktir ve optimum gelişme sıcaklığı 25-35°C'dır. *Bacillus subtilis*'in sistematigi aşağıda verilmiştir (Fritze ve Pukall 2001).

Âlem	<i>Bacteria</i>
Bölüm	<i>Firmucutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Bacillales</i>
Familya	<i>Bacillaceae</i>
Cins	<i>Bacillus</i>
Tür	<i>B. subtilis</i>
Binominal ismi	<i>Bacillus subtilis grubu</i>
Sinonimleri	<i>Vibrio subtilis,</i> <i>Bacillus globigi</i>

Bacillus subtilis, insanlarda düşük derecede patojeniteye sahip olup, "subtilisin" adı verilen proteolitik enzim üretmektedir. Subtilisin, düşük toksijenik özelliğe sahip olmakla beraber sürekli maruz kalındığında, alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. *B. subtilis*'in kullanım limitleri OSHA (-Occupational Safety and Health Administration) tarafından düzenlenmiştir.

Bacillus subtilis sporları, pişmiş gıdalarda, yüksek sıcaklıklarda canlı kalabilmekte ve ekmeek hamurunda “sünme” hastalığını oluşturmaktadır. *Bacillus subtilis*, asimetrik olarak bölünmekte, sıcaklık, asit, tuz gibi çevresel faktörlere direnç gösteren endospor oluşturmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sünme Hastalığı ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Daniel (1963), yaptığı çalışmada, hastalığın gelişimi sırasında ekmeğin iç kısmındaki proteinler ve nişastaların birbirinden ayrıldığını ve ekmeğin parçalandığı zaman, yapışkan yumuşak madde, hastalığın ismini simgeleyen berrak ip benzeri lifler halinde dışarı çıktığını belirlemiştir.

Volavsek ve ark, (1992), sünme tespit edilen 22 un ve hamur örneğinde, toplam aerobik mezofilik spor ve sünme spor sayılarını saptamışlar, un ve hamur örneklerindeki rop spor sayıları ve mezofilik spor sayıları arasında kabul edilebilir korelasyonlar belirlemişlerdir.

Palop ve ark, (1999), *Bacillus* spp. sporlarının yüksek ısı dirençlerinin, hücre protoplazmasının içerdiği su miktarıyla doğrudan bağlantılı olduğunu ispatlamışlardır.

Cazemier ve ark, (2001) , yaptıkları çalışmada, hücre içi mineral içeriği (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} and K^+) yüksek *Bacillus* türlerinin ısı dirençlerinin, normal koşullardaki *Bacillus* suşlarına oranla daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Chauhan ve ark, (2001), küçük yuvarlak ekmeklerde buğday unu yerine değişik alternatif unlar (soya, sorgum ve patates unu) kullanılmışlar ve yapılan ekmeklerin mikrobiyolojik özellikleri belirlenmişlerdir. Ekmekler, 180 °C sıcaklıkta, 25 dakika pişirilmiş ve 30 °C sıcaklıkta depolanmıştır. Ekmeğin raf ömrü süresince, 1. ve 3. günler arasında, sünme görülmemiş ve minimum düzeyde küf belirlenmiştir. Hammaddelerden ve ekmekten izole edilen en önemli bakteri *Bacillus* spp. olmuş ve sırası ile hammaddelerde % 83 ve ekmekte % 99 oranında bulunmuştur.

Giffel ve ark, (2002), *Bacillus*, *Aneurinibacillus* ve *Paenibacillus* cinsine ait bazı bakterilerin, 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda canlılıklarını koruduklarını tespit etmişlerdir.

Simmonds ve ark, (2003), *Bacillus* cinsi bakteri sporlarının yüksek hidrofobik özellikleri sayesinde üretim sırasında, alet ve ekipmanlara bulaştığını ve uygulanan ısı işlem basamaklarından sonra bile canlı kalabildiklerini rapor etmişlerdir.

Sorokulova ve ark, (2003), un ve roplu ekmekten izole ettikleri *Bacillus* çeşitlerinin ekmeğin bozulması ile olan ilişkileri ve genetik farklılıklarını araştırmışlardır. İzole edilen en önemli türler, *Bacillus subtilis* ve *B. lichoniformis* olmuştur. *B. subtilis* türünün, 15 denemeden 10 tanesinin, *B. lichoniformis*'in ise, 6 denemeden 4 tanesinin laboratuvar şartlarında üretilen ekmeklerde sünme hastalığına neden olduğu belirlenmiştir.

Demir (2006), Trakya Bölgesinde faaliyet gösteren değişik un fabrikalarından mayıs ve ekim dönemleri olmak üzere, iki farklı zamanda topladığı 100 adet un örneğinde, sünme etkeni bakteri sporlarının yanı sıra, bazı kalite kriterleri açısından incelemiştir. Yapılan analizler sonucunda, mayıs dönemine ait toplam 50 adet un örneğinin 4 tanesinde, en az 2×10^2 kob/g, en çok $1,6 \times 10^4$ kob/g *Bacillus* spp. bulunurken, ekim dönemine ait toplam 50 adet örneklerin sadece birinde 10^3 kob/g *Bacillus* spp. tespit etmiştir.

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antagonistik Etkileri İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Spelhaug ve Harlander (1989), yaptıkları çalışmada, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 11454, *Pediococcus pentosaceus* FBB61 ve *Pediococcus pentosaceus* FBB63-D62'nin gıda patojenlerine karşı inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Bakteriyosin üreten 3 suş, gıda patojeni olarak bilinen bazı Gr (+) ve Gr (-) bakterilere karşı inhibisyon etki göstermişlerdir. Gr (+) patojenler arasında; *C. perfringens*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* yer aldığını belirlemişlerdir.

Sameshima ve ark, (1998), *Staphylococcus aureus*'un enterotoksin üretimi ve gelişme hızını, *Lactobacillus* cinsine ait suşların (*L. acidophilus* FERM P-15119, *L. rhamnosus* FERM P-15120, *L. paracasei* subsp. *paracasei* FERM P-15121), antagonistik etkilerini, 20°C ve 35°C fermantasyon sıcaklıklarında araştırmışlar ve

Her iki sıcaklıkta da, LAB suşlarının, *S. aureus* gelişimini ve enterotoksin üretimini inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Messens ve De Vuyst (2002), laktik asit bakterilerinden elde edilen bakteriyosinlerden; bavaricin A ve plantaricin ST31, bakteriyosin benzeri inhibitör madde olan, BLISC57 ve reutericyclinin antimikrobiyel spektrumlarını araştırmışlardır. Sonuç olarak, Gr(-) bakteriler üzerine inhibisyon etki tespit edilmezken, Gr(+) bakterilerin duyarlı olduğu bulunmuştur.

Gratz ve ark, (2007), *L. rhamnosus* GG'nin aflatoksin B1'in taşınması, metabolizması ve toksisite etkisinin azaltılmasına yönelik bir araştırma yapmışlar. Caco-2 hücrelerinde, *L. rhamnosus* GG'in, aflatoksin B1'i hücre içine absorblayarak etkisini azalttığı, aflatoksin tarafından hücre zarı ve DNA'nın zarar görmesinin engellediği tespit edilmiştir.

