

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPONTANE FERMENTE ET ÜRÜNLERİ: LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
MUHTEMEL STARTER KÜLTÜR OLARAK İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve Ece ARABACI

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

EYLÜL, 2017

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPONTANE FERMENTE ET ÜRÜNLERİ: LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN MUHTEMEL STARTER KÜLTÜR OLARAK
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Merve Ece ARABACI
(506151523)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek HEPERKAN

EYLÜL, 2017

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506151523 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Merve Ece ARABACI, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “SPONTANE FERMENTE ET ÜRÜNLERİ: LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN MUHTEMEL STARTER KÜLTÜR OLARAK İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Dilek HEPERKAN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Doç. Dr. Filiz ALTAY**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Meral BİRBİR
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : **6 Eylül 2017**
Savunma Tarihi : **8 Eylül 2017**





Çok değerli aileme,



ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan başta Sayın Prof. Dr. Dilek Heperkan olmak üzere Gıda Mühendisliği bölümündeki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Erasmus sürecim boyunca tüm çalışmalarımda bana yol gösteren, yardım eden ve tecrübelerini aktaran başta Prof. Fausto Gardini ve Prof. Diana di Gioai'ya, sonrasında PhD. Giulia Tabanelli, PhD. Ivana Nikodinoska ve Federica Barbieri'ye çok teşekkür ederim.

Hayatımı yönlendirirken her zaman yanımda hissettiğim ve beni her koşulda destekleyen çok sevgili annem ve babam Nilgün Arabacı ve Turgay Arabacı'ya ve tüm aileme çok teşekkür ederim.

Hiçbir zaman motivasyonunu ve neşesini kaybetmeyen, tüm lisans ve yüksek lisans hayatımda İtalya'da bile beni yalnız bırakmayan çok değerli arkadaşım Büşra Demircan'a desteği için çok teşekkür ederim.

Eylül 2017

Merve Ece Arabacı
(Gıda Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1 Fermente Sucuk.....	3
2.1.1 İçindekiler	4
2.1.1.1 Et ve yağ.....	4
2.1.1.2 Katkı maddeleri.....	5
2.1.1.3 Starter kültür.....	7
2.1.2 Sucuk üretimi	8
2.1.2.1 Hammadde seçimi, öğütme veya doğrama	8
2.1.2.3 Karıştırma ve doldurma.....	9
2.1.2.4 Fermantasyon	9
2.1.2.4 Hava ile kurutma veya dumanlama.....	10
2.1.3 Sucuk olgunlaşması esnasında sucuk mikroflorasındaki değişimler	11
2.1.4 Olgunlaşma sırasında sucuktaki biyokimyasal değişimler	12
2.1.4.1 Fermantasyon	13
2.1.4.2 Proteoliz	14
2.1.4.3 Amino asitlerin dönüşümü	15
2.1.4.4 Lipoliz	17
2.1.4.5 Lipid oksidasyonu	17
2.2 Bakterilerin Karakterizasyonu ve Tanımlanması	18
2.2.1 Fermente sucuktaki temel mikroorganizmalar.....	18
2.2.2 Fermente sucuk için starter kültürler	19
2.2.3 Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak teknolojik özellikleri ve gıda güvenliğine etkisi	24
2.2.4 <i>L.sakei</i>	27
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1 Spontane Fermente Sucukların Özelliklerinin Belirlenmesi	33
3.1.1 Örnekler	33
3.1.1.1 Bresciano tipi sucuk	33
3.1.1.2 Romagnolo tipi sucuk	34
3.1.2 Örneklerin su aktivitesi ve pH ölçümü	35

3.1.3 Mikrobiyal sayım ve kültür ortamı.....	36
3.1.4 Sucuklardaki biyogenik amin tayini.....	37
3.1.5 Sucuklarda organik asit içeriğinin belirlenmesi	39
3.1.6 Sucukların aroma profillerinin belirlenmesi	40
3.2 <i>Lactobacillus</i> Suşlarının Karakterizasyonu.....	40
3.2.1 <i>Lactobacillus</i> suşlarının izolasyonu ve tanımlanması.....	40
3.2.1.1 DNA ekstraksiyonu	41
3.2.1.2 RAPD parmak izi analizi.....	41
3.2.1.3 Gel Compar II kullanarak Kümeleşme.....	41
3.2.1.4 İzolatların moleküler tanımlanması.....	42
3.2.2 Suşların farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişme ve asidifikasyon karakteristiği.....	42
3.2.3 Suşların biyogenik amin üretme kabiliyeti.....	43
3.2.4 Suşların aromatik profili.....	44
3.2.5 Bresciano sucuğundan izole edilen <i>Lactobacillus</i> suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi.....	44
3.2.5.1 Spot test	44
3.2.5.2 Cell free supernatant test	45
3.3. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1. Spontane Fermente Sucukların Özellikleri.....	47
4.1.1 Sucukların aroma profili.....	51
4.2 <i>Lactobacillus</i> Suşlarının Karakterizasyonu.....	53
4.2.1 <i>Lactobacillus</i> suşlarının izolasyonu ve tanımlanması	53
4.2.2 Suşların farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişme ve asidifikasyon karakteristiği.....	53
4.2.3 Sucuklardan izole edilen suşların biyogenik amin üretme kabiliyeti.....	63
4.2.4. Sucuklardan izole edilen suşların aroma profili	64
4.2.5 Bresciano sucuğundan izole edilen <i>Lactobacillus</i> suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi.....	69
4.2.5.1 Spot agar test	69
4.2.5.2 Cell free supernatant test	70
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR.....	77
EKLER.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	93

KISALTMALAR

BHI	: Brain Heart Infusion
CNC	: Coagulase Negative Cocci
CFU	: Colony Forming Unit
DFD	: Dark Firm Dry
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	: Etil Bromür
GC	: Gas Chromatography
GRAS	: Generally Recognized As Safe
HPLC	: High Pressure Liquid Chromatography
L.	: <i>Lactobacillus</i>
P.	: <i>Pediococcus</i>
S.	: <i>Streptococcus</i>
MRS	: De Man Rogosa Sharpe besiyeri
M-MRS	: Modifiye-De-Man Rogosa Sharpe
MS	: Mass Spectrometry
PCR	: Polymerase Chain Reaction
ppm	: Parts per million
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA
rpm	: Revolution per minute
PSE	: Pale Soft Exudative
RH	: Relative Humidity
SPME	: Solid-Phase Microextraction
TCA	: Trikarboksilik asit
UPGM	: Unweighted Pair Group Method
UV-VIS	: Ultraviolet-visible



SEMBOLLER

μ	: Mikro
v	: Hacim
w	: Ağırlık
L	: Litre
eq	: Eş değer
ppm	: Parts per million
RPM	: Revolutions per minute
g	: Gram
mg	: Miligram
Ø	: Çap



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Et fermantasyonunda kullanılan ticari bakteri türlerinin özellikleri.....	21
Çizelge 3.1 : MRS Broth içeriği.	36
Çizelge 3.2 : Baird Parker Agar Base içeriği.	37
Çizelge 3.3 : Slanetz and Bartley Medium içeriği.	37
Çizelge 3.4 : HPLC analizi sırasında kullanılan konsantrasyon gradyanları.	39
Çizelge 4.1 : Üretimden hemen sonra Bresciano tipi sucuğun (örnek B) ve Romagnolo tipi sucuğun (örnek R) özellikleri..	47
Çizelge 4.2 : Mikrobiyolojik sayımlar, kimyasal-fiziksel özellikler ve organik asit ve biyojenik amin içeriği.	49
Çizelge 4.3 : Spontan fermente edilmiş sucuklardaki aroma bileşikleri, SPME-GC-MS tekniği ile tespit edilmiştir. Parantez içinde standart sapma rapor edilmiştir. ANOVA anlamlı olduğunda ($p < 0.05$) yıldız bildirilmiştir.	52
Çizelge 4.4 : 24 saatlik inkübasyon sonunda Bresciano suşundan izole edilen suşların MRS brotundaki pH değişimlerinin ortalaması ve standart sapmaları.	55
Çizelge 4.5 : 24 saatlik inkübasyon sonunda Bresciano suşundan izole edilen suşların MRS agarda sayımı. Değerler log CFU/g olarak verilmiştir.	56
Çizelge 4.6 : 24 saatlik inkübasyon sonunda Romagnolo suşundan izole edilen suşların MRS brotundaki pH değişimlerinin ortalaması ve standart sapmaları.	58
Çizelge 4.7 : 24 saatlik inkübasyon sonunda Romagnolo suşundan izole edilen suşların MRS agarda sayımı. Değerler log CFU/g olarak verilmiştir.	60
Çizelge 4.8 : Farklı koşullarda suşların spot agar test ile indikatör mikroorganizmalara karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.	70
Çizelge 4.9 : mMRS broth kullanılarak farklı koşullarda inkübe edilmiş suşların <i>L.monocytogenes</i> ve <i>L.innocua</i> mikroorganizmalarına karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.....	73
Çizelge 4.10: MRS broth kullanılarak farklı koşullarda inkübe edilmiş suşların <i>L.monocytogenes</i> ve <i>L.innocua</i> mikroorganizmalarına karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.....	73



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : İtalyan sucuk örnekleri sol baştan Ungherese, Milano, Toscano, Genovese, Cacciatore, Napoli.	4
Şekil 2.2 : Kürleme renginin gelişim mekanizması.	6
Şekil 2.3 : Öğütme/doğrama aşaması.	9
Şekil 2.4 : Kurutma aşaması.	11
Şekil 2.5 : Olgunlaşma esnasındaki biyokimyasal reaksiyonlar ve enzimler.	13
Şekil 2.6 : Önemli proteoliz adımları	15
Şekil 2.7 : Lösin'in aroma bileşiklerine dönüştürülmesi.	16
Şekil 2.8 : 30°C'de gelişen <i>L. sakei</i> 23K suşunun görünümü	27
Şekil 2.9 : <i>L.sakei</i> 'deki glikoz ve riboz fermentasyonu için metabolik yolların genel görünüşü.	29
Şekil 3.1 : Bresciano tip sucuk.	33
Şekil 3.2 : Bresciano tipi sucuk üretim aşamaları.	34
Şekil 3.3 : Romagnolo tip sucuk.	35
Şekil 3.4 : Romagnolo tipi sucuk üretim aşamaları.	35
Şekil 4.1 : Bresciano ve Romagnolo sucuklarından izole edilen suşlar arasında seçilen sekanslanmış suşlar.	54
Şekil 4.2 : Farklı tuz konsantrasyonlarında Brescianodan izole edilen suşların MRS brothdaki pH değişimleri.	55
Şekil 4.3 : Brescianodan izole edilen <i>Lactobacillus</i> suşlarının farklı 24 saat sonunda % NaCl gelişimleri.	57
Şekil 4.4 : Farklı tuz konsantrasyonlarında Romagnolodan izole edilen suşların pH değişimleri.	59
Şekil 4.5 : Romagnolo'dan izole edilen <i>Lactobacillus</i> suşlarının farklı % NaCl gelişimleri.	61
Şekil 4.6 : Bover-Cid agar ve Bover-Cid brothta C26 suşunun putresin ürettiğini gösteren mor renkli kültür ortamları.	64
Şekil 4.7 : Bresciano sucuğundan izole edilen suşların aroma profili.	66
Şekil 4.8 : Romagnolo sucuğundan izole edilen suşların uçucu organik bileşiklere yanıtları.	67
Şekil 4.9 : İndikatör mikroorganizmaların başlangıçtaki inokulum seviyeleri ve E7B suşunun spot agar test sonucu gösterdiği antimikrobiyal aktivite.	71
Şekil 4.10 : 30°C 18 saat inkübe edilmiş C3B suşunun <i>Listeria monocytogenes</i> 'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.	72
Şekil 4.11 : mMRS brothun <i>L. innocua</i> 'ya karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.	72



SPONTANE FERMENTE ET ÜRÜNLERİ: LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN MUHTEMEL STARTER KÜLTÜR OLARAK İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Günümüzde fermente et ve et ürün üreticileri için etin muhafazasından daha çok tüketicilerin damak zevkine hitap eden ürün üretmek daha önemli bir hal almıştır. Etin fermentasyonu, dayanıklı ve güvenilir son ürün oluşumuyla sonuçlanan eski bir gıda koruma yöntemidir. Ayrıca fermentasyon süresince birçok kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyolojik değişiklik meydana gelmekte ve sonuç olarak ürünün karakteristik tat, koku ve renk gelişimi gerçekleşmektedir. Proses standardizasyonuna ve kalite güvence stratejilerine duyulan ihtiyaç, starter kültürlerin kullanımını arttırdı ve böylelikle fermentasyon süreci için doğal flora ya veya daha önceden fermente edilmiş üründen izole edilerek yapılan inokülasyona güvenme ihtiyacını ortadan kaldırdı.

Fermente sucuk mikroflorası üzerine yapılan araştırmalar sucuk fermentasyonu ve olgunlaşmasında teknolojik açıdan önemli iki ana laktik asit bakteri cinsi olduğunu ortaya koymuştur bunlar *Lactobacillus* ve *Micrococcaceae* tarafından temsil edilen koagülaz negatif koklardır. Tanımlanan en yaygın starter kültür olan laktik asit bakteri türleri *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* ve *Lactobacillus sakei*'nin egemen olduğu *Lactobacillus plantarum* karışımıdır.

