

Sucuk ve Sosislerden İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi

Aysel TOKSOY

Muğla Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla-TÜRKİYE

Yavuz BEYATLI, Belma ASLIM

Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.06.1998

Özet: Bu araştırmada, piyasada satılan 10 değişik marka sucuk ve sosis örneğinden *Lactobacillus* cinsine dahil toplam 97 adet bakteri izole edilmiştir. İdentifikasyon sonuçları, bunların 39 adedinin (%41.1) *Lactobacillus plantarum* olduğunu göstermiştir. İdentifiye edilen suşların oluşturdıkları laktik asit miktarının %0.61-0.88; H₂O₂ miktarının 1.80-3.45 µg/ml arasında olduğu belirlenmiştir. Suşların H₂S üretimleri Triple Sugar Iron (TSI) Agar besiyerinde kalitatif olarak saptanmıştır.

Suşların genel inhibisyon etkileri ve bakteriosin ve / veya bakteriosin benzeri maddelerden kaynaklanan inhibisyon etkileri bazı gıda kontaminantları ve gıda kaynaklı patojen bakteriler (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, koag.(+) ve koag.(-) *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*) üzerinde agar diffüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bazı suşlarında bakteriosin veya bakteriosin benzeri inhibitörük madde oluşturduğu ve bazı test bakterileri üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir.

Araştırma sonuçları, *L. plantarum* suşlarının değişik miktarlarda metabolik ürünler sentezlediğini ve test bakterileri üzerinde değişik oranlarda inhibisyon etkilerinin olduğunu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Et ürünleri, *L. plantarum*, Metabolik ürünler, Bakteriosin, Antimikrobiyal aktivite.

Studingon Metabolic and Antimicrobial Activities of Some *L. plantarum* Strains Isolated from Sausages

Abstract: In this research, a total of 97 *Lactobacillus* were isolated from 10 different sausage and sosis samples obtained from different markets. Identification results showed that 39 (41.1%) isolates belong to the species *L. plantarum*. Amount of lactic acid and H₂O₂ produced for the strains were 0.61-0.88% and 1.80-3.45 µg/ml respectively. For qualitative determination, Triple Sugar iron (TSI) Agar medium was used for H₂S production by the strains.

Inhibition activity of bacteriocins and/or bacteriocin-like substances of the *L. plantarum* strains against some food contaminants and pathogen bacteria (*E. coli*, *B. subtilis*, coag. (+) and coag. (-) *S. aureus*, *P. aeruginosa*) were determined by the agar diffusion method. It was observed that some of the strains produced bacteriocins and/or bacteriocin-like substances and inhibited some of the test bacteria.

Results showed that the strains produced different amount of metabolic compounds and they varied in their inhibition effect on the test bacteria.

Key Words Meat products, *L. plantarum*, Metabolic compounds, Bacteriocin, Antimicrobial activity.

Giriş

Lactobacillus plantarum fermente et ürünlerinin üretiminde en yaygın olarak kullanılan starter kültürler arasında yer almakla birlikte, fermente ürün olmayan sosis vb. diğer et ürünlerinde de rastlanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde, özellikle Avrupa ve ABD'de fermente gıdaların üretiminde starter bakterilerin kullanımına önem verilmiştir. Starter bakterilerin kullanımları ile hatalı ürün tehlikesini en az düzeye indirmek, daha kaliteli ve standart tipte ürünler elde etmek amaçlanmıştır (1). Ülkemizde bazı üretim tesislerinin dışında, fermente gıdaların üretimleri geleneksel yöntemler ile starter bakterileri kullanmaksızın yapılmaktadır.

L. plantarum sucukların olgunlaşması sırasında oluşturduğu laktik asit ile üründe yapısal nitelikler, kıvam, renk ve tadın gelişmesinde etkili rol oynar (2). Ayrıca, starter bakteriler çeşitli şekilde ürüne bulaşan kontaminant mikroorganizmalar, gıda zararlısı veya gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerinde de inhibisyon özelliği gösterir (3).

Starter bakterilerinin oluşturduğu inhibitör maddeler arasında küçük moleküllü antibiyotikler, laktik asit, hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, laktik enzimler, bakteriosin ve/veya bakteriosine benzer maddeler gösterilmiştir (4-7).

