

TÜRK FERMENTE SUCUĞUNDAN İZOLE EDİLEN LAKTOBASİLLERİN BAZI BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Haydar ÖZDEMİR¹
İrfan EROL²

T. Haluk ÇELİK¹
Ahmet YURTYERİ³

Some physiological and biochemical characterization of lactobacilli
isolated from Turkish fermented sausage (Sucuk)

Summary: *This study was undertaken to determine of some biochemical and physiological properties of lactobacilli isolated from Turkish fermented sausage (sucuk). Among the total of 140 lactobacilli strains were isolated and identified as 92.1 % L. sake, 7.1 % L. curvatus and 0.7 % L. carnis. The melibiose and sucrose fermentation and arginine hydrolysis were determined as the important tests of the differentiation between L. sake and L. curvatus.*

Özet: *Bu çalışma, Türk fermente sucuğundan izole edilen laktobasillerin bazı biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin saptanması amacıyla yapıldı. İzole edilen toplam 140 adet laktobasil suşundan %92.1'i L. sake, %7.1'i L. curvatus ve %0.7'si L. carnis olarak tanımlandı. L. sake ve L. curvatus'un ayırımında melibiyoz ve sakkaroz fermentasyonu ile arjinin hidrolizinin önemli test oldukları saptandı.*

Giriş

Fermente sucuklarda laktobasillerin bulunuşu ve bunların olgunlaşma üzerine etkilerini araştıran bir çok araştırmacı (2, 3, 11, 12, 20, 21, 24) fermente sucuklarda floranın genelde streptobakteri grubunda bulunan laktobasiller tarafından oluşturulduğunu, florada heterofermentatif laktobasillerden özellikle *L. viridescens*'in bulunduğunu, termobakteri grubundaki laktobasillerin florada bulunmadığını ve streptobakteri grubunda bulunan *L. sake* ile *L. curvatus*'un (atipik streptobakteri) dominant florayı oluşturduğunu bildirmektedirler.

Laktobasiller, fermente sucuklarda oluşturdukları laktik asit ile pH'nın düşmesini ve buna bağlı olarak da aside duyarlı mikroorganizmaların gelişmesini baskırlar. Laktobasiller ayrıca sucuğun dilimlenebilir yapı kazanmasına, olgunlaşma süresinin kısaltılmasına ve indirekt olarak da renk oluşumuna katkıda bulunurlar (4, 8, 14, 17, 18, 28, 30).

Bazı araştırmacılar (15, 16, 27) laktik asit bakterilerinin oluşturduğu, değişik metabolizma

ürünlerinden sitrik asit, H₂O₂, bakteriyosin ve antibiyotikler ile florada bulunan arzu edilmeyen mikroorganizmalar ve patojenlerin gelişiminin baskılandığını bildirmişlerdir.

Laktobasillerin sucuklarda olumlu etkilerinin yanısıra, olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Özellikle bir çok laktobasil türü tarafından oluşturulan H₂O₂, sucuklarda renk hatalarına neden olmaktadır. Yine heterofermentatif laktobasiller tarafından oluşturulan CO₂, etanol ve sitrik asit sucuklarda lezzet ve aroma hatalarına neden olmaktadır (9, 19, 22).

Bu çalışma Türk fermente sucuğundan izole edilen ve olgunlaşmada büyük önem taşıyan laktobasil türlerinin bazı fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin saptanması amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metot

Sucuk Numunelerinin Hazırlanması: Bu çalışmada, A.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Et Ünitesin-

1 Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim dalı, 06110-Ankara.

2 Doç. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 06110-Ankara.

3 Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 06110-Ankara.

de üretilen sucuklar materyal olarak kullanıldı. Bu amaçla Türk fermente sucuğu yapım tekniğine göre (1, 6) hazırlanan 7 kg sığır eti ve 2 kg sığır böbrek yağı karışımına 55 gr kırmızı biber, 50 gr karabiber, 85 gr kimyon, 45 gr glikoz-sakkaroz (1:1), 120 gr sarımsak ve 225 gr nitrit içeren tuz (%0.5) ilave edilerek sucuk hamuru hazırlandı. Hazırlanan sucuk hamuru sentetik kılıflara doldurularak 20°C de, %98-75 nisbi rutubette ve 0.4-0.8 m/sn hava akımında 7 gün süreyle fermentasyona bırakıldı. Fermentasyonu takiben sucuk numuneleri 16±2°C de, %65-70 nisbi rutubette 21. güne kadar kurutularak olgunlaştırıldı.

