

Et Ürünlerinden İzole Edilen *Pediococcus acidilactici* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi

Mustafa AŞKAR, Belma ASLIM, Yavuz BEYATLI
Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Beşevler, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 10.10.1997

Özet : Bu araştırmada, piyasada satılan 10 adet değişik marka sucuk ve sosis örneğinden *Pediococcus* cinsine dahil toplam 74 adet bakteri izole edilmiştir. İdentifikasyon sonuçları, bunların 30 adedinin (%40.5) *Pediococcus acidilactici* olduğunu göstermiştir. İdentifiye edilen suşların oluşturdıkları laktik asit, H₂O₂ miktarları %0.11-0.64 düzeyinde belirlenirken, H₂O₂ miktarları 0.441-0.90 (µg/10 ml arasında tespit edilmiştir. Suşların H₂S üretimleri Triple Sugar Iron (TSI) Agar besiyerinde kalitatif olarak saptanmıştır.

Suşların genel inhibisyon etkileri ve bakteriyosin ve / veya bakteriyosin benzeri maddelerden kaynaklanan inhibisyon etkileri bazı gıda kontaminantları ve gıda kaynaklı patojen bakteriler (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, koag.(+) ve koag.(-) *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* ve *Pseudomonas fluorescens*) üzerinde agar diffüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca, suşların starter kültür niteliğindeki laktik asit bakterileri üzerinde ve starter kültür niteliğindeki bakterilerin *P.acidilactici* üzerinde inhibisyon etkisinin de araştırılmıştır.

Araştırma sonuçları, *P. acidilactici* suşlarının değişik miktarlarda metabolik ürünler sentezlediğini ve test bakterileri üzerinde değişik oranlarda inhibisyon etkilerinin olduğunu göstermiştir. Bazı starter bakterilerinin *P. acidilactici* suşları üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler : Et ürünleri, *P. acidilactici*, Metabolik ürünler, Bakteriosin, Antimikrobiyal aktivite.

Studing on Metabolic and Antimicrobial Activities of Some *P. acidilactici* Strains Isolated from Meat Products

Abstract : In this research, , In this study, a total of 74 *Pediococcus* were isolated from 10 different sausage and sosis samples obtained from different retailers . The identification results showed that 30 (40.5%) isolates were from the species *P. acidilactici*. The amounts of lactic acid and H₂O₂ produced by the strains were in the ranges 0.11-0.64% and 0.441-0.90 (µg/10 ml, respectively. A Triple Sugar Iron (TSI) Agar medium was used for estimating the H₂S production of the strains.

The generally, inhibitory effects and the inhibitory effects of the bacteriocins and / or bacteriocin-like substances in the *P. acidilactici* strains were determined on food contaminants and pathogen bacteria (*E.coli*, *B.subtilis*, coag. (+) and coag. (-) *S.aureus*, *E.aerogenes*, *P.fluorescens*) using the agar diffusion method. The antimicrobial activity of the strains on closely related starter bacteria and the inhibitory effects of these starter bacteria on the *P.acidilactici* strains were examined.

The results showed that strains produced different amounts of metabolic compounds and varied in inhibition on the test bacteria. However some starter bacteria inhibited *P.acidilactici* strains.

Key Words : Meat products, *P.acidilactici*, Metabolic compounds, Bacteriocin, Antimicrobial activity.

Giriş

Türkiye’de fermente et ürünleri üretiminin önemli bölümünü sucuk oluşturmakta ve et ürünleri içindeki payı %42’ kadar çıkmaktadır (1). Türkiye’de bu fermente gıdaların üretiminde bazı entegre büyük işletmeler dışında üretim teknolojik gelişmelerden yoksun geleneksel yöntemlerle yapılmaktadır. Bu nedenle elde edilen ürünlerin büyük bir kısmı kalite ve hijyen bakımından arzu edilmeyen seviyededir (2). Gelişmiş ülkelerde fermente et

ürünler üretimi entegre tesislerde yapıldığı gibi, üretimde de starter kültür kullanılmaktadır. Starter kültürlerin kullanımı ile, standart ve kaliteli ürünler elde edilmektedir. Bu ürünlerin üretiminde kullanılan starter kültürler; *Lactobacillus plantarum*, *L. sake*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* ve *P.pentosaceus*’un uygun kombinasyonlarını içerir (3,4). Laktik kültürlerin dışında starter kültür olarak *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus* ve *S.xylosus*’da kullanılmaktadır.