2.3. Sünme Hastalığını Önlemeye Yönelik Yapılan Çalışmalar

Rosenquist ve Hansen (1998), buğday ekmeğinden izole ettikleri *B. subtilis* ve *B. licheniformis*'in, organik asit, ekşi hamur ve nisine karşı duyarlılığını araştırmışlardır. Bu amaçla, *B. subtilis* sporları aşılana buğday ekmeği, 10 gün bekletilerek sporlar geliştirilmiştir. Daha sonra, *B. subtilis* sporları başka bir hamurun içerisine aşılacaktır. Hazırlanan bu hamur içerisine, ayrı ayrı olacak şekilde; %0.10 v/w oranında propionik ve asetik asitin yanı sıra, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. multaromicus*, ticari ekşi hamur starter kültürü ile *L. sanfrancisco* ilave edilmiştir. Bu karışımlardan hazırlanan ekşi hamurdaki toplam asitlik, 10'un üzerindeyken, ekmekte pH değeri 4,8'in altında ölçülmüştür. Buğday hamuruna, starter kültür olarak ilave edilen laktik asit bakterileri ve nisin, (100 ppm/g) unda *B. subtilis* ve *B. licheniformis* çeşitlerine karşı her hangi bir etki göstermezken, laktik asit bakterilerinin 186 çeşidi arasında bulunan *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* nisin üretilen çeşidinin bir agar içerisinde bulunan *B. subtilis* ve *B. licheniformis* karsısında inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Olimpia ve ark, (2002), yaptıkları çalışmada, buğday ekmeğinde *Bacillus* spp. suşlarının neden olduğu sünme hastalığının, laktik asit bakterileriyle kontrolünü

araştırmışlardır. Çalışmada, 30 adet sünme hastalığını taşıyan ekmekten, 61 *Bacillus* kültürü izole edilmiş, bu izole edilen kültürlerin tamamı, *B. subtilis* olarak belirlenmiştir. İzole edilen bu kültürlerden bir kısmına, 96 °C’de 10 dakika ısı işlem uygulanmış, ikincisine, 100 °C’de 10 dakika ve üçüncüsüne ise, ısı işlem uygulanmamıştır. İlk grupta, steril ekmek dilimlerinden 12 tanesinde, sünme etkeni sporların gelişimi belirlenmiş, ikincisinde, hiç sünme hastalığına rastlanmazken, üçüncüsünde, 37 tane kültür sünme hastalığına neden olmuştur. Agar difüzyon yöntemi ile LAB’nin antagonistik etkisini de ayrıca belirlemişlerdir.

Røssland ve ark, (2003), 18 farklı laktik asit bakterisinin, fermente edilen yağsız sütte *Bacillus cereus*’un gelişi üzerine antibakteriyel etkisini araştırmışlardır. *Bacillus cereus*, sütte tek başına kullanıldığında, sayısı 10^7 - 10^8 kob/mL ulaşırken, 30°C veya 37°C’de farklı *Lactobacillus* ve *Lactococcus* kültürleri ile inkübe edildiğinde, 72 saatlik fermantasyon sonunda sayıları, 10 kob/mL ile 10^6 kob/mL olarak bulunmuştur.

Menteş ve ark, (2007), *Lactobacillus plantarum* LMO25 ve *Lactobacillus alimentarius* LMO7 ile üretilen farklı iki ekmek hamurunda, beyaz ekmekteki sünme etkeni olan *Bacillus* izolatları üzerine söz konusu laktik asit bakterilerinin, inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Beyaz hamura, *L. plantarum* LMO25 ve *L. alimentarius* türleri ayrı ayrı ilave edilerek, üretilen ekmeklerde (%15 ve %20 ekmek mayası ilaveli ve pH 3,5–4,0), *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis*’un neden olduğu sünme hastalığının engellendiğini belirlemişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Un Örnekleri ve Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan 3 adet organik, 2 adet durum ve 8 adet buğday unu örnekleri, Gaziantep'te bulunan bazı un ve ekmek fabrikaları ile marketlerden Temmuz ayında temin edilmiştir. Ayrıca, hiçbir katkı maddesi kullanılmadan organik üretim yapan tesislerden de organik un temin edilmiştir. Un çeşitleri ve araştırmada kullanılan kodları, Çizelge 3.1'de verilmiştir. Her bir deneme iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada ayrıca, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarı mikroorganizma koleksiyonundan temin edilen *Bacillus subtilis* ile Denisco USA ticari kültürü *Lactobacillus rhamnosus* kültürü kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyeri ve Çözeltiler

Plate Count Agar (Merck), Nutrient Agar (Merck), Nutrient Broth (Merck), Man Ragoza and Sharp Agar (Merck), Maximum Recovery Diluent (Merck), Anaerocult (Merck), Tripton, D-Glikoz, Bromcresol purple (% 1'lik çözeltisi), Magnezyum sülfat ($MgSO_4$), Monoamonyum fosfat ($NH_4H_2PO_4$), Dipotasyum fosfat (K_2HPO_4), Sodyum Sitrata ($C_6H_5NaO_7$), Bromtimol mavisi, Sodyum klorür ($NaCl$), Agar, Pepton, Glikoz, Metil kırmızısı, Etil alkol, Distile Su.

3.1.3. Alet ve Ekipmanlar

İnkübatör, Otoklav, Stomacher (karıştırıcı), Ph Metre, Hassas terazi, Steril Hava Kabini, Erlen Mayer, Beher, 5 ve 10 mL'lik Tüpler, Mezür, Cam Pipet, Otomatik Pipet, Petri, Cam Baget, Lam, Lamel, Huni, 10 L'lik cam kavanoz.

Çizelge 3.1. Un örnekleri ve kodları

ÖRNEK	ALINDIĞI YER	ÖRNEK KODU
Organik Un 1	Fabrika	O1
Organik Un 2	Fabrika	O2
Organik Un 3	Fabrika	O3
Buğday Unu 1	Market	ŞA-M
Buğday Unu 2	Fırın	GÜ-P
Buğday Unu 3	Market	Bİ-M
Buğday Unu 4	Fabrika	SÜ-F
Buğday Unu 5	Market	SÖ-M
Buğday Unu 6	Fırın	ÖZ-P
Buğday Unu7	Fabrika	GE-F
Buğday Unu 8	Fabrika	BE-F
Durum Buğday Unu 1	Fabrika	SÜD-F
Durum Buğday Unu 2	Fabrika	Tİ-F

3.2. Metot

3.2.1. Un Örneklerinden *Bacillus* Cinsi Bakterilerin İzolasyonu

Gaziantep ilinde faaliyet gösteren işletmelerden temin edinilen ekmeklik un örneklerinden, 10 g tartılarak, 90 mL steril serum fizyolojik içerisine, aseptik koşullarda aktarılmıştır. Karıştırma işleminden sonra örnekler, su banyosunda 65 °C’de 60 dakika tutularak, vejetatif formlarının ölmesi ve ortamda bu bakterilerin sporlu formlarının kalması sağlanmıştır. Örneklerin, 10^{-1} ’den 10^{-7} ,ye kadar seyreltmeleri yapılarak, yayma ekim yöntemiyle Nutrient agar (NA) besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiştir. 30 °C’de, 5 gün, inkübasyona bırakılan petrielerde, gelişen koloniler değerlendirilerek, *Bacillus* şüpheli kolonilerden gram boyama, spor boyama ve katalaz testleri yapılmıştır. Gram (+), sporlu, katalaz pozitif izolatlar, saflaştırılarak, spor morfolojileri, 15 ve 45°C’lerde hareket özellikleri ve kısaca IMVIC (İndol, Metil kırmızısı, Voges Proskauer, Sitrat kullanımı) olarak bilinen

tanımlama testleri uygulanarak, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de belirtilen sonuçlara göre *Bacillus* cinsi bakteri olup olmadıkları belirlenmiştir (Kim ve ark. 1998).

