

**FERMENTE SUCUKLARDAN İZOLE EDİLEN *Pediococcus pentosaceus*
SUŞLARININ BAZI METABOLİK VE ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Özlem Turgay ERDOĞRUL* Ömer ÇETİN**
Özer ERGÜN**

**Studies on metabolic and antimicrobial activities of some
Pediococcus pentosaceus isolated from fermented sausage**

Summary: Total of 34 *Pediococci* were isolated from 7 different sausage samples from different retailers in Kahramanmaraş and the identification results showed that 4 (11.7%) isolates were *Pediococcus pentosaceus*. The amounts of lactic acid and H₂O₂ produced by the strains were in ranges 0.11-0.32% and 0.41-0.81 µg/ml.

The inhibitory effects of the bacteriocins and /or bactericin-like substances in the *Pediococcus pentosaceus* strains were determined on *Bacillus brevis* FMC 3, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Mycobacterium smegmatus* RUT, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* O:3 P 41797, using the agar diffusion method.

The results showed that strains produced different amounts of metabolic compounds and showed inhibition effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Özet: Kahramanmaraş piyasasında satılan 7 adet değişik marka sucuk örneğinden *Pediococcus* cinsine ait toplam 34 tür bakteri izole edilmiştir ve identifikasyon sonuçları bunlardan 4 tanesinin (%11.7) *Pediococcus pentosaceus* olduğunu göstermiştir. İdentifiye edilen suşların oluşturdukları laktik asit miktarları % 0.11-0.32 düzeyinde belirlenirken, H₂O₂ miktarları 0.41-0.81 mg/ ml arasında tespit edilmiştir.

Suşların genel inhibisyon etkileri ile bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri maddelerden kaynaklanan inhibisyon etkileri bazı gıda kaynaklı bakterilerin üzerinde *Bacillus brevis* FMC 3, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Mycobacterium smegmatus* RUT, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* O:3 P 41797 suşları üzerinde agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

* Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimleri Bölümü, Kahramanmaraş.

** İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Avcılar- İstanbul

Araştırma sonuçları *Pediococcus pentosaceus* suşlarının değişik miktarlarda asit ve H₂O₂ ürettiği ve kullandığımız test bakterilerinden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e inhibisyon etkilerinin olduğu tespit edilmiştir

Giriş

Ülkemizde fermente et ürünleri üretiminin önemli bölümünü fermente sucuklar oluşturmakta ve et ürünleri içindeki payı %42'ye kadar çıkmaktadır (1). Gelişmiş ülkelerde fermente et ürünleri üretimi entegre tesislerde yapıldığı gibi, üretimde starter kültür kullanılmaktadır. Starter kültürlerin kullanımları ile, standart ve kaliteli ürünler elde edilmektedir. Et ürünlerinde son 25 yıldır özellikle de son 10 yıldır starter kültürler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (6). Bu ürünlerin üretiminde kullanılan starter kültürler; *Lactobacillus plantarum*, *L. sake*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* ve *P. pentosaceus*'un uygun kombinasyonlarını içerir (2, 9). Laktik kültürlerin dışında starter kültür olarak *Micrococcus* ve *Staphylococcus* cinsi bakteriler de kullanılmaktadır (2, 19).

Starter kültürlerin seçiminde bazı önemli kriterler bulunmaktadır. Bu kültürlerin kullanıldıkları ürünlerde çok hızlı ve uyum içerisinde, ürünün doğal mikroflorasını ve kalitesini bozmayacak, insan sağlığını tehdit etmeyecek şekilde işlev göstermeleri gerekmektedir. Ayrıca starter kültürler patojen ve toksik olmamalı, antibiyotik üretmemeli, histamin ve hidrojen sülfür gibi aminleri indirgemelidir (2). Laktik asit bakterilerinin antagonistik etkileri onların birbirinden farklı birkaç biyokimyasal özelliğine bağlanmaktadır. Laktik asit bakterilerinin çoğu karbonhidratlardan laktik asit ve asetik asit gibi organik asitleri üretebilmektedir. Gıda kaynaklı patojen olan veya olmayan kontaminantların büyük bir kısmı bu asitlere ve dolayısıyla düşük pH değerlerine karşı hassastır (14, 16). Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından mikroaerofilik şartlarda üretilen H₂O₂ de birçok mikroorganizma üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir (12, 14). Ayrıca, laktik asit bakterilerinin antagonistik etkisinde diasetil'in (10, 14) ve CO₂'in etkili olabileceği belirtilmiştir (15). Laktik asit bakterilerinin antagonistik aktivitelerinin mekanizmaları hakkında son yıllarda üzerinde en fazla durulan bir diğer nokta da, bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri bileşiklerdir (10, 12, 14). Bazı *Pediococcus* bakterilerin pediosin olarak adlandırılan bakteriyosin ürettiği, bu maddenin protein yapısında olduğu ve gıda kaynaklı patojen ve spor oluşturan bakteriler ile kendi türlerine yakın bakterilerin de üremelerini inhibe ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (4, 5, 17).