Geleneksel kökenlerine rağmen, İtalyan fermente sucuk üretim süreçleri, gelişmiş teknolojik standartlara adapte olmuş ve işlenmiş et algısına uygun hale getirilmiştir. Günümüzde, kullanılan starter kültür ve olgunlaşma sırasındaki sıcaklık, nem koşulları genellikle çoğu italyan endüstriyel fermente et ürününde aynıdır. Olgunlaşma mikrobiyotası önemli bir etki gösterse de koşulların ve starter kültürlerin sınırlı olması farklı ürünlerde aynılığa yol açmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmanın amaçları şöyle sıralanabilir: farklı bölgelerde starter kültür kullanılmadan üretilen iki geleneksel İtalyan sucuğunun mikrobiyal, fizyolojik ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesi, izole edilen suşların starter kültür olarak kullanılabilmesi için sağlaması gereken koşulların (biyojenik amin oluşturmama, farklı koşullara karşı direnç, patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite vb.) test edilerek geleneksel duyu sal özellikleri koruyarak güvenilir son ürün oluşumunda kullanılabilecek en uygun suşun starter kültür olarak seçilmesi.

Bu çalışmada iki farklı bölgede üretilmiş endüstriyel olmayan ve starter kültür kullanılmadan spontane fermente edilmiş sucuklar (Bresciano ve Romagnolo) ve bu sucuklardan izole edilmiş büyük çoğunluğu *L.sakei* olan 23 suş kullanılmış ve iki kısımda yürütülmüştür. İlk kısımda sucukların mikrobiyal florası, su aktivitesi, pH'ı, biyojenik amin miktarı ve aroma profili incelenmiştir. İkinci kısımda ise suşların izolasyonu ve tanımlanması, farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişim ve asidifikasyon eğilimleri, organik asit, biyojenik amin üretimleri, aroma profilleri ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

Romagnolo'da (0.853) su aktivitesi özellikle düşük, Bresciano'da ise (0.908) daha yüksek olduğu görülmüştür. İki sucuğun laktik asit konsantrasyonu benzerdir, asetik asit konsantrasyonuna bakıldığında ise Romagnolo daha yüksek bir asetik asit konsantrasyonu (0.37 g/kg) göstermiştir; Bresciano da ise bu asitin daha düşük bir konsantrasyonda olduğu görülmüştür (0.08 g/kg). Mikrobiyolojik parametrelere bakıldığında ise Bresciano'da yüksek konsantrasyonda laktik asit bakterileri (9.09 log CFU/g); Romagnola da ise aynı bakterilerin daha düşük bir konsantrasyonda olduğu görülmüştür (7.79 log CFU/g). Genel olarak, Bresciano'daki tüm aminlerin değerleri Romagnolo'dan biraz daha yüksek olduğu tespit edilmiştir, ancak yine de tehlikeli düzeyde değildir. İki sucukta da histamine rastlanmamıştır. Bresciano'da en önemli aroma bileşiği, aromatik aminoasitlerin metabolizmasından gelen benzeasetaldehitir. Romagnolo'da ise en temsili bileşikler benzenasetaldehit ve etanoldür. Bresciano'dan farklı olarak, bu sucukta yüksek miktarda ester bulunmuştur. Romagnolo sucuğundan izole edilmiş 100 izolatın kümeleme analizinden sonra 16 *Lactobacillus sakei* ve 4 *Lactobacillus curvatus* olan 20 suş seçilmiştir. Bresciano sucuğundan izole edilen 50 izolatın kümeleme analizinden sonra, 9 *Lactobacillus sakei* ve 2 *Lactobacillus curvatus* olan 11 suş seçilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda tüm suşların %0, %2, % 4, %6 NaCl içeren MRS broth ile karşılaştırıldığında ortamı asitlendirdiği görülmektedir. E3B, E7B, E8G ve E18G dışındaki tüm suşların artan tuz konsantrasyonu ile ters orantılı olarak asidifikasyon aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir. Romagnolo sucuğundan izole edilen, *Lactobacillus curvatus* olarak tanımlanan C26G suşunun ornitini dekarboksilatlamasıyla putresin birikimine neden olduğu görülmüştür. Kullanılan suşların uçucu bileşik profiline bakıldığında suşlar arasında değişkenlik görülmüştür. PCA analizi sonucunda, Romagnolo izolatlarının büyük bölümü, üç suştan (E1G, E26G, E28G) ayrı olarak, Bresciano izolatlarından ayrı gruplandırılmıştır. Bresciano sucuğundan izole edilen tüm suşlar spot agar test sonucunda *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *Salmonella enterica ssp. Typhimurium* ve *E.coli* indikatör mikroorganizmalarına inhibe etki göstermiştir, plakalardaki berrak bölge 0.75-1.4 cm arasındadır. Cell free süpernatant (CFS) test sonucunda ise mMRS broth kullanımının uygun olmadığı, MRS broth içinse 25°C 18 saatlik inkübasyon koşullarının seçilebileceği görülmüştür. Bu ön çalışma, Bresciano ve Romagnolo sucuk arasındaki mikrobiyolojik, fizyolojik parametreler ve aromatik profilleri ile izolatlarının büyüme davranışı, asitleşme profili, aromatik profilleri, patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite açısından farklılıklarına ilişkin bazı yönleri açıklığa kavuşturmuştur. Ve ayrıca bu çalışma sayesinde, starter kültür olarak istenilen teknolojik özelliklere sahip olmayan pek çok suş elimine edilmiştir. Suşların aromatik profili ve antimikrobiyal aktivitesini daha iyi anlayabilmek için gerçek sistemlerde ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

SPONTANEOUSLY FERMENTED MEATS: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA AS POSSIBLE STARTER CULTURES

SUMMARY

Nowadays, fermented meat producers are interested much more consumer perception than meat preservation. Fermentation of meats is an ancient and excellent preservation technique which results in stable and safe end products. In addition, as a result of many chemical, biochemical reactions involving proteins, carbohydrates, and lipids and microbiological changes occur during fermentation characteristic taste, odor, aroma, texture and color developments of the product occur. These phenomena are due to both endogenous and microbial enzymes, the contribution of which depend mainly on the type of process. The need for process standardization and quality assurance strategies has increased the use of starter cultures and thus overcoming the need to rely on the “in - house” flora or “back-sloping” for the fermentation process.

Studies on the ecology of fermented sausages showed that lactic acid bacteria, mainly *Lactobacillus* and coagulase-negative cocci represented by *Micrococcaceae*, are the two main bacterial groups technologically important in the fermentation and ripening of sausage. The most common lactic acid bacteria species identified are *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, and *Lactobacillus plantarum*, with *L. Sakei* prevailing. Among coagulase-negative cocci, *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* are the most common species identified from traditional products. Pediococci and enterococci have also been often identified from fermented sausages. Fast acidification and lower pH values can be ensured by *Pediococcus* in semidry sausages in which they grow and metabolize carbohydrates at higher temperatures, while *Lactobacillus* are mostly used in dry sausage production.

Despite their traditional origins, Italian fermented sausage production processes have been adapted to advanced technological standards and adapted to processed meat sensation. Today, using of starter culture and temperature and humidity conditions during ripening are generally the same in most fermented italian meat products. This could determine a standardisation of the traditional features of the different products, even if the wild ripening microbiota continues to play a crucial role in flavor formation in many products.

In this respect, the aims of this study are as follows: the characterization of the microbiological, physiological and characteristic properties of two different traditional Italian sausage (salami) produced in different regions without the use of starter cultures and identification and characterization of isolated strains in order to select the most suitable strain that preserves typical sensory quality and provide safe and standardized products as a starter culture. Strains used as starter cultures must be “generally regarded as safe” (GRAS) because they are considered to be food additives. Laws regulating the market of starter cultures may vary depending on the country but, overall, there are some requirements for the starter cultures; they must be neither pathogenic, toxic, nor allergenic.

They must to have phenotypical and genotypical stability. They have to be competitive in the typical conditions of the process (tolerance to salt, nitrite, low pH and water activity, considerable growth at manufacturing temperatures, etc.). Provide some technological benefits; for instance, on acidification, preservation, flavor formation, quality assurance, etc. They have to resist phage infection. They have to be identifiable by specific methods.

For this study, two different types of italian sausage (Bresciano and Romagnolo) which are non-industrial and produce without starter culture and 23 isolated strains which are mostly *L.sakei* are used. This study has been carried out in two parts. In the first part the microbial flora, water activity, pH, biogenic amine content and aromatic profile of sausages were examined. In the second part, antimicrobial activity, growth and acidification tendencies at different salt concentrations, production of organic acid and biogenic amine and aromatic profile of isolated strains were investigated.

The water activity is particularly low in salame Romagnolo (0.853), while in salame Bresciano is higher (0.908). the concentration of lactic acid of the two sausage is similar, while in the sample R there is a higher concentration of acetic acid (0.37 g/kg) differently from sample B, in which there is a lower concentration of this acid (0.08 g/kg). The microbiological parameters showed a high concentration of lactic acid bacteria (9.09 log CFU/g) in salame Bresciano, while a lower concentration of the same bacteria characterized the salame Romagnolo. In general, the values of all amines in salame Bresciano were slightly higher than salame Romagnolo, but still not dangerous. In particular, in salami Brasciano (sample B), the most important aroma compound is benzeacetaldehyde, which derives from the metabolism of aromatic aminoacids. Also in salame romagnolo, the most representative compound was benzeneacetaldehyde, followed by ethanol. Differently from salame bresciano, in this sausage a remarkable amount of esters was found.

After clustering analysis from 50 isolated from Bresciano sausage, subsequently 11 strains were sequenced that are 9 *Lactobacillus sakei* and 2 *Lactobacillus curvatus*. After clustering analysis from 100 isolated from Romagnolo sausage, subsequently 20 strains were sequenced that are 16 *Lactobacillus sakei* and 4 *Lactobacillus curvatus*. After 24 hours of incubation, all strains acidify the medium compared to MRS broth containing 0%, 2%, 4%, 6% NaCl. It was observed that all strains except E3B, E7B, E8G and E18G showed acidification activity in inverse proportion with increasing salt concentration. No of the isolates presented ability to accumulate biogenic amine with the exception of the strain C26G, identified as *Lactobacillus curvatus*, isolated from Romagnolo sausage. It confirmed its capacity to accumulate great amount of putrescine that is came from decarboxylation of ornitidin.

Variability was observed among the volatile compound profile of all strains. Given the complexity of this medium in which any aroma compounds are already present, this screening took into consideration the differences between the concentration of each compounds and the (eventual) concentration of the same compound in the not-inoculated medium. As it is possible to observe seven of the main compounds detected are common with the isolates from Bresciano and Romagnolo. They are the namely 2,3-butanedione, 3-hydroxy-2-butanone (acetone), 2-methyl-butanal, 3-methyl-butanal, acetic acid, benzaldehyde, benzenacetaldehyde and 3-methyl-1-butanol. The PCA was able to group separately the isolates of salami bresciano, by contrast the major part of the isolates from the salami romagnolo were grouped, well separated from three strains (E26G, E1G, E28G). All strains isolated from the Bresciano strain were examined spot agar test against *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Salmonella enterica* ssp. *Typhimurium* and *E. coli* and all strains has antimicrobial resistance against indicator microorganisms with the clear zone between 0.75 and 1.4 cm. Cell-free supernatant test results showed that the use of mMRS broth was not suitable and that for MRS broth, incubation conditions of 25 ° C for 18 hours could be selected. This preliminary study has clarified some aspects regarding the differences between Bresciano and Romagnolo sausage with respect to their microbiological, physiological parameters and aromatic profile and also their isolates with respect to their growth behaviour, acidification profile, aromatic profile, antimicrobial activity against pathogens. And also owing to this study, we could eliminate a lot of strains which have not good technological properties as a starter culture. Further investigations are also needed to better elucidate aromatic profile and antimicrobial activity of strains in real systems. Antibiotic resistance of these strains should be tested.



1. GİRİŞ

Et besleyici fakat kolay bozulabilen bir gıda ürünüdür. Üretim ve saklama sırasında, kaçınılmaz mikrobiyal kontaminasyonlara maruz kalmakta ve bu kontaminasyonlar gıdada bozulmaya neden olan organizmaları ve patojenleri içermektedir. Bu nedenle gıda üreticileri kontaminasyonları önlemek adına geçmişten günümüze vakum paketlenme, kimyasal koruyucular, soğutma ve daha geleneksel olarak fermentasyon, tuzlama ve tütsüleme gibi yöntemleri kullanmışlardır (Chaillou, 2005). Bununla birlikte, son yıllarda tüketicinin işlenmiş gıda kullanıma olan yönelimindeki azalma nedeniyle daha doğal üretim yöntemleri araştırılmaya başlanmıştır. Et ürünlerinin geliştirilmesi için farklı stratejiler önerilmiştir. Bunlar sodyum, nitrit, nitrat tuzları, yağ ve kolesterol içeriğinin azaltılması ve starter kültür kullanımıdır (Fernandez-Gines ve diğ, 2005).