Bu çalışmada piyasadan sağlanan sucuk ve sosis örneklerinden izole edilen *L. plantarum* suşlarının oluşturduğu bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi ile bu suşlardan endüstride kullanılabilecek izolatlarının seleksiyonu hedeflenmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışmada, İç Anadolu Bölgesinde üretilen ve değişik tip ve markadaki 10 adet sucuk ve sosis örneği Ankara piyasasından temin edilmiştir. Örnekler, bakterilerin izolasyon işlemi tamamlanıncaya kadar +4°C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Örneklerden *Lactobacillus* bakterilerini izole etmek amacıyla 10 gram alınıp steril 90 ml fizyolojik suda mikserle iyice karıştırılmıştır. Her bir örnekten uygun dilüsyonlar hazırlanıp MRS agar besiyerine yayma plak yöntemiyle ekimler yapılmış ve plaklar 35°C de 42 saat inkübe edilmiştir (8). Besiyerinde üreyen ve Laktobasil olduğu kanısı ile seçilen koloniler MRS sıvı besiyerine aşılansak aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler mikroskopik olarak incelenmiş, tek, çift ve zincir şeklindeki bakteriler %10'luk litmuslu süte aşılansak, 35°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Kültürler 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerine bölünmüş ve - 20°C de muhafazaya alınmıştır (9).

Bakterilerin İdentifikasyonları

İzole edilen bakterilerin identifikasyonlarında, bakterilerin morfolojik özellikleri saptanmış ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. *Lactobacillus* bakterilerini diğer bakteri gruplarından ayırmak için, morfolojik şekilleri, hareketlilik, spor oluşturma durumları, gram ve katalaz reaksiyonları, katı besiyerindeki kolonilerin şekli ve yapıları incelenmiştir. Ayrıca, izolatların heterofermentatif olmaları ve arjininden amonyak oluşturmaları da test edilmiştir.

L. plantarum suşlarını diğer *Lactobacillus*'lardan ayırmak için, bakterinin göstermiş olduğu fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanılmıştır. Parantez içindeki değerler *L. plantarum* için olmak üzere, 35°C' da üreme (+), 15°C' da üreme (+), 45°C' da üreme (-), %7.5 NaCl'de üreme (+), pH 3.6 ve 5'da gelişme (+), ksiloz (+), riboz (+), dekstroz (+), sakkaroz (+), sorbitol (+), mannitol (+), maltoz (+), fruktoz (+), galaktoz (+), mannoz (+), melibiyoz (+), rafinoz (+), salisin (+), trehaloz (+), eskülin (+), amigdalin (+), selibioz (+) ve ramnoz (-) testleri yapılmıştır.

Bakterilerin bütün tanımlama testleri ve değerlendirilmeleri genel identifikasyon yöntemleri

kullanılarak gerçekleştirilmiştir (1,10).

Suşların Asit Üretimlerinin Belirlenmesi

Suşların oluşturduğu asit miktarları %10'luk yağsız süt tozu (Skim milk) besiyerinde belirlenmiştir. Aktif kültürlerden %2 oranında besiyerine aşılansak, 35°C'de 42 saat inkübasyona bırakılmış ve süre bitiminde suşların yüzde asit üretimleri 0.1 N NaOH ile titrasyon yapılarak saptanmıştır (11).

Suşların Hidrojen Peroksit Üretimlerinin Belirlenmesi

Aktif kültürler % 2 oranında MRS broth besiyerine inoküle edilip, 35°C'de 42 saat inkübe edilmiştir. Suşların oluşturduğu hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarları Spektrofotometrik (400 nm) yöntemle µg/ml olarak saptanmıştır (12).

Suşların Hidrojen Sülfür Üretimlerinin Belirlenmesi

Bakterilerin hidrojen sülfür (H₂S) üretimleri Triple Sugar Iron Agar (TSI) besiortamında tespit edilmiştir. Aktif kültürlerden alınan 0.5 ml örnek besiyerine yayma metodu ile inoküle edilip, 35°C'de 21 gün inkübe edilmiştir. Besiortamında üreyen kolonilerin siyahlaşma durumuna göre, suşların H₂S üretimleri kalitatif olarak değerlendirilmiştir (13).

Suşların Test Bakterileri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi

Suşların Genel İnhibisyon Etkileri

Çalışmada, indikatör bakteri olarak kullanılan *Escherichia coli* K12, *Bacillus subtilis* 864, *Pseudomonas aeruginosa* Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü'nden, koag. (+) *Staphylococcus aureus* 4-43, mutant koag. (-) *Staphylococcus aureus*, Prof.Dr. Mehmet ŞABANOĞLU'ndan (Muğla Univ., Fen Ed. Fak., Biyoloji Bölümü)'den temin edilmiştir.

Suşların indikatör bakteriler üzerine olan genel inhibisyon etkileri agar diffüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Aktif *L. plantarum* suşları 10 ml'lik %2 glukoz içeren MRS broth besiyerine %2 oranında inoküle edilip, 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon bitiminde besiyeri 5000 rpm de 15 dak. santrifüj edilip berrak kısım 0.2 µm'lik membran filtreden süzölmüştür (14).

E. coli, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* ve koag. (+) ve (-) *S.*

aureus suşları Nutrient Broth'da aktifleştirilmiştir. *L. plantarum* suşlarının inhibisyon etkisini test etmek için indikatör bakteri içeren agarlı besiyerlerinde 0.8 cm çapında açılmış kuyucuklara 100 µl *L. plantarum* kültür filtratları doldurulmuş ve 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Oluşan zonların yarı çapları (mm) kompas yardımıyla ölçülmüştür (14).