Son yıllarda starter kültürlerin seçiminde bazı önemli kriterlerden yararlanılmaya başlanmıştır. Kültürlerin oluşturduğu metabolik ürünler ile bakterilerin antagonistik etkilerinin önemli kriterler olduğu bildirilmektedir (5,6). Laktik asit bakterilerinin antagonistik etkileri onların birbirinden farklı bir kaç biyokimyasal özelliğine bağlanmaktadır. Laktik asit bakterilerinin çoğu karbohidratan laktik asit ve asetik asit gibi organik asitleri üretebilmektedir. Gıda kaynaklı patojen olan veya olmayan kontaminantların büyük bir kısmı bu asitlere ve dolayısıyla pH düşüşüne karşı hassastır (7-12). Yine laktik asit bakterileri tarafından mikroaerofilik koşulda üretilen H₂O₂ de bir çok mikroorganizma üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir (7-10). Ayrıca, laktik asit bakterilerinin antagonistik etkisinde diasetilin (7-9) ve CO₂'in etkili olabileceği belirtilmiştir (8). Laktik asit bakterilerinin antagonistik aktivite mekanizmaları içerisinde son yıllarda üzerinde en fazla durulan bir diğeride, bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen 'bakteriyosin ve bakteriyosin-benzeri bileşiklerdir (7,9,10). *Bakteriyosinler*, protein yapılıdır (11). Bazı *Pediococcus* bakterilerinin pediosin adlandırılan bakteriosin ürettiği, bu maddenin protein yapısında olduğu ve gıda kaynaklı patojen ve spor oluşturan bakteriler ile kendi türlerine yakın bakterilerin de üremelerini inhibe ettiği bir çok çalışmada gösterilmiştir (13,14,15).

Bu araştırmanın amacı, piyasada satışı sunulan bir çok farklı markadaki sucuk ve sosislerden starter kültür niteliğindeki *P.acidilactici* suşlarını izole etmek ve oluşturdukları bazı metabolik ürünleri ve bunların antimikrobiyal aktivitelerini belirlemektir.

Materyal ve Metot

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

Örneklerden *Pediococcus* bakterilerini izole etmek amacıyla 10 gram alınıp steril 90 ml fizyolojik suda mikserle iyice karıştırılmıştır. Her bir örnekten uygun dilüsyonlar hazırlanıp Elliker agar besiyerine yayma plak yöntemiyle ekimler yapılmış ve plaklar 37°C de 72 saat inkübe edilmiştir (16). Besiyerinde üreyen beyaz-şeffaf-gri renkli koloniler Elliker sıvı besiyerine aşılanarak

aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler mikroskopik olarak incelenmiş, çift ve tetrad şeklindeki bakteriler %10'luk litmuslu süte aşılanarak 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerine bölünmüş ve - 20°C de muhafazaya alınmıştır (17).

Bakterilerin İdentifikasyonları

İzole edilen bakterilerin identifikasyonlarında, bakterilerin morfolojik özellikleri saptanmış ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. *Pediococcus* bakterilerini diğer bakteri grublarından ayırmak için anahtar testler olarak ; izolatların tetrad şeklindeki morfolojik şekillerine, hareketsizlik ve spor oluşturma durumlarına, gram ve katalaz reaksiyonlarına bakıldığı gibi katı besiyerindeki kolonilerin beyaz-şeffaf-gri şekli ve yapıları da incelenmiştir. *Pediococcus*' ler Gram (+) ve katalaz (-)'dir. Ayrıca, izolatların homofermentatif olmaları ve arjininden amonyak oluşturmaları test edilmiştir. Bu testler sonucu *Pediococcus* bakterileri diğer bakteri gruplarından ayrılmıştır.

P.acidilactici suşlarını diğer *Pediococcus*'lardan ayırmak için, bakterinin göstermiş olduğu fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanılmıştır. Parantez içinde gösterilen reaksiyonlar *P.acidilactici* için olmak üzere identifikasyon için kültürlerle 35°C' da üreme (+), 40°C' da üreme (+), 50°C' da üreme (+), %4 NaCl'de üreme (+), %6.5 NaCl'de üreme (+), %18 NaCl'de üreme (-), pH 4.2'de gelişme (+), pH 7.5'da gelişme (+), pH 8.5' da gelişme (-), ksiloz (+), riboz (+), dekstroz (+), sakkaroz (-), sorboz (-), mannitol (-), maltoz (-), melisitoz (-) ve nişasta (-) kullanma testleri yapılmıştır. Ayrıca, *P.acidilactici* için değişken sonuç veren laktoz, arabinoz ve trehaloz fermentasyon testleri de yapılmıştır.

Bakterilerin bütün tanımlama testleri ve değerlendirilmeleri genel identifikasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (5, 18,19).

Suşların Asit Üretimlerinin Belirlenmesi

Suşların oluşturduğu asit miktarları %10'luk yağsız süt tozu (Skim milk) besiyerinde belirlenmiştir. Aktif kültürlerden %2 oranında besiyerine aşılanıp, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve süre bitiminde suşların % asit üretimleri 0.1 N NaOH ile saptanmıştır (20).

Suşların Hidrojen Peroksit Üretimlerinin Belirlenmesi

Aktif kültürler % 2 oranında Elliker Broth besiyerine inoküle edilip, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Suşların oluşturduğu hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarları

Spektrofotometrik (400 nm) yöntemle ($\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (19,21).