3.2.2. Un Örneklerinde Sünme (Rope) Varlığının Belirlenmesi

50 g ekmelek un, 450 mL % 0,1'lik peptonlu su içinde homojenize edilerek, 10^{-1} 'lik dilüsyon hazırlanmıştır. Rope sporu sayımı için, 10^{-1} 'lik dilüsyon kaynar su banyosunda, 30 dk bekletilmiş ve bekleme süresince, her 5 dakikada bir karıştırma işlemi uygulanmıştır. Daha sonra, bu karışımdan, 10^{-2} ve 10^{-3} 'lük dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her üç dilüsyondan, içerisinde 10 mL steril glikoz tripton broth bulunan üç tüpe, 1'er mL ekim yapılmıştır. 30°C 'de, 48 saat inkübe edilen tüplerden, yüzeyde zar oluşturanlar pozitif kabul edilerek örneklerin gramındaki sünme sayısı EMS (En Muhtemel Sayı) tablosuna göre hesaplanmıştır (Ünlütürk ve Turantaş, 2002).

3.2.3. *L. rhamnosus*'un *Bacillus* İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

MRS Broth besiyerinde çoğaltılan *L. rhamnosus*, mL'de 10^5 konsantrasyonda hücre olacak şekilde seyreltme işlemi yapıldıktan sonra, hücre süspansiyonu, 5000 devir/dk 10 dakika santrifüj edilerek, hücre ve süpernatantı ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Unlardan izole edilen ve nutrient agar besiyerinde geliştirilen *Bacillus* izolatlarından, bir koloni alınmış, içerisinde, nutrient broth besiyeri bulunan tüplere inoküle edilerek, 30°C de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, mL'de 10^6 konsantrasyon hücre olacak şekilde, seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen *Bacillus* süspansiyonu, *L. rhamnosus*'un, agar kuyu difüzyon yöntemi ve sıvı ortamda, antibakteriyel etkisinin belirlenmesinde ön kültür olarak kullanılmıştır.

3.2.3.1. Agar Difüzyon Yöntemi ile *L. rhamnosus*'un *Bacillus* İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

Agar kuyu difüzyon yöntemi ile *L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine antibakteriyel etkilerinin belirlenmesinde; 10^6 konsantrasyondaki *Bacillus* izolatı, Plate Count Agar (PCA) besiyerine, dökme ekim yöntemi ile ekilmiştir. Besiyeri üzerinde açılan 10 mm'lik kuyucuklara, *L.rhamnosus*'a ait süpernatant ve hücre süspansiyonu, ayrı plaklarda olmak üzere, 100'er µL eklenmiştir. Ayrıca, bir kuyucuğa da, sadece steril besiyeri ilave edilerek, kontrol olarak değerlendirilmiştir. 37 °C'de 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra, kuyucuk etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek, Çizelge 3.2'ye göre, antibakteriyel etki olarak değerlendirilmiştir (Submuth ve ark, 1987).

Çizelge 3.2. İnhibisyon Yeteneğinin Değerlendirilmesinde kullanılan Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yönteminde Zon Çapları (Rodriguez ve ark, 2000).

ZON ÇAPI (MM)	İNHİBİSYON AKTİVİTESİ
Görülmedi	-
<10	(+)
10–14	(++)
15–19	(+++)
>20	(++++)

(-) dirençli, (+): az dirençli ,(++): Orta hassas , (+++): hassas , (++++): çok hassas

3.2.3.2.Sıvı Ortamda *L. rhamnosus*'un *Bacillus* İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

10^6 'lık konsantrasyonda, *Bacillus* izolatları içeren 10 mL'lik Nutrient broth besiyerine, 10^5 konsantrasyonda *L. rhamnosus* hücre süspansiyonundan 1 mL ilave edilmiştir. Aynı deneme, *L. rhamnosus*'dan elde edilen süpernatant için de (1 mL) uygulanmıştır. Kontrol örneği olarak, *L.rhamnosus* içermeyen, sadece 10^6 konsantrasyonda *Bacillus* izolatı içeren, 10 mL nutrient broth kullanılmıştır. Her

karışımdaki *Bacillus* canlı sayısını belirlemek için, PCA'ya dökme ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır. Daha sonra tüm örnekler, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında *Bacillus* sayımları gerçekleştirilmiştir (Modified Nieto-Lozano ve ark, 2002; Taş, 2008).

3.2.3.3.Ekmek Hamurunda *L. rhamnosus*'un, *Bacillus subtilis* Üzerine Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

25 g steril ekmeklik una, 10^4 konsantrasyonda *Bacillus subtilis* ve 10^4 konsantrasyonda *L. rhamnosus* içeren 5'er mL sıvı süspansiyonlar karıştırılarak (1/5 oranında), yumuşak kıvamlı hamur yapılmıştır. Kontrol olarak, steril bir kapta, sadece 10^6 konsantrasyonda, *Bacillus subtilis* içeren süspansiyon, una ilave edilerek, hamur elde edilmiştir. Her iki karışımdan 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} 'lik dilüsyonlar hazırlanarak, dökme ekim yöntemi ile PCA'ya ekim yapılmıştır. Daha sonra hamurlar, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra, *Bacillus* sayımları gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışmamızın birinci aşamasında, değişik firmalardan temin edilen unlardan 20 *Bacillus* cinsine ait bakteri izole edilmiş ve bu bakterilerin sünme etkeni olup olmadıkları belirlenmiştir. İkinci aşamada ise, *Lactobacillus rhamnosus*'un, izole edilen *Bacillus* izolatları üzerine inhibisyon etkisi, agar kuyu difüzyon ve sıvı ortamda ikişer tekerrür olarak incelenmiştir. Ayrıca, *L. rhamnosus*'un, *B. subtilis* üzerine inhibisyon etkisi ekmek hamurunda da ikişer tekerrür olarak araştırılmıştır.