Bakteriosin ve/veya Bakteriosin benzeri Maddelerin Etkisinin Belirlenmesi

İzole edilen *L. plantarum* suşlarının bakteriosin üretimleri oksijensiz ortam kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla laktik asidin inhibisyon etkisini gidermek için Harris et al. (15) tarafından gösterildiği şekilde, MRS Broth besiyerinde glukoz konsantrasyonu azaltılmış (% 0.2), %2 oranında aktif kültür inoküle edilip, 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonraki işlemler genel inhibisyon yönteminde açıklandığı gibi uygulanmıştır.

İstatistiksel Analizler

H₂O₂ üretimi ile test bakterileri üzerine inhibisyon etkisi arasında bir korelasyon olup olmadığı SPSS paket programına göre hesaplanmıştır.

Bulgular

Çalışmada et ürünlerinden toplam 97 adet *Lactobacillus* cinsi izolat elde edilmiştir. İdentifikasyon sonuçları, bunların 39'unun (%41.1) *L. plantarum* olduğunu göstermiştir. *L. plantarum* suşlarının yüzde asit, hidrojen peroksit ve hidrojen sülfür üretimleri Tablo 1'de verilmiştir.

L. plantarum suşlarının indikatör bakteriler üzerine olan genel inhibisyon etkileri Tablo 2'de verilmiştir.

Çalışmada, suşlardan yalnız 18 adedinin bazı test bakterileri üzerinde inhibisyon etkisi olduğu gözlenmiştir (Tablo 3).

Tartışma

Lactobacillus ve *Pediococcus* cinsine dahil olan bakterilerin fermente et ürünlerinin mikroflorasında bulunduğu bildirilmiştir (1). Ülkemizde üretilen sucuk ve soslerin kimyasal ve fiziksel yapısı hakkında bir çok çalışma mevcut olmasına rağmen, bu tip ürünlerde starter olarak kullanılan ve/veya ürün florasında bulunan laktik asit bakterileri üzerinde yapılmış çalışma son derece azdır (6,16-18).

Tablo 1. *L. Plantarum* Suşlarının Asit, Hidrojen Peroksit ve Hidrojen Sülfür Üretimleri.

<i>L.plantarum</i> Suşları	% Asitlik	H ₂ O ₂ (µg/ml)	H ₂ S
<i>L. plantarum</i> AX5L	0.88	2.20	+
<i>L. plantarum</i> AX8L	0.76	2.30	-
<i>L. plantarum</i> AX12L	0.66	2.00	-
<i>L. plantarum</i> AX13L	0.64	3.35	-
<i>L. plantarum</i> AX15L	0.64	2.20	-
<i>L. plantarum</i> AX17L	0.67	3.45	-
<i>L. plantarum</i> AX19L	0.69	2.61	-
<i>L. plantarum</i> AX22L	0.72	2.22	-
<i>L. plantarum</i> AX30L	0.79	2.60	-
<i>L. plantarum</i> BY3L	0.74	2.60	+
<i>L. plantarum</i> BY5L	0.70	2.21	-
<i>L. plantarum</i> BY10L	0.61	2.63	++
<i>L. plantarum</i> BY14L	0.69	2.47	++
<i>L. plantarum</i> BY21L	0.84	2.20	-
<i>L. plantarum</i> BY22L	0.74	2.20	-
<i>L. plantarum</i> BY23L	0.74	2.21	-
<i>L. plantarum</i> BY24L	0.67	2.20	-
<i>L. plantarum</i> BY25L	0.64	2.42	-
<i>L. plantarum</i> BY27L	0.68	2.42	-
<i>L. plantarum</i> BY29L	0.69	2.57	-
<i>L. plantarum</i> CZ1L	0.70	2.57	+
<i>L. plantarum</i> CZ2L	0.64	1.90	-
<i>L. plantarum</i> CZ3L	0.71	2.20	+
<i>L. plantarum</i> CZ5L	0.66	2.20	-
<i>L. plantarum</i> CZ6L	0.65	2.42	-
<i>L. plantarum</i> CZ9L	0.65	2.00	-
<i>L. plantarum</i> CZ10L	0.63	2.26	-
<i>L. plantarum</i> CZ13L	0.74	2.34	-
<i>L. plantarum</i> CZ19L	0.62	2.64	-
<i>L. plantarum</i> CZ20L	0.66	1.80	-
<i>L. plantarum</i> CZ22L	0.63	2.33	-
<i>L. plantarum</i> CZ23L	0.72	2.00	-
<i>L. plantarum</i> CZ24L	0.68	2.00	-
<i>L. plantarum</i> CZ25L	0.66	2.24	+
<i>L. plantarum</i> CZ26L	0.67	2.43	-
<i>L. plantarum</i> CZ27L	0.70	2.39	++
<i>L. plantarum</i> CZ28L	0.65	2.20	-
<i>L. plantarum</i> CZ29L	0.69	2.42	+
<i>L. plantarum</i> CZ30L	0.63	2.00	-
Ortalama Değer	0.69	2.34	

(+) : H₂S üretimi zayıf, (++) : H₂S üretimi orta, (-) H₂S üretimi yok.

