



**YEREL *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SUŞLARININ  
ANTAGONİSTİK AKTİVİTELERİ İLE TEKNOLOJİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE FERMENTE  
SUCUK ÜRETİMİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN  
GELİŞİMİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Aybike KAMILOĞLU**

**Doktora Tezi**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Prof. Dr. Mükerrrem KAYA**

**2016**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

YEREL *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SUŞLARININ  
ANTAGONİSTİK AKTİVİTELERİ İLE TEKNOLOJİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE FERMENTE SUCUK  
ÜRETİMİNDE *Listeria monocytogenes*'İN GELİŞİMİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aybike KAMILOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM  
2016

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**YEREL *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SUŞLARININ ANTAGONİSTİK AKTİVİTELERİ İLE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE FERMENTE SUCUK ÜRETİMİNDE *Listeria monocytogenes*' İN GELİŞİMİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Mükerrerem KAYA danışmanlığında, Aybike KAMILOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 30/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Mustafa AKÇELİK

İmza:

Üye: Prof.Dr. M.Yekta GÖKSUNGUR

İmza:

Üye: Prof.Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza:

Üye: Prof.Dr. Mükerrerem KAYA

İmza:

Üye: Prof.Dr.Güzin KABAN

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 06/10/2016 tarih ve 38/34 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ**  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Doktora Tezi

### YEREL *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SUŞLARININ ANTAGONİSTİK AKTİVİTELERİ İLE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE FERMENTE SUCUK ÜRETİMİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN GELİŞİMİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aybike KAMILOĞLU

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mükerrerem KAYA

Araştırmada sucuktan izole edilen ve fenotipik olarak tanımlanan beş *Lactobacillus plantarum* suşu genetik identifikasyona tabi tutulmuş ve teknolojik özellikler yönünden incelenmiştir. Ayrıca *L. plantarum* suşlarının fermente sucuk üretiminde *Listeria monocytogenes*'in gelişimine etkileri araştırılmıştır. *L. plantarum* suşları 16s rRNA dizi analizi sonucunda *L. plantarum* (S50, S51, S72, S74 ve S85) olarak doğrulanmıştır. Beş *L. plantarum* suşu da kuyu difüzyon testinde *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus*'a karşı farklı düzeylerde antagonistik aktivite göstermiştir. Suşlar 25°C'de 15°C'ye göre daha iyi bir çoğalma göstermiştir. Suşların %6,5 NaCl varlığında, 4,5-6,5 pH aralığında da gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Suşların lipolitik ve proteolitik özelliğe sahip olmadığı, lizin, ornitin ve arginin dekarboksilaz aktiviteleri göstermediği de belirlenmiştir. Diğer taraftan sadece iki *L. plantarum* suşunun zayıf nitrat redüktaz aktivitesi gösterdiği, dört *L. plantarum* suşunun ise glukozdan asetoin oluşturduğu ve tüm suşların DL- laktik asit ürettiği saptanmıştır. Suşların ürettiği antimikrobiyal maddelerin ise farklı sıcaklık ve enzim uygulamalarında farklı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca *L. plantarum* suşlarının genomik DNA'larında bakteriyosin üretiminden sorumlu *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnI*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* genlerinin varlığı da tespit edilmiştir. Suşlarda bakteriyosin benzeri metabolit üretiminin log fazında başladığı, durma fazında ise maksimuma ulaştığı belirlenmiştir. Fermente sucuk üretimi ile ilgili denemelerde ise fermentasyonun birinci gününde *L. plantarum* suşu inoküle edilmeyen kontrol grubunda *Listeria monocytogenes*'in geliştiği, *L. plantarum* suşlarının varlığında ise sayıda redüksiyon olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaştırma sonunda ise *L. monocytogenes* sayısında en fazla redüksiyonun *L. plantarum* S50'nin varlığında gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

2016, 88 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Antagonistik aktivite, *Lactobacillus plantarum*, bakteriyosin benzeri metabolit, *Listeria monocytogenes*, sucuk.

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### DETERMINATION OF ANTAGONISTIC ACTIVITIES AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF AUTOCHTHONOUS *LACTOBACILLUS PLANTARUM* STRAINS AND INVESTIGATION OF THEIR EFFECTS ON *LISTERIA MONOCYTOGENES* GROWTH IN FERMENTED SUCUK PRODUCTION

Aybike KAMILOĞLU

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mükerrerem KAYA

In this research, five *Lactobacillus plantarum* strains, isolated from sucuk and phenotypically identified, were subjected to genetic identification and examined in terms of technological properties and antagonistic activities. Furthermore, effects of *L. plantarum* strains on growth of *L. monocytogenes* in fermented sucuk production were investigated. According to results of 16s rRNA sequence analyses all *L. plantarum* strains were confirmed as *L. plantarum* (S50, S51, S72, S74 and S85). Five *L. plantarum* strains showed antagonistic activity against each of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* at different levels in well diffusion test. Strains showed better growth at 25°C than at 15°C. It was found that strains can grow at the existence of 6,5% NaCl as well as between a pH range of 4,5 to 6,5. It was determined that strains do not have lipolytic and proteolytic properties and do not have lysine, ornithine, arginine decarboxylase activities. On the other hand, it was detected that two *L. plantarum* strains show weak nitrate reductase activity, four *L. plantarum* strains produce acetoin from glucose and all strains produce DL-lactic acid. Antimicrobial substances produced from strains were observed to have different results at different temperatures and enzyme treatments. Moreover, presence of *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnI*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* genes responsible for bacteriocin production in genomic DNAs of *L. plantarum* strains was also detected. It was determined that bacteriocin-like metabolite production in the strains starts at the log phase and reaches to a maximum at the stationary phase. In trials of fermented sucuk production, it was determined that *L. monocytogenes* grows in the control group uninoculated with *L. plantarum* strains at the first day of fermentation, whereas there is a reduction in cell counts in the presence of *L. plantarum* strains. The highest reduction in *L. monocytogenes* number was found to be in the presence of *L. plantarum* S50 at the end of the ripening period.

2016, 88 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Antagonistic activity, *Lactobacillus plantarum*, bacteriocin like metabolite, *Listeria monocytogenes*, sucuk.

## **TEŞEKKÜR**

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi süresince bana her aşamada destek olan ve yardımlarını esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mükerrrem KAYA'ya teőekkürlerimi sunarım.

Araştırma süresince ilgi ve önerileriyle beni yönlendiren, tüm bilgisini benimle paylaşan Sayın Hocam Prof. Dr. Güzin KABAN'a, tez çalışmam sırasında tezime değerli önerileri ve destekleri ile katkıda bulunan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye, çalışmalarım boyunca desteklerini eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım Kübra FETTAHOĞLU'na, Kübra ÇİNAR'a, Fatma Yağmur HAZAR'a, Bilge SAYIN'a ve Emre KABİL'e teőekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalışmam boyunca her anlamda bana sabırla destek olan sevgili eşim Alper KAMILOĞLU ve canım oğlum Alp KAMILOĞLU'na ve varlıklarıyla bana güç veren canım aileme teşekkür ederim.

**Aybike KAMILOĞLU**

**Eylül, 2016**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar .....	19
3.1.2. Sucuk yapımında kullanılan et ve yağ.....	19
3.1.3. DNA izolasyonu ve PCR için kullanılan çözeltiler.....	20
3.2. Yöntem .....	21
3.2.1. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi.....	21
3.2.1.a. Antagonistik aktivite testleri.....	21
3.2.2. Antagonistik aktiviteye sahip <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının tanımlanması .....	22
3.2.2.a. Genomik DNA izolasyonu .....	22
3.2.2.b. Agaroz jel elektroforezi.....	23
3.2.2.c. PCR reaksiyonu .....	23
3.2.2.d. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi .....	24
3.2.2.e. Dizi analizi.....	24
3.2.3. Bakteriyosin kodlayan genin PCR yardımı ile çoğaltılması .....	25
3.2.4. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi .....	26
3.2.5. Çoğalma eğrisinin oluşturulması ve bakteriyosin üretiminin çoğalma süresine göre değişiminin belirlenmesi.....	27
3.2.6. Antimikrobiyal maddenin karakterizasyonu .....	27
3.2.6.a. Sıcaklık uygulamasının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi.....	27

3.2.6.b. Enzim uygulamalarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi .....	27
3.2.7. <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının teknolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	28
3.2.7.a. Proteolitik aktivitenin belirlenmesi .....	28
3.2.7.b. Lipolitik aktivitenin belirlenmesi .....	28
3.2.7.c. Asetoin oluşumu .....	28
3.2.7.d. Laktik asit üretiminin enzimatik olarak belirlenmesi.....	29
3.2.7.e. Nitrat redüktaz aktivitesinin belirlenmesi.....	29
3.2.7.f. Aminoasit dekarboksilaz aktivitesinin belirlenmesi .....	30
3.2.7.g. Farklı pH değerlerinde çoğalma .....	30
3.2.7.h. Farklı sıcaklıklarda çoğalma .....	30
3.2.7.i. Farklı tuz konsantrasyonlarında çoğalma.....	30
3.2.8. Fermente sucuk üretimi .....	31
3.2.9. Örneklerin alınması ve analize hazırlanması.....	32
3.2.9.a. Fiziksel analizler.....	32
3.2.9.b. Mikrobiyolojik analizler.....	32
3.2.10. İstatistiksel analizler .....	34
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>35</b>
4.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşlarının Moleküler Düzeyde Tanımlanması ve Antagonistik Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	35
4.2. Bakteriyosin Kodlayan Genin PCR Yardımı ile Çoğaltılması.....	38
4.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşlarının Çoğalma Eğrisinin Oluşturulması ve Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi .....	40
4.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitesine Farklı Sıcaklık ve Enzim Uygulamalarının Etkileri .....	46
4.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> Suşlarının Teknolojik Özellikleri.....	48
4.6. Deneme Sucuklarına Ait Sonuçlar .....	56
4.6.1. Nem değerleri (%) .....	56
4.6.2. pH değerleri.....	58
4.6.3. Laktik asit bakterileri.....	62
4.6.4. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	66
4.6.5. Enterobacteriaceae .....	72
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>74</b>

KAYNAKLAR .....	78
ÖZGEÇMİŞ .....	89



## SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µmol	Mikromol
a <sub>w</sub>	Su aktivitesi
bp	Base pair (Baz çifti)
cm	Santimetre
CTAB	Hekzadesil trimetil-amonyum bromit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
g	Gram
kg	Kilogram
kob	Koloni oluşturan birim
KOH	Potasyum hidroksit
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
MPN	En muhtemel sayı
nt	Nükleotit
OYD	Optik yoğunluk değeri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris Asetat EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 4.1.</b> Bakteriyosin kodlayan genin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüleri .....	39
<b>Şekil 4.2.</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> S50 suşuna ait çoğalma eğrisi ve çoğalma süresince pH değişimini ve bakteriyosin aktivitesini gösteren eğri grafiği .....	41
<b>Şekil 4.3.</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> S51 numaralı izolata ait çoğalma eğrisi ve çoğalma süresince pH değişimini ve bakteriyosin aktivitesini gösteren eğri grafiği .....	42
<b>Şekil 4.4.</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> S72 numaralı izolata ait çoğalma eğrisi ve çoğalma süresince pH değişimini ve bakteriyosin aktivitesini gösteren eğri grafiği .....	43
<b>Şekil 4.5.</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> S74 suşuna ait çoğalma eğrisi ve çoğalma süresince pH değişimini ve bakteriyosin aktivitesini gösteren eğri grafiği .....	44
<b>Şekil 4.6.</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> S85 suşuna ait çoğalma eğrisi ve çoğalma süresince pH değişimini ve bakteriyosin aktivitesini gösteren eğri grafiği .....	45
<b>Şekil 4.7.</b> Sucuk gruplarının pH değeri üzerine starter kültür x olgunlaşım süresi interaksyonunun etkisi.....	62
<b>Şekil 4.8.</b> Deneme sucuklarının laktik asit bakteri sayısı üzerine starter kültür x olgunlaşım süresi interaksyonunun etkisi .....	66
<b>Şekil 4.9.</b> Deneme sucuklarının <i>Listeria monocytogenes</i> sayısı üzerine starter kültür x olgunlaşım süresi interaksyonunun etkisi.....	71

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan indikatör suşlar ve temin edildiği kurumlar.....	19
Çizelge 3.2. Bakteriyosin kodlayan genin varlığını belirlemek amacı ile kullanılan oligonükleotidler .....	25
Çizelge 4.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarına ait aksesyon numaraları.....	35
Çizelge 4.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının antagonistik aktiviteleri .....	37
Çizelge 4.3. Farklı sıcaklık uygulamalarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi .....	47
Çizelge 4.4. Farklı enzim uygulamalarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi.....	48
Çizelge 4.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının farklı sıcaklık değerlerinde gelişim durumları.....	49
Çizelge 4.6. <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının farklı pH değerlerinde çoğalma durumları.....	50
Çizelge 4.7. <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim durumları .....	50
Çizelge 4.8. <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarına ait farklı biyokimyasal test sonuçları.....	54
Çizelge 4.9. <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının enzimatik yolla belirlenen laktik asit üretim değerleri .....	55
Çizelge 4.10. Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşım süresince belirlenen% nem değerleri.....	56
Çizelge 4.11. Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşım süresince belirlenen% nem değerlerine ait varyans analiz sonuçları .....	57
Çizelge 4.12. Deneme sucuklarında starter kültür ve olgunlaştırma süresi değişkenlerinin %nem değerlerine ait ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları .....	58
Çizelge 4.13. Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşım süresince belirlenenpH değerlerine ait analiz sonuçları .....	58

<b>Çizelge 4.14.</b> Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımaya süresince belirlenen pH değerlerine ait varyans analiz sonuçları .....	59
<b>Çizelge 4.15.</b> Deneme sucuklarında starter kültür ve olgunlaştırma süresi değişkenlerinin pH değerlerine ait ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları .....	60
<b>Çizelge 4.16.</b> Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımaya süresince belirlenen pH değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları .....	61
<b>Çizelge 4.17.</b> Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımaya süresince belirlenen laktik asit bakteri sayıları (log kob/g).....	63
<b>Çizelge 4.18.</b> Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımaya süresince belirlenen laktik asit bakteri sayılarına (log kob/g) ait varyans analiz sonuçları .....	64
<b>Çizelge 4.19.</b> Deneme sucuklarında starter kültür ve olgunlaştırma süresi değişkenlerinin laktik asit bakteri sayılarına ait (log kob/g) sayılarına ait ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları .....	64
<b>Çizelge 4.20.</b> Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımaya süresince belirlenen laktik asit bakteri sayılarına (log kob/g) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları .....	65
<b>Çizelge 4.21.</b> Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımaya süresince belirlenen <i>Listeria monocytogenes</i> sayıları (log kob/g).....	67
<b>Çizelge 4.22.</b> Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımaya süresince belirlenen <i>Listeria monocytogenes</i> sayılarına (log kob/g) ait varyans analiz sonuçları .....	68
<b>Çizelge 4.23.</b> Deneme sucuklarında starter kültür ve olgunlaştırma süresi değişkenlerinin <i>Listeria monocytogenes</i> sayılarına (log kob/g) ait ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları .....	69

<b>Çizelge 4.24.</b> Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşım süresince belirlenen <i>Listeria monocytogenes</i> sayılarına (log kob/g) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları .....	71
<b>Çizelge 4.25.</b> Farklı <i>Lactobacillus plantarum</i> suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşım süresince belirlenen <i>Enterobacteriaceae</i> sayıları (log kob/g) .....	73



## 1. GİRİŞ

Kuru fermente bir sosis çeşidi olan sucuk, geleneksel ve endüstriyel olmak üzere iki farklı şekilde üretilmektedir. Geleneksel üretim genellikle küçük ölçekli işletmelerde starter kültür kullanılmadan gerçekleştirilmekte ve sucuklar doğal koşullarda olgunlaştırılmaktadır. Endüstriyel üretimde ise kontrollü bir fermentasyon için starter kültürler kullanılmakta, fermentasyon ve kurutma işlemleri için sıcaklık, hava akımı ve nisbi rutubeti otomatik olarak kontrol edilebilen klima ünitelerinden yararlanılmaktadır (Gökalp vd 2004). Fermentasyon ve kurutma ana işlem basamakları kullanılarak üretilen bu ürün 2012 yılında yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliğine göre fermente sucuk olarak adlandırılmakta ve 'Büyükbaş ve küçük baş hayvan etlerinin ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal ve yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda kurutma ve fermentasyon işlemleri uygulanarak nem oranı %40 ve altına düşürülmüş, kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıl işlem uygulanmamış fermente et ürünü' olarak tanımlanmaktadır. Aynı tebliğde fermentasyon, ısıl işlem ve kurutma ana işlem basamakları uygulanarak üretilen yarı kuru fermente sosis çeşidi ise ısıl işlem görmüş sucuk olarak adlandırılmaktadır. Isıl işlem görmüş sucukta kısa süreli bir fermentasyon basamağının ardından, merkez sıcaklık en az 68°C (kanatlı eti kullanılması durumunda en az 72°C) olacak şekilde bir ısıl işlem prosesi uygulanmaktadır (Anonim 2012). Isıl işlem uygulaması piyasaya güvenilir ürün arzını kolaylaştırdığından endüstride ısıl işlem görmüş ürün üretimi daha çok tercih edilmektedir. Bununla birlikte ısıl işlem görmüş sucuk üretiminde kontrollü bir fermentasyon için starter kültürlerle de ihtiyaç duyulmaktadır. Starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakteri suşlarının asit oluşum hızı ve derecesinin yanı sıra bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolit üretme yetenekleri de önemli rol oynamaktadır. Fermente sucuk üretiminde herhangi bir ısıl işlem söz konusu olmadığından kullanılacak laktik asit bakteri suşlarının seçimi ısıl işlem görmüş sucuğa göre daha fazla önem arz etmektedir. Diğer bir ifade ile bu üründe ürün güvenliğinin sağlanmasında laktik asit bakterilerinin asit oluşum hızı ve derecesi oldukça önemlidir. Bununla birlikte kullanılacak suşların gıda kaynaklı patojenlere karşı antagonistik aktivite göstermesi, ürün güvenliğinin sağlanmasında ilave bir etkidir.

Ürün güvenliğinin yanı sıra kullanılacak suşların tat ve aroma başta olmak üzere ürünün duyuşsal özelliklerinin gelişmesinde de önemli rolü vardır. Starter kültür kullanımı standart ürün üretimi açısından da büyük önem arz etmektedir. Pek çok ülkede starter kültür üretiminde geleneksel ürünlerden izole ve tanımlanmış suşlar kullanılmış ve halen de bu yöndeki araştırmalara devam edilmektedir.

Et endüstrisinde starter kültür olarak laktik asit bakterileri (*Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*), katalaz pozitif koklar (*Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus*, *Kocuria varians*) yanı sıra küf (*Penicillium nalgiovense*) ve maya da (*Debaryomyces hansenii*) yaygın kullanılan mikroorganizmalardır (Jessen 1995). Fermente sucuk gibi kuru fermente sosislerde (salami, Rohwurst, Chorizo vb.) Avrupa'da *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinsi laktik asit bakterileri ve katalaz pozitif koklar starter kültür olarak tercih edilirken, ABD'de sadece laktobasiller ve pediokoklar tercih edilmektedir (Kaya ve Kaban 2010). Fermente sosisler öncelikle laktik asit bakterilerinin fermentasyonu ile düşen pH değeri ve elde edilen kendine özgü aroma ile karakterize edilmektedir (Freitas de Macedo *et al.* 2013). Laktik asit bakterileri fermente gıdalarda duyuşsal özellikleri geliştirici etkilerinin yanı sıra gıda kaynaklı patojen bakterileri inhibe ederek ürün güvenliğine katkıda bulunan önemli bir gruptur (Smaoui *et al.* 2010). Fermente et ürünlerinde spontan veya starter kültür olarak bulunan laktik asit bakterileri asit oluşturarak hem ürünün kurumasına hem de patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların inhibisyonuna katkıda bulunmaktadır. Günümüzde farklı fermente ürün tiplerine uygun olarak seçilmiş özel suşlar preparat halinde pazarlanmakta ve endüstriyel üretimde yaygın olarak kullanılmaktadır. Söz konusu suşların ana kaynağı geleneksel ürünlerdir.

Geleneksel fermente bir et ürünü olan sucuktan pek çok laktik asit bakteri suşu izole ve tanımlanmıştır (Gürakan *et al.* 1995; Özdemir vd 1996, 1999; Çon ve Gökalp 2000; Kaban ve Kaya 2008; Adıgüzel and Atasever 2009; Kesmen *et al.* 2012). Laktik asit bakterileri içerisinde yer alan, elliden fazla türle en büyük grubu oluşturan laktobasiller geleneksel fermente ürünlerde ve endüstriyel starter preparatlarında oldukça yaygın olarak bulunmaktadır (De Vries *et al.* 2006; Giraffa *et al.* 2010). Laktik

asit bakterilerinden *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus sakei* sucuktan izole edilen iki önemli türdür. *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. brevis*, *L. fermentum* ise sucuktan izole edilen diğer türlerdir (Gürakan 1991; Dinçer vd 1995; Özdemir vd 1996; Kaban and Kaya 2008; Kesmen *et al.* 2012).

Fermente et ürünlerinde, laktobasiller içerisinde güvenilirliği, farklı şekerleri kullanabilme yetenekleri sayesinde çeşitli ortamlara kolay adapte olabilmesi ve sahip olduğu probiyotik özellikten dolayı *L. plantarum* türü ön plana çıkmaktadır (de Vries *et al.* 2006). *L. plantarum*, fermente sosislerden fermentasyon koşullarına bağlı olarak farklı oranlarda izole edilmektedir. Fermente sosislerde 25°C'den yüksek olgunlaştırma sıcaklıklarda *L. plantarum*'un (Lücke and Hechelmann 1987; Özdemir vd 1996), daha düşük sıcaklıklarda ise *L. sakei* ve *L. curvatus*'un baskın türler olduğu bilinmektedir (Lücke 1985). Örneğin, Papamanoli *et al.* (2003) Yunan tipi fermente sosislerden %9,4 oranında *L. plantarum* izole etmişlerdir. Drosinos *et al.* (2005; 2007) ise Yunan tipi fermente sosislerde %37,2 ve %45,6 oranında *L. plantarum* tespit edildiğini bildirmiştir. Bu oranlar Türkiye'de Özdemir (1999) tarafından %2,8, Kaban and Kaya (2008) tarafından ise %45,7 olarak tespit edilmiştir.

*L. plantarum* suşunun fermentasyonda etkili olabilmesi için teknolojik özelliklerinin belirlenmesi, üretim koşullarına uyum sağlaması açısından oldukça önemlidir. Et kaynaklı *L. plantarum* izolatları suşlar arasında değişkenlik göstermekle beraber genellikle 15°C ve 45°C'de çoğalma göstermekte, 4°C'de ise çoğalamamaktadır. *L. plantarum* türleri %6,5-10 NaCl içeren ortamlarda da canlılığını sürdürebildiği belirtilmektedir (Schillinger and Lücke 1987; Hugas *et al.* 1993; Papamanoli *et al.* 2003). Lipolitik aktivite açısından zayıf olan *L. plantarum* suşları (Montel *et al.* 1998; Kaban and Kaya 2009a) zayıf proteolitik aktivite göstermelerine rağmen genellikle kazeini hidrolize etme yeteneğindedir (Ztaliou *et al.* 1996; Papamanoli *et al.* 2003; Essid *et al.* 2009). Ayrıca kullanılan laktik asit bakteri suşlarının biyojen amin oluşturma özelliği de starter kültür seçiminde önemli bir faktördür. Fermente sosislerden izole edilen *L. plantarum* suşları üzerine yapılan araştırmalarda incelenen suşların dekarboksilaz aktivitesine sahip olmadıkları bildirilmiştir (Santos *et al.* 1998;

Bover-Cid *et al.* 2001). Et ürünlerinde kullanılmaları açısından aranan bir diğer özellik ise üretmiş oldukları laktik asitin konfüğürasyonudur ki D(-)-laktik asit insanda laktat dehidrogenaz tarafından hidrolize edilemediği için L(+)- laktik asit üreten suşlar starter kültür olarak tercih edilmektedir (Holzapfel 2002; Kaya ve Kaban 2010). Bunun yanı sıra glukozdan asetoin oluşturma yeteneğinde olan suşların, üründe arzu edilmeyen aromanın gelişimine sebep olduğu da bildirilmektedir (Kaya ve Kaban 2010).

*L. plantarum* suşları, uygun teknolojik özelliklerinin yanı sıra göstermiş olduğu antagonistik aktiviteleri sayesinde ortama daha iyi adapte olmaları ve muhtemel mikrobiyal kontaminasyonları engelleme olasılıklarının yüksek olması sebebi ile starter kültür olarak kullanımıyla ürün güvenilirliğini arttırabilmektedir (Freitas de Macedo *et al.* 2013). Laktik asit bakterilerinin antagonistik etkileri üretmiş oldukları bazı son metabolitler, antibiyotik benzeri ürünler, bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri metabolitler aracılığı ile olmaktadır (Klaenhammer 1988; Dalie *et al.* 2010). Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen protein yapıda bakterisidal veya bakteriostatik etki gösteren biyoaktif bileşiklerdir. Yakın akraba suşlar üzerinde etkili olan bakteriyosinlerin, gıda kaynaklı Gram negatif patojenler üzerinde de etkili olduğu ileri sürülmektedir (Tagg *et al.* 1976; Nes *et al.* 2007; Line *et al.* 2008). Kullanımına 1988 yılında yasal olarak izin verilen ilk bakteriyosin *Lactococcus lactis* spp. *lactis* tarafından üretilen nisindir (Delves-Broughton *et al.* 1996; Chen and Hoover 2003). Günümüzde bir *Pediococcus* suşu tarafından üretilen pediosin PA-1/AcH ve *Enterococcus faecalis* tarafından üretilen enterosin AS-48'de ticari olarak kullanılmaktadır (Montet and Ray 2016). Laktik asit bakterilerinin üretmiş olduğu nisinin 1920'li yıllarda keşfinden sonra çok sayıda farklı bakteriyosinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir. 2015 yılında rapor edilen ve tanımlanan 185 laktik asit bakteri bakteriyosinin 18'inin *L. plantarum* suşları tarafından üretildiği bildirilmiştir (Woraprayote *et al.* 2016). Bakteriyosin üretimi genomik DNA'da ya da plazmitte yer alan bakteriyosin üretimini başlatan genin varlığı ile gerçekleşmektedir. Bir bakteri birden fazla bakteriyosin üretiminden sorumlu olabilmektedir (Nes *et al.* 2006; Nes *et al.* 2007). Bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri metabolitlerin genellikle yüksek sıcaklık stabilitesine sahip olmaları, asidik ve nötral pH değerlerinde aktivitelerini

koruyabilmeleri ve sindirim sisteminde yer alan proteolitik enzimlere karşı hassas olmalarından dolayı potansiyel gıda koruyucuları olarak önem kazanmıştır (Klaenhammer 1993). Bu antimikrobiyal peptitler gıdaya doğrudan ilave edilebileceği gibi gıdalarda kullanılan starter kültürlerin, bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişimini engelleyecek düzeyde bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolit üretimiyle de bu etki sağlanabilmektedir (Hillier and Davidson 1991; Nes *et al.* 2015). Et kaynaklı *L. plantarum* izolatlarının bakteriyosin üreticisi olarak incelendiği çalışmalar oldukça fazladır (Hugas *et al.* 1995; Enan *et al.* 1996; Messi *et al.* 2001; Müller *et al.* 2009; Rattanachaikunsopon and Phumhachorn 2006; Todorov *et al.* 2010). Literatürde *L. plantarum* gibi bakteriyosin /bakteriyosin benzeri metabolit üreticisi laktik asit bakterilerinin starter kültür/ koruyucu kültür olarak kullanımıyla ürün güvenilirliğine katkıda bulunacağını bildirmiştir (Balciunas *et al.* 2013).