Bu araştırmanın amacı, piyasada satışa sunulan birçok farklı markadaki sucuklardan *P. pentosaceus* suşlarını izole etmek ve oluşturdukları bazı metabolik ürünleri ve bunların antimikrobiyal aktivitelerini belirlemektir.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Kahramanmaraş piyasasında üretilen ve satışa sunulan 7 değişik markadaki fermente sucuk örnekleri kullanılmıştır.

Örneklerden *Pediococcus sp.* bakterilerini izole etmek amacıyla 10 gram alınıp 90 ml steril fizyolojik suda mikserle iyice karıştırılmıştır. Her bir örnekten uygun dilüsyonlar hazırlanıp Elliker Agar (Difco) besiyerine yayma plak yöntemiyle ekimler yapılmış ve plaklar 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Besiyerinde üreyen beyaz-şeffaf-gri renkli koloniler Elliker sıvı besiyerine aşılansak aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler mikroskopik olarak incelenmiş, çift ve tetrat şeklindeki bakteriler %10'luk litmuslu süte ekilerek 1.5 ml'lik Eppendorf tüpleri içerisinde -20°C'de muhafazaya alınmıştır (2, 20).

Bakterilerin İdentifikasyonları

İzole edilen bakterilerin identifikasyonlarında, bakterilerin morfolojik özellikleri belirlenmiş ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. *Pediococcus* bakterilerini diğer bakteri gruplarından ayırmak için anahtar testler olarak; izolatların tetrat 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. Ayrıca, izolatların homofermantatif olmaları ve arjininden amonyak oluşturmaları test edilmiştir. Bu testler sonucu *Pediococcus* bakterileri diğer bakteri gruplarından ayrılmıştır. *Pediococcus pentosaceus* suşlarını diğer *Pediococcus*'lardan ayırmak için, *P. pentosaceus*'un göstermiş olduğu fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanılmıştır. Bakterilerin bütün tanımlama testleri ve değerlendirmeleri genel identifikasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (3).

Suşların Asit Üretiminin Belirlenmesi

Suşların oluşturduğu asit miktarları %10'luk yağsız süt tozunda (Skim Milk) belirlenmiştir. Aktif kültürlerden %2 oranında besiyerine aşılansak, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve süre bitiminde suşların asit üretim oranları 0.1 N NaOH ile titrasyon yapılarak saptanmıştır (21).

Suşların Hidrojen Peroksit Üretiminin Belirlenmesi

Aktif kültürler %2 oranında Elliker Broth besiyerine inoküle edilip, 37°C'de 24 saat inoküle edilmiştir. Suşların oluşturduğu hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarları Spektrofotometrik yöntemle 400 nm'de µg/ml olarak tespit edilmiştir (22).

Suşların Test Bakterileri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan, *Bacillus brevis* FMC 3, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Mycobacterium smegmatus* RUT, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica*, O:3 P 41797, *Pediococcus pentosaceus* suşlarının indikatör bakteriler üzerine olan genel inhibisyon etkileri agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Aktif *Pediococcus* suşları 10 ml'lik yağsız süt tozundan (%10) hazırlanan besiyerine %2 oranında inoküle edilip, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde besiyeri 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip, berrak kısım 0.45 µm'lik membran filtreden süzölmüştür.