Suşların Hidrojen Sülfür Üretimlerinin Belirlenmesi

Bakterilerin hidrojen sülfür (H_2S) üretimleri Triple Sugar Iron Agar (TSI) besiortamında belirlenmiştir. Aktif kültürlerden alınan 0.1 ml örnekler besiyerine yayma metodu ile inoküle edilip, 37°C 'de 21 gün inkübe edilmiştir. Besiortamında üreyen kolonilerin siyahlaşma durumuna göre, suşların H_2S üretimleri kalitatif olarak değerlendirilmiştir (22).

Suşların Test Bakterileri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi

Suşların Genel İnhibisyon Etkileri

Çalışmada, indikatör bakteri olarak kullanılan *Escherichia coli* K12, *Bacillus subtilis* 864, *Enterobacter aerogenes* 585, *Pseudomonas fluorescens* 240 Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden koag. (+) *Staphylococcus aureus* 4-43, mutant koag. (-) *Staphylococcus aureus*, Prof. Dr. Mehmet ŞABANOĞLU'ndan (Muğla Univ., Fen Ed. Fak., Biyoloji Bölümü), *Lactobacillus plantarum* A13L, B14L, *Pediococcus pentosaceus* C9S ve C30S suşları Gazi Üniv. Fen - Ed. Fak. Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

Suşların indikatör bakteriler üzerine olan genel inhibisyon etkileri agar diffüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Aktif *Pediococcus* suşları 10 ml'lik %10 oranı ile yağsız süt tozundan hazırlanan besiyerine %2 oranında inoküle edilip, 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde besiyeri 5000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilip, berrak kısım 0.45 μm 'lik membran filtreden süzölmüştür.

E.coli, *B.subtilis*, *E.aerogenes*, *P.fluorescens* ve koag. (+) ve (-) *S.aureus* suşları Nutrient broth, *L.plantarum* suşları MRS Broth ve *P.pentosaceus* suşları Elliker Broth' da aktifleştirilmiştir. *P.acidilactici* suşlarının inhibisyon etkisini test etmek için indikatör bakteri içeren agarlı besiyerlerine açılmış kuyucuklara 100 μl *P.acidilactici* kültür filtratlarından doldurulmuş ve 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Oluşan zonların çapları (cm) kompas yardımıyla ölçülmüştür (23,24).

Bakteriyosin ve / veya Bakteriyosin benzeri Maddelerin Etkisinin Belirlenmesi

İzole edilen *Pediococcus* suşlarının bakteriyosin üretimleri oksijensiz ortam (anaerobik jar) kullanılarak

tespit edilmiştir. Bu amaçla Johanson ve Ray (25)'in araştırmalarında gösterdikleri şekilde, %0.02 şeker içeren Elliker Broth besiyerine %2 oranında aktif *P.acidilactici* kültürü inoküle edilip 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde, kültürün pH'sı 6.5' e ayarlanmıştır. Daha sonra, 16.000 rpm de 15 dak. santrifüj edilip, 1/5 oranında 5mM sodyum fosfatla (pH 6.0) yıkanmıştır. Daha sonra 0.1 M steril NaCl (pH 2.0) ile işleme tabi tutularak 4°C 'da 2 saat karıştırılmış ve 29.000 rpm de 20 dak. santrifüj edilmiştir. Hücreler 5 mM sodyum fosfat (pH 6.5) işlemine tabi tutulmuş ve elde edilen süpernatantın test bakterileri üzerine olan inhibisyon etkisi daha önce açıklanan genel inhibisyon metoduna göre saptanmıştır (23).

Bulgular

Çalışmada et ürünlerinden toplam 74 adet *Pediococcus* cinsi izolat elde edilmiştir. İdentifikasyon sonuçları, bunların 30'unun (%40.5) *P.acidilactici* olduğunu göstermiştir. *P.acidilactici* suşlarının % asit, hidrojen peroksit ve hidrojen sülfür üretimleri Tablo 1'de verilmiştir. Suşların % asit miktarları 0.11-0.64 arasında, ortalama %0.41 olarak bulunmuştur. Bu suşların hidrojen peroksit miktarları 0.441-0.900 ($\mu\text{g}/10$ ml arasına tespit edilirken, ortalama değer 0.548 ($\mu\text{g}/10$ ml olarak hesaplanmıştır. Suşların çoğunun H_2S ürettiği gözlenmiştir (Tablo 1).

P.acidilactici suşlarının indikatör bakteriler üzerine olan genel inhibisyon etkileri Tablo 2'de verilmiştir. Suşlar, *E.coli*'de 0.00-1.56, *B.subtilis*'de 0.58-2.64, koag.(+) *S.aureus*'da 0.00-2.72, mutant koag.(-) *S.aureus*'da 1.30-1.92, *E.aerogenes*'de 0.00-1.84, *P.fluorescence*'de 0.00-1.60 cm çaplar arasında inhibisyon zonları oluşturmuştur.