Geleneksel ürün kaynaklı *L. plantarum* suşlarının starter kültür ya da koruyucu kültür olarak tercih edilmesi ile ürünün kalitesi ve standardizasyonu, aroma ve tadın oluşumu, olgunlaşmanın daha etkin gerçekleşebilmesi açısından önemli avantajlar sağlanabilmektedir. Fermentasyon ortamına daha iyi adapte olmaları da bunu desteklemektedir. Bunun yanı sıra bakteriyosinogenik etkiye sahip olan koruyucu/ starter kültürlerin kullanımı gıda patojenlerine karşı alınabilecek tedbirlerin azaltılmasında etkili olabilmektedir (Hugas and Monfort 1997; Balciunas *et al.* 2013). Fermentasyon ortamının sahip olduğu düşük pH ve  $a_w$ , baharat, yüksek tuz miktarı, nitrit ve rekabetçi floranın varlığı patojen mikroorganizmalara karşı bir engel oluştururken bu şartlarda da varlığını sürdürebilen hastalık yapıcı mikroorganizmalara da rastlanmaktadır. Bu mikroorganizmalardan biri de et ve et ürünleri için önemli kontaminantlardan olan *Listeria monocytogenes*'tir (Freitas de Macedo *et al.* 2013). Örneğin fermente bir et ürünü olan sucukta *L. monocytogenes*'in tespit edildiği çalışmalar mevcuttur (Çon *et al.* 1996; Kaya and Gökalp 1997; Berktaş *et al.* 2006; Çolak *et al.* 2007). *L. monocytogenes* özellikle bağışıklık sistemi zayıf hastalar, çocuklar, yaşlılar ve hamileler üzerinde ciddi problemlere neden olabilen listeriozise yol açmaktadır. 1987 yılına kadar et ve et ürünleri kaynaklı listeriozis vakası oldukça nadir görülmekteyken (Farber and Peterkin 1991) 1987 yılından sonra süt ve süt ürünü kaynaklı vakalardan sonra en önemli

kontaminasyon kaynağı olarak tüketime hazır et ürünleri gösterilmiştir (Goulet *et al.* 2013). Listerozise neden olan minimum doz tam olarak bilinmemesine rağmen vakalardan yola çıkarak öngürücü modellemeyle sağlıklı insanlarda 7-9 log kob/g iken, risk düzeyi yüksek kişilerde 5-7 log kob/g olarak saptanmıştır (Farber *et al.* 1996).

Geniş bir sıcaklık (-0,4-45°C), pH (4,4-9,4) ve  $a_w$  (0,90-0,97) aralığında varlığını sürdürebilen *L. monocytogenes* (Beverly 2004) modifiye ve vakum ambalajlama koşullarında da çoğalabilmektedir (Baka *et al.* 2015). *L. monocytogenes* fermente sosislerde fermentasyon sıcaklığı, pH,  $a_w$  gibi iç ve dış faktörlere bağlı olarak gelişebilmekte, canlılığını sürdürebilmekte veya redüksiyona uğramaktadır (Erol and Hildebrandt 1992; Kaya ve Gökalp 2004a, 2004b; The'venot *et al.* 2005; Matagaras *et al.* 2015). *Listeria monocytogenes*'in fermente et ürünlerinde kontaminasyonuna karşı bakteriyosin/ bakteriyosin benzeri metabolit üreticisi yerel laktik asit bakteri suşların starter/ koruyucu kültür olarak kullanıldığı çalışmalar oldukça fazladır (Ananou *et al.* 2005; Benkerroum *et al.* 2005; Albano *et al.* 2009; Nieto *et al.* 2010; Kingcha *et al.* 2012; Pragalaki *et al.* 2013; Casaburi *et al.* 2016).

Kuru fermente bir sosis çeşidi olan sucuktan izole edilen laktik asit bakterilerinin karakterizasyonuna ve/veya starter kültür olarak kullanılabilme imkanlarına yönelik bazı araştırmalar yürütülmüştür (Yaman *et al.* 1998; Toksoy *et al.* 1999; Çon and Gökalp 2000; Çon *et al.* 2001; Kaban and Kaya 2008; Kaban and Kaya 2009a; 2009b). Ancak söz konusu araştırmalarda sucuk kaynaklı *L. plantarum* suşları ile ilgili çalışmaların kapsamı oldukça sınırlı tutulmuştur. Mevcut bu araştırmada beş farklı yerel *L. plantarum* izolatının moleküler düzeyde tanımlanan ve bakteriyosin üretimi açısından genotiplendirmesi yapılan 5 farklı *L. plantarum* suşunun ürettiği metabolitlerin ön karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi, teknolojik özelliklerin belirlenmesi ve bu suşların fermente sucukta *L. monocytogenes* 'in davranışına etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kuru fermente sosislerden laktik asit bakterilerinin izolasyon, identifikasyon ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça fazladır (Hugas *et al.* 1993; Coppola *et al.* 1998; Papamanoli *et al.* 2003; Aymerich *et al.* 2003; Ammor *et al.* 2005; Comi *et al.* 2005; Drosinos *et al.* 2005; Phalakornkule and Tanasupawat 2006; Kaban and Kaya 2008; Federici *et al.* 2014). Laktik asit bakterileri içerisinde önemli laktobasillerden olan *L. plantarum* suşlarının yer aldığı çalışmalara da rastlanmaktadır. Örneğin; Güney Brezilya'ya ait doğal fermente sosislerden izole edilen 7 farklı *L. plantarum* suşunun starter kültür olarak kullanılma imkanları Sawitzki *et al.* (2009) tarafından araştırılmıştır. Bu amaçla teknolojik özellikleri incelenmiş ve 7 suşun DL-laktik asit ürettiği ve *L. monocytogenes* NTC 098630'e karşı antagonistik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Diğer taraftan sucuk üzerine yapılan bazı çalışmalarda *L. plantarum* GM 77 suşu starter kültür olarak denenmiştir (Kaban and Kaya 2009a; 2009b). Ancak bu çalışmalarda kullanılan suşun gıda kaynaklı patojenlere karşı antagonistik aktivitesine yönelik herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır.

Benito *et al.* (2007) tarafından iki farklı kuru fermente sosis çeşidinden izole edilen 192 yerel laktik asit bakteri izolatu üzerinde yapılan bir çalışmada, izolatlar teknolojik özellikler yönünden incelenmiş ve genotipik olarak tanımlanmıştır. Analizler neticesinde 2 *L. plantarum* suşunun arjinin dekarboksilaz aktivitesi gösterdiği, tribütirini parçalayabildiği, 4 ve 15°C gibi iki farklı sıcaklıkta, %7 NaCl varlığında veya pH 5,5'te üreyebildiği rapor edilmiştir. Ayrıca her iki suşun da yüksek sıcaklık (45°C), yüksek tuz konsantrasyonu (%10 NaCl) ve düşük pH değerlerinde (pH 4, 4,5, 5) çoğalamadıkları vurgulanmıştır.

Fermente bir sosis çeşidinden izole edilen farklı *L. sakei* suşları ve bir *L. plantarum* suşunun düşük asitli fermente sosis üretiminde starter kültür olarak kullanım imkanlarının incelendiği bir araştırmada, *L. plantarum* suşunun renk oluşumunda *L. sakei* suşlarına göre daha etkili olduğu, *L. plantarum* suşunun kadeverin oluşumunu

%26 oranında azaltırken, tiramin, triptofan ve putresin miktarlarını arttırdığı tespit edilmiştir (Baka *et al.* 2011).

Landeta *et al.* (2013) İspanyol tipi kür edilmiş sosislerden izole ve tanımladıkları *L. plantarum* suşlarını da içeren laktik asit bakterilerinin teknolojik özelliklerini inceledikleri bir çalışmada, *L. plantarum* suşlarının nitrat redüktaz aktivitesi ve lipolitik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Mangina *et al.* (2013) et kaynaklı *Lactobacillus* suşlarının starter kültür olarak kullanım imkanlarını inceledikleri araştırmalarında *L. plantarum* suşlarının lizin, arginin ve ornitin dekarboksilaz aktivitesi göstermezken, tirozin dekarboksilaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. *Lactobacillus* suşlarının starter kültür olarak kullanıldığı denemeler neticesinde ise *L. plantarum* suşunu içeren örneklerin daha yumuşak bir tekstür gösterdiği, bu suşun serbest yağ asidini arttığı ve hatta arzu edilmeyen aroma oluşumuna sebebiyet verdiği saptanmıştır.

Et ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin teknolojik açıdan öneminin yanında antagonistik aktivitelerinin belirlenmesi üzerine de yoğunlaşmıştır. Konu üzerinde yapılan bir çalışmada, kuru sosisten izole edilen *Lactobacillus plantarum* UG1 suşunun antimikrobiyal aktivitesi kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve bu suşun *L. monocytogenes* 10470 ve *Bacillus cereus* 14579 gibi bazı gıda kaynaklı patojenlere karşı antagonistik aktivite gösterdiği saptanmıştır (Enan *et al.* 1996).

Messi *et al.* (2001) tarafından yapılan bir çalışmada İtalyan tipi fermente sosisten izole edilen ve %33'ü *L. plantarum* olarak tanımlanan 134 laktik asit bakteri suşunun %6'sının bazı gıda kaynaklı patojenler üzerinde bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri metabolit üreterek antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca kuyu difüzyon metodu uygulanarak gerçekleştirilen antagonistik aktivite testinde en yüksek inhibisyon zonunu *L. plantarum* 35d suşunun verdiği ve bu suşun gıda kaynaklı patojenlerden *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'in de bulunduğu pek çok bakteriye karşı antagonistik aktivite göstererek geniş bir etki spektrumu sergilediği bildirilmiştir.

De Martinis and Freitas (2003) tarafından vakum ambalajlanmış et ürünlerinden bakteriyosinjenik özellik gösteren laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve identifikasyonu üzerine yapılan bir çalışmada *Enterococcus* sp. 18 (bacon), *Leuconostoc* sp. 20 (ham) ve *Lactobacillus sakei* 29 (ev yapımı sosis “linguicia”) suşları izole ve identifiye edilmiştir. Araştırmada *Leuconostoc* sp. 20 ve *Lactobacillus sakei* 29 suşlarının 9 farklı *L. monocytogenes* suşuna karşı antilisterial etki gösterdiği de vurgulanmıştır.

Papamanoli *et al.* (2003) Yunan tipi kuru fermente bir sosis çeşidi üzerinde yapılan bir çalışmada, olgunlaşmanın 4 farklı aşamasında laktik asit bakterileri izole/ identifiye edilmiş ve teknolojik özellikleri ile antagonistik aktiviteleri belirlenmiştir. Analizler neticesinde 147 laktik asit bakteri suşunun 7’sinin *L. plantarum* olduğu, *L. plantarum* suşlarının %71’inin *L. monocytogenes*’e, %29’unun ise *S. aureus*’e karşı antagonistik aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Bromberg *et al.* (2004) tarafından yapılan bir çalışmada farklı et ve et ürününden kuyu difüzyon yöntemi kullanarak *Staphylococcus aureus* CTC 33 ve *L. innocua* Lin 11’e karşı inhibisyon etkisi gösteren 128 adet laktik asit bakterisi, *L. monocytogenes* CTC21 suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturan ise 49 laktik asit bakteri suşu izole edilmiştir.

İtalyan tipi fermente bir sosis çeşidinden (Salami) izole edilen laktik asit bakteri izolatlarının *L. monocytogenes* suşuna karşı antimikrobiyal etkisinin incelendiği bir çalışmada, en yüksek aktivite gösteren PD 6.9 kodlu suşunun üretmiş olduğu antimikrobiyal maddenin ısıya dayanıklılık gösterdiği, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktivite sergilediği ve protein tabiatında olduğu bildirilmiştir (Carvalho *et al.* 2006).

Jones *et al.* (2008) et kaynaklı 6 laktik asit bakteri suşunun *L. monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Campylobacter jejuni* veya *Clostridium estertheticum*’a karşı bakteriyosin benzeri metabolit kaynaklı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yarı-kuru fermente bir sosis çeşidinden izole/ identifiye edilen *L. plantarum* Ip 31 suşunun antagonistik aktivitesini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada, söz konusu suşun *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus*, *B. megaterium* ve *B. subtilis* bakterilerine karşı bakteriyosin kaynaklı antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır (Müller *et al.* 2009).

Beloura ve Chouriço olarak adlandırılan Portekize özgü geleneksel et ürünlerinden izole edilen 2 *L. plantarum* suşunun ürettiği bakteriyosinlerin karakterizasyonunun yönelik yürütülen bir araştırmada, her iki suşa ait bakteriyosinin farklı *L. monocytogenes* suşlarına karşı antagonistik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Todorov *et al.* 2010).

Castro *et al.* (2011) geleneksel kuru sosislerden izole ettikleri 141 adet laktik asit bakteri suşunun 27'sinin *Staphylococcus aureus* ve *Listeria innocua*'ya karşı antibakteriyel etki gösterdiğini ve bu etkinin bakteriyosin benzeri maddelerden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Yapılan bazı çalışmalarla antagonistik aktivite gösterdiği belirlenen suşların bakteriyosin kaynaklı antimikrobiyal aktivite gösterip göstermediğini desteklemek için daha ileri bir aşama olan bakteriyosin üretiminden sorumlu gen bölgesinin genomik DNA'da aranması yoluna gidilmiştir. Konu ile ilgili olarak Rodriguez *et al.* (1995) tarafından yapılan araştırmada starter kültür kullanılmadan üretilen 24 adet İspanyol kuru fermente sosisinden *Pediococcus acidilactici* 347, *Lactobacillus plantarum* CECT285 ve *L. monocytogenes* ScottA suşlarına karşı antagonistik aktivite gösteren 21 laktik asit bakteri izolatu elde edilmiştir. Araştırmada 21 izolattan 7 *Lactobacillus* izolatının kromozal ve plazmit DNA'sında laktosin S üretiminden sorumlu *lasA* geninin aranması amacı ile PCR'da 5'-ATG GAA TT(GA) TT(GA) CC(AG) AC(GT) GC(TC) GC(TC) GT(TC) (TC)T(GA) TA-3', 5'-ATG (AG)TG TTT (AG)GC (ACGT) (GC)(TA) (AG)TA (CT) TT-3' oligonükleotidleri primer olarak kullanılmış ve 3 *Lactobacillus* izolatının plazmit DNA'sında primerler kullanılarak *lasA* geninin 75-bp fragmentinin çoğaltıldığı saptanmıştır.

Remiger *et al.* (1996) tarafından 7'si kuru fermente sosis kaynaklı olmak üzere toplam 13 laktobasil izolatının bakteriyosin üretim yeteneklerinin incelendiği bir çalışmada, plantarisin A, curvasin A, sakasin P ve plantarisin S bakteriyosinlerinin üretiminden sorumlu *plaS*, *curA*, *sakP* ve *plnA*, genleri için sırası ile  $\alpha$ -F: AAY AAR YTI GCI TAY AAY ATG,  $\beta$ -R: GCY ITY AAR RAI CCY TCI CC, F: GTA AAA GAA ITA AGT ATG ACA, R: ITA CAT TCC AGC TAA ACC ACT, F: ATG GAA AAG TIT AIT GAA TTA, R: ITA TIT ATT CCA GCC AGC GTT ve *plnA* 5p: GTA CAG TAC TAA TGG GAG S7: CIT ACG CCA TCT ATA CG primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda *L. pentosus* DK7, *L. plantarum* DK9, *L. sake* CTC460, *L. sake* CTC372 ve *L. plantarum* TMW1.25 suşlarının belirtilen genleri DNA'larında bulundurmadığı rapor edilmiştir. Ayrıca, plantarisin S üretiminden sorumlu *plaS* geninin laktobasil DNA'larında bulunmadığı, *plnA* geninin ise kuru fermente sosis kaynaklı *L. plantarum* CTC305, *curA* geninin *L. sake* CTC494 ve *L. curvatus* LTH1174, *sakP* geninin *L. sake* LTH673, *L. bavaricus* MI401 ve *L. curvatus* MI403 suşlarının DNA'larında bulunduğu tespit edilmiştir.

Noonpakde *et al.* (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, "nham" olarak adlandırılan Tayland'a özgü geleneksel bir fermente sosisten izole edilen 14.020 adet laktik asit bakteri izolatının bakteriyosin üretim yetenekleri incelenmiş ve ayrıca *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* gibi gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibisyon etkisi gösteren *Lactococcus lactis* WNC 20 izolatının üretmiş olduğu bakteriyosinin karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Analizler neticesinde proteinaz K ve  $\alpha$ -kimotripsin uygulamalarının antimikrobiyal etki spektrumunu değiştirdiği ve tripsin, papain, pepsin,  $\alpha$ -amilaz, lipaz enzimlerine karşı dayanıklılık gösteren bu metabolitin bu özelliklerinden dolayı nisin benzeri bir bakteriyosin olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca daha ileri bir karakterizasyon için bu bakteriyosinin üretiminden sorumlu gen bölgesinin varlığını araştırılmış (F: 5'CCG GAA TTC ATA AGG AGG CAC TCA AAA TG 3' R: 3' primer 5V CGG GGT ACC TAC TAT CCT TTG ATT TGG TT 3') ve bu suşun ürettiği bakteriyosinin nisin olduğu kanıtlanmıştır. PCR ile çoğaltılan gen bölgesinin dizi analizi sonucu metabolitin Nisin Z ile benzerlik gösterdiği vurgulanmıştır.

Todorov *et al.* (2013) tarafından kuzeybatı Portekiz'e özgü geleneksel et ürünlerinden bakteriyosin üretim yeteneğine sahip laktik asit bakterilerini izole etmek amacıyla yürütülen bir çalışmada, genotipik olarak tanımlanan *L. sakei* suşlarının ürettikleri bakteriyosinlerin, pH 2-10 arasında aktivitelerini sürdürdüğü, 30, 37, 45, 60, 80 ve 100°C sıcaklıklarda 2 saat süreli uygulanan ısı işlemi sonucunda aktivitede azalma olmadığı, proteinaz K, pepsin ve tripsin enzimlerine ve 121°C'de 20 dk'lık ısı işleme dayanıksız olduklarını bildirilmiştir. Araştırmada, enterocin A, B, P ve L50B, curvasin A, sakasin P, sakasin G1, sakasin G2 bakteriyosinlerinin üretiminden sorumlu genlerin varlığı da incelenmiş ve *L. sakei* suşlarının tümünün enterosin A, enterosin P, sakasin P, sakasin G1 ve sakasin G2 üretiminden sorumlu genleri DNA'larında buldukları saptanmıştır. PCR ürünlerinin dizi analizi neticesinde curvasin A üretiminden sorumlu genin *L. sakei* ST154Ch suşunun DNA'sında da bulunduğu ileri sürülmüştür.

Taze et ve bazı fermente et ürünlerinden izole edilen 115 laktik asit bakteri izolatının antilisterial etkilerini belirlemek üzere yürütülen bir çalışmada, izolatların *L. monocytogenes* ve *L. innocua* suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Antagonistik aktivite testleri sonucunda *L. sakei*, *L. curvatus* ve *E. faecium* suşlarının *Listeria* suşlarına karşı iyi bir antagonistik aktivite gösterdiği, *Pediococcus acidilactici* ve *L. plantarum* izolatlarının sınırlı bir antilisterial aktiviteye sahip olduğu, *L. curvatus* ve *L. sakei* suşlarının sakasin P, sakasin Q ve curvasin A bakteriyosinlerini kodlayan *sppA*, *sppQ* and *sapA* genlerini taşıdığı, *L. plantarum* izolatlarının önemli bir kısmının *pln EF* genini *pln A* geninden daha fazla içerdiği saptanmıştır (Fontana *et al.* 2015).

Barbosa *et al.* (2016) İtalyan tipi fermente sosislerden izole edilen laktik asit bakteri suşlarından *L. monocytogenes* Scott A'ya karşı antimikrobiyal etki gösteren *L. plantarum* MBSa4 suşunun ürettiği antimikrobiyal maddenin plantarisin olduğunu ve ayrıca bakteriyosin üretiminden sorumlu gen varlığının tespiti için gerçekleştirilen PCR sonucunda plantaricin W geni ile uyumlu fragment tespit edildiği vurgulanmıştır.

Casaburi *et al.* (2016) tarafından yapılan bir çalışmada Campania yöresine ait (İtalya) geleneksel fermente bir sosisten izole edilen 118 laktobasil izolatu, bakteriyosin üretim yetenekleri açısından incelenmiş ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösteren suş 16s rRNA ve hsp60 dizi analizleri ile *L. curvatus* 54M16 olarak tanımlanmıştır. Ayrıca *curAF*, *curAR*, *sakX*, *sakXR*, *sakTa*, *sakTaR*, *sakTβ*, *SakTβR*, *sak PF* ve *sakPR* oligonükleotid primerlerini kullanarak gerçekleştirilen PCR ile *L. curvatus* 54M16 suşunun birden fazla bakteriyosin üretebildiği de saptanmıştır. Araştırmada sakasin X, P ve R üretiminden sorumlu gen bölgelerinin *L. curvatus* 54M16 DNA'sında olduğu da rapor edilmiştir.

Bakteriyosin/ bakteriyosin benzeri metabolit üreten laktik asit bakteri suşlarının et ve et ürünlerinde koruyucu ya da starter kültür olarak kullanıldığı çalışmalar oldukça yaygındır. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, kuru fermente sosis üretiminde, bakteriyosin üreticisi suş içeren (*Staphylococcus xylosum* DD-34 + bakteriyosin üreticisi *Pediococcus acidilactici* PA-2 + *Lactobacillus bavaricus* MI-401) ve içermeyen (*S. carnosus* MIII + *L. curvatus* Lb3) iki farklı starter kültür kullanılmış ve bu kültürlerin olgunlaşma sırasında *L. monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7'e karşı etkileri incelenmiştir. Analizler neticesinde bakteriyosin üreticisi *Pediococcus acidilactici* PA-2 varlığında *L. monocytogenes* sayısında hızlı bir düşüş olduğu rapor edilmiştir (Lahti *et al.* 2001).

Bakteriyosin üreticisi *L. plantarum* ve *L. curvatus* suşlarının deve kuşundan üretilen bir fermente sosis çeşidinde *L. monocytogenes*'in gelişimi üzerine etkisini belirlemek amacı ile yürütülen bir araştırmada, sosis hamuru  $10^7$  kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş ve olgunlaşma süresince *L. monocytogenes* sayısında meydana gelen değişimler tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunda *L. monocytogenes* sayısında olgunlaşmanın ilk 4 gününde 1 logaritmik birimden daha fazla bir artış olmuştur, *L. plantarum* ve *L. curvatus* içeren örneklerde ise söz konusu periyotta *L. monocytogenes* sayısı azalmış ve 9. günde yaklaşık 3 logaritmik birimlik bir redüksiyon gözlenmiştir (Dicks *et al.* 2004)

Benkerroum *et al.* (2005) tarafından yapılan bir çalışmada bakteriyosinjenik *L. curvatus* LBPE ve *L. lactis* LMG21206 liyofilize preparatlarının kuru fermente sosis üretiminde *L. monocytogenes* üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmada sosis hamurları  $10^2$ - $10^3$  kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* kontamine edilmiştir. Analizler neticesinde fermentasyonun ilk 4 saatinin ardından *L. curvatus*'un *L. monocytogenes* gelişimini önemli oranda inhibe ettiği, ancak fermentasyon aşamasında bakteriyosin üreticisi starter kullanımının *L. monocytogenes* üzerinde bakteriyosin üreticisi olmayan starter kültürden farklı bir etki göstermediği, 14–16°C ve %75–80 nisbi rutubette 15 günlük kurutma işleminin ardından ise tüm sosis örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının saptanabilir sınırın altına düştüğü tespit edilmiştir.

Bakteriyosin pozitif *Pediococcus acidilactici* HA-6111 suşunun 'Alherias' olarak adlandırılan Portekize özgü fermente bir sosis çeşidinde biyokoruyucu kültür olarak kullanım imkanlarının araştırıldığı bir çalışmada, *Pediococcus acidilactici* HA-6111 suşunun *Listeria* sayısında önemli bir redüksiyona neden olduğu ancak spontan laktik asit bakteri florası ile pH üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Albano *et al.* 2009).

Kingcha *et al.* (2012) tarafından fermente bir sosis çeşidi (Nham) üzerine yapılan araştırmada, bakteriyosin üreticisi *P. pentosaceus* BCC 3772 suşunun ürünün duyu özelliklerinde değişime neden olmaksızın 18-24 saatlik fermentasyonun sonunda *L. monocytogenes* sayısında 3.2 log kob/g düzeyinde bir redüksiyona sebep olduğu belirlenmiştir.