Test bakterileri Nutrient Broth ve *P. pentosaceus* suşları Elliker Broth'da aktifleştirilmiştir. *Pediococcus* suşlarının inhibisyon etkisini test etmek için indikatör bakteriler içeren agarlı besiyerine açılmış kuyucuklara 100 µl kültürümüzden doldurulmuş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (18).

Bakteriyosin ve Benzeri Maddelerin Etkisinin Belirlenmesi

İzole edilen *Pediococcus* suşlarının bakteriyosin üretimleri oksijensiz ortamda tespit edilip, %0.02 şeker içeren Elliker Broth besiyerine %2 oranında *Pediococcus pentosaceus* 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 dakika santrifüj edilip, 1/5 oranını da 5 nM sodyum fosfatla, pH 6 da yıkanmıştır. Daha sonra pH 2'de 0.1 M steril NaCl ile işleme tabi tutularak 4°C'de 2 saat karıştırılmış ve 29.000 rpm de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Hücreler pH 5'de, 5 mM sodyum fosfat işlemine tabi tutulmuş (11) ve elde edilen süpernatantın test bakterileri üzerine olan inhibisyon etkisi daha önce açıklanan genel inhibisyon yöntemine göre tespit edilmiştir (18).

Bulgular

Çalışmada fermente sucuklardan toplam 34 adet *Pediococcus* cinsi izole edilmiştir. İdentifikasyon analizleri neticesinde 4'ünün (%11.7) *Pediococcus pentosaceus* olduğu tespit edilmiştir. *P. pentosaceus* suşlarının asit, hidrojen peroksit ve hidrojen sülfür üretimleri gözlenmiştir. Suşların asit miktarları 0.11-0.32 arasında bulunmuştur. Bu suşların hidrojen peroksit miktarları 0.41-0.81 (µg/ml) arasında tespit edilmiş olup bulgular Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. *Pediococcus pentosaceus* suşlarının oluşturduğu laktik asit, H₂O₂ miktarları

Suş No	% Asitlik	H ₂ O ₂ (µg/ml)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1	0.11	0.53
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	0.14	0.41
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 3	0.32	0.81
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 4	0.29	0.80

P. pentosaceus suşlarının test bakterileri üzerine olan genel inhibisyon etkisi sadece *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'a karşı (1 cm) gözlenmiş olup bulgular Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Etlerin fermente olması sırasında starter kültürlerin en önemli işlevlerinden biri, etin mikroflorasında bulunan bazı gıda kaynaklı patojen ve kontaminant bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermesidir. Starter bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Starter kültürlerin oluşturdukları antimikrobiyal etki

Çizelge 2. *Pediococcus pentosaceus* suşlarının oluşturduğu inhibisyon etkileri (çap/mm)

Suş No	<i>B.brevis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Mic. luteus</i>	<i>Myco.smegmatus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Y.enterocolitica</i>
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	10	-
4	-	-	-	-	-	-	-

gösteren metabolitler; laktik asit, H₂O₂, H₂S, vb maddeler ve bakteriyosin ve benzeri maddelerdir (14).

Fermente et ürünlerinde bazı starter kültür bakterileri tarafından üretilen hidrojen peroksit, etlerde hoş gitmeyen renk, tat ve koku oluşturması nedeniyle arzu edilmeyen bir üründür. Ancak hidrojen peroksidin birçok patojen ve patojen olmayan mikroorganizma üzerine antimikrobiyal etkisinin varlığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (7, 8). Bu çalışmada da *P. pentosaceus* suşlarının H₂O₂ üretimleri 0.41-0.81 µg/ml bulunmuştur.

Bu çalışmada *P. pentosaceus* suşlarının bakteriyosin ve benzeri madde üretimleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan, bir suşun test bakterilerinden *Staphylococcus aureus* üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Bir çalışmada 16 adet farklı *Pediococcus* bakterisinden yalnız iki adetinin (Bac+), diğerlerinin (Bac-) olduğu bildirilirken bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin sucuk gibi fermente et ürünlerinin üretiminde kullanılması ile mikrobiyolojik açıdan daha güvenilir ürünler elde etmenin mümkün olabileceği bildirilmiştir (13).