Etin fermentasyonu, dayanıklı ve güvenli son ürün oluşumuyla sonuçlanan eski bir koruma yöntemidir. Avrupa fermente et üretimi ve tüketimi açısından önemli bir bölgedir. Özellikle fermente sucuk, Romalılar zamanında Akdeniz bölgesinde yapılmaya başlanmış, hammadde (yağsız et ve yağ), bileşen (tuz konsantrasyonu, nitrat/nitrit, baharatlar ve otlar ve katkı maddeleri), boyut (çap ve ağırlık), sıcaklık ve bağıl nem (RH) gibi olgunlaşma koşulları, kullanılan küf ve/veya duman kullanımı, olgunlaşma süresi gibi büyük farklılıklara sahip homojen olmayan bir üründür (Montanari ve diğ, 2016). Özellikle İtalya’da uygulanan eski ve geleneksel yöntemler bir bölgeden diğer bölgeye değişebildiği için fermente et ürünlerinin çeşitliliği ve farklılığı çok fazladır. Geleneksel kökenlerine rağmen, İtalyan fermente sucuk üretim süreçleri, gelişmiş teknolojik standartlarına adapte olmuş ve işlenmiş et algısına uygun hale getirilmiştir. Günümüzde, kullanılan starter kültür ve olgunlaşma sırasındaki sıcaklık ve nem koşulları genellikle çoğu endüstriyel fermente İtalyan et ürününde aynıdır. Olgunlaşma mikrobiyotası önemli bir etki gösterse de koşulların ve starter kültürlerin sınırlı olması farklı ürünlerde aynılığa yol açmıştır (Tabanelli ve diğ, 2016). Bu sebeple geleneksel duyu özellikleri koruyarak güvenilir son ürün oluşumunda kullanılabilecek yeni starter kültür arayışına başlanmıştır (Leroy ve De Vuyst, 2004).

Bu doğrultu da bu çalışmanın amaçları şöyle sıralanabilir: farklı bölgelerde starter kültür kullanılmadan üretilen iki farklı geleneksel İtalyan sucuğunun mikrobiyal, fizyolojik ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesi, izole edilen suşların starter kültür olarak kullanılabilmesi için sağlaması gereken koşulların (biyogenik amin oluşturmama, farklı koşullara karşı direnç, patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite vb.) test edilerek geleneksel duyusal özellikleri koruyarak güvenilir son ürün oluşumunda kullanılabilecek en uygun suşun starter kültür olarak seçilmesi.

Bu alışma iki farklı bölgede üretilmiş endüstriyel olmayan ve starter kültür kullanılmadan fermente olmuş sucuklar (Bresciano ve Romagnolo) ve onlardan izole edilmiş suşlar kullanılmıştır. Sucukların mikrobiyal florası, su aktivitesi, pH'ı, biyogenik amin miktarı ve aroma profili incelenmiştir. Suşların ise antimikrobiyal aktiviteleri, farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişim ve asidifikasyon eğilimleri, organik asit, biyogenik amin üretimleri ve aroma profilleri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 Fermente Sucuk

Fermentasyon ve kurutma ham madde korumanın en eski yöntemleridir. Fermente et ürünlerinin tarihsel kökeni bilinmemekle birlikte, kısmi bibliyografik araştırmalar Çin'de 2500 yıl öncesine dayandığını göstermektedir. Koruyucu etki ve lezzetlilik öğütülmüş et, nitrat bulaşmış tuz, baharatlar veya bitkilerle karıştırılıp hayvan bağırsağına doldurulup kurutulduktan sonra meydana gelmiştir. Sucuk üretiminin kanıtı ilk olarak iklim koşullarının da uygun olduğu Eski Yunan'da belgelenmiştir (Adams, 2010). Romalılar bu geleneği miras almış ve bundan sonra fermente sucuklar Orta, Doğu ve Kuzey Avrupa ülkelerinin yanı sıra Amerika ve Avustralya'ya yayılmıştır (Fadda ve Vignolo, 2007). Fermente sucuklar tüm dünyada yaygın olarak üretilmesine rağmen, Avrupa bu et ürünlerinin başlıca üreticisi ve tüketicisidir; üretim ve kişi başı tüketim rakamları sırasıyla Almanya, İtalya, İspanya ve Fransa'da en yüksek seviyededir (Di Cagno ve diğ, 2008).

Fermente sucukların resmi sınıflandırması ülkeden ülkeye değişir: nem içeriği, protein içeriği, nem/protein oranı, ağırlık kaybı vb. temel alınabilir. Raf ömrünü uzatmak amacıyla sucuklar genellikle starter kültürler tarafından fermentasyona tabi tutulur. Dolayısıyla sucuk üretimi esas olarak *Lactobacillus* spp. (*L.sake*, *L.plantarum*, *L.curvatus*) ve *Pediococcus* spp. (*P. pentosaceus*, *P. acidilacti*) gibi laktik asit bakterilerinin fermentasyonuna dayanır (Olaoye, 2010). Mikrobiyolojik olarak baktığımızda fermente sucuklar su aktivitesine ve uygulanan yüzey işlemine göre sınıflandırılabilir. Sınıflandırma için ilave kriterler arasında, kılıf çapı, katkı maddelerinin parçalanma derecesi, ham materyali elde etmek için kullanılan hayvan, kullanılan yağ ve dokusunun çeşidi, baharat, çeşni ve kullanılan etten başka bileşenler de bulunur. Ve Şekil 2.1'de görebileceğiniz gibi bu farklılıklar farklı çeşit sucukların üretilmesini sağlar (Tabanelli ve diğ, 2016). 'Sucuk olgunlaştırma' terimi, kılıflara doldurma işlemi ile ürünün satışa hazır olma zamanı arasında oluşan değişiklikleri tanımlamak için kullanılır ve 'fermentasyon' (laktik asit oluşumu ve eşlik eden

süreçler) ve 'yaşlandırma' (kurutma, aroma oluşumu vb.) olmak üzere ikiye ayrılır (Lücke, 1998).



Şekil 2.1 : İtalyan sucuk örnekleri sol baştan Ungherese, Milano, Toscano, Genovese, Cacciatore, Napoli.

2.1.1 İçindekiler

Fermente sucuk ağırlıklı olarak dana ve domuz eti ile coğrafyaya göre kanatlı, koyun, kuzu, keçi, at, devekuşu gibi hayvanların etleri, dana veya domuz yağı, tuz, kürlleme ajanları, şeker, baharatlar ve birçok durumda starter kültürlerin eklenip karıştırılmasıyla yapılan bir et ürünüdür (Vural ve Özvural, 2007).

2.1.1.1 Et ve yağ

Sucuk üretiminde et seçerken daha yüksek myoglobin içeriği sayesinde kararlı renk oluşumuna neden olan iyi beslenen yetişkin hayvanlar tercih edilir. Ayrıca et seçimi tüketicilerin yeme alışkanlıklarına, geleneklere ve hayvan türlerinin bulunabilirliğine bağlı olmakla beraber Akdeniz ülkelerinde genellikle domuz eti kullanılmaktadır; sığır bulunabilirliği ve dini sebeplerle sığır ve kuzu eti de yaygın olarak kullanılmaktadır (Vural ve Özvural, 2007). Etin bağlanması, pH ve kompozisyonu işlevsel özellikler açısından çok önemlidir. Et ve yağ kompozisyonu hayvan türüne ve etin alındığı anatomik bölgesine bağlıdır. Yağ yüzdesi genelde %10-40 arasında değişmekte olup, randısiteyi ve yağ salımını önlemek amacıyla çoklu doymamış yağ asiti içeriği az, yüksek erime noktasına sahip sıkı, beyaz ve taze yağ kullanılmalıdır. Kuru sucukların uzun raf ömrüne sahip olabilmesi için çoklu doymamış yağ asitlerinin toplam yağ asitleri içinde oranı %12'den fazla olmamalıdır (Vignolo ve diğ, 2010). Uzun süreli

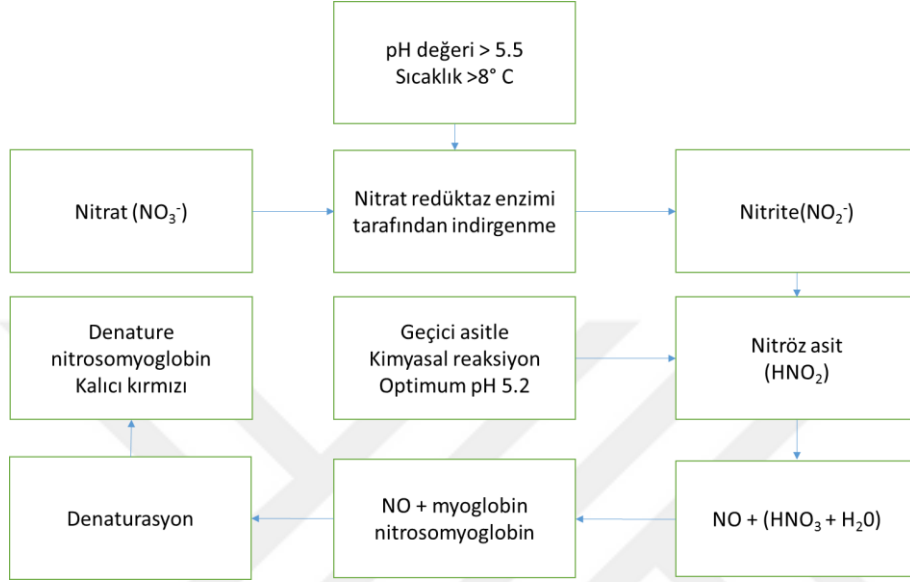
donma sıcaklıklarında saklamadan kaçınma ve kesimden sonra hızlı dondurma gibi önlemlerle yağ dokusundaki peroksit içeriği minimum tutulmalıdır. Kural olarak, pH değeri 5.9'dan yüksek et, düşük laktat ve şeker içerir; su tutma kapasiteleri yüksek olduğundan olgunlaşma ve kurutma aşamalarında sorun yaratır ve muhtemel kontaminasyonlar ortaya çıkar (Lücke, 2000). Minimum mikrobiyal yüke sahip et seçilmesi, gıda güvenliği, istenmeyen lezzet ve doku oluşumunun önlenmesinde önemli bir faktördür. Sığır eti için en uygun pH aralığı 5.4-5.5, domuz eti hızlı asitlendiği için pH 5.7-5.8'dir. pH'ı 6.2'den yüksek PSE (soluk, yumuşak ve sulu) domuz eti ve DFD (kuru, sıkı ve koyu) sığır eti kullanımdan sakınılmalıdır. Endüstride et/yağ oranı genelde 2:1 olmakla beraber geleneksel sucuklarda bu oran değişebilir (Demeyer, 2004).

2.1.1.2 Katkı maddeleri

Sucuğa tuz eklemek (ağırlıkça %2.5 ila 3.0) su aktivitesini düşürdüğü, lezzet ve mikrobiyal flora seçimine katkı sağladığı için önemli bir işlemdir. Mikrofloraya etkisi dışında NaCl miyofibriler yapıyla etkileşime geçerek et parçalarının etrafında yapışkan film oluşturan proteinleri çözer (Lücke, 2000).

Potasyum nitrat ve nitrit sucuk hamuruna eklenen yaygın kürlenme ajanlarındandır. Nitrat orijinal kürlenme ajanı olarak kullanılıyordu ve başlangıçta ete bilinmeden tuzla karışık bir şekilde eklenmiştir ancak nitrat çok kararlı bir yapıya sahiptir (Marco ve diğ., 2006). Nitrat nitrat-indirgeyen bakteriler (Micrococci ve Staplycocci) tarafından nitrite dönüştürülür. Şekil 2.2'de gösterildiği üzere, etin içine katılan veya nitratın indirgenmesiyle açığa çıkan nitrit pH 5.4-5.5 aralığında kimyasal indirgenmeyle azot oksite dönüşür, et miyoglobinlerine bağlanarak fermente sucuğa tipik kürlenmiş kırmızı et rengini veren ısıya dayanıklı NO-miyoglobin formunu oluşturur (Honikel, 2008). Nitrat, nitritin kaynağı olarak sadece direkt olmayan etkilere sahiptir. Nitrat kullanımı nitrite dönüşümü sırasındaki belirsizlik nedeniyle düşürülmüştür. Nitrit kürlenme renginin oluşumu, istenilen gram-pozitif bakterilerine destek, lipid ransiditesini önleme, *Salmonella* ve *Clostridium* spp. özellikle *Clostridium botulinum* gelişimini inhibe etme gibi bir çok etkiye sahiptir (Davidson, 1997). Günümüzde nitritin teknolojik ve güvenlik işlevleri dışında nitrosaminlerin oluşumundaki rolü konusunda büyük bir endişe vardır. Nitrat ve nitrit kullanımının faydalarını ve risklerini dengelemek adına Avrupa komisyonu yönetmeliği maksimum limitleri belirtmiştir (EU Regulation no.1129/2011). Bu limitler kuru sucuklar için 150 mg/kg

nitrat/nitrit veya uzun olgunlaşma süresi olan sucuklar içinse eğer nitrit eklenmediyse 250mg/kg'dır. Bununla birlikte, daha az katkı maddesi ile daha sağlıklı ürünlere yönelik tüketici talepleri ve bazı AB üyesi ülkelerin kısıtlayıcı düzenlemelerini sürdürmeleri talebi ile birlikte, mevcut nitrat ve nitrit düzeylerinin gelecekte revize edilmesine neden olabilir (Hospital ve diğ, 2016).