Sakacin C2 üreticisi *L. sakei* C2'nin fermente sosiste starter olarak kullanıldığı bir araştırmada söz konusu bakteriyosin üreticisi suş sosis hamuruna 7 log kob/g düzeyinde inokule edilmiş ve 21 günlük fermentasyon sırasında *L. monocytogenes* sayısında meydana gelen değişimler incelenmiştir. Araştırmada ayrıca kontrol grubu ile daha düşük bir inokülasyon (5 log kob/g) düzeyi kullanılarak üretilen sosilerdeki *L. monocytogenes* sayısı da tespit edilmiştir. Sonuç olarak yüksek inokülasyon düzeyinde (7 log kob/g) 21 günlük, düşük inokülasyon düzeyinde ise 38 günlük fermentasyonun sonunda *L. monocytogenes* sayısının saptanabilir düzeyin altına düştüğü rapor

edilmiştir. Kontrol grubu ise düşük izoklasyon düzeyine benzer bir durum sergilemiştir (Gao *et al.* 2014).

Nisin Z üreticisi *Lactococcus lactis* sp. *lactis* PD 6.9 suşunun fermente bir et ürünündeki antilisterial etkisini belirlemek için gerçekleştirilen model bir sistemde *L. monocytogenes*'in kontrolü amacı ile bakteriyosin üreticisi *L. lactis* PD 6.9'un fermente sosislerde starter kültür olarak kullanılabileceğini sonucuna varılmıştır (Paula *et al.* 2015). Konu ile ilgili benzer bir araştırmada ise sosis üretiminde bakteriyosin üreticisi *L. plantarum* suşunun starter kültür olarak kullanılması durumunda bakteriyosin negatif suşa kıyasla *L. monocytogenes* sayısında 1.7 log kob/g düzeyinde daha fazla bir inhibisyon gerçekleştiği bildirilmiştir (Zanette *et al.* 2015).

Benkerroum *et al.* (2003) tarafından taze fermente sosis (merguez) üretiminde bakteriyosin üreticisi *L. lactis* sp. *lactis* M suşunun starter kültür olarak kullanıldığı bir çalışmada,  $10^6$  kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu ile kontamine edilen, nitrit kullanılmayan örneklerde bakteriyosin üreticisi starter kullanımı, bakteriyosin üreticisi olmayan startere kıyasla *Listeria* sayısında 1,5 logaritmik birimlik daha fazla bir redüksiyona neden olduğu rapor edilmiştir.

Sabia *et al.* (2003) tarafından İtalyan tipi fermente sosisten izole edilen bakteriyosinojenik *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 suşu ve üretmiş olduğu Enterocin 416K1'nin *L. monocytogenes* üzerine etkilerini belirlemek amacı ile yürütülen araştırmada, İtalyan tipi fermente bir sosis çeşidi olan 'cacciatore'nun hamuruna *L. monocytogenes* NCTC 10888 kontamine edilmiş ve hem suşun hem de bakteriyosinin etkileri ortaya konulmuştur. Araştırma sonucunda 'cacciatore' olarak adlandırılan üründen *L. monocytogenes*'in eliminasyonu için *E. casseliflavus* IM 416K1 suşunun starter kültür olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır. İtalyan tipi 4 farklı fermente sosis üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise yine İtalyan tipi bir fermente sosisten izole edilen bakteriyosin kaynaklı antimikrobiyal aktivite gösteren 3 laktik asit bakteri suşunun *L. monocytogenes* üzerinde benzer bir etki gösterdiği belirtilmiş ve bu

suşlardan birinin koruyucu kültür olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Čaklovica *et al.* 2005).

Albano *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada “Alherias”olarak adlandırılan geleneksel bir fermente sosisten izole edilen 226 laktik asit bakteri izolatının *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. coli* 0:157 (VT-ve), *E. faecalis*, *Salmonella* Typhimurium ve *S. Enteriditis* patojen bakterilerine karşı antagonistik aktiviteleri incelenmiş ve 14 izolatın *L. innocua* ve *L. monocytogenes* karşı antagonistik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca iki izolatın muhtemelen bakteriyosin üreticisi olduğu da bildirilmiştir.

Et kaynaklı laktik asit bakterileri suşlarının fermente sosis üretiminde starter kültür olarak kullanıldığı bir çalışmada, suşların *E. coli* ve *L. monocytogenes* inhibisyonuna neden olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca yerel suş kullanımının ürün güvenliğini olumlu yönde etkilediği de rapor edilmiştir (Pragalaki *et al.* 2013).

Fermente sucuk üretiminde de *L. monocytogenes*'in gelişimi üzerine starter kültürlerin etkilerini belirlemek üzere araştırmalar yapılmış ve halen bu araştırmalara devam edilmektedir. Araştırmalarda ya ticari kültürler ya da yerel olmayan suşlar kullanılmıştır. Erol and Hildebrandt (1992) tarafından yapılan çalışmada *L. monocytogenes*'in 25°C'lik olgunlaştırma sıcaklığında 20°C'ye göre daha hızlı geliştiği, ancak starter kültür (*L. plantarum* ve *S. carnosus*) kullanılmıyyla bakteriyel çoğalmanın engellendiği rapor edilmiştir. Erol *et al.* (1999) tarafından yine fermente sucuk üretiminde yapılan bir çalışmada ise starter kültür olarak bakteriyosin üreticisi *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 ve *L. sake* Lb 706 suşları kullanılmış ve başlangıçta 5 log kob/g düzeyinde olan *L. monocytogenes* sayısının iki farklı olgunlaştırma sıcaklığında (20°C ve 25°C), 14 günlük olgunlaştırma periyodunun sonunda 0.036-0.3 MPN/g düzeylerine düştüğü bildirilmiştir.

Kaya ve Gökalp (2004a) tarafından fermente sucuk üretiminde starter kültür kullanımının *L. monocytogenes* 'in gelişimine etkisini belirlemek amacı ile yürütülen bir

çalışmada *L. plantarum* içeren ticari kültür preparatı kullanılmış ve sucuk hamuru  $10^4$  log kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiştir. Analizler neticesinde 3 günlük fermentasyon sonunda pH'nın 5'in altına düştüğü ve bundan dolayı *L. monocytogenes*'in gelişemediği sonucuna varılmıştır. Aynı araştırmada kontrol grubu örneklerde ilk 3 günlük fermentasyon sonunda pH 5,3-5,4'e kadar düşüş göstermiş ve *L. monocytogenes* sayısı da artmıştır. Ayrıca fermente sucukta *L. monocytogenes*'in kontrolü açısından fermentasyonun ilk günlerinde belirlenen asit oluşum hızı ve derecesinin önemli bir faktör olduğu da vurgulanmıştır. Kaya ve Gökalp (2004b) tarafından yapılan diğer bir araştırmada ise bakteriyosin üreticisi suşların (*L. sakei* Lb 706 veya *P. acidilactici* Lb 628) varlığında *L. monocytogenes* sayısında hızlı bir düşüş olduğu saptanmıştır.

Cosansu *et al.* (2010) bakteriyosin üreticisi *Pediococcus acidilactici* 13 suşunu starter kültür olarak kullandıkları fermente sucuk üretiminde, sucuk hamurunu 7 log kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* ile kontamine etmiş ve 8 günlük olgunlaştırma süresinin sonunda *L. monocytogenes* sayısında 3,32 logaritmik birimlik bir azalma tespit etmişlerdir. Araştırmacılar kontrol grubu örneklerde ise 1,37 logaritmik birimlik bir azalma olduğunu da belirtmişlerdir.

Sucuktan laktik asit bakteri izolatlarının karakterizasyonuna ve starter kültür olarak kullanılabilme imknlarına yönelik literatürde bazı araştırmalar da mevcuttur. Yaman *et al.* (1998) piyasadan temin edilen farklı sucuk örneklerinden izole ve identifiye ettikleri 3 *L. plantarum* ve 3 *P. pentosaceus* suşunun *L. monocytogenes* bakterisine karşı antagonistik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca laktik asit bakteri suşlarını (1 *L. plantarum* ve 3 *P. pentosaceus*) model sistemde kullanarak gerçekleştirdikleri testlerde sucuk ve sucuk benzeri et ürünlerinde starter ve koruyucu kültür olarak kullanılabileceklerini de vurgulamışlardır.

Toksoy *et al.* (1999) tarafından yapılan bir araştırmada farklı firmalara ait sucuk ve sosis örneklerinden izole edilen 39 *Lactobacillus plantarum* suşunun 18'inin *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* veya *Pseudomonas*

*aeruginosa* karşı bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri madde kaynaklı antimikrobiyal etki gösterdiği kuyu difüzyon testi kullanılarak saptanmıştır.

Çon ve Gökalp (2000) 51 sucuk örneğinden izole ettikleri 424 izolattan bakteriyosin benzeri metabolit üreticisi 19 *Lactobacillus plantarum*, 4 *Lactobacillus curvatus*, 4 *Pediococcus pentosaceus*, 3 *P. acidilactici*, 2 *Lactobacillus pentosus*, 2 *L. sakei*, 1 *L. delbrueckii*, 1 *L. rhamnosus* ve 21 *Lactobacillus* spp. suşunu izole ve tanımlamışlardır. Araştırmacılar, *P. pentosaceus* 416, *P. acidilactici* 413, 419 ve 446, *L. curvatus* 348, *L. plantarum* 452 ve 495 ile *Lactobacillus* spp. 411 suşlarının starter kültür olarak kullanılabileceğini de belirtmişlerdir.

Çon *et al.* (2001) sucuktan izole edilen laktik asit bakteri suşlarının agar spot ve kuyu difüzyon yöntemlerini kullanarak *Listeria* suşları üzerine antagonistik etkilerinin olup olmadığını incelemişlerdir. Araştırma sonucunda *L. plantarum* izolatlarının *L. monocytogenes* ve *L. innocua*'ya agar spot testinde antimikrobiyal etki gösterirken kuyu difüzyon testinde herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediği rapor edilmiştir.

Kaban and Kaya (2008) tarafından geleneksel yöntemle üretilen sucuklardan *L. plantarum* dominant olmak üzere pek çok laktik asit bakteri türü izole edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen suşlardan *L. plantarum* GM77 diğer bir çalışmada (Kaban and Kaya 2009a) yine sucuktan izole edilen *S. xylosus* GM92 suşu ile birlikte starter kültür olarak kullanılmıştır. Söz konusu çalışmada starter kültür kullanımının ürünün sadece ucucu bileşikleri ve diğer kalitatif özelliklerine etkileri belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise *L. plantarum* GM77 suşu tekli kültür, *S. carnosus* MK93 suşu ile çoklu kültür olarak sucuk üretiminde denenmiş ve yine ürünün ucucu bileşikleri ile bazı kalitatif özellikleri belirlenmiştir (Kaban and Kaya 2009b).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Araştırmada Kaban (2007) tarafından geleneksel sucuklardan izole edilen ve fenotipik olarak tanımlanan laktik asit bakteri suşlarından 5 farklı *Lactobacillus plantarum* (S50, S51, S72, S74 ve S85) seçilmiş ve denemelerde kullanılmıştır.

Araştırmada bakteriyosin pozitif suş olarak Schillinger and Lücke (1987) tarafından izole edilen *L. sake* Lb 706 kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan diğer suşlar ve temin edildiği kurumlar ise Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan indikatör suşlar ve temin edildiği kurumlar

Bakteri Suşu	Temin Edildiği Kurum			
<i>Listeria monocytogenes</i> C3970	Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü			
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Pamukkale Üniversitesi	Gıda	Mühendisliği Bölümü	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Pamukkale Üniversitesi	Gıda	Mühendisliği Bölümü	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Pamukkale Üniversitesi	Gıda	Mühendisliği Bölümü	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	Pamukkale Üniversitesi	Gıda	Mühendisliği Bölümü	
<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB	Pamukkale Üniversitesi	Gıda	Mühendisliği Bölümü	
<i>Bacillus cereus</i> 11778	Pamukkale Üniversitesi	Gıda	Mühendisliği Bölümü	

##### 3.1.2. Sucuk yapımında kullanılan et ve yağ

Araştırmada kullanılan sığır eti ve sığır et yağı Et ve Süt Kurumu Erzurum kombinasyonundan temin edilmiştir. Kesimden sonra bir gün dinlendirilmiş sığır

karkaslarından elde edilen büyük parça etlerden laboratuarda kaba yağ ve bağ dokuları uzaklaştırılmış ve -18°C’de muhafaza edilmiştir. Sığır et yağı ise soğutulduktan sonra küçük parçalara ayrılıp -18°C sıcaklıkta dondurularak muhafaza edilmiştir.

### 3.1.3. DNA izolasyonu ve PCR için kullanılan çözeltiler

TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu: 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözülüp, pH’ı 8’e ayarlanarak 100 ml’ye tamamlanan çözelti otoklavda steril edilmiştir.

%10’luk SDS (Sodium dodecile sulphate) çözeltisi: 10 g SDS 100 ml steril saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

Proteinaz K: 20 mg proteinaz K 1 ml steril saf su içerisinde çözündürülüp, -20°C’de muhafaza edilmiştir.

%10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi: 0,7 M NaCl çözeltisi içerisinde 10 g CTAB ilave edilerek hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Primer çalışma konsantrasyonu: Liyofilize primerler, kullanım talimatı doğrultusunda çözülerek  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$  formülü kullanılarak son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde hazırlanmıştır.

1XTAE Tamponu: 10XTAE (Sigma)’den 100 ml alınarak steril su ile hacmi steril distile su 1 L’ye tamamlanmıştır.

Ethidium bromür çözeltisi: 1 g ethidium bromür 100 ml steril saf su içerisinde karıştırılarak çözündürülmüştür.

6X yükleme tamponu: 40 ml %100'lük gliserol ve, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırılarak 1x TAE çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir (Barış 2009).

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi

#### 3.2.1.a. Antagonistik aktivite testleri

Araştırmada izolatların Çizelge 3.1'de yer alan indikatör suşlara karşı antagonistik aktiviteleri kuyu difüzyon testi kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için önce kültür süpernatantı hazırlanmıştır. Suşlar de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Oxoid CM0359) sıvı besiyerine inoküle edildikten sonra, 30°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra 7000 rpm'de 10 dk'lık santrifüj işlemi yapılmış ve süpernatant ayrılmıştır. Süpernatant 0.45µm delik çapına sahip selüloz asetat filtreden geçirilmiş ve kuyu difüzyon testinde kullanılmıştır

Test için önce 7 mL hacminde yarı-katı agar içeren TSB (Tryptone Soya Broth) (Oxoid CM0129) besiyerine 0.1 mL hacimde 24 saatlik indikatör mikroorganizma kültüründen ekim yapılarak, 24 saatlik (Tryptone Soya Agar) (Oxoid CM0131) katı besiyeri plakları üzerine dökülmüştür. Yarı- katı agarın katılaştırılmasının ardından plaklar üzerinde çapı 5 mm olacak şekilde açılan kuyulara test edilecek izolatların kültür süpernatantından 50 µL hacimde aktarılmış ve 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. En düşük süpernatant pH'sına ayarlanmış laktik asit ve hidroklorik asit çözeltileri ise kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca proteinaz K enzimi ile de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların boyutları değerlendirilmiştir. Bu test için *L. sakei* Lb 706 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Schillinger and Lücke 1989).

### 3.2.2. Antagonistik aktiviteye sahip *Lactobacillus plantarum* suşlarının tanımlanması

#### 3.2.2.a. Genomik DNA izolasyonu

İzolatların genomik DNA izolasyonu için Wilson (1997)'den uyarlanan protokol uygulanmıştır (Barış 2009).

- 1- MRS Agar (Oxoid CM0361) plaklarında geliştirilen genç kültürler öze yardımı ile 1 öze dolusu toplanarak 2 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.
- 2-1000 µl STE tamponu eklenip ve 10000 rpm'de santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. (Bu işlem birkaç kez tekrarlanmıştır)
- 3-Peletin üzerine 500 µl STE buffer eklenerek 75°C su banyosunda 30 dk bekletilmiştir.
- 4-Süre sonunda 50 µl %10'luk SDS çözeltisi ve 8 µl proteinaz K ilave edilmiştir.
- 5-40°C'de 1 saat bekletilmiştir.
- 6-Total hacmin 1/5'i kadar 5M NaCl ve total hacmin 0.1 katı CTAB/NaCl çözeltisi eklenerek karıştırılıp ve su banyosunda 65°C'de 10 dk bekletilmiştir.
- 7-780 µl Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (25:24:1) eklenerek alt-üst edilerek karıştırılıp 3°C'de 16000 rpm 10 dk santrifüjlenmiştir.
- 8- 0.1 katı hacimde CTAB eklenerek 65°C'de 10 dk bekletilmiştir.
- 9-Eşit hacimde Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisinde ilave edilmiştir.
- 10- 15 dk alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra 16000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve Üst faz alt faza dokunulmadan alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 11-Üzerine 0,6 hacim soğuk -20°C izopropanol eklenerek alt-üst edilerek karıştırılıp, -20°C'de bir gece bekletilmiştir.
- 12- 3°C'de 15000 rpm 10 dk santrifüjlenmiştir.
- 13-Üzerine 500 µl%70'lik etanol ilave edilmiş ve 3°C'de 15000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
- 12- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış ve kurutulmuştur.
- 13-70 µl TE tamponu ilave edilip kısa süreli santrifüjlenmiştir.

14-RNAaz'dan 2 µl ilave edilip 30 dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından kısa süreli santrifüj işleminin ardından, -80°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.2.b. Agaroz jel elektroforezi**

Genomik DNA örneklerinin elektroforezi, %0,7 oranında agaroz ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Agaroz 35 mL %TE elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözüldükten sonra dökme sıcaklığına soğutulmuş ve yatay elektroforez tablasına dökülmüştür. Daha sonra jel tarakları yerleştirilip 30 dk jelin polimerizasyonu için beklenmiş, ardından jelin üzerini kapatacak kadar TE tampon çözeltisi ilave edilmiştir.

8 µl genomik DNA örneği ve marker boya çözeltisi karıştırılıp, tarakların çıkmasıyla oluşan kuyucuklara dikkatlice aktarılmıştır.

Elektroforez, 65 voltta 1.5-2 saat süreyle yapılmıştır. Süre sonunda elektrik akımı kesilmiş ve ortamdan alınan jel, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0.2µg/mL etidyum bromit içeren çözeltisinde 1 saat boyanmıştır. Boyama işlemin sonunda jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışık altında incelenmiştir. Jel fotoğrafının çekiminde UviTec DBT-08 (Cambridge, İngiltere) jel görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

### **3.2.2.c. PCR reaksiyonu**

Bakteri izolatlarının genetik düzeyde tanısı için hedef bölge olarak bakteri sistematigi açısından önemli olan 16S rRNA'nın sentezlendiği bölge seçilerek ve evrensel primerler kullanılarak *in vitro* olarak çoğaltılmıştır.

Reaksiyonun hazırlanması: PCR'ı yapılacak her bir örnek için 7 µl 10 x PCR tamponu (Sigma), 1,4 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM), 0,7 µl 50 µM primer 27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), 0,7 µl

50  $\mu$ M primer 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'), 2,8  $\mu$ l DMSO, 4,2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 0,7  $\mu$ l 5 unit/ $\mu$ l *Taq* DNA polimeraz ve 51  $\mu$ l steril saf su ile 68,5  $\mu$ l'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışıma son olarak 1,5  $\mu$ l kalıp DNA eklenerek son hacim 70  $\mu$ l'ye tamamlanmıştır.

PCR programı: Hazırlanan örnekler, 95°C'de 2 dk denetürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dk denatürasyon, 53°C'de 1 dk bağlanma ve 72°C'de 2 dk uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 5 dk uzama basamağından oluşacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Barış 2009).

#### **3.2.2.d. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi**

1,2 g agaroz üzerine 120 ml 1XTAE tamponu ilave edilerek hazırlanan karışım mikrodalga fırında çözündürülmüş ve 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 0,6  $\mu$ l etidium bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülmüştür. Katılaşılan jelden taraklar çıkarılıp 1XTAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. İlk kuyucuğa DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D7058) 8  $\mu$ l yüklenirken diğer kuyucuklara her bir örnek için 2  $\mu$ l 6X yükleme tamponu, 8  $\mu$ l PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 90 voltta 75 dk süre ile yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip ve DNR BioImaging Systems Software ile analiz edilmiştir (Barış 2009).

#### **3.2.2.e. Dizi analizi**

Elde edilecek olan PCR ürünlerinin sekans analizleri "MacroGen Inc." firmasında hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucu elde edilen veriler NCBI veri tabanı kullanılarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.3. Bakteriyosin kodlayan genin PCR yardımı ile çoğaltılması

Primer dizaynı: Tanımlanan laktik asit bakterilerinin üretmiş olabilecekleri bakteriyosinler dikkate alınarak bakteriyosin üretiminden sorumlu genin tespiti amacı ile 11 farklı primer tercih edilmiştir. Primerlerin sekansları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Bakteriyosin kodlayan genin varlığını belirlemek amacı ile kullanılan oligonükleotidler

Sorumlu gen	Primer	Bağlanma sıcaklığı	Ref.
<i>plnA</i>	F: GTA CAG TAC TAA TGG GAG R: CTT ACG CCA ATC TAT ACG	53	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnB</i>	F: TTC AGA GCA AGC CTA AAT GAC R: GCC ACT GTA ACA CCA TGA C	51.5	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnC</i>	F: AGC AGA TGA AAT TCG GCA G R: ATA ATC CAA CGG TGC AAT CC	49.5	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnD</i>	F: TGA GGA CAA ACA GAC TGG AC R: GCA TCG GAA AAA TTG CGG ATA C	53	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnEF</i>	F: GGC ATA GTT AAA ATT CCC CCC R: CAG GTT GCC GCA AAA AAA G	53.2	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnI</i>	F: CTC GAC GGT GAA ATT AGG TGT AAG R: CGT TTA TCC TAT CCT CTA AGC ATT GG	52.5	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnj</i>	F: TAA CGA CGG ATT GCT CTG 51 475 R: AAT CAA GGA ATT ATC ACA TTA GTC	51	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnk</i>	F: CTG TAA GCA TTG CTA ACC AAT C R: ACT GCT GAC GCT GAA AAG	52.9	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnG</i>	F: TGC GGT TAT CAG TAT GTC AAA G R: CCT CGA AAC AAT TTC CCC C	52,8	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnN</i>	F: ATT GCC GGG TTA GGT ATC G R: CCT AAA CCA TGC CAT GCA C	51,9	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnNC8</i>	F:GGTCTGCGTATAAGCATCGC R:AAATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTCC	60	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnS</i>	F:GCCTTACCAGCGTAATGCCC R:CTGGTGATGCAATCGTTAGTTT	60	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)
<i>plnW</i>	F:TCACACGAAATATTCCA R:GGCAAGCGTAAGAAATAAATGAG	55,5	Doulgeraki <i>et al.</i> (2013)

Reaksiyonun hazırlanması: Her bir örnek için 30 µl'lik reaksiyon hazırlanmıştır. Bir örnek için hazırlanan reaksiyon; 3 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, %0,01 jelatin pH: 8,3), 0,6 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP-10 mM), 4 µl 50 nM (forward) primer, 4 µl 50 nM (reverse) primer, 1,2 µl DMSO, 1,8 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µl 5 unit/µl *Taq* DNA polimeraz ve 12,1 µl steril saf su ile 27 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışıma son olarak 3 µl kalıp DNA eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır.

PCR programı: Hazırlanan örnekler, 95°C'de 2 dk denatürasyon işleminin ardından 36 döngü olarak 94°C'de 1 dk denatürasyon, Çizelge 3.2'de belirtilen uygun bağlanma sıcaklıklarında 1 dk ve 72°C'de 1 dk uzama basamağını takiben 72°C'de 5 dk uzama basamağı ile programlanan PCR termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve hedef bölgelerin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir (Barış 2009).

PCR ürünlerinin elektroforezi: Bir gram agaroz üzerine 100 ml 1XTAE tamponu ilave edilerek hazırlanan karışım mikrodalga fırında çözündürülmüş ve 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 0,6 µl etidium bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülmüştür. Katılaştıran jelden taraklar çıkarılıp 1XTAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. İlk kuyucuğa O'range ruler 50bp DNA ladder (MBI Fermentas, St-Leon-Rot, Germany) 4µl yüklenirken diğer kuyucuklara her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu, 4 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 100 voltta 45 dk süre ile yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip, DNR BioImaging Systems Software ile analiz edilmiştir (Barış 2009).

#### **3.2.4. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi**

Steril kültür süpernatantının antimikrobiyal aktivitesi Biswas *et al.* (1991)'e göre belirlenmiştir. Öncelikle süpernatant, ikinin katları oranında (1/2, 1/4, 1/8) seyreltilmiştir. TSA besiyeri plakları üzerine 0.1ml hacminde 24 saatlik indikatör bakteri içeren 7 ml'lik TSA yarı- katı besiyeri dökülmüştür. Kuyu difüzyon testinde

olduğu gibi her dilüsyondan 50µl hacminde 0.5 cm çapında açılan kuyulara aktarılmıştır. 30°C’de 24 saat inkübasyonun ardından berrak zon görülen en yüksek dilüsyon dikkate alınarak bakteriyosin aktivitesi belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesi AU/mL (Arbitrary unit/mL) olarak hesaplanmıştır (AU/mL=Dilüsyon Faktörü\*1mL/50µL).

### **3.2.5. Çoğalma eğrisinin oluşturulması ve bakteriyosin üretiminin çoğalma süresine göre değişiminin belirlenmesi**

MRS sıvı besiyerine laktik asit bakteri izolatının 1 gecelik kültüründen %1 oranında inokülasyon yapılmış ve daha sonra 30°C’de 24 saatlik inkübasyon süresince 2’şer saat aralıklarla alınan örneklerin 600 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerler kullanılarak çoğalma eğrisi oluşturulmuştur. Ayrıca alınan örneklerde laktik asit bakteri suşlarının bakteriyosin üretimlerini belirlemek amacı ile *M. luteus* NCIMB ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 indikatör suşlarına karşı aktiviteleri ve zon çapları belirlenmiştir.

### **3.2.6. Antimikrobiyal maddenin karakterizasyonu**

#### **3.2.6.a. Sıcaklık uygulamasının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi**

Steril hücre süpernatantı 90°C’de 10 dk, 90 dk, 15 dk, 60°C’de 10 dk, 60°C’de 15 dk ve 121°C’de 15 dk olmak üzere farklı sıcaklıklarda bekletilerek sıcaklığın etkisi belirlenmiştir. Sıcaklık uygulamalarının ardından aktivite testleri yapılmış ve sıcaklığın etkisi ortaya çıkarılmıştır.