Bazı *P.acidilactici* suşlarının (A10S, A13S, A15S, A24S, A26S, A27S, B2S, B6S, B13S, B14S, B15S, B16S) üretmiş oldukları bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri maddelerin indikatör bakteriler üzerine olan inhibisyon etkileri incelenmiş, bu suşların indikatör bakteriler üzerinde her hangi bir inhibisyon etki göstermedikleri gözlenmiştir.

Çalışmada, 15 adet *P.acidilactici* suşunun starter *L.plantarum* A13L, 11 adet suşun *L.plantarum* B14L, 19 adet suşun *P.pentosaceus* C9S ve 3 adet suşun *P.pentosaceus* 30S suşları üzerinde genel inhibisyon zonları tespit edilmiştir. Suşların, starter bakteriler

Tablo 1. *P.acidilactici* Suşlarının Asit, Hidrojen Peroksit ve Hidrojen Sülfür Üretimleri.

Suşlar	% Asitlik	H ₂ O ₂ µg/10 ml	H ₂ S
<i>P.acidilactici</i> 10S	0.54	0.481	+
<i>P.acidilactici</i> A13S	0.55	0.603	-
<i>P.acidilactici</i> A15S	0.60	0.616	+
<i>P.acidilactici</i> A24S	0.59	0.680	++
<i>P.acidilactici</i> A26S	0.58	0.662	+
<i>P.acidilactici</i> A27S	0.54	0.630	+++
<i>P.acidilactici</i> B3S	0.22	0.455	+
<i>P.acidilactici</i> B6S	0.16	0.486	-
<i>P.acidilactici</i> B13S	0.55	0.535	+
<i>P.acidilactici</i> B14S	0.41	0.504	-
<i>P.acidilactici</i> B15S	0.45	0.441	+
<i>P.acidilactici</i> B16S	0.14	0.450	+
<i>P.acidilactici</i> B17S	0.42	0.495	+
<i>P.acidilactici</i> B20S	0.18	0.553	+
<i>P.acidilactici</i> B21S	0.16	0.441	+
<i>P.acidilactici</i> B23S	0.50	0.495	+
<i>P.acidilactici</i> B24S	0.56	0.585	-
<i>P.acidilactici</i> B28S	0.45	0.472	+
<i>P.acidilactici</i> B31S	0.64	0.531	++
<i>P.acidilactici</i> B34S	0.53	0.558	-
<i>P.acidilactici</i> B36S	0.56	0.540	+
<i>P.acidilactici</i> C3S	0.56	0.585	+
<i>P.acidilactici</i> C4S	0.55	0.639	+
<i>P.acidilactici</i> C8S	0.50	0.639	+
<i>P.acidilactici</i> C9S	0.40	0.571	-
<i>P.acidilactici</i> C10S	0.17	0.594	+
<i>P.acidilactici</i> C17S	0.51	0.499	-
<i>P.acidilactici</i> C19S	0.11	0.585	++
<i>P.acidilactici</i> C25S	0.15	0.657	+
<i>P.acidilactici</i> C28S	0.15	0.900	+
Ortalama Değer	0.41	0.548	

(+): H₂S üretimi zayıf; (++) : H₂S üretimi orta; (+++)H₂S üretimi yüksek; (-):H₂S üretimi yok.

üzerinde sırasıyla 0.00-2.42, 0.00-1.58, 0.00-2.16 ve 0.00-1.04 cm çapında genel inhibisyon zonları saptanmıştır (Tablo 3).

Denemede indikatör suş olarak kullanılan et starter kültürlerinden *L.plantarum* A13L, B14L ile *P.pentosaceus* C9S, 30S bakterilerinin *P.acidilactici* suşları üzerine olan genel inhibisyon etkileri Tablo 4'de verilmiştir. *L.plantarum* A13L, B14L ve *P.pentosaceus* C9S suşları denenilen sekiz adet *P.acidilactici* suşunun hepsine sırası ile 1.28-2.16, 1.44-2.02 ve 1.48-2.06 cm çapında zonlar

oluşturarak genel inhibisyon da etkili olduklarını göstermişlerdir. *P.pentosaceus* 30S ise yalnız altı adet *P.acidilactici* suşu üzerine 0.80-1.84 cm çapında zonlar yaparak etkili olmuş, diğer iki adet suş *P.acidilactici*'nin gelişimini inhibe etmemiştir.

Tartışma

Lactobacillus ve *Pediococcus* cinsine dahil olan bakterilerin fermente et ürünlerinin mikroflorasında doğal olarak bulunduğu bildirilmiştir (6). Ülkemizde üretilen sucuk ve sosislerin kimyasal ve fiziksel özellikleri hakkında bir çok çalışma mevcut olmasına rağmen, bu tip ürünlerde starter olarak kullanılan ve/veya ürün florasında bulunan laktik asit bakterileri üzerinde yapılmış çalışma sayısı son derece azdır (2,3,19,26,27).