Şekil 2.2 : Kürleme renginin gelişim mekanizması (Feiner G., 2009 uyarlanmıştır).

Sucukta sodyum askorbatın kullanımı çok yaygın olmakla beraber, amaç ete kırmızı rengini veren pigmentin stabilitesinin geliştirilmesi ve lipid oksidasyonun önlemesidir (Balev ve diğ, 2005). Sodyum askorbat ilave madde olarak kullanıldığında nitroz asitin nitrik oksite indirgenmesini ve düşük seviyede kalıntı kalmasını sağlayarak nitrosaminleri önlemeye katkı sağlar (Berardo ve diğ, 2016).

Fermente edilebilir karbonhidratlar, sucuk karışımına ilave edilen diğer gıda bileşenidir. Eklenen karbonhidratın çeşitliliği ve miktarı laktik asit oluşum oranını, derecesini ve sucuk mikroflorasını belirlediği için önemlidir. Hızla metabolize olabilen karbonhidratların (örneğin glukoz) büyük miktarlarda eklenmesi durumunda, pH düşüşü çok hızlı olabileceğinden, laktik olmayan mikrofloranın istenen metabolik faaliyetleri bastırılır. Öte yandan, az miktarda karbonhidratın eklenmesi ve/veya yavaşça bozunan bir karbonhidratın (örneğin oligosakaritler) seçilmesi, fermentasyon sırasında özellikle yüksek olgunlaşma sıcaklıklarında istenmeyen organizmaların gelişimine neden olabilir (Lücke, 2016). Dekstroz, glikoz, sükroz ve laktozun yanısıra mısır şurubu ve farklı nişastalar da fermente sucuklara şeker olarak eklenmektedir (Rust, 2007). Fermente et ürünlerinde şekerlerin başlıca rolü laktik asit bakterilerinin

laktik asit üretmeleri için substrat olmalardır ve şeker türü pH düşüş hızını etkilemektedir. Dekstroz, glükoz, laktoz ve sükroz gibi disakkaritlerle karşılaştırdığında daha hızlı asidifikasyonu teşvik etmektedir (Demeyer, 2004). Çoğu Avrupa tarzı sucukta, yarı kuru füme sucuklerde, tatmin edici mikrobiyal stabilite ve sertlikte hızlı bir artış sağladığı için fermantasyon sonrası hedeflenen pH 4.8-5.0'dir. Bunu gerçekleştirmek için genelde %0.4-0.8 oranında hızlı fermente olabilen (glükoz gibi) karbonhidratlar eklenir. İtalyan sucuk üretiminde eğer fermantasyon sonrası hedef pH 5.3 ise ve eğer kürlenme için nitrit yerine nitrat kullanıldıysa düşük oranda (%0.2-0.3) karbonhidrat kullanımı önerilir (Hammer ve diğ., 2008).

Baharatlar çoğunlukla fermente sucukları birbirinden farklı kılan temel maddelerden biridir. Toz biber (%0.2-%0.3) genellikle her türlü sucukta, özellikle Akdeniz fermente sucuğunda bulunur; aynı zamanda yüksek oranda (%1-%3) kırmızı biber ve/veya sarımsak içerebilirler. Baharatlar ayrıca, manganaz temin ederek laktik asit bakterilerinin aktivitesini uyaran ve istenmeyen organizmaları önleyen etkin antioksidanlardır (Chi ve Wu, 2007).

Endüstriyel olarak üretilen fermente sucuklarda, kürlenmiş kırmızı pigment stabilitesini iyileştirmek için doğal (kokineal ve kırmızı biber özleri) ve yapay renklendiriciler gibi çeşitli diğer katkı maddeleri eklenebilir (Roncales, 2007). Fosfatlar koyulaştırıcı, nemlendirici ve jelleştirici ajanlar olarak işlev görmek üzere değişken miktarlarda (% 0,5 -% 3) sıklıkla kullanılır. Son derece lezzetli ürün talepleri olan tüketiciler için lezzet artırıcılar (glutamik ve guanil asitler) ve aroma maddeleri (protein hidrolizatları, otlar ve duman özleri) de kullanılır. Hızlı pH düşüşü için, laktik veya sitrik asit veya glukono-deltalakton gibi kimyasal asitleştiriciler kullanılabilir, ancak bu son üründe farklı lezzet elde edilmesine neden olur (Rust, 2007).

2.1.1.3 Starter kültür

Proses standardizasyonuna ve kalite güvence stratejilerine duyulan ihtiyaç, başlangıç kültürlerinin kullanılımları arttırdı ve böylelikle fermantasyon süreci için doğal floraya veya daha önceden fermente edilmiş üründen alınarak yapılan inokülasyona güvenme ihtiyacını ortadan kaldırdı. Fermente sucuk mikroflorası üzerine yapılan araştırmalar sucuk fermantasyonu ve olgunlaşmasında teknolojik açıdan önemli iki ana laktik asit bakteri cinsi olduğunu ortaya koymuştur bunlar *Lactobacillus* ve *Micrococcaceae* tarafından temsil edilen koagülaz negatif koklardır (CNC). Tanımlanan en yaygın

starter kültür olan *Lactobacillus* türleri *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* ve *L. sakei*'nin egemen olduğu *Lactobacillus plantarum*'dur (Urso ve diğ, 2006). CNC arasında *Staphylococcus xylosus* ve *Staphylococcus carnosum* geleneksel ürünlerden tanımlanan en yaygın türlerdir. *Pediococcus* ve *Enterococcus* da fermente sucuklarda sıklıkla tespit edilen bakterilerdir. *Pediococcus* spp. yarı kuru sucuklarda ki bunlar yüksek sıcaklıklarda karbonhidratın metabolize edilebildiği sucuklardır, hızlı asidifikasyon ve düşük ph sağlarken, *Lactobacillus* spp. genelde kuru sucuk üretimde kullanılır (Vignolo ve diğ, 2010; Incze, 2007). Fermantasyon için starter kültür seçimi ve özellikleri ikinci kısımda detaylı bir şekilde anlatılacaktır.

2.1.2 Sucuk üretimi

21. yüzyılda olmamıza rağmen sucuk üretimi antik zamanlardakinden çok farklı değildir. Temel olarak çekilmiş etin, tuz ve baharatla karıştırıldıktan sonra kılıflara doldurulup fermentasyon ve olgulaşmaya bırakılması olarak sucuk üretim aşamalarını özetleyebiliriz. Son üründen beklentiye göre sucuklar yüzey işlemlerine de tabi tutulabilir. 19. yüzyılın ikinci yarısındaki endüstriyel gelişme nedeniyle, sucuk üretimini kontrol edebilmek adına starter kültür kullanımına başlanmıştır. Ancak yine de bazı üreticiler, starter kültür kullanmadan geleneksel fermente sucuk üretmeye devam etmektedirler (Talon ve Leroy, 2014).

2.1.2.1 Hammadde seçimi, öğütme veya doğrama

Fermente sucuk üretiminde, çoğunlukla domuz eti ve sığır eti olan sağlıklı hayvanlardan elde edilen etler kullanılır. Kemikler çıkarılmalı, bağ dokusu zarları kesilmeli ve yumuşak kas-yağ dokusu ayrılmalıdır. Şekil 2.3'te görüldüğü gibi et ve yağ soğutulur veya dondurulur ve istenilen parçacık boyutuna kadar parçalanır. Et hamurunun ısınması, soğutulmuş et ve dondurulmuş yağ kullanılarak engellenir ve doğranma genellikle kuruma ve renk gelişimi ile oksijen girişimini önlemek için vakum altında gerçekleştirilir (Lachowicz ve diğ, 2012). Bıçakların nispi dönüş hızları et ve yağın istenilen partikül boyutuna göre, yağ dokusundaki hasarı ve meyilli sıcaklık artışını en aza indirmek için optimize edilmiştir. Hem yağsız kısmın hem de yağın rengi önemlidir; yağ için beyaz, yağsız kısım için kırmızı renk parçacık ayırımına izin verir. Genel olarak, öğütme ve doğrama ne kadar iyi olursa daha fazla protein ekstraksiyonu tamamlanır (Vignolo, 2010)



Şekil 2.3 : Öğütme/doğrama aşaması.

2.1.2.3 Karıştırma ve doldurma

Et ve yağ parçalandıktan sonra, kür tuzları (NaCl, nitrat/nitritler), katkı maddeleri (askorbik asit, renklendiriciler), diğer bileşenler (şekerler, baharatlar) ve starter kültürler et hamuruna ilave edilir ve çanak kıyıcıda iyice karıştırılır. Karıştırma işlemi eklenen maddelerin düzgün şekilde dağılması için yeterli sürede olmalıdır; aşırı karıştırmadan kaçınılmalıdır. İyice karıştırıldıktan sonra, et karışımı derhal doldurmalı veya soğukta tutulmalıdır, en iyi renk gelişimini sağlamak ve mikrobiyota stabilizasyonu sağlamak için uzun süreli hava ile temastan kaçınılmalıdır. İstenmeyen renk veya lezzet oluşumunu önlemek amacıyla et karışımının doğal veya sentetik kılıflara doldurulması vakum altında yapılır. Kılıf çapları değişkendir; küçük çaplar (35-40 mm) genellikle sürülebilir sucuklar için kullanılırken, dilimlenebilir sucuklar genellikle geniş çaplı olarak kılıflanır. Doğal kılıflar ve modifiye edilmiş kolajen ve/veya selülozdan yapılmış kılıflar en sık kullanılır. Seçilen kılıf, suyun buharlaşmasına ve dumanın nüfuz etmesine izin vermeli, kurutma sırasında sucukla beraber büzülmelidir. Kurutulmamış ürünler için sentetik kaplamalar daha çok tercih edilir (Cocolin ve Rantsiou, 2012).

2.1.2.4 Fermantasyon

Doldurulmuş sucuklar, üretilecek olan sucuk türüne bağlı olarak kontrollü sıcaklık, bağıl nem (RH) ve hava hızı koşulları altında olgunlaştırma odalarına yerleştirilir. Geleneksel fermantasyon sucukları için doğal ve daha az kontrollü koşullar uygulanır (Lebert ve diğ, 2007). Fermantasyon koşulları sıcaklık ve süre açısından değişir. Genel olarak, fermantasyon sıcaklığı ne kadar yüksek olursa, laktik asit üretimi o kadar hızlı olur. Alman ve İtalyan kuru fermante edilmiş sucukları için Avrupa'da fermantasyon 1-2 gün süreyle nispeten yüksek sıcaklıklarda (18-24°C) gerçekleştirilebilirken,

Yunan, Arjantin ve bazı İtalyan kuru sucukları için 7 gün süreyle fermentasyon gerçekleştirilir. Yaklaşık bir hafta boyunca daha düşük sıcaklıklarda (10-17°C) fermentasyon genellikle geleneksel Fransız, İspanyol, Portekiz kuru fermente sucuklarında kullanılır(Incze, 2007). Yarı kuru sucuklar için, özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde fermentasyon süresini kısaltmak için sıcaklık genellikle yavaş yavaş 35°C'nin üzerine çıkarılır. Bu ürünler kuru fermente sucuklardan daha kısa bir olgunlaşma süresine sahip olsa bile, eğer hiçbir ısı işlem uygulanmadıysa çiğ dilimlenebilen yarı kuru sucukların fermentasyonu daha uzun sürer (Puolanne, 2010). Fermentasyon sırasında, olgunlaşma odasındaki bağıl nem sucuğun bağıl neminden % 5-10 daha düşük olmalıdır (% 85-90 ve hava hızı yaklaşık 0.4 m/s) (Vignolo ve diğ, 2010).

2.1.2.4 Hava ile kurutma veya dumanlama

Fermentasyon aşamasından sonra, sucuklar Şekil 2.4'teki gibi havayla kurutulur veya dumanlanır. Kurutma, özellikle fermente edilmiş kuru sucuk üretimi için anahtar bir işlemdir. Proteinlerin belirgin yüzey koagülasyonunu önlemek ve böylece merkezden dışa doğru su difüzyonunun engellenmek için kurutma oranı mümkün olduğunda düşük olmalıdır (Andrés ve diğ, 2007). Kuruma kinetiği ve süresi, sıcaklık ve hava hızına bağlı olarak değişir. Bu parametreler fermentasyon aşamasında önemli olduğu kadar önemli olmasa da Fransız, İtalyan, İspanyol, Arjantin ve Yunan kurutulmuş fermente sucuklar için 4-12 hafta 10°-15°C arasında değişir. Yunanistan ve Doğu Avrupa'da üretilen kuru sucuklar için daha yüksek kuruma sıcaklıkları (16-18°C) bildirilmiş ve olgunlaşma daha kısa olmuştur. Fermentasyon sırasında bağıl nem, kuru fermente sucuklarda en az % 63-%75 ve maksimum % 86 -% 95'e kadar değişebilir ve kurutma sonunda geleneksel sucuklar değişken su aktivitesine sahip olurlar (Lebert ve diğ, 2007). Kurutma başlangıcında, bağıl nem %98 kadar yüksek olabilir, bu da küf ve mayaların yüzeyde belirgin bir kolonizasyonuna neden olur. İlk iki hafta boyunca mayaların yüzeydeki baskın organizmalar (%95) oldukları ve sonrasında küf ve mayaların eşit miktarlarda bulunukları yapılan araştırmada görülmüştür (Samelis ve Sofos, 2003). Kuru fermente sucukların yüzeyinde, aşırı kurumayı önlediği, oksidatif reaksiyonları koruduğu ve lezzet gelişimine katkıda bulunduğu için küf büyümesi arzu edilir. Sucukların yüzeyinde doğal olarak oluşan küfler arasından fungal starter kültürlerinin seçilmesi, ilk aşamalardaki küflerin kontrolünü mümkün kılarak starter varlığını baskın hale getirir (Spotti ve Berni, 2007). Orta ve Kuzey Avrupa ülkelerinde

dumanlama yaygın bir teknolojidir. Duman, spesifik tat ve renk bileşenleri oluşturma yanısıra antimikrobiyal ve antioksidan etkiye katkıda bulunur. Polisiklik hidrokarbonların üretimini en aza indirmek için odunun kontrollü bir şekilde yanması (300- 600°C) sağlanan dumanlama odaları sayesinde dumanlama teknolojisi önemli bir gelişme yaşamıştır (Rust, 2007).