4.1. Un Örneklerinde *Bacillus*'ların Varlığı ve İzolasyonu

Denemede kullanılan 13 un örneğinden 20 *Bacillus* izolatı elde edilmiştir. Bu suşların 4'ü organik undan, 1'i durum buğday unundan, 15'i ise buğday unundan izole edilmiştir. İzolatların örneklere göre dağılımı Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Bacillus* izolatlarının elde edildiği un örnekleri

ÖRNEK	İZOLAT SAYISI	İZOLAT NO		
O1	2	O1-1	O1-2	-
O2	1	O2-1	-	-
O3	1	O3-1	-	-
ŞA-M	1	ŞA-M-1	-	-
GÜ-P	1	GÜ-P-1	-	-
Bİ-M	2	Bİ-M-1	Bİ-M-2	-
SÜ-F	1	SÜ-F-1	-	-
SÖ-M	2	SÖ-M-1	SÖ-M-2	-
ÖZ-P	2	ÖZ-P-1	ÖZ-P-2	-
SÜD-F	1	SÜD-F-1	-	-
GE-F	1	GE-F-1	-	-
Tİ-F	3	Tİ-F-1	Tİ-F-2	Tİ-F-3
BE-F	2	BE-F-1	BE-F-2	-

Benzer çalışma, Trakya Bölgesinde faaliyet gösteren un fabrikalarından alınan örneklerde yapılmış ve mayıs döneminde alınan 50 adet tesadüfî numuneden, 4 tanesinde *Bacillus* spp. tespit edilmiştir (Demir, 2006). Bu çalışmada alınan örneklerin tamamında *Bacillus* spp. izole edilmiştir.

4.2. Un Örneklerinde Sünme Etkeni Sporların Varlığı

Un örneklerinde sünme etkeni olan rop sporu varlığı araştırılarak, sayım sonuçları, EMS tablosundan yararlanılarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.2’de un örneklerinde belirlenen rope sporu sayıları verilmiştir.

Çizelge 4.2. Un örneklerinde Belirlenen Rope Sporu Sayım Sonuçları

ÖRNEKLER	ROPE
Bİ-M	40 EMS/g
GE-F	150 EMS/g
BE-F	90 EMS/g
SÖ-M	90 EMS/g
O2	90 EMS/g
O1	90 EMS/g
O3	95 EMS/g
Tİ-F	95 EMS/g
SÜ-F	250 EMS/g
SÜD-F	90 EMS/g
ÖZ-P	450 EMS/g
ŞA-M	450 EMS/g
GÜ-P	450 EMS/g

Rope sayımı sonunda en fazla kontaminasyon fırınlardan alınan numunelerde tespit edilirken, en az kontaminasyon, organik unlarda tespit edilmiştir. Forsythe ve Hayes, 1998’de yaptıkları çalışmada, uygun hijyenik koşullarda üretilmeyen hamurlarda, yapım sırasında, sünme sporlarında artışlar olduğunu ve bu hamurlarla

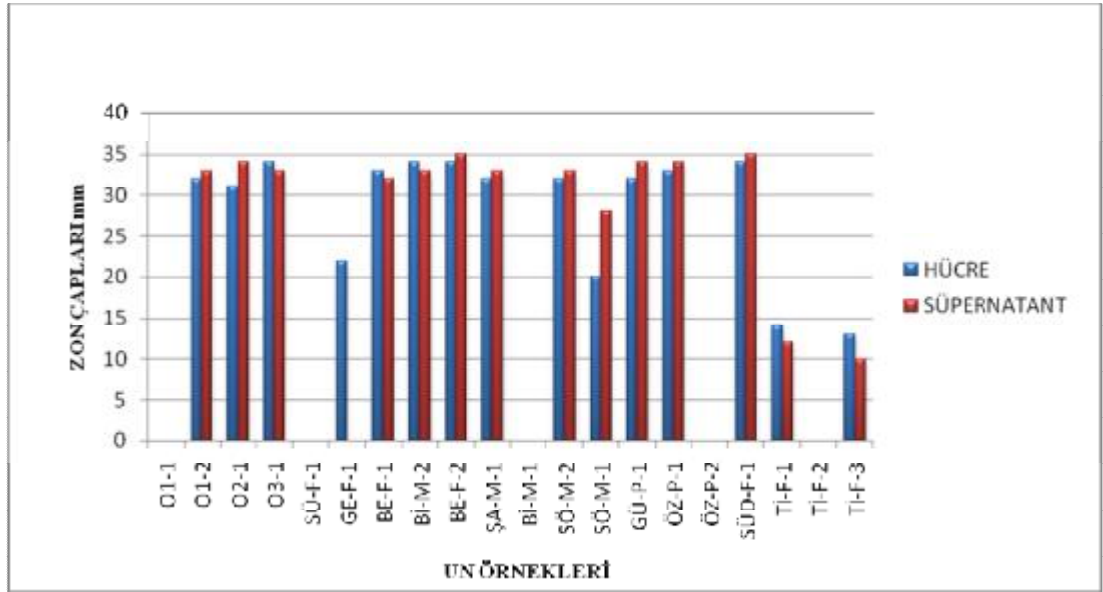
yapılan ekmeklerde de sünme hastalığı gözleendiğini belirtmişlerdir. Kontaminasyonun en fazla fırınlarda olmasının nedeni olarak, unların fırınlara gelene kadar birçok aşamasından (üretim, paketlenme, depolama, sevkiyat) geçmesi ve bu aşamalardan sonra fırınlarda üretim esnasında, unun kontaminasyona daha açık olması düşünülmektedir.

4.3. *L. rhamnosus*'un *Bacillus* İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkileri

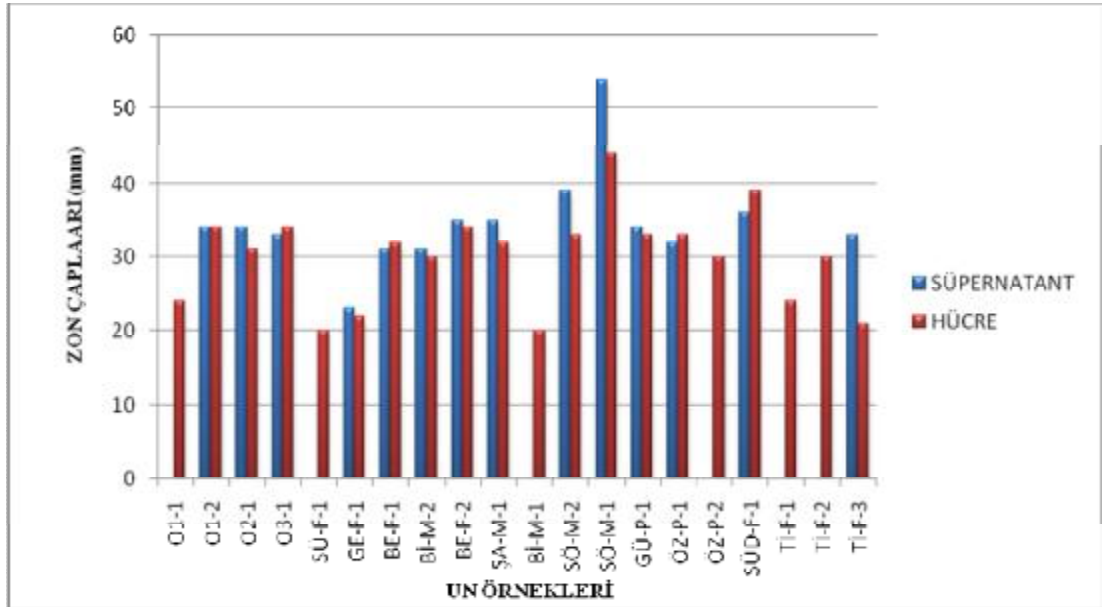
Çalışmamızda, *L. rhamnosus*'un, 13 farklı undan izole edilen 20 *Bacillus* izolatı üzerine antibakteriyel etkisi, agar kuyu difüzyon yönteminin yanı sıra, sıvı ortamda ve ekmek hamurunda araştırılmıştır.