Numunelerin Mikrobiyolojik Analizlere Hazırlanması: Olgunlaşma periyodunun 0., 2., 5., 7., 14. ve 21. günlerinde aseptik koşullarda alınarak laboratuvara getirilen sucuk numunelerinden, 10'ar gram steril plastik torbalara konularak üzerine 90'ar ml steril peptonlu su (%0.1) ilave edildi ve karışım stomacherde yaklaşık 3 dakika süreyle homojenize edildi (2, 31).

Laktobasillerin İzolasyon ve İdentifikasyonu: Sucuk numunelerinin 10⁸'e kadar hazırlanan desimal dilusyonları, laktobasillerin izolasyonu için MRS (Merck Art. Nr. 10660) agara ekilerek, plaklar 30°C de, anaerob ortamda (BBL- gaspak veya karbondioksitli etüvde %10 CO₂) 3-5 gün süreyle inkübe edildi (2, 5, 13). MRS agarda üreyen tek kolonilerden önce MRS buyyona (Merck-Art. No. 10661) geçildi ve 30°C de 24 saat süreyle anaerob ortamda inkübe edildi. Sonra Gram reaksiyonu için boyama yapıldı ve faz kontrast mikroskopta bakılarak kolonilerin saflıkları ve hücre morfolojileri incelendi. Saf olarak belirlenen koloniler, tekrar MRS buyyona geçilerek katalaz testi uygulandı. Daha sonra Gram (+), katalaz (-), kokoid ve çomak şeklindeki koloniler laktobasil olarak ayrıldı. Bu koloniler bazı araştırmacıların (2, 3, 13, 20, 23, 26) bildirdiği karbonhidrat fermentasyon testleri, gaz oluşumu, arjinin hidrolizi, sakkarozdan dekstran oluşumu, Voges-Proskauer, pH 3.9'da üreme, 4°C, 15°C ile 45°C'lerde ve %7.5-10 tuz konsantrasyonunda üreme yetenekleri yönünden test edilerek identifiye edildi.

Karbonhidrat fermentasyon testleri, içerisinde glikoz ve et ekstraktı bulunmayan ancak %0.004 oranında klorfenolred ile %1 düzeyinde test edilen karbonhidratları içeren MRS buyyonda yapıldı (2, 25, 26). Glikozdan gaz oluşumu sitrat bulunmayan ve içerisinde durheim tüpleri bulunan MRS buyyonda yapıldı (25, 26). Arjinin hidrolizi, içerisinde glikoz ve et ekstraktı bulunmayan, %0.3 oranında arjinin ve %0.2 oranında sodyum sitrat bulunan MRS buyyonda yapıldı ve amonyak oluşumu Nessler

ayırıcı ile saptandı (26). Sakkarozdan dekstran oluşumunun saptanmasında, içerisinde glikoz yerine %5 oranında sakkaroz bulunan MRS agar kullanıldı (2, 26). Asetoin oluşumu Voges-Proskauer testi ile MRS buyyonda yapıldı (23). Değişik tuz konsantrasyonunda üreme yeteneklerinin saptanmasında, içerisinde %7.5 ve %10 oranında tuz bulunan MRS buyyon kullanıldı (2, 25, 26). Değişik ısı derecelerinde (4°C, 15°C, 45°C) üreme yeteneklerinin saptanması için MRS buyyon kullanıldı (2, 25, 26). pH 3.9 da üreme yeteneklerinin saptanmasında, pH değeri HCl ile 3.9'a ayarlanmış MRS buyyon kullanıldı (26).

Bulgular

Bu çalışmada izole edilen toplam 140 adet laktobasil suşundan %92.1'i *L. sake*, %7.1'i *L. curvatus* ve %0.7'si *L. camis* olarak identifiye edildi. İzole edilen tüm suşlar Gram (+), katalaz (-), kokoid ve çomak formunda görüldü. *L. sake* olarak identifiye edilen suşlar, faz kontrast mikroskopta, genelde kısa, ikili ve dördü, iç bükey, kokoid ve çomak formunda görülmüştür. *L. curvatus* suşları ise, *L. sake* ile benzer morfolojik yapıda olmasına karşın daha iç bükey formda görülmüştür. *L. camis* ise, genelde kısa, tekli ve çomak formda görülmüştür. Bu çalışma çerçevesinde izole edilerek A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ ve A₆ olarak adlandırılan suşlar *L. sake*, A₇ ve A₈ olarak adlandırılan suşlar *L. curvatus* ve A₉ olarak adlandırılan suş ise *L. camis* olarak identifiye edilmişlerdir. İdentifiye edilen suşların biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri tabloda gösterilmiştir.