Şekil 2.4 : Kurutma aşaması.

2.1.3 Sucuk olgunlaşması esnasında sucuk mikroflorasındaki değişimler

Çiğ sucuk karışımının mikroflorası çeşitlidir ve bileşimi ete uygulanan işlemlere, çevrede bulunan mikroorganizmalara ve üretim için kullanılan katkılara bağlı olarak değişir. Bununla birlikte, arzu edilen floranın (*Micrococcaceae* ve laktik asit bakterileri) geliştirilmesi, patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalarının (özellikle gram-negatif aerobik bakterilerin) gelişiminin önlenmesi için seçiciliği etkileyen birkaç faktör vardır. Bu seçici faktörler, düşük pH, su aktivitesinde azalma, sıcaklık, oksijen tükenmesi, metabolik ürünlerin birikimi ve katkı maddelerinin varlığıdır (tuz ve nitrit) (Toldra ve diğ, 2001).

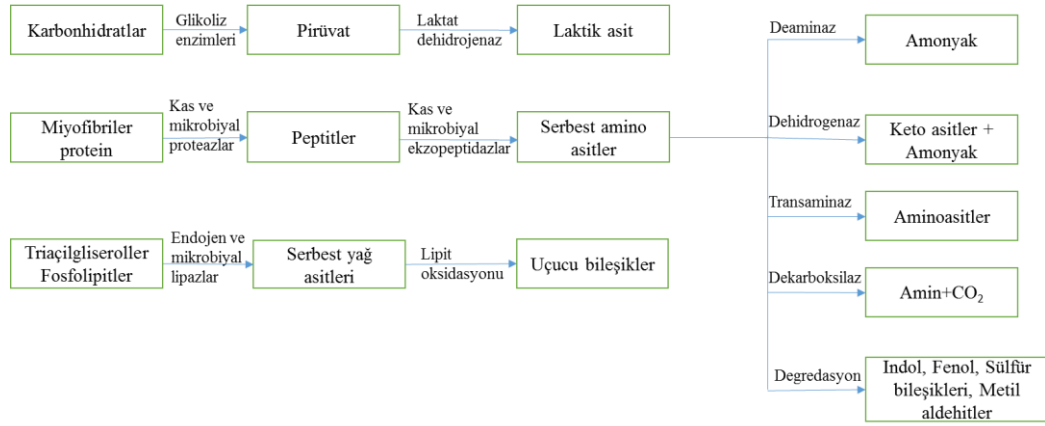
Aerobik mezofilik bakterilerin toplam sayısı başlangıçta 10^4 den 10^6 CFU/g ulaşır. Laktik asit bakterileri ve *Micrococcaceae* seviyeleri genellikle 10^3 ila 10^5 CFU/g civarındadır. Gram negatif bakterilerin (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, vb.) başlangıç sayıları 10^3 - 10^4 CFU/g civarındadır (Drosinos ve diğ, 2005). Küf ve mayaların başlangıç düzeyleri ise biraz daha düşüktür (10^2 ile 10^3 CFU/g) (Roncales ve diğ, 1991).

Fermantasyon aşaması, karbonhidrat fermantasyonu sonucunda pH düşüşüne paralel olarak her mikrobiyal grubun genel ekspanensiyel büyümesi ile nitelebilir. Laktik asit bakterileri hakim mikrofloradır ve kurutma süresince 10^7 ile 10^9 CFU/g düzeylerinde sabit kalır. *Lactobacillus* cinsi üyeler, laktik asit bakterileri arasında en rekabetçi

olanlardır; bunu *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* takip eder. *L. sakei* ve *L. curvatus* türleri, 20° ila 25°C civarında sıcaklıklarda fermente edilen geleneksel Avrupa ürünlerinin florasına hakimken, *L. plantarum* ise daha yüksek sıcaklıklarda fermente edilen sucuklarda bulunur. (Toldra ve diğ, 2001). Bununla birlikte, *Micrococcaceae* ailesi üyeleri mikroorganizmalar (şimdi farklı cinslere ayrılmış olan *Staphylococcus* ve *Micrococcus*) asite duyarlı ve kuruma süresince düşüş eğilimi gösterirler. Bu grubun gelişimi ve hayatta kalması üründe bulunan asitlenme derecesine bağlıdır. Staphylococci'ni micrococci üzerine kolonizasyonu, anaerobik koşullarda büyüme ve metabolize etme kabiliyetinin bir sonucudur. Doğal fermente ürünlerde bulunan suşlar esas olarak *S. xylosus* ve *S. carnosus* türlerine aittir; *S. saprophyticus*, *S. simulans* veya *S. sciuri* suşları izolatların küçük bir bölümünü oluşturmaktadır (Drosinos ve diğ, 2007). Küf ve mayaların seviyeleri fermantasyon aşamasında 10^6 ila 10^7 CFU/g yükselmektedir. Mayalar anaerobik fakültatifdir ve bu nedenle sucukların iç yüzeyinde ve yüzeysel kısımlarında gelişebilirler, oysa küflerin gelişimi yüzeyle sınırlıdır. *Debaryomyces hansenii*, doğal fermente etlerden en sık izole edilen mayadır. Küfle fermente edilmiş sucuklarda çoğunlukla *Penicillium spp.* cinslerinin *Eurotium* ve *Aspergillus* türleri izole edilir. Enterobacteriaceae fermantasyon aşamasında hafif bir artış yaşayarak 10^5 CFU/g'ın üzerine çıkabilir ancak kuruma süresince dramatik olarak düşer (Lücke, 2016). Genellikle, gram negatif bakterilerin seviyeleri (enterobakteriler ve psikotroplar), olgunlaşmanın sonunda) hemen hemen ihmal edilebilir hale gelir (10^3 CFU / g'den az). *Salmonella spp.* gibi patojen bakterilerin gelişimi başlangıçta nitrit varlığı ve sonrasında su aktivitesinin ve pH'nın daha da düşürülmesi ile engellenir. *Listeria monocytogenes*, düşük pH, rekabetçi flora ve antimikrobik bileşiklerin birikimi ile engellenir. Yeterli bir fermantasyon işlemi, *Staphylococcus aureus*'un gelişimini ve toksin üretimini engeller. *Clostridium botulinicum* ve *C. perfringens*'in varlığı, nitritin, sodyum klorit ve düşük pH gibi diğer seçici faktörlerin etkisi ile hariç tutulur (Chevallier ve diğ, 2006).

2.1.4 Olgunlaşma sırasında sucuktaki biyokimyasal değişimler

Fermente sucuğun işlenmesi sırasında proteinler, karbonhidratlar ve lipitleri içeren bir çok biyokimyasal reaksiyon oluşur ve bunlar ürünün son özelliklerini belirler. Bu reaksiyonların nedeni hem iç kaynaklı hem de mikrobiyal enzimler olup, katkısı esas olarak işlem türüne bağlıdır. Sucuk fermantasyonundaki biyokimyasal değişiklikler Şekil 2.5'te özetlenmiştir (Lachowicz ve diğ, 2012).



Şekil 2.5 : Olgunlaşma esnasındaki biyokimyasal reaksiyonlar ve enzimler.

2.1.4.1 Fermantasyon

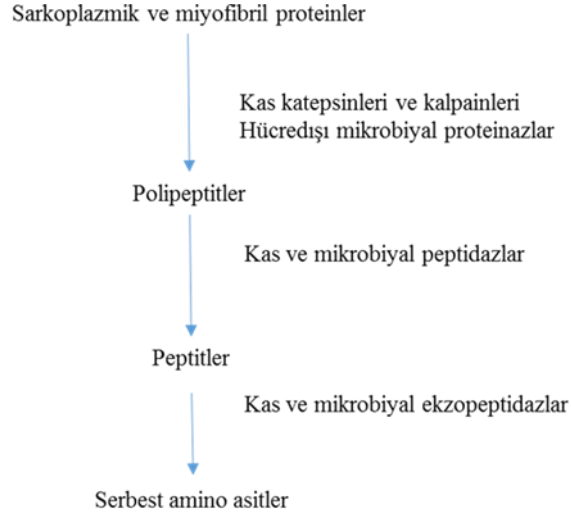
En eski fermente sucukların üretimi, hammaddede doğal olarak bulunan mikrobiotanın gelişimine bağlı olarak gerçekleşen spontan fermantasyona dayanıyordu. Hammaddenin doğasından gelen laktik asit bakterileri çığ ette genellikle az sayıda (10^2 - 10^3 CFU/g) bulunmasına rağmen hızlıca fermantasyona yön verir, NaCl, nitrat/nitrit ve anaerobik ortam laktik asit bakterilerinin gelişimine ve et fermantasyon ekosisteminin kurulmasına katkı sağlar (Ammor ve diğ, 2005). Bu işlem sırasında, iki temel mikrobiyolojik reaksiyon aynı anda ve birbirine bağlı olarak gerçekleşir: laktik asit bakterileri glikoliz yoluyla et karışımının pH'ını düşürür, koagülaz negatif kokiler nitrate/nitrit indirgenmesi yoluyla nitrik oksit üretime yardımcı olur (Dainity ve diğ, 1995). Karbonhidratlar tarafından asit üretimi nedeniyle, laktik asit bakterileri sucuklarda "ekşi/keskin" lezzetten sorumludur. Asidifikasyon, et proteinlerinin denatürasyonunu ve pıhtılaşmasını da beraberinde getirir bu da kurutma işlemi ile birlikte sucuk dokusunun geliştirilmesine yardımcı olur (Barbut, 2007).

Sucuk üretiminde iki farklı fermantasyon kullanılabilir. 'Yavaş' yöntemde, az miktarda şeker eklenir, starter kültür eklenmez, kütleme ajanı olarak nitrit yerine nitrat kullanılır ve düşük sıcaklıklarda sucuklar olgunlaştırılır. Asit üretimi yavaştır ve aside duyarlı mikroorganizmaların (katalaz pozitif koklar, Gram-negatif bakteriler) aktivitesi daha yüksektir. Buna karşın hızlı fermantasyonda, starter kültür ve yüksek miktarda şeker eklenmesi, kütleme ajanı olarak nitrit kullanılması ve 22-25°C aralığındaki fermantasyon sıcaklıkları aside duyarlı bakterilerin daha düşük aktivite göstermesine neden olur (Lücke, 2015).

Karbonhidratlar sucuğa eklenen starter kültürlerin gelişebilmesi için kullanılan substratlardır. Bu fermentasyon sonucunda son ürün olarak laktik asit üretir ve laktik asit birikimi pH düşüşüne neden olur. D (-) veya L (+) konfigürasyonu veya her ikisinin bir karışımı, starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterisinin türüne bağlıdır (Demeyer ve Toldra, 2004). pH düşüşü de yine starter kültürün türüne, eklenen karbonhidrat çeşidine ve miktarına, fermentasyon sıcaklığına (ABD'de daha yüksek ve Avrupa'da daha düşük), tuz miktarı, zaman, olgunlaşma koşulları ve benzeri diğer ilgili işlem parametrelerine bağlıdır (Demeyer ve diğ, 2000). Eğer starter kültürler heterofermentatif ise, asetat, format, etanol ve asetoin gibi bazı ilave son ürünler üretilebilir ve bu sucuğun duyu kalitesini etkiler. Örneğin, diasetil, asetoin veya butandiol gibi bileşiklerin üretilmesi fermente sucuklara tereyağı ve yoğurt aromasını verir (Demeyer ve Stahnke, 2002). pH'ın asit değerlerine doğru düşmesi ile birlikte protein pıhtılaşması ve su salınımını gerçekleştirirken katepsin D ve lizozomal asit lipazının uyarılmasıyla proteoliz ve lipoliz gerçekleşmeye başlar. Ayrıca, asidite istenmeyen patojenlerin veya bozulma bakterilerinin engellenmesine katkıda bulunur. Fermentasyon sırasında spesifik uçucu bileşiklerin üretilmesi de fermente sucukların işlenmesinde kullanılan starter kültüre bağlıdır (Toldra, 2008).