<i>L. plantarum</i> Suşları	Test Bakterileri				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> (+)	<i>S. aureus</i> (-)	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>L. plantarum</i> AX5L	10.20	3.00	9.10	7.00	9.00
<i>L. plantarum</i> AX8L	9.20	3.10	8.90	6.30	6.50
<i>L. plantarum</i> AX12L	6.70	a	7.90	6.00	4.90
<i>L. plantarum</i> AX13L	6.80	2.20	5.80	3.90	9.60
<i>L. plantarum</i> AX15L	a	a	4.20	a	a
<i>L. plantarum</i> AX17L	a	1.40	4.30	3.30	4.00
<i>L. plantarum</i> AX19L	3.90	1.70	a	3.40	4.10
<i>L. plantarum</i> AX22L	7.90	5.00	8.00	6.40	7.30
<i>L. plantarum</i> AX30L	8.70	3.90	9.00	7.10	9.00
<i>L. plantarum</i> BY3L	7.60	3.10	8.00	a	8.00
<i>L. plantarum</i> BY5L	6.20	3.90	4.40	a	4.90
<i>L. plantarum</i> BY10L	5.30	2.90	4.20	3.10	5.30
<i>L. plantarum</i> BY14L	8.20	3.60	4.80	3.70	7.90
<i>L. plantarum</i> BY21L	10.10	3.00	8.70	6.90	9.00
<i>L. plantarum</i> BY22L	9.00	3.00	7.60	6.10	9.00
<i>L. plantarum</i> BY23L	9.60	2.40	7.80	6.20	9.00
<i>L. plantarum</i> BY24L	8.70	3.30	8.20	5.90	7.70
<i>L. plantarum</i> BY25L	7.40	3.00	7.90	6.20	7.80
<i>L. plantarum</i> BY27L	8.00	a	7.70	5.80	7.90
<i>L. plantarum</i> BY29L	8.20	3.90	7.80	5.80	9.00
<i>L. plantarum</i> CZ1L	8.60	4.70	7.90	5.90	8.50
<i>L. plantarum</i> CZ2L	8.60	3.90	7.50	6.50	8.50
<i>L. plantarum</i> CZ3L	8.60	3.50	8.00	6.00	8.40
<i>L. plantarum</i> CZ5L	8.10	4.10	7.20	5.50	8.10
<i>L. plantarum</i> CZ6L	8.00	6.20	7.60	5.00	9.90
<i>L. plantarum</i> CZ9L	6.80	5.40	7.00	5.60	8.80
<i>L. plantarum</i> CZ10L	6.20	7.30	6.50	5.60	8.10
<i>L. plantarum</i> CZ13L	8.90	5.80	7.60	6.50	8.90
<i>L. plantarum</i> CZ19L	6.00	4.40	5.30	3.70	7.00
<i>L. plantarum</i> CZ20L	6.70	4.50	6.90	5.70	8.30
<i>L. plantarum</i> CZ22L	6.00	3.90	6.90	5.00	5.90
<i>L. plantarum</i> CZ23L	5.90	3.90	7.60	6.30	9.00
<i>L. plantarum</i> CZ24L	7.00	3.60	6.40	6.50	8.70
<i>L. plantarum</i> CZ25L	7.20	3.10	6.70	6.20	8.50
<i>L. plantarum</i> CZ26L	7.80	a	7.40	5.90	8.70
<i>L. plantarum</i> CZ27L	7.80	3.40	7.20	3.90	9.00
<i>L. plantarum</i> CZ28L	6.10	4.40	6.00	5.70	7.70
<i>L. plantarum</i> CZ29L	6.90	5.40	6.70	5.90	7.80
<i>L. plantarum</i> CZ30L	5.90	5.40	5.30	4.70	4.10
Ortalama Değer*	7.54	3.87	7.00	5.53	7.73

Tablo 2. *L. Plantarum* Suşlarının indikatör Bakteriler Üzerine Genel İnhibisyon Etkisi (Zon yarı çapı, mm).

a; İnhibisyon yoktur.

*; İnhibisyon gösteren değerlerin ortalamasıdır.