#### **3.2.6.b. Enzim uygulamalarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi**

1 ml süpernatant 10µl enzimle mikrosantrifüj tüplerinde karıştırılıp uygun koşullarda inkübe edilmiştir. Bu amaçla tripsin, pepsin ve proteinaz-K enzimleri kullanılmıştır.

Tripsin uygulanan örnekler 25°C’de, proteinaz K ve pepsin uygulanan örnekler 37°C’de 1 saat süre ile inkübe edilmiştir (Van Reenen *et al.* 1998). İnkübasyon periyodunun sonunda örnekler kuyu difüzyon testine tabi tutulmuştur (Schillinger and Lücke 1989).

### **3.2.7. *Lactobacillus plantarum* suşlarının teknolojik özelliklerinin belirlenmesi**

#### **3.2.7.a. Proteolitik aktivitenin belirlenmesi**

Jelatinaz Aktivitesi: Jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi amacı ile Gelatine agar besiyeri içeren petri plakları kullanılmıştır. Besiyeri üzerine 24 saatlik kültürden yüzeye çizim yapılmış ve 30°C’de 48 saat inkübasyonun ardından koloniler etrafında berrak zonun varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Kazeini Parçalama Yeteneği: Bu amaçla hazırlanan Calcium Caseinate agar (Merck 1.05409) içeren petri plaklarına kuyucuklar açılmış ve açık kuyulara 24 saatlik hücre kültüründen ilave edilmiştir. 30°C’de 48 saat inkübasyonun ardından kuyu etrafında oluşan berrak zonlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

#### **3.2.7.b. Lipolitik aktivitenin belirlenmesi**

Bu amaçla hazırlanan Trybutyirin agar (Merck 1.01957) içeren petri plaklarına kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuklara 24 saatlik hücre kültüründen aktarılacak 30°C’de 6 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından oluşan berrak zonlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

#### **3.2.7.c. Asetoin oluşumu**

İzolatların glukozdan asetoin oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacı ile 5 ml MR-VP besiyeri (Peptone from meat 7,0 g/L; D(+) Glucose 5,0 g/L; Phosphate buffer 5,0 g/L) içeren tüplere 1/10 oranında 24 saatlik hücre kültüründen aktarılıp 30°C’de 48 saat

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerden 1 ml alınarak steril bir tüpe aktarılmış ve üzerine 0,2 ml %40'lık KOH çözeltisi ve 0,6 ml alfa naftol eklenmiştir. 15 dk beklemenin ardından sıvı yüzeyinde pembeden parlak kırmızıya değişen renkli halkanın varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Harrigan 1998).

#### **3.2.7.d. Laktik asit üretiminin enzimatik olarak belirlenmesi**

Enzimatik yolla, L (+) ve D(-) laktik asit üretimlerinin belirlenmesi için enzimatik reaksiyon esaslı Boehringer Mannheim test kiti(Roche yellow line, 11112821035) kullanılmış ve miktarlar hesaplanmıştır.

#### **3.2.7.e. Nitrat redüktaz aktivitesinin belirlenmesi**

5 ml Nitrate broth (Sigma-Aldrich 72548) besiyeri içeren tüplere 24 saatlik laktik asit bakteri kültürden 1-2 damla ilave edilmiş, daha sonra 30°C sıcaklıkta 24 saatlik inkübasyonun ardından tüplere sırası ile 0.2 ml A solüsyonundan ve 0.2 ml B solüsyonundan ilave edilmiştir. Bu işlemden sonra tüp içerisindeki besiyerinin renginin kırmızıya dönmesi pozitif, değişiminin olmaması negatif olarak değerlendirilmiştir. Ancak negatif sonuç elde edildiğinde besiyerine çinko tozu ilave edilerek 15 dk bekletilmiş ve renk dönüşümünün olması kesinlikle negatif, dönüşüm olmaması ise kesinlikle pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kloos and Schleifer 1975).

A Solüsyonu: 1 lt 5 N asetik asit çözeltisi içerisinde 8 g sulfanilik asit çözündürülerek hazırlanmıştır.

B Solüsyonu: 1 lt 5 N asetik asit çözeltisi içerisinde 6 g  $\alpha$ - naphthylamine(N,N-dimethyl-1 naphthyl-amene) çözündürülerek hazırlanmıştır.

### **3.2.7.f. Aminoasit dekarboksilaz aktivitesinin belirlenmesi**

İzolatların biyojen amin oluşturma yeteneklerini belirlemek amacı ile Moeller yöntemi kullanılmıştır. Miller (MERCK 1.10285.5007) sıvı besiyerine ayrı ayrı arginin, ornitin ve lizin aminoasitleri %1 oranında ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerleri 3'er ml olacak şekilde tüplere doldurulup, tüplerin içerisine hava ile temasını kesmek amacıyla sıvı parafin ilave edilmiştir. Hazırlanan tüpler 115°C sıcaklıkta 10 dk steril edilmiştir.

### **3.2.7.g. Farklı pH değerlerinde çoğalma**

MRS sıvı besiyeri hazırlandıktan sonra 5 N NaOH ve 5 N HCl çözeltileri kullanılarak besiyeri pH'sı 4,5, 5, 5,5, 6 veya 6,5 olacak şekilde hazırlanmış ve 5'er ml olacak şekilde tüplere aktararak otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası tekrar pH kontrolü yapılmıştır. pH'sı ayarlı besiyerlerine 1/10 oranında 24 saatlik kültürden ekim yapılmış ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda UV spektrofotometrede 600 nm'de absorbans ölçümü ile pH'ın gelişim üzerine etkisi belirlenmiştir.

### **3.2.7.h. Farklı sıcaklıklarda çoğalma**

MRS sıvı besiyeri hazırlandıktan sonra 5'er ml olacak şekilde tüplere aktarıldıktan steril edilmiştir. Besiyerlerine 1/10 oranında 24 saatlik kültürden ekim yapılmış ve 4°C'de 7 gün, 15°C'de 3 gün, 25°C'de 2 gün ve 45°C'de 3 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda UV spektrofotometrede 600 nm'de absorbans ölçümü ile sıcaklığın gelişim üzerine etkisi belirlenmiştir.

### **3.2.7.i. Farklı tuz konsantrasyonlarında çoğalma**

MRS sıvı besiyerine NaCl ilave edilerek tuz konsantrasyonu %6,5 veya 10 olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerinden 5'er ml olacak şekilde tüplere

aktarılarak steril edilmiştir. Steril besiyerlerine 1/10 oranında 24 saatlik kültürden ekim yapılmış ve 25°C sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda UV spektrofotometrede (Aquamate Thermo electron corporation, England) 600 nm’de absorbans ölçümü ile sıcaklığın gelişim üzerine etkisi belirlenmiştir.

### 3.2.8. Fermente sucuk üretimi

Fermente sucukta bakteriyosin benzeri metabolit üreticisi suşların kullanımının *L. monocytogenes*’e karşı etkisini belirlemek amacı ile sucuk hamurları *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu ile  $10^6$  kob/g düzeyinde kontamine edilmiştir. 5 farklı bakteriyosin benzeri metabolit üreticisi *L. plantarum* suşları (S51, S72, S74 ve S85) ile birlikte *S. xylosus* GM92 (Kaban and Kaya 2008) suşu starter olarak kullanılarak 6 farklı sucuk grubu 2 tekerrürlü olarak üretilmiştir. Üretim süresince farklı günlerde (0, 1, 3, 5, 7 ve 11. günler) alınan örnekler farklı analizlere tabi tutulmuştur.

Sucuk hamurunun hazırlanmasında %80 yağsız sığır eti ve %20 sığır et yağı kullanılmıştır. Her bir kg et-yağ karışımı için 20 g tuz, 10 g sarımsak, 4g sakaroz, 7 g kırmızı biber, 5 g karabiber, 9 g kimyon ve 2,5 g yenibahar, 150 ppm sodyum nitrit kullanılmıştır (Kaban 2007). Sucuk hamurlarının tümü laboratuvar tipi kuterde (MADO Typ MTK 662, Dornhan, Schwarzwald) hazırlanmıştır. Hazırlanan hamurlar 38 cm çaplı kallogen kılıflara laboratuvar tipi pistonlu bir doldurucu (MADO Typ MTK 591, Dornhan, Schwarzwald) ile doldurulmuş ve bağlanmıştır. Dolum sonrasında sucuklar dengeleme işleminin ardından sıcaklığı, nemi ve hava akımı otomatik olarak ayarlanabilen bir klima ünitesine alınmış (Reich, Klima-Rauchtechnik, Germany) ve  $24\pm 1^\circ\text{C}$ ’lik bir başlangıç fermentasyon sıcaklığı ve %92 nem uygulanmıştır.

0. Gün (%92 $\pm$ 2 RH, 24 $\pm$ 1°C,)

1. Gün (%90 $\pm$ 2 RH,20 $\pm$ 1°C)

3.Gün(%88  $\pm$ 2RH,18 $\pm$ 1°C)

5. gün (%88  $\pm$ 2RH,18 $\pm$ 1°C)

7. gün (%88  $\pm$ 2RH,16 $\pm$ 1°C)

9-11.günler (%80±2 RH, 16±1°C)

### **3.2.9. Örneklerin alınması ve analize hazırlanması**

Analizler sucuk hamurundan (0. gün) ve olgunlaştırmanın belirli günlerinde (0, 1, 3, 5, 7 ve 11. günler) şansa bağlı olarak seçilen sucuk örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Mikrobiyolojik analizler ve fiziksel analizler için stomacher poşetlerine örnekler alınmıştır.

#### **3.2.9.a. Fiziksel analizler**

##### **Nem (%)**

10 g örnek kurutulmuş kaplara tartılmış ve 100°C'de kurutma fırınında sabit tartım elde edilinceye kadar kurutulduktan sonra %nem miktarı belirlenmiştir (Gökalp vd 2001).

##### **pH**

Homojen hale getirilmiş sucuk örneklerinden 10 g tartılıp üzerine 100 ml saf su ilave edilerek Ultra-Turrax (IKA Werk T 25, Germany) ile 1 dk homojenize edildikten sonra kullanılmadan önce uygun tampon çözeltiler (pH 4.0 ve pH 7.0) ile kalibre edilen pH-metre (ATI ORION 420, MA 02129, USA) ile pH değerleri belirlenmiştir (Gökalp vd 2001).

#### **3.2.9.b. Mikrobiyolojik analizler**

Analizler üretim sürecince alınan örneklerde (0, 1, 3, 5, 7 ve 11. günler) gerçekleştirilmiştir. Mikrobiyolojik analizler için sucuk örneğinden 25 g steril plastik torbaya tartılmış, üzerine 225 ml steril fizyolojik su (%0.85 NaCl, Merck) ilave edildikten sonra Stomacher'de (Lab Stomacher Blander 400-BA 7021, Sewardmedical,

England) 1 dk homojenize edilmiştir. Daha sonra bu homojenattan steril serum fizyolojik (%0.85 NaCl, Merck) kullanılarak uygun dilüsyonlar hazırlanmış ve mikrobiyolojik sayımlar yapılmıştır.

### **Laktik asit bakteri sayımı**

MRS agar içeren petri plaklarına uygun dilüsyonlardan 0,1 ml hacimde aktararak yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve 30°C'de 48 saatlik anaerobik (Aneorocult A, Merck) inkübasyondan sonra koloni sayımı yapılmıştır.

### ***Listeria monocytogenes* sayımı**

Uygun dilüsyonlardan PALCAM Listeria Selective Supplement (MERCK 1.12122.0001) içeren PALCAM Listeria Selective Agar (Base) (MERCK 1.11755.0500) plaklarına yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve ekimi yapılan petri plakları 37°C'de 2 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda siyah zonlu yeşil-siyah renkli koloniler dikkate alınarak sayım yapılmıştır. Sayım işleminden sonra agar plaklarından 5-10 koloni seçilmiş ve Nutrient Agar(Merck) besiyerine çizim yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından Gram boyama (+), 22°C'de hareketlilik (+) ve katalaz (+) testleri uygulanmış ve elde edilen sonuçlara göre *L. monocytogenes* sayısı hesaplanmıştır.

### **Enterobacteriaceae sayımı**

Uygun dilüsyonlardan VRBD (Violet Red Bile Dextrose) Agar (Merck 1.10275.0500) plaklarına 0.1'er ml aktararak yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve petri plakları 30°C'de 2 gün anaerobik şartlarda inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonucunda 1 mm'den büyük koloniler sayılarak Enterobacteriaceae sayısı tespit edilmiştir.

### 3.2.10. İstatistiksel analizler

Araştırmada deneme üretimi tam şansa bağlı deneme planına göre 2 tekerrürlü olarak kurulmuş ve yürütülmüştür. Deneme sucuklarında starter kültür (kontrol veya laktik asit bakteri suşları (S51, S72, S74 veya S85) + *S. xylosus* GM92) ve olgunlaştırma süresi (0, 1, 3, 5, 7 ve 11. günler) faktör olarak seçilmiştir. Elde edilen veriler SPSS 16.0 paket programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş, önemli bulunan ana varyasyon kaynaklarına ait ortalamalar ise Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1. *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Moleküler Düzeyde Tanımlanması ve Antagonistik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Sucuk kaynaklı beş *L. plantarum* izolatu genotipik tanımlanması için DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonunun ardından 27F ve 1492R evrensel primerleri kullanılarak hedef DNA bölgelerini çoğaltmak amacıyla gerçekleştirilen PCR işlemi sonucunda elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütülerek işlemin uygunluğu teyit edilmiş ve çoğaltılan bölgelerin dizi analizleri MacroGen firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi analiz sonuçları Blast veri tabanı kullanılarak çoğaltılan 16S rRNA bölgelerinin diğer mikroorganizmalar ile karşılaştırılması sonucu S50 1290 nt ile %100 oranında, S51 1312 nt ile %100 oranında, S72 1306 nt ile %99 oranında, S74 1279 nt ile %99 oranında ve S85 1278 nt ile %99 oranında *L. plantarum*'a benzediği belirlenmiştir. Moleküler düzeyde tanımlanması yapılan laktik asit bakteri suşlarının aksesyon numaraları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *Lactobacillus plantarum* suşlarına ait aksesyon numaraları

Örnek Numarası	Aksesyon Numarası	İzolat İsmi	%Benzerlik
S50	KR011000	<i>Lactobacillus plantarum</i> S50	100
S51	KR011001	<i>Lactobacillus plantarum</i> S51	100
S72	KR011010	<i>Lactobacillus plantarum</i> S72	99
S74	KR011011	<i>Lactobacillus plantarum</i> S74	99
S85	KR011017	<i>Lactobacillus plantarum</i> S85	99

Suşların antagonistik aktivite testlerine ait sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere suşların tümü kullanılan yedi indikatör bakteriye karşı kuyu difüzyon testinde antagonistik aktivite göstermiştir. Toksoy vd (1999) tarafından yapılan araştırmada da sucuk ve sosislerden izole edilen bazı *L. plantarum* suşlarının

*Staphylococcus aureus* (+), *S. aureus* (-) ve *Bacillus subtilis*'in yanı sıra *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gibi Gram (-) bakterilere karşı da antagonistik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Konu ile ilgili diğer bir araştırmada ise doğal fermente bir sosis çeşidinden izole edilen bazı *L. plantarum* suşlarının *L. monocytogenes* ve *S. aureus* suşlarına karşı antagonistik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Papamanoli *et al.* 2003). Sucuk, salami, Rohwurst gibi fermente sosislerinde, laktik asit bakterileri *S. aureus* ve *L. monocytogenes* gibi önemli gıda patojenleri inhibisyonu açısından önemli mikroorganizmalardır (Schillinger and Lücke 1989; Lewus *et al.* 1991). Sawitzki *et al.* (2009) ise doğal fermente sosislerden izole edilen ve genotipik olarak *L. plantarum* olarak tanımlanan 7 laktobasil suşunun, 7'sinin *L. monocytogenes*'e, 4'ünün ise *S. aureus*'e karşı antagonistik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

**Çizelge 4.2.** *Lactobacillus plantarum* suşlarının antagonistik aktiviteleri

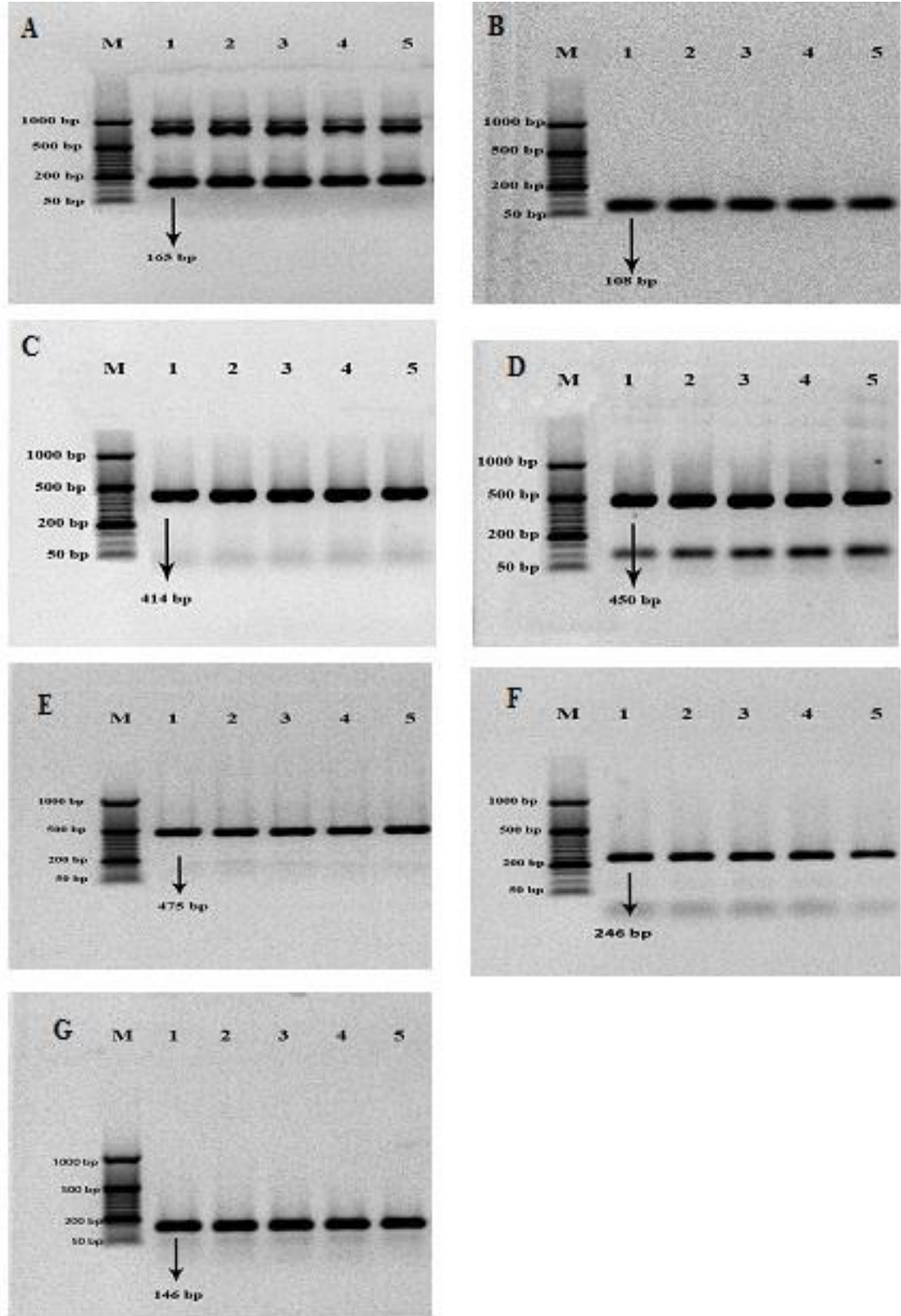
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. aureus</i> ATCC25922	<i>Listeria monocytogenes</i> C3970	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	<i>Bacillus cereus</i> 11778	<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB
	İnhibisyon zon çapı (mm)						
S50	9	9	11	7	15	9	9
S51	7	9	11	7	13	9	9
S72	9	13	11	11	13	11	15
S74	9	9	11	9	17	9	9
S85	11	15	13	11	13	9	9

Barbosa *et al.* (2015) ise İtalyan tipi fermente bir sosisten izole edilen ve 16s rRNA dizi analizi ile identifiye edilen *L. plantarum* suşunun *L. monocytogenes* ve *S.aureus* suşlarına karşı antagonistik aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

#### 4.2. Bakteriyosin Kodlayan Genin PCR Yardımı ile Çoğaltılması

İzolatlara ait genomik DNA kullanılarak 11 farklı primer ile gerçekleştirilen PCR işleminin ardından PCR ürünlerini görüntülemek amacıyla yürütülen jel elektroforezi görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Elektroforez sonucunda yedi primer ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinde bant görüntüsü elde edilmiştir. Elde edilen bantların büyüklerinin, çoğaltılmak istenilen kısım ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Bant varlığı kullanılan primerlerin genomik DNA'da uygun bölgeleri çoğaltmış olması, bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin varlığına işaret etmektedir (Remiger *et al.* 1996). Plantarisin üretiminden sorumlu *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnF*, *plnG*, *plnH*, *plnI*, *plnJ*, *plnK* ve *plnL* genleri için kullanılan primerler ile PCR işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Wen *et al.* (2016) *L. monocytogenes* de dahil farklı indikatör mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite gösteren *L. plantarum* K25 suşunun genomik DNA'sında plantarisin üretiminden sorumlu *plnR*, *plnL*, *plnK*, *plnJ*, *plnP*, *plnD*, *plnI*, *plnEF*, *plnG*, *plnH*, *plnS*, *plnT*, *plnU*, *plnV*, *plnW* ve *plnC8β* genlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.



**Şekil 4.1.** Bakteriyosin kodlayan genin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüleri

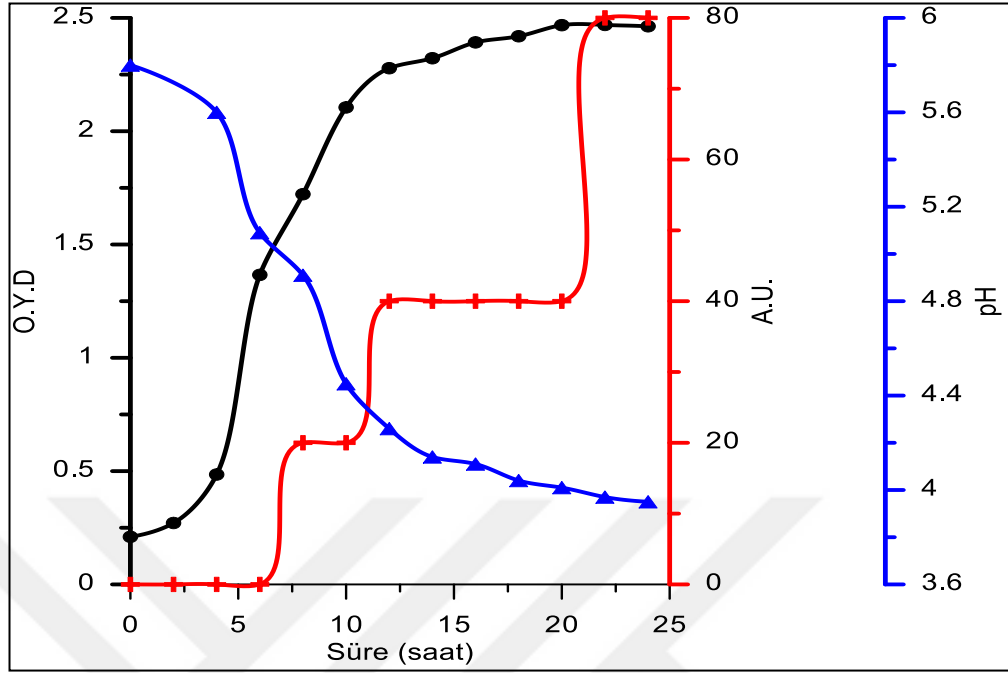
A- (*PlnB-F/ PlnB-R*), B-(*PlnC-F/ PlnC-R*), C-(*PlnD-F/ PlnD-R*), D-(*PlnI-F/ PlnI-R*), E-(*PlnJ-F/ PlnJ-R*), F-(*PlnK-F/ PlnK-R*), G-(*PlnN-F/ PlnN-R*) 1-*Lactobacillus plantarum* S50, 2-*L. plantarum* S51, 3- *L. plantarum* S72, 4- *L. plantarum* S74 5- *L. plantarum* S85

Fontana *et al.* (2015) et kaynaklı 111 laktik asit bakteri izolatında antilisterial etkiye sahip bakteriyosin üretiminden sorumlu gen aradıkları bir çalışmada domuz sosisinden izole edilmiş olan *L. plantarum* izolatlarının plantarisin kodlayan *plnA* geninin varlığını 6 izolatta belirlerken, *plnEF* genini ise sadece 2 izolatta tespit etmişlerdir. Araştırmacılar 1 izolatın antimikrobiyal aktivite göstermezken *plnEF* genini DNA'sında bulundurduğu, 6 izolatın ise antimikrobiyal etki göstermeyip yapısında da aranan sorumlu genlerden hiçbirine rastlanmadığını ve sonuç olarak bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin her zaman antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olamayacağını ifade etmişlerdir.

Yapılan bu çalışmalar bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin genomik DNA'da varlığının önemli ölçüde mikroorganizmanın antimikrobiyal peptit ürettiğine işaret ederken, DNA da aranan sorumlu genlerin saptanamaması farklı bir antimikrobiyal peptit ürettiği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmada aranan 11 farklı bakteriyosin kodlayan genden 7'si ile PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmesi sonucunda söz konusu suşların bakteriyosin üreticisi potansiyeline sahip olduğu yorumu yapılabilir.