2.1.4.2 Proteoliz

Miyofibriller ve sarkoplazmik proteinlerin hidrolizi sucuk fermentasyonu ve olgunlaşma sırasında gerçekleşir. Bu hidroliz kas proteinazlarının (katepsinlerin ve kalpainlerin) ve ekzopeptidazların (dipeptidilpeptidazlar ve alanil-, arginil-, lösil- ve piroglutamil-aminopeptidazlar) ve starter proteazların kombine etkisi ile sağlanır (Toldra ve diğ, 2001). Et proteinlerinin, ilk olarak, katepsinler ve kalpainler gibi endojen kas enzimleri tarafından polipeptitlere ve daha sonra peptidazlarla daha küçük peptidlere hidrolize olduğu bilinmektedir. Aminopeptidazlar tarafından peptidlerden serbest amino asit üretimi proteoliz olayındaki son adımdır ve mikroorganizmaların ürettiği proteaz enzimlerinin yanı sıra etin kendisinde bulunan enzimler bu adımda etkilidir (Şekil 2.6) (Casaburi ve diğ, 2007). Bu proteolitik süreç, miyofibril yapısının bozunmasıyla ürün kıvamlılığına ve tat ile doğrudan ilişkili olan serbest amino asitler ve küçük peptitlerin birikimiyle lezzete veya dolaylı olarak daha sonra açıklanacak olan amino asit bozunma reaksiyonları vasıtasıyla öncü lezzet bileşenlerinin oluşumuna katkıda bulunur. Aşırı proteoliz, acı peptidlerin varlığı nedeniyle acı ve metalik gibi istenmeyen tada neden olabilir (Lachowicz, 2012).



Şekil 2.6 : Önemli proteoliz adımları

Laktobasillerin proteolitik sistemi esasen proteinleri oligopeptidlere dönüştüren hücre duvarına bağlı proteinazlardan oluşur. Oligopeptit taşınması bakteriyel hücrelere azot girişinin ana yoludur ve neredeyse tüm peptidazlar hücrelerarasıdır. Starter kültürlerin proteolitik aktivitesi, doku enzimlerine kıyasla zayıftır. Buna bağlı olarak, sucuğa inokule edilmiş starter suşlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, starter suşlu sucukların amino asit seviyesinde çok az bir yükselme görülmüştür (Hammes ve diğ, 2008). Proteolitik aktivite birçok faktöre bağlıdır. Katepsin B ve L'nin potansiyel aktivitelerinin, tuzun önleyiciliğini sonucu olarak işlem sırasında orijinal potansiyel etkinliklerinin yalnızca % 9.3'ü ve % 13.7'sine düştüğü kanıtlanmıştır (Zhao ve diğ, 2005). Morales ve diğerleri (2007) 'e göre sıcaklık, bu enzimler üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. 30°C'de yaşılanmakta olan biceps femoris kasının, 5°C'dekiyle karşılaştırıldığında proteoliz yoğunluğunun önemli derecede fazla olduğu görülmüştür. Proteolizin ürünün son dokusunu (sertlik, yapışkanlık) etkilediği ve duyusal özelliklerin gelişmesinde önemli bir parametre olduğu düşünülür (Zhao ve diğ, 2008).

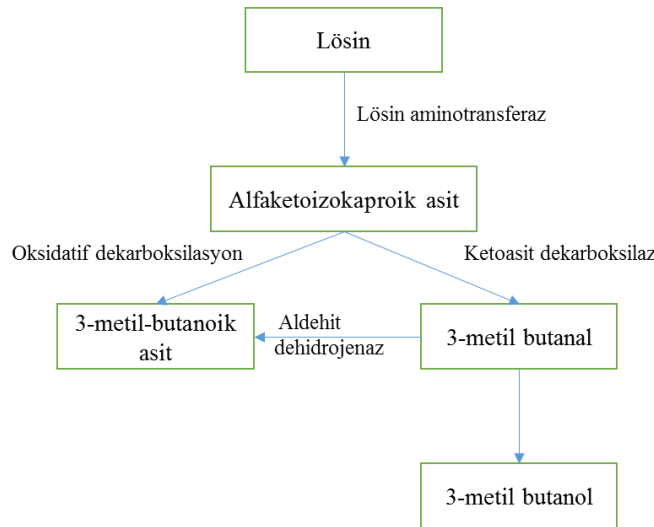
2.1.4.3 Amino asitlerin dönüşümü

Laktik asit bakteri hücrelerine amino asidi taşıyıcıları tarafından eklenen veya peptidaz aktivitesi ile hücre içi salınan serbest amino asitler, dekarboksilasyon, deaminasyon ve transaminasyon gibi metabolik yollarla çeşitli uçucu bileşiklere dönüştürülebilir (Smit ve diğ, 2009). Amino asit dönüşümünde, dallı aldehitleri üreten bir oksidatif deaminasyon-dekarboksilasyon reaksiyonu olan amino asitlerin Strecker bozunması

gibi nonenzimatik yollar da vardır (Toldra ve diğ., 2001). Dallı zincirli amino asitlerin (BCAAs) (valin, lösin ve izolösin), aromatik amino asitler (tirozin, triptofan ve fenilalanin) ve kükürt içeren amino asitler (metionin ve sistein)'in transaminasyon ve dekarboksilasyon ile dönüştürülmesi, fermente gıdalarda duysal algılamaya katkıda bulunan uçucu bileşiklerin oluşumunu sağlar (Şekil 2.7).

Macar salamında lezzete katkıda bulunan temel bileşikler olarak sırasıyla, lösin, metiyonin ve fenilalaninin bozunmasından kaynaklanabilen 3- metilbutanal, 3- metilbutanoik asit, 3- (metiltio) -propanal (metional) ve fenilasetaldehit tanımlanmıştır (Söllner ve Schieberle, 2009). Kuru fermente edilmiş sucukta valin parçalanması ile oluşturulan 2-metilpropanal, 2-metilpropanol ve 2-metilpropanoik asit metabolitleri ile birlikte lösin katabolizması sonucu üretilen 3-metilbütanol de tespit edilmiştir (Marco ve diğ, 2008). Yapılan başka bir araştırmada ise Milano sucuğundaki uçucu bileşiklerin %11.8'inin muhtemelen amino asit katabolizmasından kaynaklandığı bulunmuştur (Sinz ve Schwab, 2012).

Biyojenik aminler, amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu ile üretilir. Amino asitlerden tirozin, triptofan ve fenilalaninin enzimatik dekarboksilasyonu sırasıyla tiramin, triptamin ve feniletilamin üretir. Benzer şekilde, lizin, histidin ve ornitin, sırasıyla kadeverin, histamin ve putresin verir. Bu maddelerin varlığı sadece tadı etkilemekle kalmaz aynı zamanda tüketicilerin sağlığı için bir risk teşkil eder. Uygun hammadde, işleme sıcaklığı ve amin üretme potansiyeli olmayan starter kültürlerin seçimi, biyojenik amin seviyesinin kontrol edilmesinde önemli faktörlerdir (Toldra ve diğ, 2001).



Şekil 2.7 : Lösın'ın aroma bileşiklerine dönüştürülmesi.

2.1.4.4 Lipoliz

Lipoliz, sucuk tadının gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Enzimler lipitleri hidrolize eder ve oksidatif değişiklikler için substrat olabilecek serbest yağ asitleri ortaya çıkar. Bu olay aroma bileşiklerinin oluşumundan da sorumludur. Lipit parçalanmasının ilk basamağı, trigliseridlerin hem mikrobiyal hem de endojen (kas ve yağ dokusu) lipazlar tarafından hidrolizidir (Paramithiotis ve diğ, 2010). Yağdaki serbest yağ asitlerinin konsantrasyonu, lipazların hidrolitik aktivitesine; mikrobik metabolik süreçlere ve son üründe ve lipoliz ile salınan serbest yağ asitleri üzerinde çalışan oksidatif reaksiyonlara bağlıdır. İleri lipoliz, enzimatik ve enzimatik olmayan oksidatif süreçlerden geçen yağ asitlerinin serbest bırakılmasını içerir. Nihai ürünler olarak karbonilleri (aldehit ve metil ketonlar) ve son ürünün ana tat bileşenleri olan diğer düşük molekül ağırlıklı bileşikler (alkol, karboksilik asitler, vb.) açığa çıkarır (Toldrá, 2008).

Fermente sucukların yağ içeriği tipik olarak kuru maddenin % 40 ila % 60'ı arasında değişir. Fermantasyon sırasında, trigliseridlerden ve fosfolipidlerden uzun zincirli yağ asitleri salınır. Yağın yağ asidi kompozisyonu, hayvanın besleme rejimine bağlı olarak önemli derecede değişir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin spesifik salınımı, tekli doymamış ya da doymuş yağ asitlerine göre daha fazladır (Hammes ve diğ, 2003). Starter kültür inoküle edilen aseptik fermantasyonlu sucukların karşılaştırması sonucu, fermantasyon sırasında lipolizin ete ait endojen enzimler tarafından gerçekleştirildiği görülmüştür. Laktobasillerin zayıf lipolitik olduğu düşünülmektedir. Küfle olgunlaştırılmış ürünlerde, yüzeydeki küf florasının lipolitik aktiviteleri sonucu uzun zincirli yağ asitlerinin açığa çıktığı bulunmuştur (Gandemer, 2002).

2.1.4.5 Lipid oksidasyonu

Lipid oksidasyonu, depolama ve işleme sırasında et kalitesinin bozulmasının temel nedenlerinden biridir. Bununla birlikte, kötü lezzet oluşumuna neden olmasının yanı sıra pek çok et ürününün tipik aroması için de gereklidir. Kaslarda lipid oksidasyonunun ana süreci, otooksidasyon adı verilen kimyasal bir süreçtir (Gandemer, 2002). Bu, başlatma, çoğaltma ve sonlandırma adımlarını içeren serbest radikal bir süreçtir. Başlatma basamağı, bir alkil radikali oluşturmak üzere yağ asiti içindeki bir metilen karbonundan bir hidrojen çıkarılarak gerçekleşir (Zanardi ve diğ, 2004). Bu işlem, çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) etkilemektedir çünkü yağ asidi içindeki çiftli bağların sayısı arttıkça bir metilen karbonundan bir hidrojenin

ıkarılması daha kolaydır. Çoğaltma basamağı, bir peroksil radikali ($\text{LOO}^\cdot$) oluşturmak için radikal ve oksijen arasında bir reaksiyon ile başlar ve daha sonra bir başka yağ asidinden bir hidrojen çıkarır ve otomatik oksidasyonun birincil ürünleri olan hidroperoksitler (LOOH) oluşturur (Pelser ve diğ, 2007). Sonlandırma basamağı hidroperoksit ayrışmasıyla başlar ve karmaşık reaksiyonlar vasıtasıyla çok sayıda uçucu ve uçucu olmayan bileşiklerin oluşumuna neden olur. Bu reaksiyonlar kapsamlı olarak incelenmiş ve aroma üzerindeki etkileri nedeniyle uçucu bileşikler dikkate alınmıştır (Estevez ve diğerleri, 2008).

Gıdalardan elde edilen uçucu bileşiklerin yapısı ve orantıları, çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunların arasında, hidroperoksit izomerlerinin sayısını ve oranını etkilediğinden, yağ asiti yapısı en önemlisidir. Bir diğer önemli faktör ki bunlar peroksitlerin oluştuğu ve ayrıştırıldığı koşullardır, oksidasyon mekanizmaları (otoksidezlenme, termooksidasyon, foto-oksidasyon, vb.) ve ortam koşullarıdır (sıcaklık, pH, demir varlığı, vb.). Bu süreçten alkanlar, aldehitler, alkoller, esterler ve karboksilik asitler gibi çok çeşitli uçucular ortaya çıkmaktadır (Zanardi ve diğ, 2004). Oluşan çok sayıda uçucu madde arasında en önemlileri gıdaların aroması üzerindeki etkileri nedeniyle düşük aroma eşiğine sahip olan aldehitler, birkaç doymamış keton ve furan türevidir. Bunlar arasında C3-C10 aldehitler, C5 ve C8 doymamış ketonlar ve pentil veya pentenil furanlar bulunur. Bu bileşiklerin aroma notaları çeşitlidir ve bunların aromaları yağlı, don yağlı, kızarmış, yeşil, metalik, salatalık, mantar ve meyvemsi olarak tanımlanmıştır (Lachowicz, 2012).

2.2 Bakterilerin Karakterizasyonu ve Tanımlanması

2.2.1 Fermente sucuktaki temel mikroorganizmalar

En başından beri, et karışımı çeşitli mikroorganizmalarla doğal olarak kontamine olmuş haldedir. Bu kontaminasyon düşük seviyede kalmalıdır (maksimum 10^6 CFU/g). Mikroorganizmalar, hayvan kesimden etin kesilmesine kadar çeşitli süreçlerden kaynaklanır; flora bu nedenle çok karmaşıktır. Sucuğun retimi ve olgunlaşması süresince, bu mikroorganizmalar evre koşullarına (sıcaklık, tuz içeriği, pH ve redoks potansiyeli) toleransa bağlı olarak gelişirler (Lücke, 2015). Sucuğun mikroflorası dört genel kategoriye ayrılabilir:

Yararlı flora, ürünün asidifikasyonuna katkıda bulunur ve zararlı bakterilerin gelişimini engeller. Nitrat'ın indirgenmesinde görev alırlar. Ayrıca, aromatik

bileşiklerin serbest bırakılması için gerekli lipoliz ve proteoliz aktivitelerinde de etkilidirler. Bunlar, laktik asit bakterileri (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), patojenik olmayan stafilokoklar ve mikrokok ve mayalardır.