Tabloda görüldüğü üzere identifiye edilen tüm suşlar glikozdan gaz oluşturmamış (homofermentatif), pH 3.9'da, 4°C ve 15°C'de üremelerine karşın, 45°C'de üreme göstermemişlerdir. *L. sake*, *L. curvatus* ve *L. camis* suşları %7.5 tuz konsantrasyonunda iyi derecede üreme göstermelerine karşın, %10 tuz konsantrasyonunda zayıf derecede üreme göstermişlerdir. Yine identifiye edilen *L. sake* suşlarının %17'si sakkarozdan dekstran ve %23'ü asetoin oluştururken, *L. curvatus* suşlarının %10'u dekstran ve asetoin oluşturmuştur.

L. sake suşları, *L. curvatus* suşlarına oranla daha geniş bir karbonhidrat spektrumuna sahip olup, bazı karbonhidratları (melibiyoz, mannoz, riboz, sakkaroz, trehaloz, melesitoz) 18-24 saat içerisinde fermente etmelerine karşın, bazı karbonhidratları (salisin, laktoz, sellobiyoz, ramnoz) daha geç zamanda fermente etmişlerdir.

L. curvatus suşları ise *L. sake* suşlarının aksine melibiyoz ve sakkarozu fermente etmiş ve bu iki karbonhidrat testi, *L. curvatus*'un

İdentifiye Edilen Laktobasillerin Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikleri.
Biochemical and Physiological Characterization of the Identified Laktobacilli.

	L. sake						L. curvatus		L. carnis
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9
Riboz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mamitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Melibiyoz	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Sellobiyoz	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinoz	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Laktoz	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Trehaloz	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnoz	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Salisin	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Eskulin	-	+	+	-	+	-	+	+	+
Melesitoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4°C Üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15°C Üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C Üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%7.5 tuz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%10 tuz	±	±	±	±	±	±	±	±	±
pH 3.9	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ : Pozitif reaksiyon, - : Negatif reaksiyon, ± : Zayıf reaksiyon
+ : Positive reaction, - : Negative reaction, ± : Slightly reaction

L. sake'den ayrıntıda tipik olarak gözlenmiştir.

Yine izole edilen tüm L. sake suşları, L. curvatus suşlarının aksine arjinini hidrolize etmişlerdir.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma kapsamında izole ve identifiye edilen laktobasillerin tür bazında florada bulunma oranları ve dağılımına ait bulgular, bu konuda çalışan araştırmacıların (3, 11, 12, 20, 26) bulgularını teyit eder niteliktedir. Bu çalışmada pH 5.4'ün üzerinde iken izole edilen L. carnis, fermentasyonun ilerleyen günlerinde pH'nın 5.0'in altına düşmesine bağlı olarak, florada izole edilebilme düzeyinin ($<2.0 \times 10^2$) altında kalmıştır. Nitekim Comi ve ark. (3) pH'nın hızla 5.0'in altına düştüğü sucuklarda L. carnis

gibi aside duyarlı laktobasillerin florada gelişemediğini bildirmişlerdir.

Gürakan (7) Türk fermente sucuklarından izole ettiği toplam 31 adet laktobasil türünden 12'sini L. sake, 10'unu L. alimentarius, 4'ünü L. curvatus, 3'ünü L. plantarum ve 2'sini L. brevis olarak identifiye etmiştir. Bu çalışmada identifiye edilen A₁ ve A₄ suşları, Gürakan'ın (7) G₂ ve G₅ suşları ile benzer özelliktedir.