4.3.1. Agar Kuyu Difüzyon Yöntemiyle *L. rhamnosus*'un *Bacillus* İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkisi

L. rhamnosus'un, *Bacillus* izolatları üzerine inhibisyon etkisi, hem direk hücre süspansiyonu, hem de süpernatant kullanılarak, agar kuyu difüzyon yöntemi ile inkübasyonun, 24. ve 48. saatlerinde belirlenmiş ve oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülerek değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.1. *L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine inhibitör etkisi (24 saatlik inhibisyon).



Şekil 4.2. *L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine antibakteriyel etkisi (48 saatlik inhibisyon).



Şekil 4.3. O3-1



Şekil 4.4. O1-2



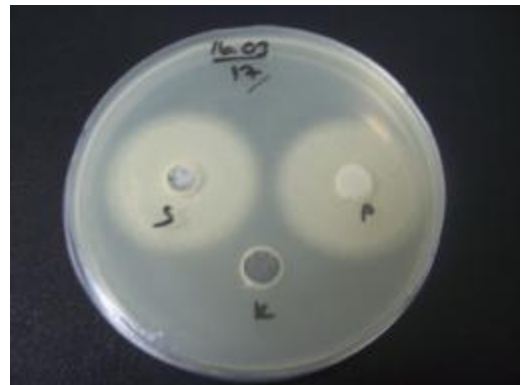
Şekil 4.5. ÖZ-P-1



Şekil 4.6. ÖZ-P-2



Şekil 4.7. Tİ-F-2



Şekil 4.8. BE-F-2

Çizelge 4.3. *L.rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine inhibisyon etkisi (Agar kuyu difüzyon yöntemi).

ÖRNEKLER	İNKÜBASYON			
	24 SAAT		48 SAAT	
	SÜPERNATANT	HÜCRE	SÜPERNATANT	HÜCRE
O1-1	-	-	-	++++
O1-2	++++	++++	++++	++++
O2-1	++++	++++	++++	++++
O3-1	++++	++++	++++	++++
SÜ-F-1	-	-	-	++++
GE-F-1	-	++++	++++	++++
BE-F-1	++++	++++	++++	++++
Bİ-M-2	++++	++++	++++	++++
BE-F-2	++++	++++	++++	++++
ŞA-M-1	++++	++++	++++	++++
Bİ-M-1	-	-	-	++++
SÖ-M-2	++++	++++	++++	++++
SÖ-M-1	++++	++++	++++	++++
GÜ-P-1	++++	++++	++++	++++
ÖZ-P-1	++++	++++	++++	++++
ÖZ-P-2	-	-	-	++++
SÜD-F-1	++++	++++	++++	++++
Tİ-F-1	++	++	-	++++
Tİ-F-2	-	-	-	++++
Tİ-F-3	++	++	++++	++++

(-) Dirençli, (+): Az dirençli, (++) : Orta hassas, (+++): Hassas, (++++): Çok hassas

Marketlerden alınan unlardan izole edilen beş *Bacillus* izolatıyla (Bİ-M-2, ŞA-M-1, Bİ-M-1, SÖ-M-2, SÖ-M-1) yapılan araştırmada, ilk 24 saatte bir izolat, (Bİ-M-1) hem süpernatantta hem de hücrede dirençli bulunurken, aynı izolat, 48 saatlik inkübasyonun da sadece süpernatanta direnç göstermiştir.

Fırınlarından alınan unlardan izole edilen üç izolatın, (GÜ-P-1, ÖZ-P-1, ÖZ-P-2) sadece bir tanesi, (ÖZ-P-2) ilk 24 saatte hem süpernatantta hem de hücrede dirençli bulunurken, aynı izolat, 48 saatlik inkübasyonun sonunda sadece süpernatanta direnç göstermiştir. Organik unlardan alınan örneklerden elde edilen

dört izolattan, (O1-1, O1-2, O2-1, O3-1) bir tanesinin, (O1-1) ilk 24 saatlik inkübasyon sonucunda, hem süpernatanta, hem de hücre süspansiyonuna dirençli olduğu belirlenirken, aynı izolatın 48 saatlik inkübasyonu sonucu, sadece süpernatanta karşı dirençlilik göstermiştir.

Fabrikalardan alınan örneklerden elde edilen sekiz izolattan üç tanesinde direnç gözlenmiştir. Bunlardan ikisinin (SÜ-F-1, Tİ-F-2) 24 saatlik inkübasyonda hem süpernatant hem de hücre süspansiyonuna karşı dirençli bulunurken, aynı izolatların, 48 saatlik inkübasyonu sonucu, sadece süpernatanta direnç gösterdikleri bulunmuştur. Üçüncü izolat (GE-F-1) ise, 24 saatlik inkübasyonda sadece süpernatanta direnç göstermiştir. *Bacillus* spp.'lerin, genel olarak, süpernatant kısmına daha fazla direnç gösterdikleri ve inkübasyon süresi uzadıkça, *L. rhamnosus*'un, inhibisyon etkisinin arttığı görülmüştür.

4.3.2. Sıvı Ortamda *L.rhamnosus*'un *Bacillus* İzolatları Üzerine Antibakteriyel Etkisi

L. rhamnosus'un, *Bacillus* izolatları üzerine inhibisyon etkisi sıvı ortamda belirlenip sonuçlar kob/ml olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Sıvı ortamda, *L.rhamnosus*'un *Bacillus* spp. üzerine inhibisyon etkisi.