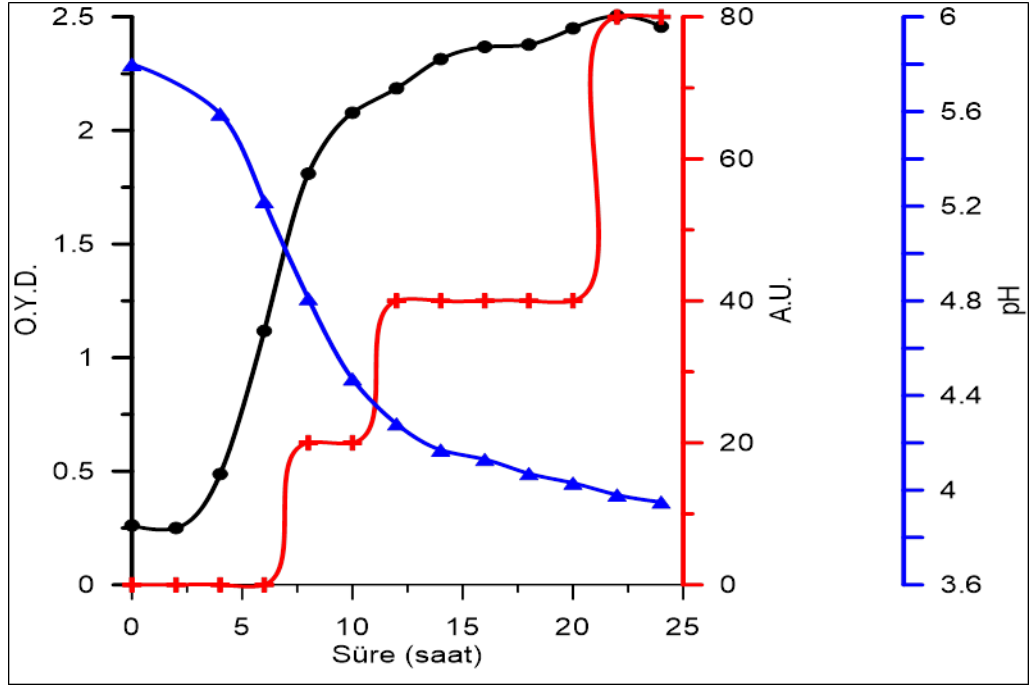
#### **4.3. *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Çoğalma Eğrisinin Oluşturulması ve Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi**

*L. plantarum* S50 suşunun 24 saat süresince O.Y.D. belirlenerek oluşturulan çoğalma eğrisi Şekil 4.2'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere suş 4. saate kadar lag fazında, 4. saatten sonra ise log faza geçmiştir. Suş, antimikrobiyal aktivitesini 8. saatte göstermeye başlamıştır. Log fazın sonuna doğru antimikrobiyal aktivitede artış gözlemlenirken durma fazının sonunda maksimum seviyeye ulaşmıştır. Çoğalma eğrisi süresince yapılan pH ölçümleri ile çoğalmaya paralel olarak pH'ın azaldığı tespit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda ortamda pH 4'ün altına düşmüştür.



**Şekil 4.2.** *Lactobacillus plantarum* S50 suşuna ait çoğalma eğrisi ve çoğalma süresince pH değişimini ve bakteriyosin aktivitesini gösteren eğri grafiği

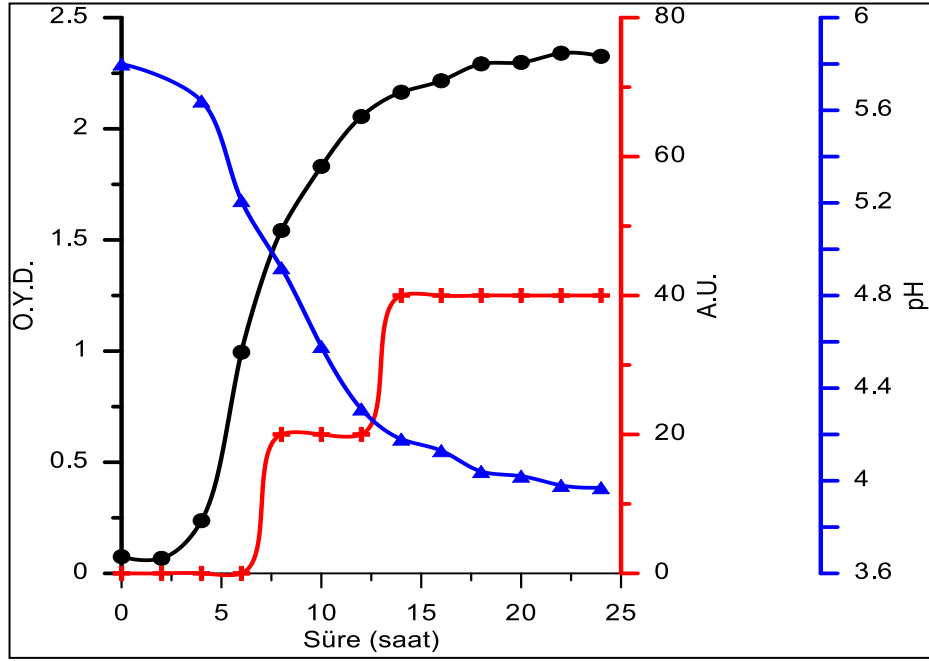
*L. plantarum* S51 suşunun 24 saat süresince O.Y.D. belirlenerek oluşturulan çoğalma eğrisinden de (Şekil 4.3) görüldüğü üzere suş 4. saatten sonra log faza geçmiştir. *L. plantarum* S50 suşunda olduğu gibi antimikrobiyal aktivite ilk olarak 8. saatte belirlenmiştir. Log fazının sonuna doğru artış gösteren antimikrobiyal aktivite durma fazının sonunda maksimum seviyeye ulaşmıştır. Çoğalma süresince O.Y.D. ile doğru orantılı olarak pH'nın azaldığı, 24 saat inkübasyonun ardından ortam 4'ün altına düştüğü görülmüştür.



**Şekil 4.3.** *Lactobacillus plantarum* S51 numaralı izolata ait çoğalma eğrisi ve çoğalma süresince pH değişimini ve bakteriyosin aktivitesini gösteren eğri grafiği

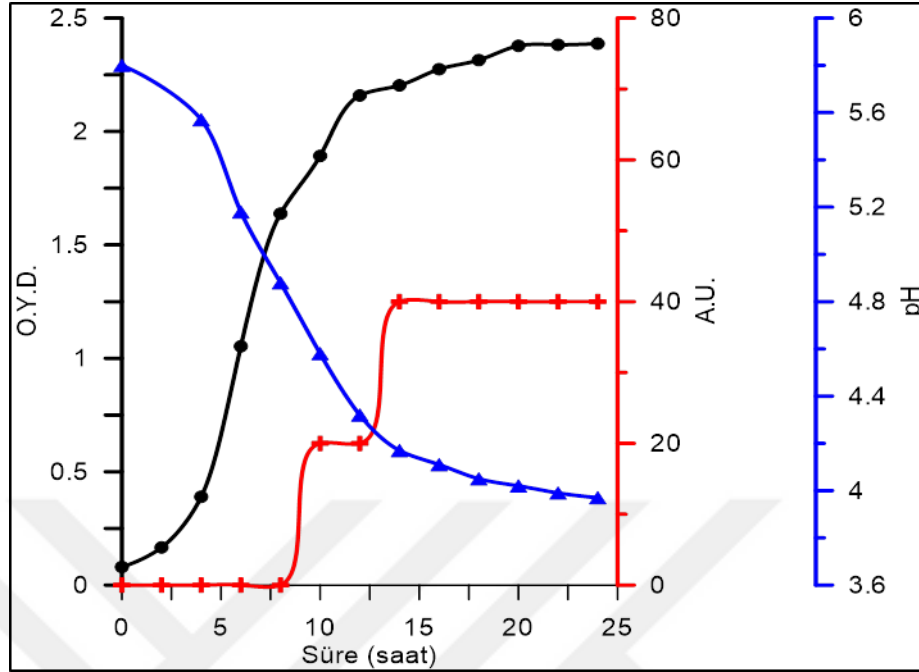
*L. plantarum* S72 suşuna ait çoğalma eğrisi ile bakteriyosin aktivite ve pH değerine ait sonuçlar Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Bu suşta antimikrobiyal aktivitesini ilk olarak 8. saatte göstermiş ve aktivite 14. saatte maksimum maksimum seviyeye ulaşmıştır. Daha sonra ise aktivite de önemli bir değişim gözlenmemiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda bu suşta da pH 4'ün altına düşmüştür.





**Şekil 4.5.** *Lactobacillus plantarum* S74 suşuna ait çoğalma eğrisi ve çoğalma süresince pH değişimini ve bakteriyosin aktivitesini gösteren eğri grafiği

*L. plantarum* S85 suşunun 24 saatlik inkübasyon süresince 2'şer saat aralıklarla belirlenen O.Y.D. ile oluşturulan çoğalma eğrisi Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu suş da 4 saatlik bir lag fazı göstermiştir. Ancak antimikrobiyal aktiviteyi 10. saatte vermiştir. Maksimum aktivite ise 14. saatte gözlemlenmiştir. Çoğalma süresince ortam pH değerinde azalma görülmüş ve 24 saatlik inkübasyonun ardından pH 4'ün altına düşmüştür



**Şekil 4.6.** *Lactobacillus plantarum* S85 suşuna ait çoğalma eğrisi ve çoğalma süresince pH değişimini ve bakteriyosin aktivitesini gösteren eğri grafiği

*L. plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85 numaralı izolatlarına ait çoğalma eğrilerinden görüleceği üzere tüm suşlar için ilk 4 saat lag fazını oluşturmaktadır. Bakteriyosin üretimi tüm suşlar için log fazda başlamış ve durma fazında maksimum seviyeye erişmiştir. Hücre sayısının artmasının ve ortamdaki besin miktarının kritik düzeye inmesinin bakteriyosin üretimini arttırdığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlar Nes *et al.* (2006) tarafından da bildirilmiştir. Bakteriyosin aktivitesi açısından suşlar arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. *L. plantarum* S50 ve S51'in antimikrobiyal aktiviteleri S72, S74 ve S85 suşlarına göre daha yüksek düzeyde bulunmuştur.

*L. plantarum* suşları çoğalma eğrisi ve bakteriyosin aktivitesi açısından genellikle benzer sonuçlar vermektedir. Kormin *et al.* (2001) tarafından yapılan çalışmada *L. plantarum* BS2 suşunun bakteriyosin üretimine çoğalma eğrisinin 8. saatinde başladığı ve log fazın sonunda bakteriyosin aktivitesinin maksimum düzeye ulaştığı rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise bakteriyosin üreticisi *L. plantarum* N014 suşunun bakteriyosin üretimine log fazında başladığı, hücre sayısının en yüksek olduğu durma fazına geçerken maksimum seviyeye ulaştığı bildirmiştir

(Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2006). Benzer sonuçlar Todorov and Dicks (2006) tarafından da tespit edilmiştir. Diğer taraftan François *et al.* (2013) bakteriyosin üreticisi *L. plantarum* 29V suşunun, bakteriyosin üretimine log fazda başladığını, çoğalmanın durduğu fazda maksimum inhibisyonu verdiğini ve daha sonra ise antimikrobiyal etkinin azaldığını bildirmişlerdir. Buna karşın mevcut araştırmada suşların 24 saatlik inkübasyonun sonunda antimikrobiyal aktivitede bir azalma olmamıştır. Bu sonucun muhtemelen ekstraselüler proteazların henüz üretilmemesinden ileri geldiği söylenebilir.

*L. plantarum* suşları 24 saatlik inkübasyon sonunda pH değeri açısından benzer düşüşler göstermiştir. Tüm suşlar için antimikrobiyal etki pH 4,5-5,0 arasında başlamış ve maksimum antimikrobiyal aktiviteye pH 3,95- 4,50 aralığında ulaşıldığı belirlenmiştir. Benzer sonuçlar bakteriyosin üreticisi *L. plantarum* suşları için de bildirilmiştir (Todorov *et al.* 2000; Todorov 2008).

#### **4.4. *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitesine Farklı Sıcaklık ve Enzim Uygulamalarının Etkileri**

Araştırmada kullanılan *L. plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85 suşlarının ürettiği antimikrobiyal maddelerin karakterizasyonu amacı ile sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkileri incelenmiştir.

Her bir suşa ait süpernatantın farklı sıcaklık ve sürelerde inkübasyonun ardından kuyu difüzyon testine tabi tutulmuştur. İndikatör mikroorganizma olarak *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *M. luteus* NCBI kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Test edilen suşlar içerisinde *L. plantarum* S74 suşunda uygulanan tüm sıcaklık süre kombinasyonlarında aktivitede herhangi bir kayıp görülmemiştir. Bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerin karakterizasyonunda ısıl işleme dayanıklılık önemli bir parametredir. *L. plantarum* tarafından üretilen bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitlerin ısıl işleme dayanıklı olduğu diğer bazı araştırmalarda da ortaya konulmuştur (Müller *et al.* 2009; Marie *et al.* 2012; Yang *et al.*

2012). Örneğin Müller *et al.* (2009) *L. plantarum* lp31 suşunun üretmiş olduğu bakteriyosinin 100°C’de 10 ve 30 dk’lık uygulamalardan etkilenmediğini bildirmişlerdir. *L. plantarum* S85 ve S50 suşlarının üretmiş olduğu antimikrobiyal madde sıcaklık süre uygulamalarının tümünden çok az etkilenirken, S72 ve S51 izolatlarının ise 121°C 15 dk inkübasyon sonucunda *M. luteus* üzerine antimikrobiyal etkisini tamamen kaybettikleri saptanmıştır. Marie *et al.* (2012) 121°C’de 30 dk’lık ısıtma işlemi uygulaması neticesinde *L. plantarum* Lp6SH suşunun aktivitesinde %80 oranında kayıp olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Yang *et al.* (2012) tarafından laktik asit bakteri suşlarının antilisterial etkilerini belirlemek amacı ile yürütülen bir çalışmada da bakterilerin üretmiş olduğu antimikrobiyal maddelerin 80 ve 100°C’de 60 ve 90 dk’lık ısıtma işlem uygulamalarından etkilenmediği, 121°C’de 15 dk’lık uygulama neticesinde ise inhibisyon zonlarında kısmen ya da tamamen kayıplar olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmada elde edilen sonuçlara göre kullanılan *L. plantarum* suşlarının özellikle de *L. plantarum* S74 suşunun fermente sucuğun yanı sıra ısıtma işlem görmüş sucuk üretiminde *L. monocytogenes*’e karşı koruyucu kültür olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

**Çizelge 4.3.** Farklı sıcaklık uygulamalarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

<i>Lactobacillus plantarum</i>	121°C 15dk		90°C 10 dk		90°C 15dk		60°C 10dk		60°C 15dk		Kontrol	
	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M
S50	9	7	9	11	7	11	9	11	9	11	11	13
S51	7	0	7	9	7	9	7	9	7	9	9	9
S72	9	0	9	8	9	9	9	8	9	9	11	13
S74	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
S85	7	7	9	7	9	7	9	7	9	7	9	9

L: *Listeria monocytogenes* ATCC7644 suşuna karşı oluşturulan inhibisyon M: *M. luteus* NCIMB suşuna karşı oluşturulan inhibisyon zon çapı (mm)

Proteolitik enzimlerin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisini belirlemek amacıyla enzim uygulamasının ardından her bir suşa ait süpernatantın *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *M. luteus*’a karşı antagonistik aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’de verilmiştir. Çizelge 4.4’ten de görüldüğü üzere tripsin, pepsin ve proteinaz K

enzimleri antimikrobiyal aktiviteyi olumsuz yönde etkilemiştir. Uygulanan enzimlerin proteolitik enzim olması *L. plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85'nin ürettiği metabolitlerin protein yapısında olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı söz konusu metabolitlerin bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri bir metabolit olabileceği sonucuna varılmıştır. Konu ile ilgili araştırmalarda laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin proteolitik enzim uygulaması ile tamamen ya da kısmen aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Van Reenen *et al.* 1998; Hernandez *et al.* 2005; Müller *et al.* 2009; Marie *et al.* 2012; Yang *et al.* 2012). Ancak indikatör bakteriye göre farklı sonuçlar da ortaya çıkabilmektedir. Çizelge 4.4'den görüldüğü üzere tripsin enzimi mevcudiyetinde hem *L. plantarum* S50 suşu hem de *L. plantarum* S74 suşu *L. monocytogenes*'e karşı aktivite gösterirken, *M. luteus*'a karşı aktivite gösterememiştir. Benzer sonuçlar Yang *et al.* (2012) tarafından da tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Farklı enzim uygulamalarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

<i>Lactobacillus plantarum</i>	Tripsin		Pepsin		Proteinaz K		Kontrol	
	L	M	L	M	L	M	L	M
S50	7	0	7	0	<6	0	11	13
S51	<6	<6	<6	6	6	<6	9	9
S72	7	7	<7	<7	7	<7	11	13
S74	<7	0	<7	0	<7	0	9	9
S85	<7	<7	<7	<7	<6	<6	9	9

L:*Listeria monocytogenes* ATCC7644 suşuna karşı oluşturulan inhibisyon M: *M. luteus* NCIMB suşuna karşı oluşturulan inhibisyon zon çapı (mm)

#### 4.5. *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Teknolojik Özellikleri

Fermente et ürünlerinde kullanılacak veya kullanılan laktik asit bakteri suşlarının asit oluşum hızı ve derecesi hem tekstürel ve duyuşsal özelliklerinin çoğalması hem de ürün güvenliği açısından büyük önem arz etmektedir. Diğer taraftan fermentasyon sıcaklığı, ortamın pH'sı, tuz miktarı gibi iç ve dış faktörler bu mikroorganizmaların gelişimini önemli ölçüde etkilemektedir. Ayrıca kullanılan laktik asit bakteri suşlarının biyojen

amin oluşturma özellikleri de önemli bir faktördür. Bu nedenle suşlarda aranan önemli bir özellik bunların dekarboksilaz aktivitesine sahip olmamalarıdır. Genellikle proteolitik aktivite bakımından oldukça zayıf olan bu suşlar nitrat redüktaz aktivitesi de göstermezler (Lücke, 1985). Araştırmada kullanılan suşlar belirtilen bu özellikler yönünden test edilmiştir. Laktik asit bakteri suşlarının farklı sıcaklıklarda çoğalma durumu optik yoğunluk değerleri (600nm) ölçülerek belirlenmiştir *L. plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85 suşlarının 25°C’de optimum bir çoğalma gösterdiği tespit edilmiştir. 15°C’lik bir sıcaklıkta da çoğalma gösteren suşlar, 45°C’de zayıf bir çoğalma göstermiştir (Çizelge 4.5). Fermente sucukta da genellikle *L. plantarum* dominant olarak bulunmaktadır (Kaban and Kaya 2008; Adıgüzel and Atasever 2009).

**Çizelge 4.5.** *Lactobacillus plantarum* suşlarının farklı sıcaklık değerlerinde gelişim durumları

<i>Lactobacillus plantarum</i> izolatları	4°C	15°C	25°C	45°C
<i>L. plantarum</i> S50	-	++	+++	+
<i>L. plantarum</i> S51	-	++	+++	+
<i>L. plantarum</i> S72	-	++	+++	+
<i>L. plantarum</i> S74	*	+	+++	*
<i>L. plantarum</i> S85	-	++	+++	+

\*zayıf, +orta, ++ iyi, +++ çok iyi

*L. plantarum* suşlarının farklı pH değerlerinde gelişim durumları Çizelge 4.6’da verilmiştir. Düşük pH değerlerinde (pH 4,5 ve 5,0) orta düzeyde bir çoğalma gösteren suşlar pH 5,5’de iyi, pH 6,0 ve 6,5 da ise çok iyi bir çoğalma göstermişlerdir. Bu sonuçlar fermentasyon sırasında pH’nın 5,0 civarlarına düşmesinin laktik asit bakterilerinin gelişimini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

**Çizelge 4.6.** *Lactobacillus plantarum* suşlarının farklı pH değerlerinde çoğalma durumları

Laktik asit bakterisi	pH 4,5	pH 5,0	pH5,5	pH 6,0	pH 6,5
<i>L. plantarum</i> S50	+	+	++	+++	+++
<i>L. plantarum</i> S51	+	+	++	+++	+++
<i>L. plantarum</i> S72	+	+	++	+++	+++
<i>L. plantarum</i> S74	+	+	++	+++	+++
<i>L. plantarum</i> S85	+	+	++	+++	+++

+orta,++ iyi, +++ çok iyi

*L. plantarum* suşlarının %6,5 ve %10 NaCl mevcudiyetinde çoğalma durumlarını gösteren sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir. Buna göre suşların tümü %6,5 tuz konsantrasyonunda gelişirken %10 tuz mevcudiyetinde çoğalma gösterememektedir.

Fermente et ürünlerinde önemli bir katkı maddesi olan tuz, fermente sosis hamurlarına %2-3 oranında ilave edilmektedir (Toldra 2001; Kaya ve Kaban 2010). Tuz kısmi bakteriyostatik aktiviteye sahip olup formülasyondaki yağ oranına bağlı olarak başlangıç  $a_w$  değerinin 0,960-0,955’e kadar düşürmektedir (Lücke 1998). Su aktivitesinin düşmesi ise laktik asit bakterileri ile Micrococceae familyası üyelerinin gelişimini teşvik ederken, arzu edilmeyen floranın gelişimini sınırlandırmaktadır (Kaya ve Kaban 2010).

**Çizelge 4.7.** *Lactobacillus plantarum* suşlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim durumları

<i>Lactobacillus plantarum</i>	%6,5 NaCl	%10 NaCl
S50	++	-
S51	++	-
S72	++	-
S74	++	-
S85	++	-

-yok, +orta,++ iyi, +++ çok iyi

Fermente et ürünlerinde özellikle nitrat kullanılan formülasyonlarda kullanılacak starter kültürlerin nitrat redüktaz aktivitesine sahip olması gerekmektedir. Bu aktivite bu tip ürünlerde *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus* ve *Kocuria varians* suşları tarafından sağlanmaktadır. Katalaz pozitif bu suşlar genellikle laktik asit bakterileri ile birlikte karışık kültür olarak piyasada yer almaktadır (Kaban *et al.* 2012). Nitrat kullanılan formülasyonlarda nitrattan beklenen etkilerin görülebilmesi için nitratin mutlaka nitrite indirgenmesi gerekmektedir. Böylelikle renk oluşumunda etkili olan bu mikroorganizmalar katalaz aktiviteleri ile oksidasyonu önlemekte ve ayrıca lipolitik ve proteolitik aktiviteleri ile aroma oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar (Kamiloglu *et al.* 2014; 2016). Diğer taraftan nitrat redüktaz aktivitesi gösteren laktik asit bakterileri de mevcuttur. Paik and Lee (2014) *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. sakei* ve *L. curvatus* suşlarında az da olsa nitrat redüktaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Mevcut bu araştırmada da iki *L. plantarum* suşunda (S72, S85) zayıf bir nitrat redüktaz aktivitesi gözlenmiştir (Çizelge 4.8).

Laktobasiller suşa bağlı olmakla beraber dekarboksilaz aktivitesi göstererek değişik biyojen aminler oluşturabilmektedir (Kaya ve Kaban 2010). Nitekim yapılan çalışmalarda *L. curvatus*'un bazı suşlarının amin ürettiği tespit edilmiştir (Vidal-Carou *et al.* 2007; Kaya ve Kaban 2010). Bundan dolayı starter kültür olarak kullanılacak laktik asit bakteri suşlarının dekarboksilaz aktiviteleri yönünden de test edilmeleri gerekmektedir. Çizelge 4.8'den de görüldüğü üzere suşların tümü lizin, ornitin ve arginin dekarboksilaz aktivitesi yönünden negatif sonuç vermişlerdir.

Santos (1998) İspanyol tipi fermente et ürünlerinden izole etmiş olduğu *L. plantarum* suşlarının histidin, ornitin, lizin ve tirozin dekarboksilaz aktivitesi göstermediğini bildirmiştir. Aynı şekilde Bover-Cid *et al.* (2001) tarafından yapılan bir çalışmada fermente sosislerden izole edilen *L. plantarum* suşlarının tiramin, histamin, triptamin, feniletilamin, putresin ve kadeverin oluşmadığı rapor edilmiştir.

Biyojen aminlerin yüksek miktarda tüketimi ile istenmeyen fizyolojik sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Latorre-Moratalla *et al.* 2012a). Fermente et ürünlerinde,

fermentasyon, olgunlaşma ve depolama sırasında aminoasit dekarboksilaz aktivitesi tiramin, putresin, kadeverin, histamin, feniletilamin ve triptamin gibi biyojen aminlerin birikimine sebep olmaktadır (Vidal-Carou *et al.* 2007). Bu olumsuz durumu engellemek amacı ile fermente sosis üretiminde uygun starter kültür seçimi önem taşımaktadır.

Latorre-Moratalla *et al.* (2012b) aminoasit dekarboksilaz aktivitesi gösteren *L. curvatus* CTC273 suşunun sosis fermentasyonunda starter kültür olarak kullanılması durumunda biyojen amin birikiminin spontan fermentasyona göre yüksek miktarda olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan starter kültür olarak *L. plantarum* suşlarının kullanılması durumunda ortam pH'sının hızlı düşürmesinden dolayı, aminojenik aktiviteye sahip mikroorganizmaların gelişiminin engellenerek biyojen amin oluşumunun inhibe edildiğini bildiren araştırmalar da mevcuttur (Capozzi *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013; Nie *et al.* 2014).

Laktik asit bakterileri zayıf proteolitik aktiviteye sahip olduğundan fermente et ürünlerinde lezzet gelişiminde kısmi bir etkiye sahiptir. Bu bakterilerin lipolitik aktiviteleri de oldukça zayıftır (Kaya ve Kaban 2010). İncelenen suşların tümünün kazeni ve jelatini parçalama yeteneğine sahip olmadıkları belirlenmiştir. Aynı şekilde tribütirini parçalama özelliğine sahip olmadıkları da saptanmıştır. Bu sonuçlar kullanılan suşların proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olmadığını göstermektedir (Çizelge 4.8). Reqnena *et al.* (1993) tarafından yapılan araştırma da *L. plantarum* IFPL 935 suşunun  $\alpha$ -kazein ve  $\beta$ -kazeini parçalayamadığı bildirilmiştir. Buna karşın bazı araştırmalarda *L. plantarum* suşlarının kazeini hidroliz edebildiği rapor edilmiştir (Ztaliou *et al.* 1996; Papamanoli *et al.* 2003; Essid *et al.* 2009). *L. plantarum* suşlarının lipolitik aktiviteye sahip olmadığı da rapor edilmiştir (Papamonoli *et al.* 2003; Essid *et al.* 2009; Zeng *et al.* 2014).

Starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinden *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* ve *P. acidilactici* asetoin oluşturabilmektedir. *L. sakei* çoğunlukla *L. curvatus* ise çok seyrek olarak bu bileşiği oluşturmaktadır (Lücke and Hechelmann, 1987). Mevcut bu çalışmada incelenen suşlarda *L. plantarum* S51 hariç diğerleri Voges-

proskeur testinde pozitif sonuç vermiştir(Çizelge 4.8). Glukozdan asetoin oluşumunun göstergesi olan bu test Wheater (1985) tarafından incelenen 22 *L. plantarum* suşunda da Voges-Proskaeur negatif olarak tanımlamışlardır. Fermente et ürünlerinde çok yüksek miktarda asetik asit veya asetoin oluşumu arzu edilen bir durum değildir (Kaya and Kaban 2010).



**Çizelge 4.8.** *Lactobacillus plantarum* suşlarına ait farklı biyokimyasal test sonuçları

<i>Lactobacillus plantarum</i>	Nitrat Redüktaz Aktivitesi	Lisin dekarboksilaz	Ornitin dekarboksilaz	Arginin dekarboksilaz	Kazein dekarboksilaz	Jelatin	Tribütirin	Voges-Proskauer
S50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
S51	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
S72	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
S74	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
S85	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

Laktik asit bakterilerinde aranan önemli bir özellik ise laktik asitin konfüğürasyonudur. Fermentasyon sırasında üretilen laktik asit izomeri, kullanılan türe göre değişiklik göstermektedir. Örneğin *L. delbruecki*, D(-) laktik asit izomeri üretirken, *L. sakei* ve diğer heterofermentatif laktobasiller DL rasemik karışımını üretmektedir (Holzapfel, 2002). Laktik asit bakterilerinin laktat dehidrogenaz (LdhL, LdhD) aktivitelerine bağlı olarak üretmiş oldukları rasemik karışımda D-laktik asit ve L- laktik asit oranı değişkenlik göstermektedir. Rasemik karışım her zaman eşit oranla oluşmamaktadır (Goffin *et al.* 2005). D(-)-laktik asit insanlarda laktat dehidrogenaz tarafından hidrolize edilemediği için L(+)- laktik asit üreten suşlar starter kültür olarak tercih edilmektedir (Holzapfel 2002; Kaya and Kaban 2010).

Araştırmada incelenen 5 *L. plantarum* suşunun tümünün DL-laktik asit ürettiği belirlenmiştir. Çizelge 4.9'dan da anlaşılacağı üzere belirtilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek L(+)-laktik asit üretimi %50'nin üzerinde olan 2 suş söz konusudur (*L. plantarum* S51, S72). Sawitzki *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada ise *L. plantarum* suşlarından bir suşun %65,28 oranında L(+)-laktik asit ürettiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.9.** *Lactobacillus plantarum* suşlarının enzimatik yolla belirlenen laktik asit üretim değerleri

<i>Lactobacillus plantarum</i>	D-Laktik Asit (g/L)	D-Laktik Asit (%)	L-Laktik Asit (g/L)	L-Laktik Asit (%)
S50	10,54	63,8	5,98	36,2
S51	6,47	43,89	8,27	56,11
S72	5,7	48,68	6,01	51,32
S74	6,73	66,05	3,46	33,95
S85	8,97	66,47	4,52	33,53

#### 4.6. Deneme Sucuklarına Ait Sonuçlar

##### 4.6.1. Nem değerleri (%)

Farklı *L. plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucuklarda olgunlaştırma süresince belirlenen %nem değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir. 11 günlük olgunlaştırmanın sonunda Çizelge 4.10'dan da görüldüğü üzere tüm sucuk gruplarında %nem değerleri %40'ın altına düşmüş ve böylelikle Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliğinde belirtilen kritere (en fazla %40) uygunluk sağlanmıştır (Anonim 2012).

**Çizelge 4.10.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımına süresince belirlenen %nem değerleri

	Tekerrür	Olgunlaştırma Süresi				
		0	3	5	7	11
Kontrol	1	61,77	51,91	46,97	43,83	37,25
	2	63,15	55,57	49,95	45,48	36,39
<i>L. plantarum</i> S50	1	62,77	55,49	49,74	44,19	35,69
	2	63,04	53,93	49,33	44,16	36,58
<i>L. plantarum</i> S51	1	62,92	57,24	51,69	38,73	36,10
	2	65,16	56,40	50,42	45,58	36,58
<i>L. plantarum</i> S72	1	63,61	55,47	55,16	52,44	39,03
	2	63,26	54,84	52,06	46,10	38,83
<i>L. plantarum</i> S74	1	65,43	51,96	49,58	43,10	37,16
	2	63,60	54,12	50,05	44,5	36,55
<i>L. plantarum</i> S85	1	62,53	54,75	49,12	43,66	35,53
	2	62,96	54,26	49,95	45,12	38,25

Deneme grubu sucukların varyans analiz sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir. Starter kültür kullanımı ve olgunlaştırma süresinin nem miktarı üzerinde çok önemli etkisi olurken ( $p < 0,01$ ), starter kültür ve olgunlaştırma süresi interaksiyonunun önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür ( $p > 0,01$ ).

**Çizelge 4.11.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşma süresince belirlenen %nem değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
<b>Starter Kültür (S)</b>	5	10,986	4,194**
<b>Olgunlaştırma süresi(O)</b>	4	1190,56	454,483**
<b>SxO</b>	20	3,396	1,296
<b>Hata</b>	30	2,62	
<b>Genel</b>	60		

\*\* P < 0.01 seviyesinde önemli

Deneme sucuklarının % nem değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir. Sucuk hamurunda  $63,35 \pm 1,03$  olarak belirlenen ortalama %nem değeri, olgunlaştırma süresi ilerledikçe düşüş göstermiş ve en düşük değeri  $37,00 \pm 1,16$  ile 11. günde vermiştir. Olgunlaştırma süresince ortalamalar birbirinden farklılık göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Olgunlaştırma süresi ilerledikçe tüm gruplarda kuruma nedeni ile nem miktarı düşüş göstermiştir. Olgunlaştırmanın son gününde (11. Gün) tüm gruplarda nem değeri %40’ın altına düşmüş olmakla birlikte gruplar arasında bazı farklılıklar gözlemlenmiştir. Starter kültür kullanılmadan üretilen kontrol grubuna ait ortalama nem değeri *L. plantarum* S72 hariç diğer starter kültürlü gruplara ait ortalama değerlerden istatistiki olarak bir farklılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuç kontrol grubunda bulunan spontan floranın iyi bir çoğalma göstererek ürünün kurumasına ve ürün özelliklerinin çoğalmasına önemli katkıda bulunduğunu göstermektedir. Kaya ve Gökalp (2004b) tarafından yapılan araştırmada da 12 günlük olgunlaştırma süresinin sonunda starter kültürlü ve starter kültürsüz sucuklarda nem miktarının %40’ın altına düştüğü rapor edilmiştir.

**Çizelge 4.12.** Deneme sucuklarında starter kültür ve olgunlaştırma süresi değişkenlerinin %nem değerlerine ait ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Faktör		0	3	5	7	11	
O		63,35±1,03a	54,66±1,59b	54,34±1,98c	44,74±3,08d	37,00±1,16e	
	Kontrol		S50	S51	S72	S74	S85
S		49,23±9,16	49,49±9,6	50,08±10,61	52,08±8,6	49,61±9,81	49,61±9,29
		b	0b	b	2a	b	b

Aynı satırda farklı harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. (P<0.05), ± standart sapma, O: Olgunlaştırma süresi(gün), S: starter kültür, S50: *L. plantarum* S50, S51: *L. plantarum* S51, S72: *L. plantarum* S72, S74: *L. plantarum* S74, S85: *L. plantarum* S85

#### 4.6.2. pH değerleri

Sucuk örneklerinde olgunlaştırmanın farklı günlerinde belirlen pH değerleri Çizelge 4.13'te verilmiştir. Sucuk hamurlarında 5,60-5,70 arasında değişen pH değeri 24 saatlik fermentasyon sonunda *L. plantarum* kullanılarak üretilen gruplarda 5,00'in altına düşmüştür. Kontrol grubunda ise pH spontan floranın iyi bir çoğalma göstermesinden dolayı 5,50'in altına düşmüştür. Olgunlaştırmanın 3. gününde kontrol grubunda pH değeri 5,02-5,05 aralığına kadar düşmüştür. Olgunlaştırmanın son günlerinde ise ortamda biriken bazik karakterdeki bileşenler nedeni ile pH değerinde artışlar kaydedilmiştir.

**Çizelge 4.13.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşma süresince belirlenen pH değerlerine ait analiz sonuçları

		Olgunlaştırma Süresi (Gün)						
		Tekerrür	0	1	3	5	7	11
Kontrol	1		5,74	5,39	5,02	4,72	4,70	4,86
	2		5,69	5,48	5,05	4,73	4,73	4,92
<i>L. plantarum</i>	1		5,72	4,76	4,71	4,42	4,51	4,63
S50	2		5,70	4,78	4,73	4,43	4,50	4,62
<i>L. plantarum</i>	1		5,70	4,80	4,75	4,41	4,49	4,60
S51	2		5,69	4,86	4,73	4,38	4,49	4,60

**Çizelge 4.13.** (devam)

<i>L. plantarum</i>	1	5,69	4,87	4,81	4,51	4,63	4,70
S72	2	5,69	4,86	4,84	4,48	4,59	4,70
<i>L. plantarum</i>	1	5,70	4,85	4,87	4,53	4,58	4,68
S74	2	5,73	4,86	4,92	4,57	4,65	4,70
<i>L. plantarum</i>	1	5,72	4,87	4,84	4,53	4,64	4,70
S85	2	5,73	4,89	4,86	4,55	4,64	4,70

Kontrol grubu ve *L. plantarum* içeren sucukların pH değerlerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.14'te verilmiştir. Buna göre starter kullanımı, olgunlaştırma süresi ve starter kültür x olgunlaştırma süresi interaksyonunun pH değeri üzerinde çok önemli etkileri söz konusudur. Gençcelep *et al.* (2007) tarafından da bildirilmiştir.

**Çizelge 4.14.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşım süresince belirlenen pH değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
<b>Starter Kültür (S)</b>	5	0,139	4,261**
<b>Olgunlaştırma Süresi(O)</b>	5	2,237	265,397**
<b>SxO</b>	25	0,014	27,012**
<b>Hata</b>	36	0,001	
<b>Genel</b>	72		

\*\* P < 0.01 seviyesinde önemli

Deneme sucuklarının pH değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.15'te verilmiştir. Olgunlaştırma süresince belirlenen ortalama değerler birbirinden istatistiki olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Sucuk hamurunda  $5,71 \pm 0,02$  olarak belirlenen ortalama pH değeri, olgunlaştırmanın 5. güne kadar düşüş göstermiş ve daha sonra artış göstermiştir. Starter kültür içeren gruplara ait ortalama değerler, kontrol grubuna ait ortalama değerden daha düşük bulunmuştur. En düşük ortalama değer *L. plantarum* S50 ve S51 suşlarının varlığında gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.15).

**Çizelge 4.15.** Deneme sucuklarında starter kültür ve olgunlaştırma süresi değişkenlerinin pH değerlerine ait ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

<b>Faktör</b>						
<b>O</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>11</b>
	5,71±0,02 a	4,94±0,24 b	4,84±0,11 c	4,52±0,11 f	4,60±0,08 e	4,70±0,10 d
<b>S</b>	<b>Kontrol</b>	<b>S50</b>	<b>S51</b>	<b>S72</b>	<b>S74</b>	<b>S85</b>
	5,09±0,39a	4,79±0,45 c	4,79±0,45 c	4,86±0,41 b	4,89±0,4 1b	4,89±4,4 1b

Aynı satırda farklı harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. ( $P < 0,05$ ),  $\pm$  standart sapma, O: Olgunlaştırma süresi(gün), S: starter kültür, S50: *L. plantarum* S50, S51: *L. plantarum* S51, S72: *L. plantarum* S72, S74: *L. plantarum* S74, S85: *L. plantarum* S85

Deneme sucuklarının olgunlaştırma süresince değişen pH değerlerinin Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Çizelge 4.16'dan görüldüğü üzere pH 24 saatlik fermentasyonun sonunda kontrol grubunda 5,5'in, diğer gruplarda ise 5'in altına düşmüştür. Bu süre zarfında en az düşüş kontrol grubunda gözlenmiş ve bu gruba ait değerler starter kültürü gruplara ait değerlerden istatistiki olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). *L. plantarum* içeren gruplar arasında ise ilk 24 saatte *L. plantarum* S50 pH değerinde daha fazla bir düşüşe sebep olmuştur. Ancak *L. plantarum* S50'ye ait pH değeri, *L. plantarum* S51'e ait ortalama değerden istatistiki olarak farklılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ ). Olgunlaştırmanın sonunda ise en düşük değerler yine *L. plantarum* S50 ve *L. plantarum* S51 suşları kullanılarak üretilen gruplarda belirlenmiştir. Bu iki suş hem fermentasyonun 1. gününde hem de 3. gününde daha düşük değerler vermiştir. Buna göre bu iki suş asit oluşum hızı ve derecesi bakımından diğer suşlara göre daha iyi sonuçlar vermektedir. Tüm gruplar için 7. gün en düşük pH değerleri elde edilmişken, 11. gün değerlerinde artış görülmüştür. Olgunlaştırmanın ilerleyen günlerinde gerçekleşen bu pH artışı, laktat ve amonyak oluşumundan kaynaklanabilmektedir (Demeyer *et al.* 1979).

Fermente sosislerde asit oluşumu ürün güvenliğinin yanı sıra kuruma açısından da önemlidir. Fermentasyon sırasında pH'ın düşmesi ile birlikte proteinlerin izoelektrik noktasına yaklaşılması neticesinde su tutma kapasitesi düşmektedir. pH'ın düşmesi kurumanın da daha etkin olmasını sağlamaktadır (Soyer *et al.* 2005). Ancak izoelektrik

noktanın altındaki pH değerlerinde su tutma kapasitesi tekrar artış gösterdiğinden aşırı pH düşüşü kuruma açısından arzu edilen bir durum değildir (Gökalp vd 2004). Sucuk gruplarının tümünde pH değeri, Et ve Et Ürünleri Tebliği'nde (Anon 2012) verilen sınır değerin (5,4) çok altındadır.

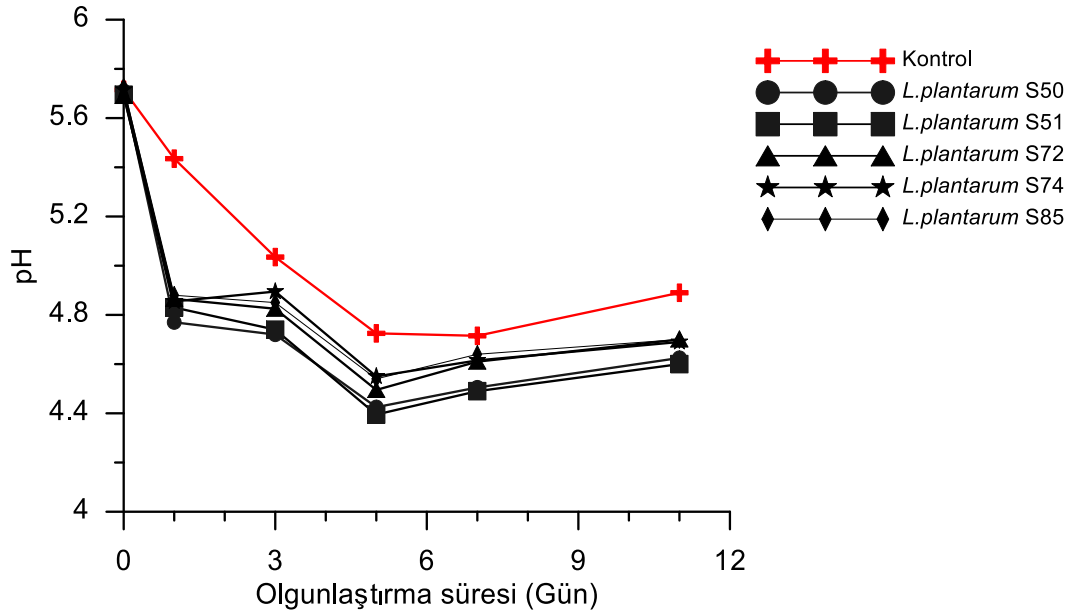
**Çizelge 4.16.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşma süresince belirlenen pH değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

	Olgunlaştırma süresi					
	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	11.gün
Kontrol	5,72± 0,04a, A	5,44± 0,06b, A	5,04± 0,02c, A	4,73± 0,01e, A	4,72± 0,02e, A	4,89±0,04 d, A
<i>L. plantarum</i> S50	5,71± 0,01e, A	4,77± 0,01b, C	4,72± 0,01c, D	4,43± 0,01d, D	4,51± 0,01e, C	4,63± 0,01f, C
<i>L. plantarum</i> S51	5,70± 0,01a, A	4,83± 0,04b, BC	4,74± 0,01c, D	4,40± 0,02f, D	4,49± 0,00e, C	4,60± 0,00d, C
<i>L. plantarum</i> S72	5,69± 0,00a, A	4,87± 0,01b, B	4,83± 0,02b, C	4,50± 0,02e, C	4,61± 0,03d, B	4,70± 0,00c, B
<i>L. plantarum</i> S74	5,72± 0,02a, A	4,86± 0,01b, B	4,90± 0,04b, B	4,55± 0,03d, B	4,62± 0,05d, B	4,69± 0,01c, B
<i>L. plantarum</i> S85	5,73± 0,01a, A	4,88± 0,01b, B	4,85± 0,01c, BC	4,54± 0,01d, B	4,64± 0,00e, B	4,70± 0,00f, B

Aynı satırda farklı küçük harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. (P<0.05), ± standart sapma

Aynı sütundaki farklı büyük harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. (P<0.05), ± standart sapma

Deneme sucuklarının pH değeri üzerinde çok önemli etkisi saptanan starter kültür x olgunlaştırma süresi interaksyonuna ait grafik Şekil 4.7'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere fermentasyonun ilk gününde kontrol grubunda pH 5,5'in altına düşerken, starter kültürlü gruplarda 5'in altında pH değerleri gözlemlenmiştir. Daha sonraki iki günde de kontrol grubunda pH düşüşü devam etmiştir. Olgunlaştırma süresince kontrol grubu diğer gruplara göre daha yüksek pH değeri vermiştir.



**Şekil 4.7.** Sucuk gruplarının pH değeri üzerine starter kültür x olgunlaştırma süresi interaksyonunun etkisi

#### 4.6.3. Laktik asit bakterileri

Farklı *L. plantarum* suşları (S50, S51, S72, S74 ve S85) kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların laktik asit bakteri sayılarına ait sonuçlar Çizelge 4.17’de ve bu sonuçlara ait grafik ise Şekil 4.8’de verilmiştir. Kontrol grubu sucuk hamurlarında  $10^4$  kob/g düzeyinde spontan laktik asit bakteri sayısı tespit edilmiştir. Buna karşın *L. plantarum* suşlarının kullanıldığı gruplarda  $10^7$  kob/g düzeyinde laktik asit bakteri sayısı tespit edilmiştir. 24 saatlik fermentasyon sonunda gerek kontrol grubunda gerekse starter kültürlü gruplarda iyi bir çoğalma gözlenmiş ve  $1 \times 10^8$  kob/g’den daha yüksek laktik asit bakteri sayılarına ulaşılmıştır. Burada dikkat çeken en önemli sonuç spontan laktik asit bakterilerinin fermentasyonun ilk gününde iyi bir çoğalma göstermesidir.

**Çizelge 4.17.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşma süresince belirlenen laktik asit bakteri sayıları (log kob/g)

		Olgunlaştırma Süresi (Gün)						
		Tekerrür	0	1	3	5	7	11
Kontrol	1		4,60	8,29	8,83	8,93	8,85	8,50
	2		4,40	8,17	8,72	8,17	9,14	8,18
<i>L. plantarum</i> S50	1		7,30	8,67	8,1	8,98	8,55	8,63
	2		7,36	8,24	8,75	8,51	8,36	8,09
<i>L. plantarum</i> S51	1		7,35	8,55	8,62	8,43	8,08	7,80
	2		7,72	8,37	8,64	8,63	8,29	7,69
<i>L. plantarum</i> S72	1		7,38	8,58	8,89	8,93	8,71	8,30
	2		7,34	8,38	8,67	8,71	8,76	8,07
<i>L. plantarum</i> S74	1		7,48	8,48	8,69	8,57	8,51	8,39
	2		7,44	8,54	8,41	8,67	8,54	7,90
<i>L. plantarum</i> S85	1		7,44	8,66	8,94	8,67	8,41	8,32
	2		7,59	8,46	8,82	8,53	9,80	8,39

Farklı *L. plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucukların olgunlaşma süresince belirlenen laktik asit bakteri sayılarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.18'de verilmiştir. Starter kültür ve olgunlaştırma süresi faktörlerinin, laktik asit bakteri sayısı üzerinde çok önemli ( $p < 0,01$ ) etkileri olduğu belirlenmiştir. Starter kültür x olgunlaştırma süresi interaksyonunun da laktik asit bakteri sayısı üzerinde çok önemli ( $p < 0,01$ ) etkisi olduğu tespit edilmiştir. Starter kültür ve olgunlaştırma faktörlerinin sucuğun laktik asit bakteri sayısı üzerinde önemli etkilerinin olduğu Kaban and Kaya (2006), Kaya ve Gökalp (2004a;b) tarafından da rapor edilmiştir.

**Çizelge 4.18.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımına süresince belirlenen laktik asit bakteri sayılarına (log kob/g) ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
<b>Starter Kültür (S)</b>	5	0,520	7,768**
<b>Olgunlaştırma Süresi(O)</b>	5	5,378	80,368**
<b>SxO</b>	25	0,567	8,477**
<b>Hata</b>	36	0,067	
<b>Genel</b>	72		

\*\* P < 0.01 seviyesinde önemli

Deneme sucuklarının laktik asit bakteri sayılarına ait ortalama değerlerinin Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.19’da verilmiştir. Sucuk hamurunda  $6,95 \pm 1,15$  olarak belirlenen ortalama laktik asit bakteri sayısı 24 saatlik fermentasyon sonunda yaklaşık 2 log birimlik artış göstermiş ve bu seviyede kalmıştır. *L. plantarum* S50, S72, S74 ve S85 içeren gruplara ait ortalama değerler, kontrol grubuna ait ortalama değerden daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Starter kültürlü gruplar arasında da bazı farklılıklar gözlemlenmiştir (Çizelge 4.19).

**Çizelge 4.19.** Deneme sucuklarında starter kültür ve olgunlaştırma süresi değişkenlerinin laktik asit bakteri sayılarına ait (log kob/g) sayılarına ait ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Faktör						
O	0	1	3	5	7	11
	$6,95 \pm 1,15$ c	$8,45 \pm 1,16$ ab	$8,67 \pm 0,23$ a	$8,64 \pm 0,23$ a	$8,67 \pm 0,45$ a	$8,19 \pm 0,29$ b
S	Kontrol	S50	S51	S72	S74	S85
	$7,90 \pm 1,62$ c	$8,30 \pm 0,$ 52ab	$8,18 \pm 0,4$ 4bc	$8,39 \pm 0,5$ 4ab	$8,30 \pm 0,4$ 4ab	$8,50 \pm 0,6$ 1a

Aynı satırda farklı harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. ( $P < 0,05$ ),  $\pm$  standart sapma, O: Olgunlaştırma süresi(gün), S: starter kültür, S50: *L. plantarum* S50, S51: *L. plantarum* S51, S72: *L. plantarum* S72, S74: *L. plantarum* S74, S85: *L. plantarum* S85

Farklı *L. plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaştırma süresince belirlenen laktik asit bakteri sayılarına ait ortalamaların Duncan

çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.20’de verilmiştir. Sucuk hamurunda en düşük değeri kontrol grubu verirken ( $p<0,05$ ), diğer gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık söz konusu olmamıştır ( $p>0,05$ ). Olgunlaştırmanın 1. gününde ise kontrol grubu da dahil tüm gruplara ait değerler istatistiki açıdan önemli bir farklılık göstermemiştir. *L. plantarum* içeren gruplarda bu süre zarfında laktik asit bakteri sayısında 1 logaritmik birim civarında artış gözlenirken, kontrol grubunda spontan laktik asit bakterileri yaklaşık 4 logaritmik birimlik bir artış göstermiştir. Spontan laktik asit bakterileri sayı açısından 3. günde de starter kültürlü gruplardan farklı sonuç vermemiştir. Bu sonuç spontan laktik asit bakterilerinin iyi bir çoğalma sergilediğini göstermektedir. Burada başlangıç laktik asit bakteri sayısının yüksek olmasının önemli etkisinin olduğu düşünülmektedir. Olgunlaştırmanın 5, 7 ve 11. günlerinde gruplar arasında laktik asit bakteri sayısı açısından önemli bir farklılık görülmemiştir ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.20).