Suşların asit üretimleri 0.11-0.64 arasında, ortalama %0.41 olarak bulunmuştur. Acton ve ark. (28), çalışmalarında dondurulmuş konsantre *P.acidilactici* kültürünü %1 dekstroz ve sakkaroz içeren sucuk hamuruna inököle edip, 38°C'de 24 saat inkübe ettikten sonra üründe titrasyon asitliğinin %0.9 olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan birçok araştırma *P.acidilactici*'nin farklı karbonhidrat içeren besiyortamlarında farklı miktarda laktik asit ürettiğini bildirirken, laktik asit üretimini arzu edilen seviyede oluşturan *P.acidilactici* kültürlerin sucuk fermentasyonunda kullanımını önerilmiştir (29,30,31). Çalışmamızda, izole edilen suşların laktik asit üretimleri ortalama %0.41, en yüksek %0.6 olarak bulunmuştur. İzolatların 21 adedi %0.4 ve daha fazla asit üretirken, diğer 9 suşun %0.11-%0.22 düzeyde asit ürettikleri görülmüştür.

Fermente et ürünlerinde starter kültür niteliğindeki bazı bakteriler tarafından üretilen hidrojen peroksit, etlerde hoş gitmeyen 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 (4,32,33). Çalışmamızda, *P.acidilactici* suşlarının H₂O₂ üretimleri 0.441-0.900 arasında, ortalama olarak 0.548 (µg/10 ml bulunmuştur (Tablo 1).

Suşların hidrojen peroksit üretim düzeyleri birbirlerine yakın olup, içlerinden yalnız bir suş (C28S) 0.900 (µg/10 ml üretim ile diğerlerini geride bırakmıştır. Reinheimer ve ark.(1990), laktik asit bakterilerinin farklı miktarda hidrojen peroksit ürettiklerini, hidrojen peroksit

Tablo 2. *P. acidilactici* Suşlarının İndikatör Bakteriler Üzerine Genel İnhibisyon Etkisi (Zon çapı, cm).

Suşları	Test Bakterileri					
	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i> koag.(+)	<i>E.aerogenes</i> koag.-)	<i>P.fluorescens</i>
A10S	0.00	0.58	0.00	1.92	0.00	0.98
A13S	0.98	1.18	2.72	1.76	1.84	1.26
A15S	1.28	1.02	2.50	1.62	1.16	1.16
A24S	1.54	0.80	2.26	1.58	1.48	1.08
A26S	1.08	0.78	0.00	1.90	1.24	1.20
A27S	1.28	1.36	0.00	1.62	1.36	1.36
B3S	1.46	1.28	0.00	1.54	1.12	0.90
B6S	1.38	1.22	0.00	1.82	0.00	1.06
B13S	1.22	2.38	0.00	1.80	1.66	0.00
B14S	0.00	2.08	0.00	1.16	1.78	1.50
B15S	0.00	1.35	0.00	1.56	1.54	1.38
B16S	1.12	1.62	0.00	1.34	1.56	1.60
B17S	0.00	1.92	0.00	1.30	1.34	1.38
B20S	0.00	1.62	0.00	1.44	1.24	1.40
B21S	1.02	1.90	0.00	1.72	1.28	1.26
B23S	1.34	1.66	0.00	1.38	1.10	1.20
B24S	1.02	2.36	0.00	1.46	1.62	1.34
B28S	1.26	1.64	0.00	1.32	1.52	1.30
B31S	1.02	1.58	0.00	1.26	0.00	1.12
B34S	0.00	2.26	0.00	1.28	1.28	1.24
B36S	1.34	2.44	0.00	1.36	1.42	1.16
C3S	1.26	2.34	0.00	1.44	1.42	1.08
C4S	0.00	2.58	0.00	1.46	0.00	0.92
C8S	0.00	2.00	0.00	1.52	1.02	1.08
C9S	0.82	1.90	0.00	1.56	1.08	1.42
C10S	0.00	2.22	0.00	1.62	1.42	1.10
C17S	1.48	2.64	0.00	1.64	1.36	1.56
C19S	1.50	2.62	0.00	1.92	1.18	1.16
C25S	1.56	2.22	0.00	1.18	1.40	1.08
C28S	0.00	1.92	0.00	1.50	1.36	1.40

üretimindeki farklılıkların, suşların oksijen oksidoredüktaz aktivitelerinin farklı olmasından ileri geldiğini bildirmişlerdir (23).

P.acidilactici suşlarından 7'sinin H₂S üretmediği gözlenirken, diğer suşların farklı derecelerde H₂S ürettikleri bulunmuştur. Starter kültür niteliğindeki bazı bakteriler tarafından oluşturulan hidrojen sülfür, fermente et ürünlerinde arzu edilmeyen bir ürün olmasına rağmen, bu ürünün aynı zamanda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir (34). Çalışmalar, bazı laktik asit bakterilerinin hidrojen sülfür oluşturmadıkları, hidrojen sülfür üretiminin sülfid redüktaz ve sistein desülfhidraz enzim aktivitesine bağlı olduğunu göstermiştir (23,35).