ÖRNEK	BAŞLANGIÇ	24. SAAT
O3-1	$>1 \times 10^9$	$>1 \times 10^9$
ŞA-M-1	$1,9 \times 10^7$	1×10^6
GÜ-P-1	$7,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
Bİ-M-1	1×10^7	Bulunamadı
SÜ-F-1	1×10^7	$>1 \times 10^9$
SÖ-M-1	$1,2 \times 10^2$	$4,1 \times 10^5$
ÖZ-P-1	$1,6 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$
ÖZ-P-2	$>1 \times 10^9$	$>1 \times 10^9$
O2-1	$5,8 \times 10^6$	$>1 \times 10^9$
SÜD-F-1	$2,5 \times 10^7$	7×10^6
SÖ-M-2	$1,8 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^9$

Çizelge 4.4.'ün devamı

GE-F-1	$1,9 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^9$
Tİ-F-1	$>1,0 \times 10^9$	$>1,0 \times 10^9$
Tİ-F-2	$>1,0 \times 10^9$	$>1,0 \times 10^9$
BE-F-1	$>1,0 \times 10^9$	$>1,0 \times 10^9$
Bİ-M-2	$1,9 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^9$
BE-F-2	$2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^9$
Tİ-F-3	$>1,0 \times 10^9$	$>1,0 \times 10^9$
O1-1	$>1,0 \times 10^9$	$>1,0 \times 10^9$
O1-2	$2,6 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^9$
<i>B.subtilis</i>	$1,0 \times 10^7$	$8,3 \times 10^6$
Kontrol	$1,2 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^9$

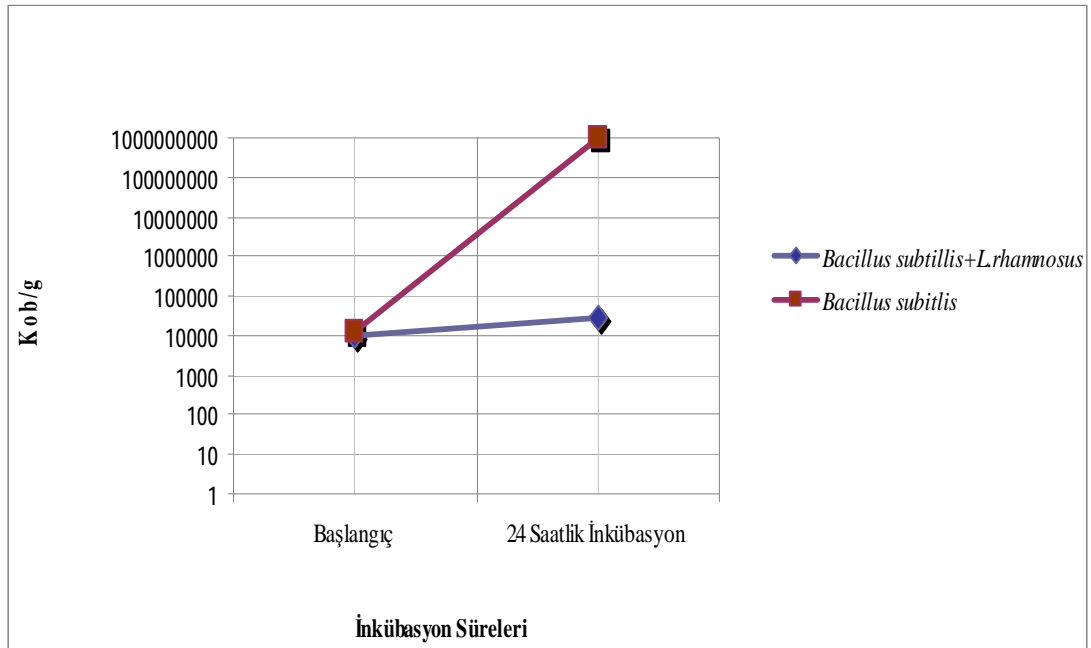
Bacillus izolatlarından 3 tanesinde (Bİ-M-1, ÖZ-P-1, SÜD-F-1) *L. rhamnosus*'un, inhibisyon etkisi gözlenmiştir. *L. rhamnosus*'un, *Bacillus subtilis* üzerine inhibisyon etkisinin sıvı ortamda araştırılmasında ise başlangıçta $1,0 \times 10^7$ kob/g olan spor sayısı, 24 saatlik inkübasyondan sonra $8,3 \times 10^6$ kob/g'a inmiştir.

4.3.3. Ekmek Hamurunda *L. rhamnosus*'un *B. subtilis* Üzerine Antibakteriyel Etkisi

Steril edilmiş ekmeklik undan elde edilen hamura 10^4 kob/mL *B. subtilis* ve aynı sayıda *L. rhamnosus* (10^4 kob/mL) İlave edildikten sonra, 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, *B. subtilis* sayısında bir azalma söz konusu olmayıp, yok denecek kadar az bir çoğalma saptanmıştır. Ancak, kontrol örneğinde hızlı bir artış olması, hamur içerisinde *L. rhamnosus*'un *B. subtilis*'in gelişimini önlediğini göstermektedir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.9).

Çizelge 4.5. Hamurda *L.rhamnosus*'un *Bacillus subtilis* üzerine inhibisyon etkisi.

Bakteriler	Başlangıç (kob/g)	24 Saatlik İnkübasyon (kob/g)
<i>Bacillus subtilis</i>	$1,3 \times 10^4$	$>1 \times 10^9$
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>L.rhamnosus</i>	1×10^4	$2,9 \times 10^4$

Şekil 4.9. Hamurda *L.rhamnosus*'un *B. subtilis* üzerine inhibisyon etkisi.

Sıvı ortamda izlenen inhibisyon etkide (Bİ-M-1, ÖZ-P-1, SÜD-F-1) 10^1 'lik bir azalma gözlenirken, hamurda yapılan çalışmada biyositatik bir etki göstermiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada probiyotik özelliğe sahip *Lactobacillus rhamnosus*'un, unlarda sünme (rope) hastalığı etkeni olan *Bacillus* spp. üzerine, inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, *L. rhamnosus*'un *Bacillus* spp. üzerine antibakteriyel etkisi, agar kuyu difüzyon yönteminin yanı sıra, sıvı ortamda ve hamurda belirlenmiştir.

Alınan tüm örneklerin hepsinde rope tespit edilmiş olup, en fazla kontaminasyon fırınlarda tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak, unların fırınlara gelene kadar birçok aşamadan (üretim, paketlenme, depolama, sevkiyat) geçmesi ve üretim esnasında unun kontaminasyona açık olması düşünülmektedir. En az kontaminasyon ise organik unlarda tespit edilmiştir. Un üretiminde, tarladan satış sahasına kadarki aşamalarda (hasat, üretim, paketlenme, depolama, sevkiyat) kontaminasyonun daha da arttığı belirlenmiştir. Un üretiminde hijyen kurallarına uyulması ve ekmek yapım aşamasında, biyokoruyucuların kullanılması, rope gelişmesini engelleyecektir.

Agar kuyu difüzyon yöntemiyle yapılan inhibisyon araştırmalarında, *L. rhamnosus* hücre süspansiyonunun antibakteriyel etkisi, süpernatanta göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. *L. rhamnosus*'un ürettiği laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür ve bakteriyosin gibi metabolitler süpernatanta etkili olmaktadır. *L. rhamnosus* hücresinin direk kullanılması ile antibakteriyel etkideki artışın nedeni ise, ortamdaki besinlere karşı rekabet veya endojen özellikteki bir başka antibakteriyel etkili faktör olabileceği düşünülmektedir.

Hamurda yapılan inhibisyon araştırmasında ise pH, besin maddesi, nem vb. etmenlerin olumsuz etkilerinden dolayı *L. rhamnosus*, *B. subtilis* üzerine biyositatik bir etki göstermiştir. Agar kuyu difüzyon, sıvı besiyerinde ve hamurda da antibakteriyel etkinin görülmesi, *L. rhamnosus*'un biyokoruyucu olarak uygulanabilirliğini göstermiştir.