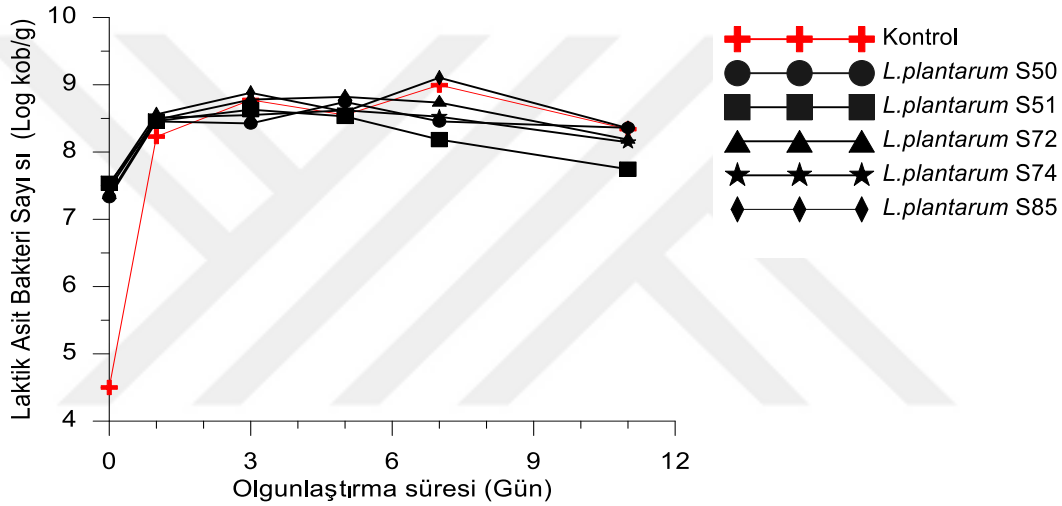
**Çizelge 4.20.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşma süresince belirlenen laktik asit bakteri sayılarına (log kob/g) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

	Olgunlaştırma süresi (gün)					
	0	1	3	5	7	11
Kontrol	4,50 ±0,14c, B	8,23± 0,08b, A	8,78± 0,08a, AB	8,55± 0,54ab, A	9,00± 0,21a, A	8,34± 0,23ab, A
<i>L. plantarum</i> S50	7,33± 0,04b, A	8,46± 0,30a, A	8,43± 0,46a, A	8,75± 0,33a, A	8,47± 0,11a, A	8,36± 0,38a, A
<i>L. plantarum</i> S51	7,54±0,26c ,A	8,46± 0,13ab, A	8,63± 0,01a, A	8,53± 0,14ab, A	8,19± 0,15b, A	7,75± 0,08c, A
<i>L. plantarum</i> S72	7,36± 0,03d, A	8,48± 0,14bc,A	8,78± 0,16a, AB	8,82± 0,16ab, A	8,74± 0,16ab, A	8,19± 0,16c, A
<i>L. plantarum</i> S74	7,46± 0,03d, A	8,51± 0,04ab, A	8,55± 0,20a, AB	8,62± 0,07a, A	8,53± 0,03ab, A	8,15± 0,35c, A
<i>L. plantarum</i> S85	7,52± 0,11b, A	8,56± 0,14a, A	8,88± 0,08a, A	8,60± 0,10a, A	9,10± 0,99a, A	8,36± 0,05ab, A

Aynı satırda farklı küçük harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. ( $P<0.05$ ), ± standart sapma

Aynı sütündeki farklı büyük harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. ( $P<0.05$ ), ± standart sapma

Farklı sucuk gruplarının laktik asit bakteri sayısı üzerinde çok önemli ( $p < 0,01$ ) etkisi saptanan starter kültür x olgunlaştırma süresi interaksyonuna ait grafik Şekil 4.8’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere kontrol grubunda yer alan spontan laktik asit bakterileri fermentasyonun ilk gününde çok hızlı bir çoğalma göstererek  $1 \times 10^8$  kob/g’den daha yüksek sayılara erişmiştir. Buna bağlı olarak yukarıda da açıklandığı gibi pH değerinde de arzu edilen ölçüde bir düşüş sağlanmıştır. Ancak sürekli ve güvenilir bir asitleşme için starter kültür kullanımı kaçınılmazdır.



**Şekil 4.8.** Deneme sucuklarının laktik asit bakteri sayısı üzerine starter kültür x olgunlaştırma süresi interaksyonunun etkisi

#### 4.6.4. *Listeria monocytogenes*

Farklı *L. plantarum* suşları (S50, S51, S72, S74 ve S85) kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucuklarda olgunlaştırma süresince saptanan *Listeria monocytogenes* sayıları Çizelge 4.21’de verilmiştir. Sucuk hamurlarına  $10^4$  kob/g düzeyinde inoküle edilen *L. monocytogenes*, kontrol grubunda 24 saatlik fermentasyon sonunda yaklaşık 0,5 logaritmik birimlik artış göstermiştir. *L. plantarum* içeren gruplarda ise sayıda aynı süre zarfında kullanılan suşa bağlı olarak redüksiyonlar gözlenmiştir. Olgunlaştırmanın sonunda *L. monocytogenes* sayısı *L. plantarum* S50 kullanılan grupta saptanabilir sınırın altına düşmüştür. *L. plantarum* S51 varlığında ise 3 log kob/g’ın altında bir değer tespit

edilmiştir. Kontrol grubu ile diğer gruplarda ise  $10^4$  kob/ g'dan daha düşük değerler tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.21.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşma süresince belirlenen *Listeria monocytogenes* sayıları (log kob/g)

	Tekerrür	Olgunlaştırma Süresi (Gün)					
		0	1	3	5	7	11
Kontrol	1	4,18	5,06	4,51	4,56	4,06	4,32
	2	4,68	4,99	4,31	4,48	3,49	3,46
<i>L. plantarum</i> S50	1	4,69	4,24	4,26	4,3	3,41	<2
	2	4,79	4,19	4,52	4,06	3,95	<2
<i>L. plantarum</i> S51	1	4,77	4,31	4,52	4,5	3,76	2,48
	2	4,81	4,04	4,42	4,7	4,09	2,3
<i>L. plantarum</i> S72	1	3,97	4,37	4,41	4,29	4,29	3,37
	2	4,64	4,32	4,75	4,3	3,96	3,18
<i>L. plantarum</i> S74	1	4,61	4,36	4,18	4,25	3,22	3,36
	2	4,72	4,48	4,33	4,45	3,73	3,48
<i>L. plantarum</i> S85	1	4,66	4,15	4,29	4,52	3,65	3,22
	2	4,92	4,32	4,42	4,49	4,62	3,53

Sucuk gruplarının *Listeria monocytogenes* sayılarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.22'de verilmiştir. Buna göre starter kültür ve olgunlaştırma süresi *Listeria monocytogenes* sayısı üzerinde çok önemli ( $p<0,01$ ) etki göstermiştir. Starter kültür x olgunlaştırma süresi interaksyonunun da *Listeria monocytogenes* sayısı üzerinde çok önemli ( $p<0,01$ ) derecede etkili olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.22.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşımına süresince belirlenen *Listeria monocytogenes* sayılarına (log kob/g) ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
<b>Starter Kültür (S)</b>	5	0,314	5,274**
<b>Olgunlaştırma Süresi(O)</b>	5	4,6069	68,332**
<b>SxO</b>	25	0,239	4,018**
<b>Hata</b>	36	0,060	
<b>Genel</b>	71		

\*\* P < 0.01 seviyesinde önemli

Deneme sucuklarının *L. monocytogenes* sayılarına ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.23'te verilmiştir. Sucuk hamurunda  $4,62 \pm 0,27$  olarak belirlenen *L. monocytogenes* sayısı olgunlaştırma süresi ilerledikçe düşüş göstermiş ve en düşük değeri  $3,06 \pm 0,71$  log kob/g ile 11. günde vermiştir. Olgunlaştırmanın 1., 3. ve 5. günlerine ait ortalamalar birbirinden farklılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuç fermentasyonun ilk 24 saati içerisinde gerçekleşen asitleşmenin önemli bir faktör olduğunun göstergesidir. Starter kültürler içeren gruplara ait ortalama değerler de birbirinden farklılık göstermiştir. En düşük ortalama değeri *L. plantarum* S50 vermiş, ancak bu ortalama değer istatistiki olarak *L. plantarum* S51'den farksız bulunmuştur ( $p > 0,05$ ).

**Çizelge 4.23.** Deneme sucuklarında starter kültür ve olgunlaştırma süresi değişkenlerinin *Listeria monocytogenes* sayılarına (log kob/g) ait ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

<b>Faktör</b>						
<b>O</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>11</b>
	4,62±0,27 a	4,40±0,31 a	4,41±0,15 a	4,41±0,17 a	3,85±0,39 b	3,06±0,71 c
<b>S</b>	<b>Kontrol</b>	<b>S50</b>	<b>S51</b>	<b>S72</b>	<b>S74</b>	<b>S85</b>
	4,34±0,50 a	3,87±0,94 a	4,06±0,84 ab	4,15±0,84 ab	4,10±0,51 ab	4,23±0,51 a

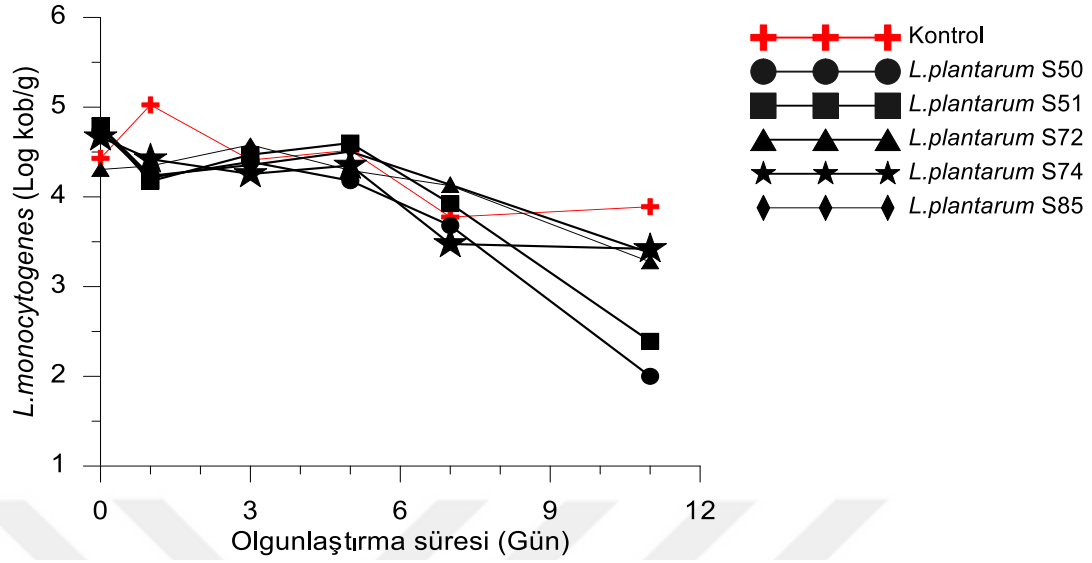
Aynı satırda farklı harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. (P<0.05), ± standart sapma, O: Olgunlaştırma süresi(gün), S: starter kültür, S50: *L. plantarum* S50, S51: *L. plantarum* S51, S72: *L. plantarum* S72, S74: *L. plantarum* S74, S85: *L. plantarum* S85

Sucuk gruplarının *L. monocytogenes* sayısı üzerinde çok önemli etkisi saptanan starter kültür x olgunlaştırma süresi interaksyonuna ait grafik Şekil 4.9'da verilmiştir. Buna göre olgunlaştırmanın ilk gününde kontrol grubunda *L. monocytogenes* sayısı artış gösterirken, diğer gruplarda azalmıştır. Kaya ve Gökalp (2004a;b) tarafından yapılan araştırmalarda starter kültür kullanılmayan gruplarda olgunlaştırmanın ilk 3 gününde, asitleşmenin yavaş olmasından dolayı *L. monocytogenes* sayısında önemli artışlar kaydedilmiştir. Mevcut bu araştırmada yukarıda verilen pH değerlerine ait sonuçlardan da görüleceği üzere, kontrol grubunda olgunlaştırmanın ilk gününde pH değeri 5,5'in altına 3. gününde ise 5,1'in altına düşmüştür. Kaya ve Gökalp (2004a) tarafından yapılan araştırmada kontrol grubunda pH değeri ancak 3. günde 5,4 civarına düşmüştür. Sucuk üzerinde yapılan mevcut bu araştırma ile Kaya ve Gökalp (2004a) tarafından yapılan araştırmalara ait sonuçlara göre sucuk üretiminde *L. monocytogenes*'in kontrolü açısından pH'nın önemli bir faktördür. Erol *et al.* (1999) tarafından yapılan araştırmada ise kontrol grubu örneklerde pH olgunlaştırmanın 4. gününde 4.85-4.99 arasında değiştiği *L. monocytogenes* sayısında ise önemli bir değişimin olmadığı rapor edilmiştir.

Deneme sucuklarının olgunlaştırma süresi ve starter kültür arasındaki interaksyonlarına ait Duncan çoklu test sonuçlarına göre (Çizelge 4.24) 1. günde kontrol grubu diğer gruplara göre istatistiki açıdan önemli farklılık göstermiştir (p<0,05). 3., 5. ve 7. günlerde ise gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık gözlenmemiştir

( $p>0,05$ ). Kontrol grubunun 0. gün ile 11. gününe ait değerler birbirinden istatistiki olarak farklılık göstermezken, starter kültür içeren gruplarda en düşük değer olgunlaştırmanın son gününde saptanmıştır. En fazla düşüş ise *L. plantarum* S50 varlığında görülmüştür. Bu sonuçlara göre kontrol grubu sucuklarda *L. monocytogenes* sayısında spontan floranın iyi bir çoğalma göstermesine rağmen *L. monocytogenes* sayısında önemli bir azalmaya sebep olmamıştır. *L. plantarum* suşları özellikle de *L. plantarum* S50 sayıda önemli redüksiyonlara sebep olmuştur. Bu sonucun seçilmiş bu suşların fermentasyon aşamasında pH'da hızlı bir düşüşe neden olmalarından ve muhtemelen bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitler üretmelerinden ileri geldiği düşünülmüştür. Nitekim bu suşların *L. monocytogenes*'e karşı antagonistik aktivite gösterdiği in vitro testlerle de ortaya konulmuştur.

Erol *et al.* (1999) tarafından sucuk üzerinde yapılan bir çalışmada, starter kültür mevcudiyetinde özellikle de bakteriyosin pozitif suşların varlığında *L. monocytogenes* sayısında önemli redüksiyonların gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Kaya and Gökalp (2004b) tarafından yapılan araştırmada da bakteriyosin oluşturan suşların (*L. sakei* Lb706, *Pediococcus acidilactici* Lb 628) starter kültür olarak kullanılması durumunda *L. monocytogenes* sayısında önemli redüksiyonların olduğu bildirilmiştir. Sucuk üzerinde yapılan diğer bir çalışmada da bakteriyosin üreticisi *P. acidilactici* suşunun kontrol grubuna göre 2 log kob/g düzeyinde daha fazla bir azalma sağladığı rapor edilmiştir (Cosansu *et al.* 2010).



**Şekil 4.9.** Deneme sucuklarının *Listeria monocytogenes* sayısı üzerine starter kültür x olgunlaştırma süresi interaksiyonunun etkisi

**Çizelge 4.24.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaştırma süresince belirlenen *Listeria monocytogenes* sayılarına (log kob/g) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

	Olgunlaştırma süresi (gün)					
	0	1	3	5	7	11
Kontrol	4,43±0,35 ab, A	5,03±0,05 a, A	4,41±0,14 ab, A	4,52±0,06 ab, A	3,78±0,40 b, A	3,89±0,61 b, A
<i>L. plantarum</i> S50	4,74± 0,07 aA	4,22±0,04 b, B	4,39±0,18 b, A	4,18±0,17 b, A	3,68±0,38 c, A	<2,00±0,00 d, C
<i>L. plantarum</i> S51	4,79± 0,03 a, A	4,18±0,19 cd, B	4,47±0,07 bc, A	4,60±0,14 b, A	3,93±0,23 d, A	2,39±0,13 e, BC
<i>L. plantarum</i> S72	4,31±0,47 a, A	4,35±0,04 a, B	4,58±0,24 a, A	4,30±0,01 a, A	4,13±0,23 a, A	3,28±0,13 b, B
<i>L. plantarum</i> S74	4,79±0,18 a, A	4,42±0,08 b, B	4,2±0,11 b, A	4,35±0,14 b, A	3,48±0,36 b, A	3,42±0,08 c, AB
<i>L. plantarum</i> S85	4,62±0,127 a, A	4,24±0,12 b, B	4,36±0,09 ab, A	4,51±0,02 ab, A	4,07±0,69 b, A	3,38±0,22 c, AB

Aynı satırda farklı küçük harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. (P<0.05), ± standart sapma

Aynı sütundaki farklı büyük harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır. (P<0.05), ± standart sapma

Olgunlaştırma süresi sonunda *L. plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85 sırasıyla 2,74, 2,40, 1,03, 1,37 ve 1,24 log kob/g inhibisyon gerçekleştirdiği kontrol grubunda ise *Listeria monocytogenes* inhibisyonunun 0,94 log kob/g olduğu saptanmıştır. Berry *et al.* (1990) bakteriyosin üreticisi starter kültür kullanımıyla yarı kuru fermente bir sosis çeşidinde *Listeria* sayısında 2 log kob/g'lık bir redüksiyonun sağlandığını, bakteriyosin üreticisi olmayan starter kullanılması durumunda ise 1 log kob/g'dan daha az bir redüksiyonun gerçekleştirildiğini bildirilmiştir. Foegeding *et al.* (1992) da bakteriyosin üreticisi suş kullanılmasıyla *Listeria* sayısında 1 veya 1,2 log kob/g daha fazla bir redüksiyonun gerçekleştiğini yaptıkları denemelerle ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde Diaz-ruiz *et al.* (2012) model sosis fermentasyon ortamında bakteriyosin üreten *L. plantarum* suşunun bakteriyosin üreticisi olmayan *L. plantarum* suşuna göre *L. monocytogenes* sayısında daha fazla bir redüksiyon sağladığını bildirmişlerdir.

#### 4.6.5. Enterobacteriaceae

Farklı *L. plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaştırma süresince belirlenen Enterobacteriaceae sayıları Çizelge 4.25'te verilmiştir. Sucuk hamurlarında <2 ile 2,6 log kob/g arasında değişen enterobacteriaceae sayısı kontrol grubunda 1. Günden itibaren saptanabilir sınırın altına düşmüştür. Diğer gruplarda da 3. Günden itibaren sayı saptanabilir değerinin altında bulunmuştur. Enterobacteriaceae familyası üyelerine, düşük pH ve su aktivitesine karşı hassas olmalarından dolayı fermente et ürünlerinde az rastlanılmaktadır (Gonzalez and Diez 2002). Mevcut bu araştırmada pH değerlerindeki düşüşlerden dolayı Enterobacteriaceae üyelerinin gelişemediği düşünülmektedir. Benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Kaya and Gökcalp 2004a, b; Genççelep *et al.* 2007; Kaban 2007).

**Çizelge 4.25.** Farklı *Lactobacillus plantarum* suşları kullanılarak üretilen sucuklar ile kontrol grubu sucukların olgunlaşma süresince belirlenen *Enterobacteriaceae* sayıları (log kob/g)

		Olgunlaştırma süresi (gün)						
		Tekerrür	0	1	3	5	7	11
Kontrol	1		2,48	<2	<2	<2	<2	<2
	2		<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. plantarum</i> S50	1		2,60	2,70	<2	<2	<2	<2
	2		2,60	2,00	<2	<2	<2	<2
<i>L. plantarum</i> S51	1		2,30	2,30	<2	<2	<2	<2
	2		<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. plantarum</i> S72	1		2,00	<2	<2	<2	<2	<2
	2		2,00	2,95	<2	<2	<2	<2
<i>L. plantarum</i> S74	1		2,00	<2	<2	<2	<2	<2
	2		<2	2,60	<2	<2	<2	<2
<i>L. plantarum</i> S85	1		<2	2,70	<2	<2	<2	<2
	2		2,48	2,00	<2	<2	<2	<2

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırma kapsamında sucuktan izole edilen 5 *Lactobacillus plantarum* izolatu moleküler olarak doğrulanmış ve 7 gıda kaynaklı patojene karşı antagonistik aktiviteleri incelenmiştir. Bu laktik asit bakteri izolatları *Lactobacillus plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85 olarak tanımlanmış ve proteolitik, lipolitik özellikleri, dekarboksilaz ve nitrat redüktaz aktiviteleri, glukozdan asetoin oluşturabilme yetenekleri ile L (+), D(-) laktik asit üretimleri yönünden incelenmiştir. Ayrıca araştırmada bu suşların fermente sucukta *L. monocytogenes*'e karşı koruyucu kültür olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek amacı ile deneme sucukları üretilerek analiz edilmiştir. Araştırmada elde edilen sonuçlardan aşağıda verilen genel sonuç ve önerilere varılmıştır.

1. Seçilen 5 *L. plantarum* izolatu 16s rRNA dizi analizi ile *L. plantarum* olarak doğrulanmıştır. *L. plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85 olarak adlandırılan *L. plantarum* suşlarının kuyu difüzyon testi sonucunda kullanılan 7 indikatör suşa karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Suşlar, *Listeria monocytogenes*'e karşı iyi bir antagonistik aktivite göstermiştir. Bu sonuç, suşların potansiyel koruyucu kültür olabileceğine dair iyi bir işaret olarak düşünülmüştür.
2. *L. plantarum* suşlarının genomik DNA'sında 11 farklı bakteriyosin üretiminden sorumlu gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla kullanılan primerler ile gerçekleştirilen PCR, başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve plantarisin üretiminden sorumlu 7 farklı (*plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnI*, *plnJ*, *plnK* ve *plnN*) geni çoğaltan primerler ile PCR sonucunda amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.
3. *L. plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85 numaralı izolatların 24 saat boyunca alınan optik yoğunluk değerlerine bakılarak oluşturulan çoğalma eğrisinde 0-4 saat arası lag(adaptasyon) fazı, 4-12 saat arası ise log (çoğalma) fazı oluşturduğu belirlenmiştir.
4. *L. plantarum* S50, S51, S72 ve S74 'ün 8. saatte bakteriyosin benzeri metabolit üretimine başladığı, log fazının sonuna yaklaşıldığında bakteriyosin aktivitesinin arttığı ve durma fazında ise maksimuma ulaştığı görülmüştür. *L. plantarum* S85'in ise 10. saatte bakteriyosin üretimine başladığı ve durma fazında maksimum bakteriyosin aktivitesine eriştiği belirlenmiştir.

5. *L. plantarum* S85 ve S50 suşlarının üretmiş olduğu antimikrobiyal madde sıcaklık süre uygulamalarından çok az etkilenirken, *L. plantarum* S74 suşunda uygulanan sıcaklık süre kombinasyonlarında aktivitede herhangi bir kayıp görülmemiştir. S72 ve S51 izolatlarının ise 121°C 15' inkübasyon sonucunda *M. luteus* NCIMB üzerine antimikrobiyal etkisinde tamamen kaybettikleri saptanmıştır. Bu sonuçlar dikkate alındığında *L. plantarum* suşlarının özellikle *L. plantarum* S74 suşunun fermente sucuğun yanı sıra ısıl işlem görmüş sucuk üretiminde *L. monocytogenes*'e karşı koruyucu kültür olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

6. Tripsin, pepsin ve proteinaz K enzim uygulamaları antimikrobiyal aktiviteyi olumsuz yönde etkilemiştir. Uygulanan enzimlerin proteolitik karakterde olması *L. plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85'in göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivitenin protein kaynaklı olduğuna işaret etmektedir. Proteolitik enzim uygulaması indikatör suşlara göre değişkenlik göstermiştir. Enzim uygulaması sonucunda, *L. plantarum* S50 ve S74'ün üretmiş oldukları antimikrobiyal maddenin *L. monocytogenes*'e karşı aktivitesi devam ederken *M. luteus*'a karşı aktivitesi tamamen kaybolmuştur.

7. *L. plantarum* suşlarının teknolojik özellikleri incelendiğinde suşların tümünün 25°C'de optimum bir çoğalma gösterdiği tespit edilmiştir. 15°C'lik bir sıcaklıkta da çoğalma gösteren suşlar, 45°C'de zayıf bir çoğalma göstermiştir. %6,5 tuz konsantrasyonunda gelişen suşlar %10 tuz mevcudiyetinde çoğalma sergileyememiştir. Sucuk ve benzeri fermente et ürünlerinde daha düşük tuz oranları (%2-3) kullanıldığından, kullanılan *L. plantarum* suşlarının fermentasyon aşamasında iyi bir çoğalma göstereceği ve daha sonraki aşamalarda da canlılığını sürdürebileceği düşünülebilir. Farklı pH değerlerinde çoğalmaları incelendiğinde ise düşük pH değerlerinde (pH 4,5 ve 5) orta düzeyde bir çoğalma gösteren suşlar pH 5,5'de iyi, pH 6 ve 6,5 da ise çok iyi bir çoğalma göstermiştir. Fermentasyon sırasında pH'nın 5 civarlarına düşmesinin laktik asit bakterilerinin gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceği söylenebilir.

8. *L. plantarum* suşlarının biyokimyasal özellikleri dikkate alındığında *L. plantarum* S51 hariç diğerleri glukozdan asetoin oluşumunun göstergesi olan Voges-proskauer testinde pozitif sonuç vermiştir. Fermente et ürünlerinde çok yüksek miktarda asetik asit veya asetoin oluşumu arzu edilen bir durum değildir (Kaya and Kaban 2010). İncelenen suşların tümünün kazeni ve jelatini parçalama yeteneğine sahip olmadıkları

belirlenmiştir. Aynı şekilde tribütirini parçalama özelliğine sahip olmadıkları da saptanmıştır. Bu sonuçlar kullanılan suşların proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olmadığını göstermektedir. Suşların tümü lizin, ornitin ve arginin dekarboksilaz aktivitesi yönünden negatif sonuç vermişlerdir. Biyojen aminlerin yüksek miktarda tüketimi ile istenmeyen fizyolojik sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Latorre-Moratalla *et al.* 2012a). Araştırmada incelenen 5 *L. plantarum* suşunun tümünün DL-laktik asit ürettiği belirlenmiştir. İki *L. plantarum* suşunda (S72, S85) zayıf bir nitrat redüktaz aktivitesi gözlenirken, diğer suşlarda nitraz redüktaz aktivitesi tespit edilmemiştir. Tüm bu sonuçlara göre *L. plantarum* suşları sucuk ve benzeri ürünlerde bir starter kültür için gerekli biyokimyasal özellikleri sergilemektedir. Ancak *L. plantarum* S51 suşunun Voges-proskauer testinde negatif sonuç vermiş olması, bu suşu ön plana çıkarmaktadır. Asetoin seviyesi ürün aroması açısından önemli olduğundan diğer suşların model sistemlerde aroma oluşuma etkileri detaylı bir şekilde incelenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

9. *L. plantarum* suşları kullanılarak üretilen fermente sucuklarla ilgili denemelerde tüm gruplarda kuruma nedeni ile nem miktarı olgunlaştırma süresi ilerledikçe düşüş göstermiştir. Olgunlaştırmanın son gününde (11. gün) tüm gruplarda nem değeri %40'ın altına düşmüştür. Starter kültür kullanılmadan üretilen kontrol grubuna ait ortalama %nem değeri dahi *L. plantarum* içeren grupların ortalama değerinden istatistiki olarak bir farklılık göstermemiştir ( $p>0,05$ ). Bu sonuç spontan laktik asit bakterilerinin ortamda iyi geliştiğini göstermekle birlikte, standart bir ürün üretimini garanti altına almamaktadır. Hammadde kalitesi özellikle hijyenik kalite farklılık gösterebileceğinden standart ve kaliteli bir ürün için starter kültürler ihtiyacı vardır.