Starter kültürlerin en önemli işlevleri etlerin fermentasyon olayları sırasında etin mikroflorasında bulunan bazı gıda kaynaklı patojen ve patojen olmayan kontaminant bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermeleridir. Starter bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, metabolik aktiviteleri sonucunda ürettikleri laktik asit, H₂O₂, H₂S vb gibi metabolitler veya doğrudan bakterilerin tür veya suşlara özgül olarak ürettikleri bakteriyosin gibi maddelerdir.

Tablo 2'den de anlaşılacağı gibi suşların antimikrobiyal etkilerinin laktik asitten ileri geldiği görülmüştür. Bazı araştırmacılar, laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan değişik metabolizma ürünlerinin ve özellikle laktik asidin etkisine bağlı olarak, sucuk hamurunun florasında

Tablo 3. *P.acidilactici* Suşlarının Starter Bakteriler Üzerine Genel İnhibisyon Etkileri (Zon çapı,cm).

Suşlar	Starter Bakterileri			
	<i>L.plantarum</i> (A13L)	<i>L.plantarum</i> (B14L)	<i>P.pentosaceus</i> (C9S)	<i>P.pentosaceus</i> (30S)
A10S	0.34	0.38	1.22	0.00
A13S	1.32	1.58	1.06	0.68
A15S	0.46	1.10	1.64	0.00
A24S	1.42	0.78	1.80	0.00
A26S	0.00	0.00	0.00	0.00
A27S	0.82	1.04	1.34	0.00
B3S	0.96	1.20	0.00	0.00
B6S	1.70	0.00	0.00	0.00
B13S	0.00	0.00	0.00	0.00
B14S	0.00	1.74	2.16	0.00
B15S	0.00	1.80	0.00	0.00
B16S	0.88	1.32	0.00	0.00
B17S	1.16	0.00	0.00	0.00
B20S	0.00	0.00	0.00	0.00
B21S	1.04	0.00	0.00	0.00
B23S	0.00	0.00	0.00	0.00
B24S	0.00	0.00	1.32	0.00
B28S	1.28	0.00	0.94	0.00
B31S	0.00	0.00	1.20	0.00
B34S	0.00	0.00	0.68	0.00
B36S	0.00	0.00	0.00	0.00
C3S	1.06	0.48	0.00	1.04
C4S	0.00	0.00	0.80	0.00
C8S	1.16	0.00	0.44	0.00
C9S	0.00	0.00	0.96	0.98
C10S	1.08	1.00	0.00	0.00
C17S	0.00	0.00	0.00	0.00
C19S	0.00	0.00	1.44	0.00
C25S	2.42	1.58	1.60	0.00
C28S	0.00	0.00	0.92	0.00

bulunan ve arzu edilmeyen gıda kaynaklı kontaminant ve muhtemelen patojen organizmaların engellendiğini bildirmişlerdir (6,7). Sucuklarda düşük miktarda laktik asit üreten starter bakterilerin, sucuklarda gıda kaynaklı kontaminant ve patojen bakterilerin üremelerini inhibe etmediği ve buna bağlı olarak da istenmeyen koku, gaz oluşumu, proteoliz ve hijenik riskin varlığı bildirilmiştir (5).

Çalışmamızda, otuz adet *P.acidilactici* suşundan 10'u *E.coli* K12'yi inhibe etmediği halde, 20 suşun ise 0.82-1.56 cm arasında inhibisyon zonu oluşturarak etkili

inhibisyon oluşturduğu tespit edilmiştir. Ray ve ark. (36), *P.acidilactici* suşlarının 4 ayrı *E.coli* K12 üzerinde antimikrobiyal etkilerini incelemişler ve bu suşların *E.coli*'lerden ikisinin üremesini az oranda inhibe ettiğini, diğer ikisini ise etkilemediğini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, tüm *P.acidilactici* suşlarının *B.subtilis* üzerinde genellikle antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 2). Bazı suşlar bu indikatör bakteri üzerinde, denenen diğer test bakterilerine kıyasla daha yüksek etki göstermişlerdir.

P.acidilactici suşlarından, yalnız 3 adedi koag.(+) *S.aureus* üzerinde yüksek inhibisyon etki gösterirken, diğer suşların bu indikatör bakteri üzerinde inhibisyon etki yapmadığı belirlenmiştir. Graciela ve ark. (37), değişik fermente sucukların üretim aşamalarında *S.aureus*'un varlığını gösterirken, üretimde bakteri üzerinde yüksek antimikrobiyal etki gösteren starter kültürlerin kullanımını önermişlerdir. Daly ve ark.(38), *P.acidilactici* suşlarının ortamın asitliğini düşürmeleri ile orantılı olarak *S.aureus* suşlarının üremelerini hızlı bir şekilde azalttığını bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise *P.acidilactici* PC suşlarının *S.aureus* 196E'ye karşı inhibitör etkisinin olmadığı gösterilmiştir (9).