Sağlığa zararlı flora, fekal koliformlar, sülfid indirgeyen anaerobik *Staphylococci aureus*, *Salmonella* gibi gıda zehirlenmesine neden olan patojenlere karşılık gelir.

Bozulmaya neden olan flora, sıklıkla *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Clostridium* gibi bozulmaya neden olarak istenmeyen aroma ve gaz oluşturan bakteri cinsleridir.

Doğal flora, anlamlı miktarlarda mevcut olmasına rağmen sucuk üretiminde bilinen bir rolü olmayan fekal streptokoklar, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*

Kılıflara doldurma işleminden sonra, bazı sucuklarda olgunlaşma aşamasında yüzey "yüzey çiçeği" adı verilen bir flora kaplanır. Buna *Penicillium* genus ve farklı renkte doğal gelişimi gösteren mayalar dahildir (Guérin, 2016).

2.2.2 Fermente sucuk için starter kültürler

Starter kültür kullanmadan da geleneksel sucuklar üretmek mümkündür. Uygun olgunlaşma koşulları sağlandığında hammadde içinde doğal olarak bulunan ve olgunlaşma sırasında arzu edilen bakteriler seçici bir avantaja sahiptirler ve fermente edilmiş sucuklara gerekli duyuşal özellikleri (görünüm, aroma, tat, doku) ve muhafazayı sağlarlar (Leroy ve diğ, 2006). Buna rağmen, ürünlerde standardizasyon sağlaması, üretimin güvenliği açısından avantajlı oluşu ve üründe stabilite sağlaması sucukta starter kültürlerin kullanımı arttırmaktadır. Starter kültürler, hızlı olgunlaşmış fermente sucuklar için özellikle kullanışlıdır ve starter kültürlerin koruyucu kültürler olarak kullanımı, genellikle çiğ sucukta değil sadece et ürünlerinde artmaktadır (Casaburi ve diğ, 2016). Starter kültürlerin işlevi ile koruyucu kültürlerin işlevleri arasındaki fark gıda için faydalı çünkü starter kültürler gıda maddelerinin duyuşal özelliklerini geliştirirken, koruyucu kültürler gıda içindeki istenmeyen mikroorganizmaları bastırır. İdeal olarak, starter kültür aynı zamanda koruyucu kültür olmalıdır (Leistner, 2013).

Fermente sucuk için kullanılan temel starter kültürler, laktik asit bakterileri, koagülaz olmayan cocci (NPC), özellikle de *Staphylococcus* spp., maya ve küflerdir. Bakteriler genelde laktik asit bakterileri ve *Micrococcaceae* karışımı olarak sucuk karışımına inoküle edilir mayalarda bu karışıma starter kültür olarak eklenebilir. Küfler fermente

edilmiş sucukların yüzeyine inoküle etmek için kullanılır; bazen mayalar da bunun için kullanılır (Cocconcelli, 2010).

Starter kültür olarak kullanılan suşlar, gıda katkı maddeleri olarak kabul edildiğinden "genel olarak güvenli" (GRAS) kabul edilmelidir. Starter kültürlerin pazarını düzenleyen kanunlar ülkeye bağlı olarak farklılık gösterebilir ancak genel olarak starter kültürler için bazı gereklilikler vardır; patojenik, toksik veya alerjik olmamalıdır. İstenmeyen mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivitesi olmalıdır. Karbondioksit ve biyojenik amin üretmemelidir (Lücke, 2015). Antibiyotiğe karşı dirençli olmamalıdır. Fenotipik ve genotipik stabiliteye sahip olmalıdır. Kolayca saklanabilir ve dağıtılabilir olmalıdır Prosesin tipik koşullarında (tuza, nitrite, düşük pH ve su aktivitesine tolerans, imalat sıcaklıklarında kayda değer gelişme vb.) rekabetçi olmalıdır. Bazı teknolojik faydalar sağlamalıdır; asidifikasyon, koruma, lezzet oluşumu, kalite güvencesi vs.. Belirli yöntemlerle tanımlanabilmelidir (Toldra ve diğ, 2001).

Starter kültürler olarak kullanılan laktik asit bakterileri, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerine aittir. Ticari olarak temin edilebilen türler Çizelge 2.1'de görülebileceği gibi *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. pentosu*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *K. varians*, *S. xylosus*, *S. carnosus*'dur (Cocconcelli ve diğ, 2010). *L. sakei* ve *L. curvatus* bu ortamdaki en rekabetçi mikroorganizmalardandır. Bu türler psikrotroftir ve, geleneksel Avrupa fermentasyon sıcaklığına (20°-24°C) daha yakın sıcaklarda optimal gelişme (25°-30°C) gösterir. *L. plantarum* ve *Pediococcus* spp. mezofiliktir ve optimal gelişme sıcaklıkları 30°C -35°C (*P. acidilactici* için 40°C'ye kadar) (Papamanoli ve diğ, 2003). Laktik asit bakterilerinin ana rolü, karbonhidrat mekanizmasının sonucu olarak et karışımının asidifikasyonudur. Bu işlem birçok etkiye sahiptir: pH'ın düşüşüyle hijyenik stabilite sağlanır ve organik asitler meydana çıkar, karakteristik asit tadı ürüne verilir, et tutma kapasitesindeki azalış ile et proteinlerinin pıhtılaşmasını sağlar (pH 5.4 ila 5.5'te) ve kuruma süreci kolaylaşır, azot monoksitin miyogloblin ile reaksiyonu (pH 5.4 ila 5.5) sonucu istenen kırmızı rengin gelişir (Adams, 2010).

Çizelge 2.1: Et fermentasyonunda kullanılan bazı ticari bakteri türlerinin özellikleri (Cocconcelli ve Fontana, 2010 uyarlanmıştır.).

Türler	Et fermentasyonu için fonksiyonel ve teknolojik özellikleri	Kaliteye etkisi
<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	Hızlı asidifikasyon, üründe sabit renk ve pozitif aroma gelişimi. Fermente edilebilir şekerler et karışımına eklenerek son pH ayarlanabilir.	Muhafaza Sertlik (kıvam) Aroma
<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Normal asidifikasyon, pozitif aroma gelişimi, iyi ve kalıcı kırmızı renk oluşumu arasında iyi bir kombinasyon oluşturur. Fermente edilebilir şekerler et karışımına eklenerek son pH ayarlanabilir.	Muhafaza Sertlik (kıvam) Aroma
<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Hızlı bir şekilde asidifikasyon başlatır ve sonucunda orta şiddette bir pH düşüşü sağlar. S. xylosus güçlü, stabil renk ve aromatik bir lezzet verir.	Muhafaza Sertlik (kıvam)
<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	Hızlı fermentasyon, berilgin ve iyi bir lezzet, iyi renk oluşumu ve stabilite. Bakteriosin oluşumu sayesinde L.curvatus ve P.acidilactici, Listeri monocytogenes büyümesini baskılar.	Muhafaza(pH ve bakteriosin) Sertlik (kıvam) Aroma
<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	Orta dereceli asidifikasyon, pozitif aroma gelişimi ve sabit renk.	Muhafaza Sertlik (kıvam) Aroma
<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	Orta dereceli asidifikasyon, pozitif aroma gelişimi ve sabit renk.	Muhafaza Sertlik (kıvam)
<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> and <i>Staphylococcus carnosus</i>	Proteoliz Amino asit yıkımı Lipoliz Antioksidan özellikleri; katalaz ve superoksidadiz dismutaz Nitrat indirgenmesi	Renk Aroma Muhafaza
<i>Kocaria varians</i>	Nitrat indirgenmesi	Renk Muhafaza

Ette starter olarak kullanılan *Lactobacillus* spp., glikoliz yardımıyla glikoz ve hekzoz-fosfat kullanan fakültatif heterofermentatif organizmalardır ve ana fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretirler. Karbonhidratlar genellikle glikoliz yoluyla metabolize olur, ancak heterofermentatif yol belirli koşullarda istenmeyen fermentasyon ürünlerinin (asetik asit, hidrojen peroksit, karbondioksit, asetoin, formik asit, vb.) üretimine neden olabilir (Leroy ve diğ, 2006). Renk ve lezzet kusurlarını önlemek için seçilen starter kültürlerde katalaz ve nitrat/nitrit redüktaz aktivitelerinin varlığı arzu edilir. Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesi sayesinde küçük peptidleri ve serbest amino asitleri salarak kısmen aroma gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Laktik asit bakterilerinin lipolitik aktivitesi zayıftır fakat proteolitik aktivite farklı *Lactobacillus* türlerinde (*L. curvatus*, *L. sakei* ve *L. plantarum*) önemli derecede etkilidir. Bu aktivite, olgunlaştırılmış ürünlerin duysal özelliklerinin geliştirilmesinde etkilidir (Centeno ve diğ, 2014).

Lactobasiller ayrıca amino asitlerin dekarboksilasyonu sonucu insanlarda olumsuz etki yaratan biyolojik aminler üretmektedir. Biyojenik aminleri oluşturma kabiliyeti genellikle tür özelliği yerine bir suşa özgü karakteristik olarak kabul edilir. Bu nedenle biyojenik amin üretimi ile mikroorganizma sayısı arasındaki kesin korelasyonları bulmak zordur (Suzzi ve Gardini 2003). *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait birçok laktik asit bakterisi bir veya daha fazla amino asiti dekarboksile edebilmektedir. Fermente et ürünlerinde, starter kültürlerden ziyade kontamine eden mikrofloraların artan biyojenik amin seviyesinin oluşumundan sorumlu olduğuna dair iyi kanıtlar vardır (Stadnik ve Dolatowski, 2010).

Bakteriyosinlerin istenmeyen organizmalara karşı sentezi, starter kültür seçiminde son derece önemli bir özelliğe sahiptir. Laktik asit bakterileri tarafından mikrobiyal koruma bakteriosinlerin (bakteriler tarafından ribozom yoluyla sentezlenen peptitler), birçok gıda kaynaklı bozulma ve patojen bakterilerin gelişimine müdahale etme özelliği sayesinde gerçekleşir (De Vuyst ve Leroy 2007). Fermente sucuk üretimi sırasında saf canlı bakteriosin üreten laktik asit bakteri suşunun eklenmesi biyolojik muhafazanın bir örneğini temsil eder. Bakteriyosini et ürünlerine dahil etmenin dolaylı yolu, eklenen suşun fermentasyon süreci boyunca gelişimi ve bakteriosin üretme kabiliyetine bağlıdır. Ancak, bir bakteriyosinin laboratuvar koşullarında sentezi, gerçek üretim koşullarında etkinliğini garanti etmez. Sucuk fermentasyonu veya

biyolojik koruma için bakteriyosin üreten bir kültürü değerlendirirken et ve et ürünlerinin karmaşık sistemler olduğunu düşünmek önemlidir; dolayısıyla formül ve fermantasyon teknolojisinin bakteriyosin üreten suşların performansı üzerindeki etkisi test edilmelidir (Cocolin ve Rantsiou, 2012). Bakteriosin üreten *L.sakei* ile yapılan bir çalışmada sakacin P'nin üretilmesinden sorumlu olan sakP geninin sekanslanmasından sonra, suş sucuk fermantasyonuna inoküle edildi ve suşun antimikrobiyal bileşiği üretme kabiliyetini değerlendirmek için genin ekspresyonu, bakteriyosin tayini ile birlikte gerçekleştirildi. Bakteriyosin geni ekspresyonu ve üretimi, fermantasyon boyunca saptanmış ve suşun başlangıç kültürü olarak kullanılma potansiyeli vurgulanmıştır (Urso ve diğ, 2006a). Sonraki bir çalışmada *L. sakei* kullanılmış ve sucuk imalatı için kullanılan başka bir ticari başlangıç kültürüyle karşılaştırılmıştır. I151 suşuyla yapılan sucuklar, ticari başlangıç maddesi ile üretilen sucuklarla karşılaştırıldığında düşük enterokok seviyeleri ve toplam bakteri sayımı ile genel olarak daha iyi bir mikrobiyolojik kaliteye ve panelist ekibi tarafından tercih edilen bir duyu profiline sahipti. Bakteriyosin üreten laktik asit bakterisi kullanımı, gıda kaynaklı patojenlerin azaltılmasında farklılık göstermesinee rağmen, sucukların fermantasyonunda iyi bir uygulanabilirlik göstermiştir (Urso diğ, 2006b).

Kocuria (exMicrococcus) ve *Staphylococcus* suşları starter kültür olarak ticarileştirilir. Bununla birlikte, esasen anaerobik koşullardaki metabolik aktiviteleri nedeniyle *Staphylococcus* daha rekabetçidir. Bu mikrobiyal grup tarafından geliştirilen başlıca işlevler, katalaz, nitrat ve nitrit redüktaz aktiviteleri, lipid metabolizması yoluyla renk oluşumu ve stabilizasyon ve aroma oluşumunu içermektedir. Nitrat redüktazlar, çok düşük oksijen konsantrasyonlarında veya anaerobiyozda nitratin parçalanmasını sitoplazmik membran ile bağlantılı enzimlerdir. Enzimatik aktivite *S. carnosus*'da karakterize edilmiştir ve et fermantasyonunda tipik koşullarda aktif olduğu gösterilmiştir (Coccocelli, 2010). Bu aktivite ayrıca, *K. varians* suşlarından optimum suş üzerinde araştırılmıştır. Ve nitrattan üretilen nitrit, nitrit redüktazlarla indirgenebildiği veya kimyasal olarak dönüştürülebildiği görülmüştür (Toldra ve diğ, 2001).