Bu araştırmada bulunan, laktik asit bakterilerinin, sünme etkeni *Bacillus*'lar üzerine antagonist etkisi, araştırmanın genişletilerek, farklı unlardan elde edilen hamurlarda ve diğer laktik asit bakterileri ile de denenmesi ve LAB'in etkili olduğu

inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Böylece, unlarda koruyucu kültür olarak LAB kullanım olanaklarına yönelik daha kesin bulgular elde edilmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

- ADAMS, M.R. AND MOSS, M. O, 1995. Food Microbiology. Royal Society of Chemistry Cambridge, İngiltere.
- ADAMS, M.R., 1999. Safety of Industrial Lactic Acid Bacteria. Journal of Biotechnology, 68:171-178.
- AKÇELİK,M., KAMURAN, A., ÇAKIR, I., DOĞAN, H.B., GÜRGÜN, V., HALKMAN, A.K., KADİR, K.D., KULEŞAN, H., ÖZKAYA, D.F., TUNÇİL, N., TÜKEL, Ç., 2000. SİM Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 522s.
- ALANDER,M., SATOKARI,R., KORPELA, R., SAXELIN, M., VILPONNENSALMELA, R., MATILLA-SANDHOLM, T., von WRIGHT,A.,1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. Appl.Environ. Microbiol. 65:351–354.
- ANONYMOUS, 2008a, <http://www.probi.com/Standard.asp>
- ANONYMOUS, 2008b, <http://www.gidacilar.net/sünme-hastaligi-t371.html>.
- ANONYMOUS, 2008c, <http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Teblig/2008-22.html>
- ANONYMOUS, 2009a, <http://www.food-info.net/tr/e/e263.html>
- ARAN, N. ve BOYACIOGLU M.H., 2006. Rope hastalığı. www. Ekmekçilik.com. All Rights Reserved, 2006.
- ARDA, M., “Genel Bakteriyoloji”, A.Ü. Vet. Fak. Yay., No: 402, Ankara, 250-256 (1985).
- AXELSSON L., 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In,S. Salminen and A. Von Wright (Eds). Lactic acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd ed Marcel Dekker, Inc, New York.
- AXELSSON L., 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S.von Wright, A. and Ouwehand A. (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd rev. and exp. ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66.
- BATISH, V.K., ROY, U., and GROVER, S., 1997. Antifungal Attributes of Lactic Acid

Bacteria-A Review. Critical Reviews in Biotechnology. Vol.17(73),p: 209-225.

- BEASLEY, S. (2004), Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota, Academic Dissertation in Microbiology, University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry Sciences, Finland.
- CAZEMIER, A.E., S.F.M. WAGENAARS, TER STEEG, P.F. 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage *Bacilli* Microbiology & Preservation, Unilever Research Vlaardingen, Vlaardingen, The Netherlands.
- CHAUHAN, S., and LINDSAY, D., 2001. Rey, Mec., Holy, A., 2001. Microbial ecology of muffins baked from cassava and other nonwheat flours. Microbious. 105 (410):15–27
- DANIEL, A.R., 1963. Bakery Materials and Methods. Mc Laren & Sons,Ltd.London, İngiltere.
- DEMİR, Y., 2006. “Trakya bölgesinde üretilen ekmeklik buğday unlarında rop sporu varlığı ve bazı kalite kriterlerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Tekirdağ, (2006).
- DEVLIEGHIERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J. 2004. New Preservation Technologies: Possibilities And Limitations. Inter. Dairy J. 14: 273-285.
- DORON S, SNYDMAN, DR, and GORBACH, SL. (2005) *Lactobacillus GG*: bacteriology and clinical applications. Gastroenterol Clin North Am 2005; 34: 483-498.
- EICHLER, J. 2001. Biotechnological uses of archaeal ekstremozymes. Biotechnology Advances, 19: 261- 278.
- FARIAS, M.E., DE RUIZ HOLGADO, A.A.P., and SESMA, F., 1994. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses:Inhibition of foodborne pathogens. Journal of Food Prot., 57(11);1013-1015.

- FORSTYHE, S.J. and HAYES, P.R., 1998. Food Spoilage, Food Hygiene, Microbiology; HACCP. S. 87-145. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, ABD.
- FRITZE D, and PUKALL R. 2001. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. Int J Syst Evol Microbiol 51:35–37.
- GIFFEL, M.C., WAGENDORP, A., HERREWEGH, A., and DRIEHUIS, F., 2002. Bacterial Spores in Silage and Raw Milk. Antonie Van Leeuwenhoek 81, 625-630.
- GILLIAND, S.E. (1990), “Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria,” FEMS Microbiol. Rev., 87, 175-188.
- GORBACH, S.L. and GOLDIN, B.R. ,1992. *Lactobacillus acidophilus* strains of bacteria and compositions thereof. European Patent Specification 0 199 535 B1 (Application number: 86302836.1)
- GRATZ, S., WU, Q, K., EL-NEZAMİ, H., JUVONEN, R, O., MYKKANEN, H., and TURNER, P. C., 2007. “*Lactobacillus rhamnosus* Strain GG Reduces Aflatoxin B1 Transport, Metabolism, and Toxicity in Caco-2 Cells”, Department of Clinical Nutrition, University of Kuopio, P.O. Box 1627, 70211 Kuopio, Finland1; Food and Health Research Centre, University of Kuopio, P.O. Box 1627, 70211 Kuopio, Finland2; Department of Pharmacology and Toxicology, University of Kuopio, P.O. Box 1627, 70211 Kuopio, Finland3; and Molecular Epidemiology Unit, Centre for Epidemiology and Biostatistics, LIGHT Laboratories, University of Leeds, LS2 9JT Leeds, United Kingdom, (16 April 2007).
- GÜRSOY, O. ve KINIK, O. (2005), “Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyelleri,” Müh. Bil., Derg., 11 (3), 361–371.
- HAKI, G.D. and RAKSHIT, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology 89: 17–34.
- HAYALOĞLU, A.A., ve ERGİNKAYA, Z., 2001. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri. Gıda Teknolojileri Derneği Yayın No:23