<i>L. plantarum</i> Suşları	Test Bakterileri				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> (+)	<i>S. aureus</i> (-)	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>L. plantarum</i> AX8L	a	a	a	a	1.00
<i>L. plantarum</i> AX13L	1.00	1.10	1.70	1.80	1.60
<i>L. plantarum</i> AX17L	a	a	1.70	1.70	1.40
<i>L. plantarum</i> AX30L	a	a	1.00	a	a
<i>L. plantarum</i> BY3L	a	a	1.00	a	1.00
<i>L. plantarum</i> BY10L	1.20	1.10	a	a	a
<i>L. plantarum</i> BY14L	a	a	a	a	1.20
<i>L. plantarum</i> BY25L	1.30	1.20	a	a	1.30
<i>L. plantarum</i> BY27L	a	a	1.20	a	a
<i>L. plantarum</i> BY29L	a	a	a	a	a
<i>L. plantarum</i> CZ1L	a	a	1.10	a	a
<i>L. plantarum</i> CZ2L	a	a	1.10	a	a
<i>L. plantarum</i> CZ3L	a	a	a	a	1.10
<i>L. plantarum</i> CZ6L	1.50	a	a	a	a
<i>L. plantarum</i> CZ13L	1.00	a	a	a	a
<i>L. plantarum</i> CZ22L	a	a	a	a	1.40
<i>L. plantarum</i> CZ25L	a	1.00	a	a	a
<i>L. plantarum</i> CZ29L	a	a	a	a	1.00

a; İnhibisyon yoktur.

L. plantarum suşlarının yüzde asit üretimleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Suşların ürettiği asit miktarları 0.61-0.88 arasında, ortalama %0.69 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda izole ve identifiye edilen *L. plantarum* suşlarının istenilen düzeyde laktik asit ürettikleri gözlenirken bu değerler diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermiştir. Nitekim, Beyatlı ve Tunail (19) laktik asit bakterilerinin tür ve suşlarının farklı miktarlarda metabolik ürünler sentezlediğini bildirmişlerdir. *L. plantarum*'un sütte üretildiğinde, %0.3-1.2 arasında titre edilebilir asit geliştirdikleri bildirilmiştir (20).

Vignolo et al.(21), *L. plantarum*'un olgunlaşmamış fermente sosislerde 32-35°C'de 12 saatte pH'yı 6.65'den 3.96'ya kadar düşürebileceğini veya asitliği %0.02'den %0.18'e kadar yükselebileceğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, starter kullanılarak üretilen sosislerden izole edilen 13 adet *L. plantarum* suşunun yüzde asit üretimleri incelenmiş, suşlar tarafından üretilen %asit miktarları üç grup altında toplamıştır. Birinci gruptaki suşların %1.7'nin üstünde, ikinci gruptaki suşların %1.4

Tablo 3. *L. plantarum* Suşlarının Test Bakterileri Üzerine Bakteriyosin ve/veya Bakteriyosin Benzeri Maddelerinin İnhibisyon Etkileri (Zon yarı çapı, mm).

ve üçüncü gruptaki suşların ise %0.7'nin altında asit ürettikleri tespit edilmiştir (22). Çalışmamızda suşların asit üretimleri %1.4'ün altında olarak bulunmuştur. Yapılan birçok araştırma laktik asit bakterilerinin farklı karbonhidrat içeren besiortamlarında farklı miktarlarda laktik asit ürettiğini bildirirken, laktik asit üretimini arzu edilen seviyede oluşturan suşların sucuk fermentasyonunda kullanımını önerilmiştir (23-25).

Fermente et ürünlerinde bazı starter bakteriler tarafından üretilen hidrojen peroksit, etlerde hoşagitmeyen renk, tat ve koku oluşturmaları nedeni ile arzu edilmeyen bir üründür. Ancak hidrojen peroksidin birçok patojen ve patojen olmayan mikroorganizma üzerine antimikrobiyal aktivitesinin varlığı da araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (7,26-27). Çalışmamızda, *L. plantarum* suşlarının H₂O₂ üretimleri 1.80-3.45 arasında, ortalama olarak 2.34 µg/ml bulunmuştur (Tablo 1).

Raccach ve Baker (26), çalışmalarında *L. plantarum* suşlarının H₂O₂ üretimleri 0.85 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada *L. plantarum* suşlarının 0.59-0.65 µg/ml H₂O₂ ürettikleri bildirilmiştir

(28). Çalışmamızda, suşların hidrojen peroksit üretim düzeylerinin birbirlerine yakın değerlerde olduğu saptanmış olup, bu değerler diğer araştırmacıların bulgularından daha fazla olduğu gözlenmiştir. Reinheimer ve ark.(14), laktik asit bakterilerinin farklı miktarlarda hidrojen peroksit ürettiklerini, hidrojen peroksit üretiminin suşların oksijen oksidoredüktaz aktivitelerinin farklı olmasından ileri geldiğini bildirmişlerdir.

L. plantarum suşlarından 30'nun H₂S üretmediği gözlenirken, diğer 9 adet suşun farklı derecelerde H₂S ürettikleri bulunmuştur (Tablo 1). Hanna et al (29), çalışmalarında sığır bifteği ve sterilize edilmiş etlere *L.plantarum* suşlarını inoküle etiklerinde, etlerde bazı suşların H₂S ürettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, starter bakterileri tarafından oluşturulan hidrojen sülfürün, fermente et ürünlerinde arzu edilmeyen bir ürün olmasına rağmen, bu ürünün aynı zamanda antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu da bildirilmişlerdir.