10. Fermente sucuk, ısı işlem görmüş sucuk, salami, chorizo, summer sausage, lebanon Bologna, Rohwurst gibi kuru veya yarı kuru fermente sosislerde pH hem ürünün duyusal özellikleri hem de mikrobiyolojik açıdan önemli bir iç faktördür. Fermentasyon aşamasında pH'nın izoelektirik noktaya kadar düşmesi su tutma kapasitesini düşürerek kurumaya katkıda bulunmaktadır. Diğer taraftan bu aşamadaki asit oluşum hızı ve derecesi gıda kaynaklı patojenlerin ve hatta arzu edilmeyen Gram(-) floranın inhibisyonunda oldukça önemlidir. Mevcut bu araştırmada 24°C'de 24 saatlik fermentasyon sonunda *L. plantarum* içeren gruplarda pH 5'in altına düşerken, kontrol grubunda 5,5'in altına düşmüştür. Olgunlaştırmanın 3. gününde kontrol grubunda pH

5,04'e kadar düşmüştür. Tüm gruplarda olgunlaştırmanın son gününde proteolizis nedeniyle pH'da artış gözlenmiştir.

11. Sucuk hamuruna  $10^7$  kob/ g düzeyinde inoküle edilen *L. plantarum* suşları fermentasyonun ilk gününde  $10^8$  kob/g düzeyine kadar çoğalmış ve hemen hemen bu düzeyde kalmıştır. Kontrol grubunda ise  $10^4$  kob/g düzeyinde laktik asit bakterisi tespit edilirken olgunlaştırma süresince daha yüksek sayılara erişilmiştir. Kontrol grubunda da bu düzeye erişilmesi spontan laktik asit bakterilerinin çok iyi geliştiğini göstermektedir.

12. Sucuk hamurlarına  $10^4$  kob/g düzeyinde inoküle edilen *Listeria monocytogenes*, kontrol grubunda 24 saatlik fermentasyon sonunda 0,5 logaritmik birimlik artış gösterirken, *L. plantarum* içeren gruplarda ise inhibisyon saptanmıştır. Bu sonucun olgunlaştırmanın ilk gününde asitleşmenin kontrol grubunda daha yavaş olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. *Listeria monocytogenes* sayısında en önemli inhibisyon *L. plantarum* S50 içeren grupta olduğu diğer *L. plantarum* suşlarında da inhibisyon saptanmıştır. Olgunlaştırma süresi sonunda *L. plantarum* S50, S51, S72, S74 ve S85 sırasıyla 2,74, 2,40, 1,03, 1,37 ve 1,24 log kob/g inhibisyon gerçekleştirdiği kontrol grubunda ise *Listeria monocytogenes* inhibisyonunun 0,94 log kob/g olduğu saptanmıştır. Bu sonucun *L. plantarum* suşlarının yukarıda da belirtildiği gibi pH'da sağlamış olduğu hızlı düşüş ve in vitro testlerle de tespit edilen, *Listeria monocytogenes*'e karşı sahip olduğu antagonistik aktiviteden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak mevcut bu araştırmada kullanılan geleneksel sucuk kaynaklı *L. plantarum* suşlarının pek çok özellik açısından starter ve/veya koruyucu kültür olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu kanaatine varılmıştır.

**KAYNAKLAR**

- Adıguzel, G. and Atasever, M. 2009. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4130-4138.
- Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T. and Teixeira, P., 2007. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages): in situ assays. *Meat Science*, 76, 796-800.
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Magalhaes, R., Hogg, T. and Teixeira, P., 2009. Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “alheira”, a fermented meat sausage. *Food Control*, 20, 764-770.
- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prevost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E. and Chevallier, I., 2005. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22, 373-382.
- Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A. and Valdivia, E., 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 179-190.
- Anonim, 2012. Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2012/74), 5/12/2012/ 28488. Resmi Gazete.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M. and Hugas, M., 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4583-4594.
- Baka, A.M., Papavergou, E.J., Pragalaki, T., Bloukas, J.G. and Kotzekidou, P., 2011. Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 54-61.
- Baka, M., Noriega, E., Tsakali, E. and Van Impe, J.F.M., 2015. Influence of composition and processing of frankfurter sausages on the growth dynamics of *Listeria monocytogenes* under vacuum. *Food Research International*, 70, 94-100.
- Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., Berna Franco, B.D.G.M., Converti, A. and Oliveira, R.P.S., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134-142.
- Barbosa, M.S., Todorov, S.D., Ivanova, I., Chobert, J.M., Haertle, T. and Melo Franco, B.D.G., 2015. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*, 46, 254-262.
- Barbosa, M.S., Todorov, S.D., Ivanova, I.V., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J.-M., Haertle, T. and Franco, B.D.G.M., 2016. Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. *Food Control*, 60, 103-112.

- Barış, Ö., 2009. Erzurum ilindeki mağaralarda damlataşı oluşumunda etkili bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Benito, M.J., Mart'In, A., Aranda, E 'Erez-Nevado, F. P Ruiz-Moyano S., and C'Ordoña. M.G., 2007. Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchich'on and chorizo sausages. *Journal of Food Science* , 72(6), 194-201.
- Benkerroum, N., Daoud, A. and Kamal, M., 2003. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw sausages (merguez) in presence of a bacteriocin-producing lactococcal strain as a protective culture. *Meat Science*, 63, 479–484.
- Benkerroum, N., Daoudi, A., Hamraoui, T., Ghalfi, H., Thiry, C., Duroy, M., Evrart, P., Roblain, D. and Thonart, P., 2005. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 56-63.
- Berktaş, M., Bozkurt, E.N., Hamza Bozkurt, H., Alişarlı, M. and Güdücüoğlu, H., 2006. Et ve et ürünlerinden *Listeria monocytogenes* 'in izolasyonu *Van Tıp Dergisi*: 13 (2),36-41.
- Berry, E. D., M. B. Liewen, R. W. Mandigo, and R. W. Hutkins. 1990. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. *Journal of Food Protection*, 53,194-197.
- Beverly. R.L., 2004. The control, survival, and growth of *Listeria monocytogenes* on food products. Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the Requirements for the degree of Doctor of Philosophy The Department of Food Science.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., and Ray, B., 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1265-1267.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C., 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 185–189.
- Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.L., Delboni, R.R., Oliveira, J., 2004. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35,137-144.
- Čaklovica, F., Kozačinski, L., Cvrtila, Ž., Veskovíc-Moračanin, S., Gasparik Reichardt, J., Zdolec, N., Smajlović, M. and Alagić, D., 2005. Influence of selected lab on *L. monocytogenes* during production of traditionally fermented sausages. *Tehnologija Mesa*, 46, 185-193.
- Capozzi, V., Russo, P., Ladero, V., Fernández V., Fiocco, D., Alvarez M.A., Grieco, F. and Spanol, G., 2012. Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: toward a potential application in wine, *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2012.00122
- Carvalho, A.A.T., Paula, R.A., Mantovani, H.C., and Moraes, C.A.,2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiology*, 23, 213–219.

- Casaburi, A., Di Martino, V., Ferranti, P., Picariello, L. and Villani, F., 2016. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*, 59, 31-45.
- Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A. and Campos, C.A., 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, 87, 321-329.
- Chen, H., and Hoover, D. G., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 82-100.
- Colak, H., Hampikyan, H., Ulusoy, B. and Bingol, E.B. 2007. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage. *Food Control*, 18, 30–32.
- Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C. and Cocolin, L., 2005. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the north east of Italy. *Meat Science*, 69, 381-392.
- Coppola, R., Giagnacovo, B., Iorizzo, M. and Grazia, L., 1998. Characterization of lactobacilli involved in the ripening of soppressata molisana, A typical Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology*, 15, 347-353.
- Cosansu, S., Geornaras, I., Ayhan, K. and Sofos, J.N., 2010. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* 13 and its antimicrobial substance in a dry fermented sausage sucuk and in turkey breast. *Journal of Food and Nutrition Research*, 49(4), 206-214.
- Çon, A.H. and Gokalp, H.Y., 2000. Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Sci*, 55:89–96.
- Çon, A.H., Gokalp, H.Y. and Kaya, M., 2001. Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science*, 59, 437-441.
- Çon, A.H., Kaya, M. and Gokalp H.Y., 1996. Isoilerung und identifizierung von *Listeria monocytogenes* und weiteren Listerienarten aus der Türkischen Rohwurst "Sucuk". *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 47, 65–66.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M. and Richard-Forget, F., 2010. Lactic acid bacteria – potential for control of mould growth and mycotoxins: A Review, *Food Control*, 21, 370-380.
- De Martinis, E.C.P. and Freitas, F.Z., 2003. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*, 14, 197-200.
- De Vries, M., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., and de Vosa, W.M., 2006. Review *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018–1028.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. and Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(2), 193-202.
- Demeyer, D.I. and Vandekerckhove, P., 1979. Compounds determining pH in dry sausage R. Moermans. *Meat Science*, 3(3), 161-167.
- Díaz-Ruiz, G., Omar, N.B., Abriouel, H., Cañamero, M.M. and Gálvez, A., 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* EC52 in a meat sausage model system, *African Journal of Microbiology Research*, 6(6), 1103-1108.

- Dicks, L.M.T., Mellett, F.D. and Hoffman, L.C., 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*, 66, 703-708.
- Dinçer, B., Mutluer, B., Erol, İ., Özdemir, H., Yağlı, Ö. ve Akgün, S., 1995. Türk fermente sucuğuna özgü starter kültür bakterilerinin izolasyon, identifikasyon ve üretimleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 42 (3), 285-293.
- Doulgeraki, A., Paraskevopoulos, N., Nychas, G.J.E. and Panagou, E.Z., 2013. An in vitro study of *Lactobacillus plantarum* strains for the presence of plantaricin genes and their potential control of the table olive microbiota. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103-821.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. and Metaxopoulos, J., 2005. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented Sausage. *Meat Science*, 69 (2), 307-317.
- Drosinos, E.H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I. and Metaxopoulos, I., 2007. phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, 24, 260-270.
- Enan, G., El-Essawy, A.A., Uyttendaele, M. and Debeverea, J., 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UGI isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG 1. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 189-215.
- Erol, I. and Hildebrandt, G., 1992. Einfluss von Starterkulturen auf das Wachstum pathogener Keime in Türkischer Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, 72, 90-97.
- Erol, I., Çelik, T.H., Şireli, U.T. ve Özdemir, H., 1999. Bakteriyosin oluşturan starter kültürlerin fermente türk sucuklarında *L. monocytogenes* üzerine etkisi .*Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 23(4), 793-802.
- Essid, I., Medini, M. and Hassouna, M., 2009. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*, 81, 203-208.
- Farber J.M., Rossb, W.H. and Harwig, J., 1996. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal of Food Microbiology* 30, 145-156.
- Farber, J. M., and Peterkin, P. I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*, 55(3), 476-511.
- Foegeding, P.M., Thomas A.B., Pilkington, D.H. and Klaenhammer, T.R., 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production, *Applied And Environmental Microbiology*, 58(3), 884-890.
- Fontana, C., Cocconcelli, P. S., Vignolo, G. and Saavedra, L., 2015. Occurrence of antilisterial structural bacteriocins genes in meat borne lactic acid bacteria, *Food Control*, 47, 53-59.
- François, Z.N., Marie, K.P., Noëlle, T.A.H. and Emeric, G.W.R., 2013. Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 29V and strain's viability in Palm kernel oil. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(3), 102-108.
- Freitas de Macedo, R.E., Miyague, L., Costa, B. and Luciano, F.B., 2013. Control of *Listeria monocytogenes* growth by bacteriocin-producing starter cultures in the

- manufacturing of dry fermented sausage. *African Journal of Microbiology Research*, 7(9), 710-718.
- Gao, Y., Li, D. and Liu, X., 2014. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages. *Food Control*, 35, 1-6.
- Genççelep, H., Kaban, G. and Kaya, M., 2007. Effects of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in sucuk. *Meat Science*, 77(3), 424-430.
- Giraffa, G., Chanishvili, N. and Widyastuti, Y., 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161(6), 480-487.
- Goffin, P., Deghorain, M., Mainardi, J., Tytgat, I., Champomier-Verge`s, M., Kleerebezem, M., and Hols, P., 2005. Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of bacteriology*, 187(19), 6750-6761.
- Gonzalez, B. and Diez, V., 2002. The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of “chorizo” a Spanish dry cured sausage. *Meat Science*, 60, 295–298.
- Goulet, V., King, L.A., Vaillant, V. and Valk, H., 2013. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infectious Diseases BMC series open, inclusive and trusted*, 13(1), 1.
- Gökalp, H.Y., Kaya M.,Tülek Y. ve Zorba Ö., 2001. Et ve ürünlerinde kalite kontrolü ve laboratuvar uygulama kılavuzu. Atatürk Üniv. Yayın No:751, Ziraat Fak. Yayın No:318, Ders Kitapları Serisi, No: 69, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Ofset Tesisi, Erzurum.
- Gökalp, H.Y., Kaya, M. ve Zorba, Ö., 2004. Et ürünleri işleme mühendisliği. Atatürk Üniv. Yayın No:786, Ziraat Fak. Yayın No: 320, Ders Kitapları serisi No:70, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Ofset Tesisi, Erzurum.
- Gürakan, G.C., Bozoğlu, T.F. and Weiss, N., 1995. Identification of lactobacillus strains from turkish-style dry fermented sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1),139-144.
- Harrigan, W.F., 1998. *Laboratory methods in food microbiology*. Academic Press. California 92101-4495, USA, pp100.
- Hernández, D., Cardell, E. and Zárata, V., 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 77–84.
- Hillier, A.J. and Davidson, B.E., 1991. Bacteriocins as food preservatives. *Food Res Q*.51:60–64.
- Holzapfel, W.H., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 197–212.
- Hugas, M. and Monfort, J.M., 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, 59, 547-554.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. and Monfort J.M., 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC 494. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 322–330.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T. and Monfort, J.M., 1993. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 18(2), 107-113.

- Jessen, B., 1995. Starter cultures for meat fermentations. in: fermented meats.(Edited by G. Campbell-Platt and P.E. Cook), 134-140. Blackie Academic & Professional. Glasgow G64 2NZ, UK.
- Jones, R.J., Hussein, H.M., Zagorec, M., Brightwell, G. and Tagg, J.R., 2008. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*, 25, 228-234.
- Kaban, G., 2007. Geleneksel olarak üretilen sucuklardan laktik asit bakterileri ile katalaz pozitif kokların izolasyonu- identifikasyonu, üretimde kullanılabilme imkanları ve uçucu bileşikler üzerine etkileri, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kaban, G. and Kaya, M., 2006. Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in Sucuk. *Food Control*, 17 (10), 797-801.
- Kaban, G. and Kaya, M., 2008. Identification of lactic acid bacteria and gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (Sucuk) . *Journal of Food Science*, 73(8), 385-388.
- Kaban, G. and Kaya, M., 2009a. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* on the quality characteristics of dry fermented sausage “Sucuk”. *Journal of Food Science*, 74(1), 58-63.
- Kaban, G., and Kaya, M. 2009b. Effects of *Staphylococcus carnosus* on quality characteristics of sucuk (Turkish dry-fermented sausage) during ripening. *Food Science and Biotechnology*, 18(1), 150-156.
- Kaban, G., Kaya, M. and Lücke, F.K., 2012. Meat starter cultures. *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*, Taylor and Francis, Newyork, 1-4.
- Kamiloğlu, A., Kaban, G. and Kaya, M., 2016. Contribution of catalase positive cocci on flavour formation in fermented sausages. *British Journal of Applied Science & Technology* , DOI: 10.9734/BJAST/2016/27740.
- Kamiloğlu, A., Sayın, B., Kaban, G. and Kaya, M., 2014. Catalase positive cocci and volatile compounds in fermented sausages. *Journal of Biotechnology*, 185S, S18–S36.
- Kaya, M., and Gökalp, H.Y., 1997. The incidence of *Listeria* spp. in Turkish style dry sausage. *Fleischwirtschaft*, 77(3), 275-276.
- Kaya, M. and Gökalp, H.Y., 2004a. Sucuk üretiminde starter kültür kullanımının ve farklı nitrit dozlarının *Listeria monocytogenes*'in gelişimi üzerine etkisi, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 28, 1121-1127.
- Kaya, M. ve Gökalp H.Y., 2004b. Farklı laktik starter kültürler kullanılarak üretilen sucuklarda *Listeria monocytogenes*'in davranışı. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 28(6), 1113-1120.
- Kaya, M. ve Kaban, G., 2010. Fermente et ürünleri. *Gıda biyoteknolojisi*, (2nd Ed.), N. Aran. Nobel Yayın, İstanbul, Türkiye, 157–190.
- Kesmen, Z., Yetiman, A.E., Gulluce, A., Kacmaz, N., Sagdic, O., Cetin, B., Adiguzel, A., Sahin, F. and Yetim, H., 2012. Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 428–435.
- Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P., Chareonpornsook, K. and Visessanguan, W., 2012. Anti-listerial activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for nham, a traditional fermented pork sausage. *Food Control*, 25, 190–196.

- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology*, 12, 39-86.
- Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337-349.
- Kloos, W.E. and Schleifer, K.H., 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 1(1), 82-88.
- Kormin, S., Rusul, G., Radu, S. and Ling, F.H., 2001. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from traditional fermented food. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 8(1), 63-68.
- Lahti, E., Johansson, T., Honkanen-Buzalski, T., Hill, P. and Nurmi, E., 2001. Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. *Food Microbiology*, 18, 75-85.
- Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Muñoz, R., and De Las Rivas, B., 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat science*, 95(2), 272-280.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Bosch-Fusté, J. and Vidal-Carou, M.C. 2012b. Influence of technological conditions of sausage fermentation on the aminogenic activity of *L.curvatus* CTC273. *Food Microbiology*. 29, 43–48.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T. and Vidal-Carou, M.C., 2012a. Control of biogenic amines in fermented sausages: role of starter cultures. *Frontier in Microbiology*, 3(169), 1-9.
- Lewus, C.B., Kaiser, A. and Montville, T.J., 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1683-1688.
- Line, J.E., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P. and Stern, N.J., 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), 1094-1100.
- Lücke, F.K., 1985. Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken in: *Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken*. Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, 85-102.
- Lücke, F.K. and Hechelmann, H., 1987. Starter cultures for dry sausages and raw ham composition and effect. *Fleischwirtschaft*, 67(3), 307-314.
- Lücke, F.K., 1998. Fermented sausages. In: *Microbiology of fermented foods*. Springer US, 1998. p. 441-483.
- Mangia, N.P., Trani, A., Di Luccia, A., Faccia, M., Gambacorta, G., Fancello, F. and Deiana, P., 2013. Effect of the use of autochthonous *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* strains on microbiological and biochemical properties of the Sardinian fermented sausage. *European Food Research and Technology*, 236(3), 557-566.
- Marie, K.P., François, Z.N., Abbasi, A., Anwar, F. and Ali, S.A., 2012. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* Lp6SH isolated from "Sha'a", a maize-based traditionally fermented beverage from cameroon. *International Journal of Biology* 4(2), 149-158.
- Mataragas, M., Bellio, A., Rovetto, F., Astegiano, S., Greci, C., Hertel, C., Decastelli, L. and Cocolin, L., 2015. Quantification of persistence of the food-borne

- pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* during manufacture of Italian fermented sausages, *Food Control*, 47, 552-559
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R., Manicardi, G., 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 193-198.
- Montel, M.C., Mason, F. and Talon, R., 1998. Bacterial Role in flavour development. *Meat Science*, 49 (1), 111-123.
- Montet, D. and Ray R.C., 2016. *Fermented Foods, Part I: Biochemistry and biotechnology*. CRC Press, Taylor and Francis, 413.
- Müller, D.M., Carrasco, M.S., Tonarelli, G.G. and Simonetta, A.C., 2009. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1364-5072.
- Nes, I. F., Brede, D.A. and Holo, H., 2006. The nonantibiotic heat-stable bacteriocins in Gram positive bacteria. *Handbook of Biologically Active Peptides*, Kastin, A. Academic Press, 85-93.
- Nes, I.F., Gabrielsen, C., Brede, D.A., and Diep, D.B., 2015. Novel developments in bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, Mozzi, M., Raya, R.R., Vignolo, G.M. John Wiley & Sons, 80-97.
- Nes, I.F., Yoon S.S. and Diep, D.B., 2007. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, 16(5), 675 – 690.
- Nie, X., Zhang, Q. and Lin, S., 2014. Biogenic amine accumulation in silver carp sausage inoculated with *Lactobacillus plantarum* plus *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry* 153, 432–436
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Paláez-Martínez, M.C., Sacristán-Perez-Menayo, G., Gutiérrez-Fernández A.J. and Torre A.H., 2010. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*, 21, 679-685.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S., 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 137 – 145.
- Özdemir, H., 1999. Türk fermente sucuğunun florasındaki dominant laktobasil türlerinin sucuğun organoleptik nitelikleri ile ilişkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46: 189-198.
- Özdemir, H., Çelik, T.H., Erol, İ., Sireli, U.,T. ve Sırıken, B., 1996.Yüksek sıcaklık derecelerinde olgunlaştırılan Türk fermente sucuklarında laktobasillerin seyir, izolasyon ve identifikasyonu. *Gıda*, 21(6), 465-478.
- Paik, H. and Lee, J., 2014. Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition. *Meat Science*, 97, 609–614.
- Papamanoli, E., Tzanetakakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P., 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented

- sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65, 859-867.
- Paula, R.A., Barbosa, A.A.T., Machado, S.R.S., Saraiva, M.A.V., Moraes, C.A. and Mantovani, H.C., 2015. Growth and anti-listerial activity of a nisin Z producer in a pork lean meat broth fermentation system. *African Journal of Microbiology*, 9(39), 2095-2102.
- Phalakornkule, C. and Tanasupawat, S., 2006. Characterization of lactic acid bacteria from traditional thai fermented sausages. *Journal of culture Collections*, 5, 46-57.
- Pragalaki, T., Bloukas, J.G. and Kotzekidou, P., 2013. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in liquid broth medium and during processing of fermented sausage using autochthonous starter cultures. *Meat Science*, 95(3), 458-464.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P., 2006. Isolation and preliminary characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* N014 isolated from nham, a traditional thai fermented pork. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1937-1943.
- Remiger, A., Ehrmann, M. A. and Vogel, R.F., 1996. Identification of bacteriocin-encoding genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 28-34.
- Requena, T., Pelaez, C. and Fox, P.F., 1993. Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 196 (4), 351-355.
- Rodriguez, J.M., Cintas, L.M., Casaus, P., Suarez, A. and Hernandez, P.E., 1995. PCR detection of the lactocin s structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2802-2805.
- Sabia, C., Niederhausern, S., Messi, P., Manicardi, G. and Bondi, M., 2003. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages (cacciatore). *International Journal of Food Microbiology*, 87, 173-179.
- Santos, M.H.S., 1998. Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products international. *Journal of Food Microbiology* 39, 227-230.
- Sawitzki, M.C., Fiorentini, A.M., Bertol, T.M. and Sant'Anna, E.S., 2009. *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(2), 340-345.
- Schillinger, U. and Lücke, F. K., 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, 4, 199-208.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (8), 1901-1906.
- Smaoui, S.L., Elleuch, W., Bejar, I., Karray-Rebai, I., Ayadi and B. Jaouadi 2010. Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1132-1146.

- Soyer, A., Erta, A.H. and Uzümcüoğlu, Ü., 2005. Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). *Meat Science*, 69, 135–141.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews*, 40(3), 722.
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, C. and Vernozy-Rozand, C., 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 85 – 94.
- Todorov S.D., Ho, P., Vaz-Velho, M. and Dicks, L.M.T., 2010. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from beloura and chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science*, 84, 334–343.
- Todorov, S., Gotcheva, B., Dousset, X., Onno, B. and Ivanova, I., 2000. Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* ST31. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 14, 50-55.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41, 11–19.
- Todorov, S.D., 2008. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp.. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 178-187.
- Todorov, S.D., Vaz-Velho, M., de Melo Franco, B.D.G. and Holzappel, W.H., 2013. Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicao, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control*, 30, 111-121.
- Toksoy, A., Beyatlı, Y. ve Aslım, B., 1999. sucuk ve sosislerden izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*, 23, 533-540.
- Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.L., 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1131–1137.
- Vidal-Carou, M.C., Toldrà, F., Hui, Y.H., Astiasarán, I., Nip, W.K., Sebranek, J.G., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Silveira, E.T., Stahnke, L.H. and Talon, R., 2007. Biogenic amines: risks and control. handbook of fermented meat and poultry, Toldra, F. Blackwell Publishing, Oxford, 455–468.
- Wen, L.S., Philip, K. and Ajam, N. 2016. Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 60, 430-439.
- Wheater, D.M., 1955. The characteristics of *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus* and *L. casei*. *Journal of General Microbiology*, 12, 133-139.
- Wilson, K., 1997. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2.4.1-2.4.5.

- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwathana, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W., 2016. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*. (article in press)
- Yaman, A., Gökalp, H.Y. and Çon, A.H., 1998. Some characteristics of lactic acid bacteria present in commercial sucuk samples. *Meat Science*, 49, 387-397.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C. and Fillmore, S., 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2, 48.
- Zanette, C.M., Dalla Santa, O.R. and Bersot, L.S., 2015. Effect of *Lactobacillus plantarum* starter cultures on the behavior of *Listeria monocytogenes* during sausage maturation. *International Food Research Journal*, 22(2), 844-848.
- Zeng, X., Xia, W., Wang, J., Jiang, Q., Xu, Y., Qiu, Y., & Wang, H., 2014. Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional low salt fermented whole fish. *Food Control*, 40, 351-358.
- Zhang, Q., Lin, S. and Nie, X., 2013. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 32, 496-500.
- Ztaliou, I., Tsakalidou, E., Tzanetakis, N. and Kalantzopoulou, G., 1996. *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Greek cheese. Taxonomic characterization and screening for enzyme activities. *Lait*, 76, 209-216.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'un Merkez ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Cudibey İlkokulunda, orta ve lise öğrenimini Trabzon Kanuni Anadolu Lisesinde tamamladı. 2007 yılında Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. Yüksek lisans eğitimini 2007-2010 yılları arasında Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde tamamladı. Yüksek lisans eğitimi sırasında Bayburt Tarım İl Müdürlüğü'nde başladığı Gıda Mühendisliği görevinden 2011 yılında ayrılarak Bayburt Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı.

Halen Bayburt Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.