Bantleon (2) yaptığı çalışmada farklı biyokimyasal ve fizyolojik özelliklere sahip 13 değişik L. sake suşu ile 6 değişik L. curvatus suşu bulunduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ ve A₆ olarak adlandırılan L. sake suşları, sırasıyla Bantleon'un (2) Ls₂, Ls₄, Ls₆, Ls₇, Ls₉ ve Ls₁₀ suşlarıyla benzer özellikte bulunurken, A₈ suşu Bantleon'nun (2) Lc₂ suşuyla

benzerlik göstermektedir. İzole edilen *L. sake*'nin değişik suşlarının 45°C'de üreme göstermemesi, bazı araştırmacıların (10, 20, 23) bulgularıyla benzerlik göstermesine karşın, bazı araştırmacılar (3, 11) identifiye ettikleri *L. sake* suşlarından çok azının 45°C'de üreyebildiklerini bildirmişlerdir. Yine Schillinger ve Lücke (26), identifiye ettikleri *L. sake* suşlarının %87'sinin, *L. curvatus* suşlarının ise %77'sinin 45°C'de ürediklerini bildirmişlerdir. Bu farklılığın muhtemelen identifiye edilen suşların farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada izole edilen *L. sake* suşlarının *L-arabinozu* fermente etme yetenekleri farklılık göstermesine karşın, Stetter ve Stetter (29), *L. sake*'nin *L-arabinozu* fermente etmediğini bildirmişlerdir. Ancak bir çok araştırmacı da (2, 3, 11, 12, 26) *L. sake*'nin *L-arabinoza* karşı değişik reaksiyon gösterdiğini bildirmiştir. *L. sake*'nin *L. curvatus*'tan ayırımında önemli bir karbonhidrat fermentasyon testi olan melibiyoz ile sakkaroz, *L. sake* tarafından fermente edilmesine karşın, *L. curvatus* tarafından fermente edilmemiştir. Nitekim bazı araştırmacılar da (3, 11, 12, 26) bu iki karbonhidrat fermentasyon testinin *L. sake*'nin, *L. curvatus*'tan ayırımında önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Yine bu çalışmada identifiye edilen *L. sake* suşları arjinini hidrolize etmelerine karşın, *L. curvatus* suşları arjinini hidrolize etmemiştir. *L. sake* suşlarının tümünün arjinini hidrolize etmesi bazı araştırmacıların (11, 25) bulgularını teyit etmektedir. Identifiye edilen *L. sake* ve *L. curvatus*'un aseton oluşturma özellikleri değişik araştırmacıların (11, 23, 26) bulguları ile uyum içerisindedir.

Bu çalışmada identifiye edilen *L. sake*'nin değişik suşları içerisinde florada en fazla A₁, A₃ ve A₅ suşları bulunmuş olup, diğer suşlara nadiren rastlanmıştır. Sonuç olarak 20°C'de, %98-75 nisbi rutubette ve 0.4-0.8 m/sn hava akımında 7 gün süreyle fermente edilerek, 16±2°C'de ve %65-70 rutubette kurutularak oluşturulan Türk fermente sucuklarında, *L. sake*'nin dominant grubu oluşturduğu ve *L. sake*'nin A₁, A₃ ve A₅ suşlarının florada dominant olduğu ve bu suşların muhtemelen olgunlaşmada etkin rol oynadıkları görüşüne varılmıştır.