Sharpe ve Franklin (30), bazı *Lactobacillus* türlerinin düşük pH, anaerobik ortam ve az karbonhidrat içeren substratlarda H₂S ürettiğini bildirmişlerdir. Çalışmalar, bazı laktik asit bakterilerinin hidrojen sülfür oluşturmadıklarını, hidrojen sülfür üretiminin sülfid redüktaz ve sistein desülfhidraz enzim aktivitesine bağlı olduğunu göstermiştir (27,30).

Starter kültürlerin en önemli işlevlerinden birisi de etlerin fermentasyonu sırasında etin mikroflorasında bulunan bazı gıda kaynaklı patojen ve patojen olmayan kontaminant bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermeleridir. Starter bakterilerin antimikrobiyal etkileri, metabolik aktiviteleri sonucunda ürettikleri laktik asit, H₂O₂, H₂S vb gibi metabolitlerden veya doğrudan bakterilerin tür veya suşlara özgül olarak ürettikleri bakteriosin gibi maddelerden meydana gelmektedir (31-33).

Tablo 2'de görüldüğü gibi suşların antimikrobiyal etkileri genellikle laktik asitten ileri gelmektedir. Bazı araştırmacılar, laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan değişik metabolizma ürünlerinin ve özellikle laktik asidin etkisine bağlı olarak, sucuk hamurunun florasında bulunan ve arzu edilmeyen gıda kaynaklı kontaminant ve muhtemelen patojen organizmaların gelişiminin engellendiğini bildirmişlerdir (32,34). Sucuklarda düşük miktarda laktik asit üreten starter bakterilerinin, gıda kaynaklı kontaminant ve patojen bakterilerin üremelerini inhibe edemedikleri ve buna bağlı olarak da sucuklarda istenmeyen koku, gaz, proteolizis ve hijyenik riskin oluştuğu bildirilmiştir (1).

Çalışmamızda, 39 adet *L. plantarum* suşundan 2'sinin *E. coli* K12'yi inhibe etmediği halde, 37 suşun ise 3.90-

10.20 mm yarı çap arasında inhibisyon zonu oluşturarak etkili inhibisyon oluşturduğu tespit edilmiştir. Bir çalışmada da, 23 adet atasal ve mutant *L. plantarum* suşunun *E. coli* üzerinde 16.0-26.0 mm çap arasında inhibisyon oluşturarak etkili olduğu tespit edilmiştir (28).

Tuza toleranslı *S. aureus* ve enterotoksininin et ve kanatlı etlerinde zehirlenme etmeni olduğu bildirilmiştir (35). Çalışmamızda, *L. plantarum* suşlarından, yalnız 4 adedi koag.(+) *S. aureus* üzerinde inhibisyon etki göstermezken, diğer suşlar bu test bakterisi üzerinde 1.40-7.30 mm yarı çap arasında inhibisyon zonu oluşturarak etkili olmuştur. Graciela ve ark. (36), değişik fermente sosislerin üretim aşamalarında *S.aureus*'un varlığını gösterirken, üretimde bu bakteri üzerinde yüksek antimikrobiyal etki gösteren starter kültürlerin kullanımını önermişlerdir.

Bir suşun dışında, tüm suşlar mutant koag.(-) *S. aureus* test bakterisi üzerinde 4.20- 9.10 mm yarı çap arasında zonlar yaparak gelişmeyi engellemişlerdir (Tablo 2). Bir araştırmada, laktik asit bakterilerinin koag.(-) *S. aureus* üzerine olan inhibisyon etkilerinin koag.(+) *S. aureus* kıyasla yüksek olduğunu bildirilmiştir (9). Çalışmamızda da benzer sonuç elde edilmiştir.

Pseudomonas ve *Bacillus* cinsi proteolitik bakterilerin et ve et ürünlerinde üremesi sonucu etin bozulmasına neden olabilmektedir (37). Çalışmamızda, üç suşun dışında, tüm suşlar *B. subtilis* test bakterisi üzerinde 3.10-7.10 mm yarı çap arasında zonlar yaparak gelişmeyi engellemişlerdir. *L. plantarum* suşlarından yalnız birinin *P. aeruginosa* üzerinde etkisi gözlenmezken, diğer suşlar bu test bakterisi üzerinde 4.10-9.90 mm yarı çap arasında zonlar yaparak gelişmeyi engellemişlerdir (Tablo 2).

L. plantarum suşlarının test bakteriler üzerinde yüksek genel inhibisyon etkileri sırası ile *P. aeruginosa*, *E. coli*, koag.(-) *S. aureus*, *B. subtilis* ve koag.(+), *S. aureus* bakterileri üzerinde görülmüştür.