Araştırmaların sonuçları değerlendirildiğinde, *P. pentosaceus* suşlarının genelde orta derecede laktik asit ürettikleri hidrojen peroksit üretimlerinin düşük olduğu bulunmuştur. Suşların, patojen ve patojen olmayan kontaminantları bakteriler üzerine olan antagonist etkilerinin ise farklı derecelerde olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile, ülkemizdeki sucukların *P. pentosaceus* suşları yönünden durumları incelenmiştir. Bulgular, fermente et ürünleri üretiminde denenmekte olan *P. pentosaceus* suşlarının starter kültür olarak kullanımı üzerinde ileride yapılacak çeşitli çalışmalara bir katkı sağlayabilecektir.

Kaynaklar

1. Anonim (1991): Türkiye'de üretilen et ürünleri miktarı: 1990 yılı üretimi. SETBİR Haber Bülteni, 3, 25.
2. Aşkar, M., Aslım, B., Beyatlı, Y. (1999): Et ürünlerinden izole edilen *Pediococcus acidilactici* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Tr. J. Veterinary and Animal Sciences, 23, (3): 467-474.

3. **Barrow, G. I., Feltham, R. K. A. (1993):** Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. Third Edition, Printed in Great Britain at the Univ. Press Cambridge ISBN 0 521 32611, 7, 331 pages.
4. **Berry, E. D., Lieven, R. W., Mandigo, R. W., Hutkins, R. W. (1990):** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semi-dry sausage. *J. Food Protect.*, 54: 194-197.
5. **Bhunja, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. (1988):** Purification characterisation and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, 65: 261-268.
6. **Erdoğan, Ö. T. (1998):** Et ve süt ürünlerinde kullanılan starter kültürler. Celal Bayar Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Dergisi, ISSN 1301-2428, s. 127-130.
7. **Fernandes, C. F., Shahani, K. M., Amer, M. A. (1987):** Therapeutic role of dietary Lactobacilli and Lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiology Reviews*, 46: 343-356.
8. **Geisen, R., Lücke, F. K., Krockel L. (1992):** Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch.*, 72: 894-895.
9. **Gökalp, H. Y., Kaya, M., Zorba, Ö. (1994):** Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, No. 320, s: 561.
10. **Harlender, S. K., Spelhaug, S. R. (1989):** Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins form *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Protect.*, 52: 856-862.
11. **Johanson, R. Y., Ray, B. (1992):** Novel method to extract large amount of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3355-3359.
12. **Juven, B. J., Meinersmann, R. J., Stern, N. J. (1991):** Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonisation by human enteropathogenes in live poultry. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 95-103.
13. **Klaenhammer, T. R. (1988):** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochem.*, 70: 337-349.
14. **Lewis, C. B., Kaiser, A., Montville, T. J. (1991):** Inhibition of food-borne bacterial pathogens by lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Env. Microbiol.*, 57: 1683-1687.
15. **Lücke, F. K. (1986):** Microbiological process in the manufacture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtsch.*, 66: 1505-1509.
16. **Mortvedt, C. I., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F. (1991):** Purification an amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L. 45. *Appl. Env. Microbiol.*, 57: 1829-1834.
17. **Motlagh, A. M., Johnson, M. C., Ray, B. (1991):** Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Protect.*, 54: 873-878.
18. **Reinhamier, J. A., Demkow, M. R., Condioti, M. C. (1990):** Inhibition of coliform bacteria by lactic acid cultures. *Aust. J. Dairy Technol.*, 2: 5-9.
19. **Smith, J. L., Palumbo, S. A. (1983):** Use of starter cultures in meat. *J. Food Protect.*, 46: 997-1006.
20. **Toksoy, A., Beyatlı, Y. (1999):** Bazı Laktik asit bakterilerinin antagonistik ilişkileri üzerine bir araştırma. *Gıda*, 24 (4): 269-275.
21. **Türker, I. (1992):** Laboratuvar Tekniği. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, No: 1237, S. 380.
22. **Walter, A. P., Herman, B. W. (1949):** Determination of hydrogen peroxide in small concentrations. *Analytical Chem.*, 21: 1279-1280.