Tüm suşlar mutant koag.(-) *S.aureus* test bakteri üzerinde 1.26 - 1.92 cm çapında zonlar yaparak gelişmeyi engellemişlerdir (Tablo 2). Bazı araştırmacılar, laktik asit bakterilerinin koag.(-) *S.aureus* üzerine olan inhibisyon etkilerinin koag.(+) *S.aureus* kıyasla yüksek olduğunu bildirmişlerdir (19,24).

Bu çalışmada, *P.acidilactici* suşlarından sadece 3'ünün *E.aerogenes* üzerinde inhibitör etki göstermediği, diğer suşların 1.02-1.84 cm çapında inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir. Suşların, *P.fluorescens* üzerinde 0.92-1.56 cm çapında zonlarla yine inhibisyon etki gösterdikleri bulunmuştur (Tablo 2).

Denemede 12 adet *P.acidilactici* suşunun bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri madde üretimleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan, hiç bir suşun test bakteriler üzerinde etkili olmadıkları gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda bazı *P.acidilactici* suşlarının antimikrobiyel bir peptid olan pediocin PA-1 ve pediocin AcH olarak isimlendirilen bakteriyosin ürettiği bildirilmiştir (13,39). Bir çalışmada, 16 adet farklı *Pediococcus* bakterisinden yalnız iki adedinin bakterinin (Bac+) , diğerlerinin (Bac-) olduğu bildirilirken, bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerin sucuk gibi fermente et ürünlerinin üretiminde

Fermente et starter bakterileri	<i>P.acidilactici</i> suşları							
	A10S	A26S	B23S	B34S	B36S	C17S	C19S	C28S
<i>L.plantarum</i> (A13L)	2.16	1.32	1.40	1.74	1.72	1.88	1.51	1.28
<i>L.plantarum</i> (B14L)	1.56	1.52	1.44	1.96	2.02	1.92	1.86	1.58
<i>P.pentosaceus</i> (C9S)	1.76	1.56	1.86	1.94	1.86	2.06	1.48	1.76
<i>P.pentosaceus</i> (30S)	1.84	1.14	1.28	0.00	0.80	0.00	1.40	1.62

Tablo 4. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin *P. acidilactici* Suşları Üzerine İnhibisyon Etkileri (Zon çapı, cm).

kullanılması ile mikrobiyolojik açıdan daha güvenilir ürünler elde etmenin mümkün olabileceği bildirilmiştir (11). Ayrıca, gıdalara ilave edilmeyen antibiyotiklerin aksine, bakteriyosinler veya bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin gıdalara katılabilmesi de önerilmiştir (5).

P.acidilactici suşlarından 15'inin *L.plantarum* A13L ve 18'inin *L.plantarum* B14L üzerine inhibisyon etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Diğer suşların ise farklı derecelerde bu iki indikatör bakteri üzerine inhibisyonları tespit edilmiştir. Suşlardan, 14'ünün *P.pentosaceus* C9S ve 28'nin *P.pentosaceus* 30S suşları üzerine inhibitör etkilerinin olmadığı da saptanmıştır (Tablo 3).

Bu çalışmada aynı zamanda, fermente et ürünleri üretiminde kullanılan bazı starter kültür niteliğindeki laktik asit bakterilerinin *P.acidilactici* suşları üzerine olan inhibisyon etkileride tespit edilmiştir. *L.plantarum* A13L, B14L, *P.pentosaceus* C9S suşlarının 8 adet ve *P.pentosaceus* 30S suşunun da 6 adet *P.acidilactici* suşu üzerinde inhibisyon etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 4).

Kaynaklar

1. Anonmou. Türkiyede üretilen et ve ürünleri miktarı. 1990 yılı üretimi: SETBİR Haber bülteni, 3,25. 1991.
2. Dinçer, B.: Yerli Sucuklarda Fermentasyon ve Kurumade Bileşimsel, Lipolitik ve Organoleptik Değişiklikler Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi. Ankara Üniv. Vet. Fak., 1980.
3. Gökalp, H.Y., Kaya, M., Zorba, Ö., Et Ürünleri İşleme Müh. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, Yay. No.320. 1994. 561 Sayfa.
4. Geisen, R., Lücke, F.K., Krockel, L., Starter and protective cultures for meat and meat products. Fleischwirtsch. 72, 894-895. 1992.
5. Gilliland, S.E., Bacterial Starter Cultures for Foods, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA. 1986.
6. Knauf, H.J., Hammes, W.P., Starters in the processing of meat products. Meat Sci., 36,155-168, 1994.
7. Lewus, C.B., Kaiser, A., Montville, T.J., Inhibition of food-borne bacterial pathogens from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Env. Microbiol., 57, 1683-1687, 1991.
8. Lücke, F.K., Microbiological process in the manufacture of dry sausage and raw ham. Fleischwirtsch., 66, 1505-1509, 1986.
9. Harlender, S.K., Spelhaug, S.R., Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins form Lactococcus lactis and Pediococcus pentosaceus. J. Food Protect., 52, 856-862. 1989.
10. Juven, B.J., Meinersmann, R.J., Stern, N.J., Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonisation by human enteropathogenes in live poultry. J. Appl. Bacteriol., 70, 95-103, 1991.
11. Klaenhammer, T.R., Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochem. 70, 337-349, 1988.

12. Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Env. Microbiol., 57, 1829-1834, 1991.
13. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., Purification characterisation and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J.Appl. Bacteriol. 65, 261-268, 1988.
14. Berry, E.D., Lieven, R.W., Mandigo, R.W., Hutkins, R.W., Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semi-dry sausage. J. Food Protect. 54, 194-197, 1990.
15. Motlagh, A.M., Johnson, M.C., Ray, B., Viability loss of foodborne pathogenes by starter culture metabolites. J. Food Protect. 54, 873-878, 1991.
16. Aşkar, M., 1996. Bazı Fermente Et Ürünlerinden İzole Edilen *Pediococcus* Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi ve Yeni Bir Metotla Bakteriosinin Kısmi Pürifikasyonu İle Aktivitesinin Tesbiti. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniv. Fen Edebiyat Fak., Biyoloji Bölümü, 1996.
17. Karahan, A.G., *Streptococcus diacetylactis*'den Yüksek Düzeyde Diasetil Oluşturan Mutantların Eldesi ve Bunların Doğal Suşa Oranla Faj Duyarlıklarının Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Ziraat Fak., 1992.
18. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th. Edition. Williams and Wilkins Co. Baltimore, USA. 1994.
19. Toksoy, A., *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniv. Fen Edebiyat Fak., Biyoloji Bölümü, 1996.
20. Türker, I. : Laboratuvar Tekniği, Ankara Üniv., Ziraat Fak. Yayınları, No:1237, 380 s. 1992.
21. Walter, A.P., Herman, B.W., Determination of hydrogen peroxide in small concentrations. Analytical Chem., 21, 1279-1280, 1949.
22. Lee, B.H., Simard, R.E., Evaluation of methods for detecting the production H₂S, volatile and greening by Lactobacilli. J. of Food Sci., 49, 981-983, 1984.
23. Reinhamier, J.A., Demkow, M.R., Condioti, M.C., Inhibition of coliform bacteria by lactic acid cultures. The Aust. J. Dairy Technol., 2, 5-9, 1990.
24. Aslım, 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.
25. Johanson, R.Y., Ray, B., Novel method to extract large amount of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. microbiol., 58, 3355-3359, 1992.
26. Akbari, M., Beyatlı, Y., *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Gazi Üniv. Fen Bilim. Enstit. Derg. 9, 139-148, 1996.
27. Develi, N., Gürgün, V., Sucuklarda starter kültürlerin *Clostridium perfringens*'in gelişimi üzerine etkisi. KÜKEM Dergisi, 12,16-17, 1989.
28. Acton, J.C., Dick, R.L., Norris, E.L., Utilization of various carbohydrates in fermented sausage. J. Food Sci., 42, 174-178, 1977.
29. Tandler, K., The use of sugar substances in the manufacture of salami-type sausages (in German). Fleischw. 43, 804, 1963.
30. Coretti, K., Tandler, K., Effect of sugar addition on the quality of dry sausages (in German). Fleischw. 45, 1058, 1965.
31. Urbaniak, L., Pezacki, W., The lactic acid forming microflora of dry sausages and the technology determined changes it undergoes (in German). Fleischw. 55, 229, 1975.
32. Raccach, M., Baker, R.C., Formation of hydrogen peroxide by meat starter cultures. J. Food Prot., 41,798-799,1978.
33. Fernandes,C.F., Shahani, K.M., Amer, M.A., Therapeutic role of dietary Lactobacilli and Lactobacillic fermented products. FEMS Microbiology Reviews, 46,343-335, 1987.
34. 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 colour and odor of aseptically prepared vacum packaged round steaks. J. Food Protect., 52,384-387, 1983.
35. Sharpe, M.E., Franklin, J.G., Production of hydrogen sulfide by Lactobacilli with special refrence to strains isolated from cheese. 8 th. Int. Coba Microbiol., 56 (Absts), 1962.
36. Ray, B.A., Johnson, M.C., Processing of prepediocin in *P.acidilactici* . FEMS Microbiol. Rev. 12,119, 1993.
37. Graciela, M.V., Aida, P., Ruiz, H., Guillermo, O., Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausages. J. Food Protect., 52, 787-789, 1989.
38. Daly, C., Sandine, W.E., Elliker, P.R., Control of *S.aureus* in sausage by starter cultures. J. Food Sci., 38, 462-430,1973.
39. Gonzales, C.F., Kunka, B.S., Plasmid associated bacteriocin production and succrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2534-2538, 1987.