Çalışmalar, *L. plantarum* tarafından üretilen bakteriosinin inhibisyon etkisinin yakın akraba olan *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* bakterileri üzerinde daha fazla olduğu göstermiştir (5, 38). *L. plantarum*'un bazı gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerinde antagonistik etkisinin laktik asit ve bakteriosinden ileri geldiği bildirilmiştir (33). Ray (39), laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriosinin gram pozitif bakteriler üzerinde düşük pH derecelerinde etkili olduğunu göstermiştir.

H₂O₂ ile test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkisi arasındaki ilişki korelasyon testi yapılarak belirlenmiştir. Korelasyon testine göre *E. coli* test bakterisi üzerindeki

inhibisyon test sonucu $p = 0.047$, koag (+) *S. aureus*'da $p = 0.165$, koag. (-) *S. aureus* da $P = 0.065$ *B. subtilis*'de $P = 0.430$ ve *P. aeruginosa*'de de $P = 0.658$ bulunmuştur. %99 güven aralığı ve %1 hata payına göre sonuçlar değerlendirildiğinde bütün sonuçlar $p \geq 0.01$ olduğundan, H_2O_2 üretimi ile test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkisi arasında bir bağlantı bulunamamıştır (Tablo 1,2).

Ahn ve Sites (40), vakum ile muhafaza edilen etlerden izole ettikleri bazı *Lactobacillus*'ların bazı test bakteriler üzerinde antagonistik etkilerinin bakteriosinden ileri geldiğini bildirmişlerdir. Lewus et al. (32), etten izole ettikleri 10 adet laktik asit bakterisinin bazı gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerinde inhibisyon etkilerinin laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriosinden ileri geldiğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda, 18 adet *L. plantarum* suşunun bakteriosin ve/veya bakteriosin benzer madde ürettiği gözlenirken, diğer 21 adet suşun bu maddeleri üretmediği tespit edilmiştir. Bakteriosin üreten *L.*

plantarum AX13L suşu, diğer suşlara kıyasla tüm test bakterileri üzerinde daha fazla inhibisyon etki göstermiştir. Çeşitli araştırma sonuçlarında, bakteriosin ve/veya bakteriosin benzeri madde üreten laktik asit bakterilerinin fermente et ürünlerinde starter bakterileri olarak kullanımları önerilmiştir (41-42).

Bu araştırma sonuçları *L. plantarum* suşlarının genelde orta derecede laktik asit ürettikleri, hidrojen peroksit üretimlerinin orta ve hidrojen sülfür üretimlerinin az olduğunu göstermiştir. Suşların, patojen ve patojen olmayan kontaminant bakteriler üzerine olan antagonistik etkilerinin ise farklı derecelerde olduğu tespit edilmiştir. Kontaminant ve patojen bakteriler üzerinde antagonistik etkileri yüksek olan suşlar ileride starter kültür olarak değerlendirilme potansiyeli ile koleksiyona alınmıştır. Bulgular, fermente et ürünleri üretiminde kullanılan *L. plantarum* suşlarının starter kültür olarak kullanımı üzerinde ileride yapılacak çeşitli çalışmalara yön verecektir.

Kaynaklar

- Gilliland, S.E. Bacterial starter cultures for foods. CRC Press, inc. Boca Raton, Florida, 1986. pp 205.
- Lücke, F.K. Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken. Fleischwurst. 1986; 66: 302-309.
- Bacus, J.N., Brown, W.L. Use of microbiol cultures in meat products, Food Technol. 1981; 35: 74-78.
- Hammes, W.P., Bantleon, A., Min, S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiol. Rev. 1990; 87: 165-174.
- Andersson, R.E., Daeshel, M.A., Hasson, H.M. Antibacterial activity of plantaricin SIK 83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*, Biochim. 1988; 70: 381-390.
- Develi, N., Gürgün, V. Sucuklarda starter kültürlerin *Clostridium perfringens*'in gelişimi üzerine etkisi. KÜKEM Derg. 1989; 12: 16-17.
- Geisen, R., Lück, F., Kröckel, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. Fleischwurst. 1992; 72: 894-898.
- Harrigan, W.F., McCance, M.E. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press London, New York. 1966. pp 362.
- Aslim, B. *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerinin metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bazı fiziksel ve kimyasal mutagenlerin etkisi. Doktora Tezi, Gazi Üniv. Fen Edebiyat Fak., Biyoloji Bölümü. 1994.
- Sneath, P.H., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore. 1986. 1599 pp.
- Türker, I. Laboratuvar Tekniği. Ankara Üni. Ziraat Fak. Yayınları. 1992. 380 s.
- Walter, A.P., Hermann, B.W. Determination of hydrogen peroxide in small concentrations. Analytical Chem. 1949; 10: 1279-1280.
- Lee, B.H., Simard, R.E. Evaluation of methods for detecting the production H_2S , volatile and greening by *Lactobacilli*. J. of Food Sci. 1984; 49: 981-983.
- Reinhammer, J.A., Dekow, M.R., Candiotti, M.C. Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures. The Aust. J. of Dairy Technol. 1990; May: 5-9.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 1989; 52:384-387.
- Diñçer, B. Yerli Sucuklarda Fermentasyon ve Kurumadde Bileşimsel, Lipolitik ve Organoleptik Değişiklikler Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi. Ankara Üniv. Vet. Fak., 1980.
- Gökalp, H.Y., Kaya, M., Zorba, Ö. Et Ürünleri İşleme Müh. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, Yay. No.320. 1994. 561 S.
- Akbari, M., Beyatlı, Y. *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Gazi Üniv. Fen Bilim. Enstit. Derg. 1996; 9:139-148.
- Beyatlı, Y., Tunail, N. Yoğurtlardan izole edilen kimi bakterilerin starter olarak seçilme olanakları üzerinde bir araştırma. 1982; TÜBİTAK, TOAG-414.