Kaynaklar

1. Anon. (1973). *Sucuk Yapım ve Üretimi*. 1. Bölüm Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü Yönetmelik Sıra No: 33, Ankara.
2. Bantleon, A. (1987). *Lactobacillus sake* und *Lactobacillus curvatus* als Starterkulturorganismen für die Rohwurstreifung. Diss rer nat., Uni. Hohenheim.
3. Comi, G., Manzano, M., Citterio, B., Bersani, C., Cantoni, C und Bertoldi, M. (1993). *Physiologische Charakterisierung und Entwicklung von Laktobazillen*. Fleischwirtsch 73, 1312-1318.
4. Coretti, K. (1973). *Warum interessiert den Praktiker die Mikrobiologie der Rohwurstreifung?* Fleischwirtsch. 53, 907-911.
5. De Man, J.C., Rogosa, M and Sharpe, M.E. (1960). *A medium for the cultivation of lactobacilli*. J Appl Bacteriol 23, 130-135.
6. Erol, I. (1991). *Der Einfluß von Starterkulturen auf das Wachstum pathogener Keime in türkischer Rohwurst*. Diss Vet Med FU Berlin.
7. Gürakan, G.C. (1991). *Characterization of lactobacilli and staphylococci isolated from turkish dry sausages*. Doktora tezi ÖDTÜ, Gıda Müh Fak Ankara.
8. Hammes, W.P., Bantleon, A. and Min, S. (1990). *Lactic acid bacteria in meat fermentation*. FEMS Microbiol Reviews 87, 165-174.
9. Hechelmann, H. (1986). *Mikrobiell verursachte Fehlfabrikate bei Rohwurst und Rohschinken*. Fleischwirtsch 66, 515-528.
10. Hitchener, B.J., Egan, A.F. and Rogers, P.J. (1982). *Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum packed beef*. J Appl Bacteriol 52, 31-37.
11. Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T. and Monfort, J. M. (1993). *Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages*. Int J Food Microbiol 18, 107-113.
12. Kagermeier, A. (1981). *Taxonomie und Vorkommen von Milch säurebakterien in Fleischprodukten*. Diss rer nat., Uni München.
13. Kandler, O. and Weiss, N. (1986). *Genus Lactobacillus*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. II. Eds. Sneath, P.H.A. and Holt, J.G., Williams and Wilkins Co. Baltimore.
14. Leistner, L. (1986). *Allgemeines über Rohwurst*. Fleischwirtsch 66, 290-300.
15. Lewus, B.C., Kaiser, A. and Montville, T.J. (1991). *Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat*. Appl Environ Microbiol 57, 1683-1688.
16. Lopez, L.B.F. and Fernandez, V.A.D. (1992). *Antibacterial activity of lactobacilli isolated from "Chorizo"*. Fleischwirtsch 72, 36-39.
17. Lücke, F.K. (1986). *Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken*. Fleischwirtsch 66, 302-309.
18. Lücke, F.K. und Hechelmann, H. (1986). *Starterkulturen für Rohwurst und Rohschinken*. Zusammensetzung und Wirkung. Fleischwirtsch 66, 154-166.
19. Lücke, F.K., Popp, J. und Kreutzer, R. (1986). *Bildung von Wasserstoffperoxid durch Laktobazillen aus Rohwurst und Brühwurstaufschnitt*. Chem Mikrobiol Technol Lebensmittel 10, 78-81.
20. Morishita, Y. and Shiromizu, K. (1986). *Characterization of lactobacilli isolated from meats and meat products*. Int J Food Microbiol 3, 19-29.

21. Reuter, G. (1967). *Atypische Streptobakterien als dominierende Flora in reifender und gelagerter Rohwurst*. Fleischwirtsch 47, 397-402.
22. Reuter, G. (1970). *Lactobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischwaren. 1. Mitteilung: Vorkommen und Bedeutung*. Fleischwirtsch 50, 951-954.
23. Reuter, G. (1970). *Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischwaren. 2. Mitteilung: Die Charakterisierung der isolierten Laktobazillenstämme*. Fleischwirtsch 50, 954-962.
24. Sanz, B., Selgas, D., Parejo, I. and Ordonez, A.J. (1988). *Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages*. Int J Food Microbiol 6, 199-205.
25. Schillinger, U. und Lücke, F.K. (1986). *Milchsäurebakterien-Flora auf vakuumverpacktem Fleisch und ihr Einfluß auf die Haltbarkeit*. Fleischwirtsch 66, 1515-1520.
26. Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1987). *Identification of lactobacilli from meat and meat products*. Food Microbiol 4, 199-208.
27. Schillinger, U. und Lücke, F.K. (1989). *Einsatz von Milchsäurebakterien als Schutzkulturen bei Fleischerzeugnissen*. Fleischwirtsch 69, 1581-1585.
28. Smith, L.J. and Palumbo, A.S. (1983). *Use of Starter Cultures in Meats*. J Food Prox 46, 997-1006.
29. Stetter, H. and Stetter, K.O. (1980). *Lactobacillus bavaricus sp. nov. a new species of the subgenus Streptobacterium*. Zentrabl Bacteriol Parasitenkd Infektionstr Hyg I Abt Orig C1 70-74.
30. Weber, H. (1993). *Zur Bedeutung sogenannter Schutzkulturen und deren Stoffwechselprodukten*. Fleischwirtsch 73, 726-733.
31. Yurteri, A., Mutluer, B., Erol, İ. ve Hildebrandt, G. (1993). *Beschaffenheit und Technologie von türkischer Rohwurst*. Fleischerei, (9) 725-730.