- HESSLE, C., HANSSON, L.A., and WOLD, A.E., 1999. *Lactobacilli* from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production, *Clin. Exp. Immunol.* 116: 276-282.
- HOLY, A.VON. 1994. Rope spoilage of bread. *Food Industries*; 47 (7) 13, 15.
- HUANG, J., BOUSVAROS, A., LEE, J.W., DIAZ, A. and DAVIDSON, E.J., 2002. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children. *Digestive Diseases and Sciences* 47: 2625-2634.
- ICMSF, 1998. Cereals and cereal products. *Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Foods*. S.313–355. Blackie Academic & Professionals, London, İngiltere.
- JACOBSEN, C.N., ROSENFELDT NIELSEN, V., HAYFORD, A.E., MØLLER, P.L., MICHAELSEN, K.F., POERREGAARD, A., SANDSTRÖM, B., TVEDE, M. and JAKOBSEN, M.,1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4949-5956.
- JENSON, I. 1998. Bread and Baker's Yeast. S. 172–198. *Microbiology of Fermented* (Ed. J. B. Wood). Blackie Academic & Professional, London, İngiltere.
- KIM, H. S., LEE, D. W., WOO, S. D., YU, M. Y., KANG, K. S., 1998. Distribution, serological identification, and PCR analysis *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea”, *Current Microbiology*, 37: 195-200 (1998).
- KURT, Ş., ve ZORBA, Ö., 2005. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları, *YYÜ. Vet. Fak. Derg.*,16(1); 77-83. .
- LEWUS, C.B., KAISER, A. VE MONTVILLE, J.T. (1991), “Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat,” *Appl. and Environ. Microbiol.*, 57 (6), 1683-1688.
- LUCK, E. and JAGER, M. 1997. *Antimicrobial Food Additives. Characteristics, Uses, Effects*, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin
- MADIGAN, M.T. and MARTINKO, J.M. (2006), “*Brock Biology of Microorganisms*,” Pearson Education, Inc. Eleventh Edition, 375-378.

- MAJAMAA H, ISOLAURI E, SAXELIN M, and VESIKARI T.,1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition* 20:333–338.
- MENTEŞ, Ö., ERCAN, R., ve AKÇELİK, M., 2005. Determination of the antibacterial activities of *Lactobacillus* strains isolated from sourdoughs produced in Turkey. *Gıda* 3, 155–164 (in Turkish).
- MESSENS, W., and DE VUYST, L., 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs-a review. *Int. Journal of Food Microbiology*, 72, 31-43.
- MORITA H, TOH H, OSHIMA K, MURAKAMI M, TAYLOR TD, IGIMI S, and HATTORI M (2009). "Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103". *J Bacteriol.* 191 (24): 7630–1.
- NIETO-LOZANO, J.C., RAGUERA-USEROS, J.I., PELAEZ-MARTINEZ, M.C., and DE LA TORRE, A.H., 2002. Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Science*, 62, 237-243.
- OLIMPIA, P., GIUSEPPE, B., GIANCARLO, M., GRECO, T., FRANCESO, V., and 2002. "Sünme-Producing Strains of *Bacillus* spp. from Wheat Bread and Strategy for Their Control by Lactic Acid Bacteria", Dipartimento di Scienza delgi Alimenti, Universita` degli Studi di Napoli Federico II, 80055 Portici, Italy.
- ÖZDEMİR, H. 2003. Pastörize Sütlerde *Bacillus cereus* 'un Varlığı. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*: 611–615. Ankara.
- PALOP, A., MANA AS, P. , and CONDO AN, S., 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *Journal of Food Safety* 19, 57±72.
- REES, T.J., (1997). The development of a Novel Antifungal Silage Inoculant. Doctoral Resaerch Thesis, Cranfield University Biotechnology Centre, UK, 8-23.
- RINGO, E., GATESOUBE, F.J. (1998). Lactic acid Bacteria in fish, review, *Aquaculture*, 160: 177-203

- RODRIGUEZ, E., GONZALEZ, B., GAYA, P., NUNEZ, M. and MEDINA, M., 2000, Diversity of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated From Raw Milk., *International Dairy Journal* 10 (2000): 7-15
- ROSENQUIST, H., 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 (3): 621–631.
- RØSSLAND, E. BORGE, A. G. LANGSRUD, T. AND SØRHAUG, T. 2003 “Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk” *International Journal of food Microbiology*, Norway
- ROSS, R.P., DESMOND, C., FITZGERALD, G.F. VE STANTON, C. (2005), “Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods,” *J. Of Appl. Microbiol.*, 98, 1410-1417.
- SAMESHIMA, T., MAGOME, C., TAKESHITA, K., ARIHARA, K., ITOH, M., and KONDO, Y., 1998. Effect of intestinal *lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausages. *Int. Journal of Food Microbiol.*, 41,1-7.
- SAXELİN, M. 1997. *Lactobacillus GG-a* Human Probiotic Strain with Thorough Clinical Documentation. *Food Rev.*, 13, 293–313.
- SEVİM, E. Ç., KARAOĞLU, Ş. A., SEVİM, A., ÖZGÜMÜŞ, O. B., “İçme Sularından izole edilen *Bacillus* suşlarının identifikasyonu ve antibiyotiklere Direnç profilleri”, Rize Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize, (2006).
- SIMMONDS, P., MOSSEL, B. L., INTARAOPHAN, T., and DEETH, H.C., 2003. “Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity”. *J Food Prot* 66:2070-2075, (2003.)
- SOROKULOVA, I.B., REVA, O.N., SMIRNOV, V.V., PINCHUK, I.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 (2): 169–173.

- SPELHAUG, S.R., and HARLANDER, S.K., 1989. Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. Journal of Food Prot., 52(12);856-862.
- SUBMUTH, R.; EBERSPAECHER, J.; HAAG, R.; and SPRINGER, W., 1987. Biochemisch Mikrobiologisches Prakticum. Thieme Verlag-Stuttgart, 409 s.
- TAŞ, E., (2008). "Probiyotik Laktik Asit Bakterileri ve Baharatların Bazı Gıda Patojenleri Üzerine İnhibisyon Etkisi", Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı.
- 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 (3) 481-486.
- ÜNLÜTÜRK, A., ve TURANTAŞ, F., 2002. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi Düzeltilmiş İkinci Baskı. Meta Basım, İzmir, 186s.
- VANGÖL, Y. 2006. Ekmekte Rope Hastalığı, Yenigün, 03.06.2006.
- VESCOVA, M., TORRIANI, S., ORSI, C., MACCHIAROLO, F., and SCOLARI, G., 1997. Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. Journal of Applied Bacteriology, 81, 113-119.
- VOLAVSEK, P.J.A., KIRSCHNER, L.A.M., and VONHOLY, A., 1992. Accelerated methods to predict the sunme- inducing potential of bread raw- materials. South African Journal of Science. 88 (2): 99-102.
- YANG, Z., SUOMALAINEN, T., MAYRA-MAKINEN, A., and HUTTUNEN, E., 1997. Antimicrobial activity of 2-pyrrolidone-5-Carboxylic acid produced by lactic acid bacteria. Journal of Food Prot., 60(7); 786-790.
- YETİSMEYEN, A., (1995). "Süt Teknolojisi, 1214", A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, Ankara, 229.

ÖZGEÇMİŞ

08.02.1983 yılında Gaziantep'te doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep'te tamamladı. Lise öğrenimini Nizip Salih Ekmekçi Sağlık Meslek Lisesi'nden Çevre Sağlığı Teknisyeni olarak 2001 yılında tamamladı. 2002 yılında başladığı Osmaniye Meslek Yüksek Okulu Çevre Koruma Bölümü'nü Çevre Koruma Teknikeri olarak 2004 yılında tamamladı, aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü dikey geçişle kazandı ve 2007 yılında mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yüksek lisans çalışmalarına başladı.