20. Tunail, N., Köşker, Ö. Süt Mikrobiyolojisi. A.Ü. Ziraat Fak. Tarım Ürünleri Teknolojisi Böl. Ders kitabı No. 320, 1989; 183 s.
21. Vignolo, G.M., Ruiz-Holgado, A.A., Oliver, G. Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausage. J. Food Protect. 1989; 52: 787-791.
22. Vignolo, G.M., Ruiz-Holgado, A.A., Oliver, G. Acid production and proteolytic activity of *Lactobacillus* strain from dry sausage. J. Food Protect. 1988; 51: 481-488.
23. Tandler, K. The use of sugar substances in the manufacture of salami-type sausages (in German). Fleischw. 1963; 43: 804.
24. Coretti, K., Tandler, K. Effect of sugar addition on the quality of dry sausages (in German). Fleischw. 1965; 45: 1058.
25. Urbaniak, L., Pezacki, W. The lactic acid forming microflora of dry sausages and the technology determined changes it undergoes (in German). Fleischw.1975; 55: 229.
26. Raccach, M., Baker, R.C. Formation of hydrogen peroxide by meat starter cultures. J. Food Protect. 1978; 41: 798-799.
27. Fernandes, C.F., Shahani, K.M., Amer, M.A. Therapeutic role of dietary Lactobacilli and Lactobacillic ferment in dairy products. FEMS Microbiol. Rev. 1987; 46: 343-335.
28. Beyatlı, Y., Akbari, M. UV-ışınlarının *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* bakterileri üzerine etkisinin araştırılması. Gazi Üniv. Fen Bilim. Enstit. Derg. 1996; 9: 255-262.
29. Hanna, M.O., Savell, J.W., Smith, G.C., Pureser, D.E., Dardner, F.A., Vanderzant, C. Effect of growth of individual meat bacteria on pH, color and odor of aseptically prepared vacuum packaged round steaks. J. Food Protect. 1983; 52: 384-387.
30. Sharpe, M.E., Franklin, J.G. Production of hydrogen sulfide by Lactobacilli with special reference to strains isolated from Chem. 8th. int. Ciba Microbiol. 1962; 56 (Abst).
31. Lin, C.W., Shih, C.H., Su, H.P. Studies on the natural antimicrobial agents from lactic acid bacteria. 1. Primary screening of lactic cultures for antimicrobial activity. J. Chinesee Agricul. Chem. Soci. 1986; 24: 384-391.
32. Lewus, C.B., Kaiser, A., Montville, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogenes by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Env. Microbiol. 1991; 57: 1683-1688.
33. Klaenhammer, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, 1988; 70: 337-349.
34. Knauf, H.J., Hammes, W.P. Starters in the processing of meat products. Meat Sci. 1994; 36:155-168.
35. Topal, Ş. Gıda Güvenliği ve Kalite Yönetim Sistemleri. TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi Mat. 1996; 225 s.
36. Graciela, M.V., Aida, P., Ruiz, H., Guillermo, O. Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausages. J. of Food Protect. 1989; 52: 787-789.
37. Göktan, D. Gıdaların Mikrobiyal Ekolojisi. Cilt 1, Et Mikrobiyolojisi. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova- İzmir, 1990: 292 s.
38. Daeschel, M.A., McKenney, M.C., McDonald, L.C. Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 1990; 7: 91-93.
39. Ray, B. Antimicrobials of starter culture bacteria and their use in food preservation. J. Dairy Sci.1989; 72; 122-123.
40. Ahn, C., Sites, M.E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. J. Appl. Bacteriol. 1990; 69: 302-310.
41. Kroeckel, L. Lactic acid bacteria bacteriocins for meat products. Milchsaeurebakterjen fuer Fleischerzeugnisse. 1992; 31: 207-215.
42. Stiles, M.E., Hastings, J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. 1991; Trends in Food Sci. and Technol. 2: 247-251.