Kürlenmiş kırmızı renkten sorumlu bileşikler, renk kusurlarına neden olan oksidasyona duyarlıdır. Micrococcaceae katalaz aktivitesi hidrojen peroksitin bozunmasında görev aldığı için renk stabilizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu sayede lipit oksidasyonu ve rancidite de engellenir. Proteolitik aktivite

Micrococcaceae'de önemli değildir, ancak bazı endo- ve exoproteolitik aktivite *K. varians*, *S. sciuri*, *S. xylosus* ve *S. carnosus* türlerinde tespit edilmiştir. Ancak genel olarak *Micrococcaceae*'lerin lipit metabolizması ve uçucu aroma bileşiklerinin üretilmesinde daha etkili olduğu görülmüştür (Mainar ve diğ, 2017).

Debramomyces hansenii fermente ette baskın bir maya türüdür ve *Candida famata* ile birlikte şimdiye kadar starter kültür kullanılabilen mevcut tek maya türüdür. Anaerobik ve zayıf fermentatif metabolizmalara sahiptirler ve bu metabolizmalarını et ürünlerinin hem yüzey hem de iç kısımlarındaki büyümelerine izin verir. Seçilen maya suşlarının uygulanması ağırlıklı olarak sırasıyla katalaz ve lipolitik etkinlikler yoluyla renk stabilizasyonuna ve lezzet üretimine katkıda bulunur. Mayalar aynı zamanda organik asitleri metabolize eder ve pH artışına neden olabilecek deaminaz aktivitesi üretir (Olesen ve Stahnke, 2000).

Penicillium nalgiovense ve *Penicillium chrysogenum*, starter kültürleri olarak kullanılan mevcut küfleri oluşturmaktadır. Genellikle fermente ürünlerin görünümüne, tadına ve güvenliğine katkıda bulunurlar. Küflerin aerobik bir metabolizması vardır, bu da sucuğun yüzeyindeki gelişimlerini sınırlar. Dış görünüşün yanı sıra, küflerin yüzeye uygulanması, oksijen ve ışığın; renk değişikliği ve ransidite gibi olumsuz etkilerine karşı koruyucu bir etki yaratırken kurumanın daha eşit bir şekilde gerçekleşmesini de sağlar (Cocolin ve Rantsiou, 2012). Lezzete katkısı, lipolitik ve proteolitik enzimlerin faaliyetiyle sağlanır. Ayrıca, laktik fermantasyondan kaynaklanan organik asitleri metabolize etme özelliği, asitleşme seviyesinin ve keskin (tangy) tadın azalmasına neden olur. Bu aynı zamanda amino asitlerden amonyum üreten deaminaz aktivitesinin sonucudur. Toksik olmayan suşların uygulanması, ürünü mikotoksijenik küflerin gelişiminden uzak tutar (Sunesen ve Stahnke, 2004).

2.2.3 Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak teknolojik özellikleri ve gıda güvenliğine etkisi

Starter kültür seçilirken, önce istenilen et ürününden elde edilen laktik asit bakteri suşlarının izole edilmesi ve tanımlanması gerekir sonrasında ise seçilen uygun suşlarla devam edilir. Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kaynaklarından yeterli konsantrasyonlarda hızlı bir şekilde laktik asit üretmesi beklenir. Bu, et üretiminde laktik asit bakterilerinin ana rolüdür ve çeşitli kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik reaksiyonlara bağlıdır. Et ürünlerinin asitlenmesi sırasında, laktik asit bakterileri kas

proteinlerinin pıhtılaşmasını sağlar ve bu son üründe artan stabilite, sağlamlık ve birleşebilirlik sağlar (Cocolin ve Ranstiou, 2010). Aynı zamanda, nitritin nitrik oksite spontan indirgenmesini geliştirirler ve nitrik oksit miyoglobin ile reaksiyona girerek, et ürünlerinin tipik kırmızı renginden sorumlu bileşik olan nitrosomyoglobini oluşturur (Leroy ve diğ, 2006). Ayrıca, laktik asit bakterileri fark edilebilir asidik ve sirke tadı oluşturarak son ürünün lezzetine katkıda bulunur Organik asit üretimi, raf ömrü ve son ürünün güvenliği için belirleyici faktördür. Patojenik ve bozulma florasının engellenmesi, bu organik asitlerin hızlı ve yeterli bir şekilde oluşturulmasına bağlıdır. Ayrıca, amin-negatif starter kültürlerin neden olduğu hızlı pH düşüşünün sucukta biyojenik amin birikimini büyük oranda önleyebileceği de gözlenmiştir (Olaoye ve Idowu, 2010).

Starter kültür olarak seçilen suşların kullanılması farklı aroma üreterek sucuğa lezzet katmasının yanı sıra olgunlaşma süresini de azaltır. Laktik asit bakterileri, karbonhidratların fermantasyonu yoluyla uçucular üretmesine rağmen, büyük miktarlarda laktik asit ve bazı asetik asit üretmektir. Bazı et suşlarında peptidaz ve lipaz aktivitesi gözlemlenmesine rağmen, genellikle güçlü proteolitik veya lipolitik özelliklere sahip değildirler (Leroy ve diğ, 2006). Laktobacillusların sucuk fermantasyonu sırasında lipolitik aktivitesi hakkında çok az bilgi mevcut olsa da *L.sakei*, *L. curvatus* ve *L. plantarum*'un lipolitik aktivitesi belgelenmiştir. (Papamanoli ve diğ, 2003). Bununla birlikte, laktobasilluslardaki lipazlar genellikle fermente sucuk koşullarında az veya hiç aktivite göstermemektedir (Demeyer ve diğ, 2000). Laktobasillere ilaveten, aromayı etkilemek için sucuğa diğer laktik asit bakterileri de ilave edilebilir. *Enterococcus* proteolitik, lipolitik ve esterolitik gibi çeşitli metabolik aktiviteleri sergilemektedir (Sarantinopoulos ve diğ., 2001). Ayrıca, Akdeniz'de üretilen birçok geleneksel peynirde (Giraffa, 2003) ve fermente sucukta olgunlaşma sürecinde ve aroma gelişiminde önemli rol alır (Hugas ve diğ, 2003).

Laktik asit bakterileri starter kültür olarak kullandıklarında istenmeyen floranın gelişimini önleyen, ürün güvenliği sağlayan ve raf ömrünü uzatan organik asitlerin hızlı üretiminde birincil bir role sahiptir. Organik asitlerin antimikrobiyal etkisi pH'ın düşürülmesinde ve ayrışmamış asit moleküllerinin etkisinde yatar. Ayrışmamış asitin lipofilik doğası hücre zarı boyunca dağılmasına izin vererek elektrokimyasal proton gradyanında bir çöküşe neden olurken düşük dış pH sitoplazmayı asitleştirir. Alternatif

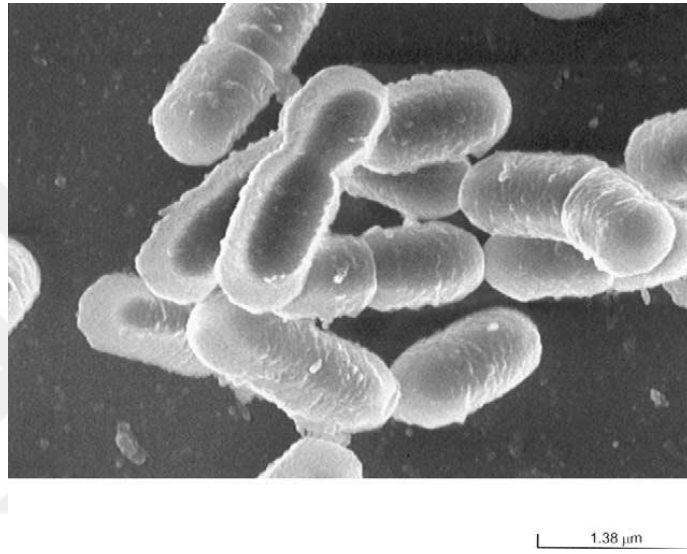
olarak, hücre zarının geçirgenliği substrat taşıma sistemlerinin bozulmasından etkilenebilir (Oloaye ve Idowu, 2010).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlere ilgi son zamanlarda çarpıcı biçimde arttı. Çoğu bakteriyosin, et fermentasyon süreçlerinde yer alan bazı laktik asit bakteri türleri tarafından üretilir. Etten izole edilen laktik asit bakterileri, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Bacillus cereus* gibi gıda patojenlerine ve genel olarak diğer laktik asit bakteri suşlarına karşı etkili olan bir dizi bakteriosin üretir (Messi ve diğ, 2001; Noonpakdee ve diğ, 2003). Bu bakteriyosinler, diğer gram pozitif bakterilerini inhibe eden antibakteriyel peptitler veya proteinlerdir. *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. casei* gibi bir çok Laktobasil sucuk izolatu sıklıkla bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri bileşikler üretir (Leroy ve diğ, 2006). Bakteriyosin üreten *L. sakei*'nin kullanımının fermante edilmiş sucukta *Listeria* spp. seviyelerini düşürmeye izin verdiği bulunmuştur. Ayrıca *L. curvatus* ve *L. plantarum* türlerinin de antilisteriyal etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Dicks ve diğ, 2004).

Tiramin, histamin, triptamin, kadaverin, putresin ve spermidin gibi biyojen aminler, çeşitli gıdalarda bulunan alifatik, aromatik veya heterosiklik yapılara sahip organik bazlardır ve çoğunlukla amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonuyla üretilirler. Gıdalardaki biyojenik aminlerin birikimi, öncüllerin (amino asitler) ve amino asit dekarboksilaz aktivitesine sahip mikroorganizmaların bulunması, gelişme ve dekarboksilasyon için uygun koşulların mevcut olmasıyla meydana gelir. Mevcut protein miktarı ve et olgunlaşması sırasında görülen proteolitik aktivite, hem başlangıç kültürleri hem de diğer mikrobiyotada tarafından gerçekleştirilen dekarboksilaz reaksiyonlarının öncülleridir (Suzzi ve Gardini, 2003). Genel olarak starter kültürler sınırlı tirozin-dekarboksilasyon aktivitesine sahiptir, ancak kontaminant olmayan laktik asit bakterilerin özellikle enterokokların tiramin üretiminden sorumlu oldukları düşünülmektedir (Ansorena ve diğ, 2002). Starter kültür olarak laktik asit bakterisi seçerken amino dekarboksilaz aktivitesi göstermemesi önemli bir koşuldur. Amin negatif laktik asit bakterileri hızlı gelişim ve asit üretimi, amin üreten mikrofloranın gelişimini önleyecektir. Seçilmiş *L. sakei*'nin fermente edilmiş sucuklardaki biyojenik amin birikimini büyük oranda azaltma kabiliyeti olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Bover-Cid ve diğ, 2001; González-Fernandez ve diğ, 2003).

2.2.4 *L.sakei*

L. sakei, önce *Laktabacillus sake* olarak tarif edilmiş, sake isimli fermente edilmiş içecekte bozulmaya neden olan mikroorganizma olarak 1934'te bulunmuştur (Şekil 2.8) (Trüpper, 1997). *L. sakei*, psikotrofik, yüksek tuz konsantrasyonuna toleransı olan, 4°C ve %6.5 NaCl'de gelişme kapasitesine sahip suşları olan taze et ve balığın doğal florasında bulunan gram pozitif laktik asit bakterisidir (Ammor ve diğ, 2005). Fermente etlerin üretiminde starter olarak kullanılmaktadır ve biyokoruma ve gıda güvenliği alanında biyoteknolojik potansiyele sahiptir (Hufner ve diğ, 2007).



Şekil 2.8 : 30°C'de gelişen *L. sakei* 23K suşunun tarama elektron mikroskopisinde görünümü (Champomier-Vergès ve diğ, 2002).

Suşlar ve diğer türler arasındaki fenotipik farklılaşma, genellikle, üretilen laktik asit izomer türüne, şeker fermantasyonuna ve arginin kaynaklı amonyak üretimine dayanır. *L.sakei*'nin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerine özellikle şeker fermantasyonuna dayanan birçok çalışmada etten izole edilen *L. sakei* suşları arasında geniş fenotipik heterojenlik olduğu bildirilmiştir. Bu suşların doğru bir şekilde tanımlanmasında zorluk et ürünlerinde bulunan *L. curvatus*'la arasındaki yakın ilişkiden kaynaklanmaktadır. İki *L. sakei* suşu fenotipik özelliklere göre ayırt edilemezken, iki *L. curvatus* suşu melibiyozu fermente etme kabiliyeti ile ayırt edilir (Berthier ve Ehrlich, 1999).

Et, protein açısından zengin bir alt tabaka olup, yaşlanması sırasında proteolitik enzimler lizozomlardan salınır ve amino asitler bakteri aktivitesi olmaksızın et proteinlerinden ayrılır. Böyle bir ortamda yaşamla tutarlı olan *L. sakei*, aspartik ve

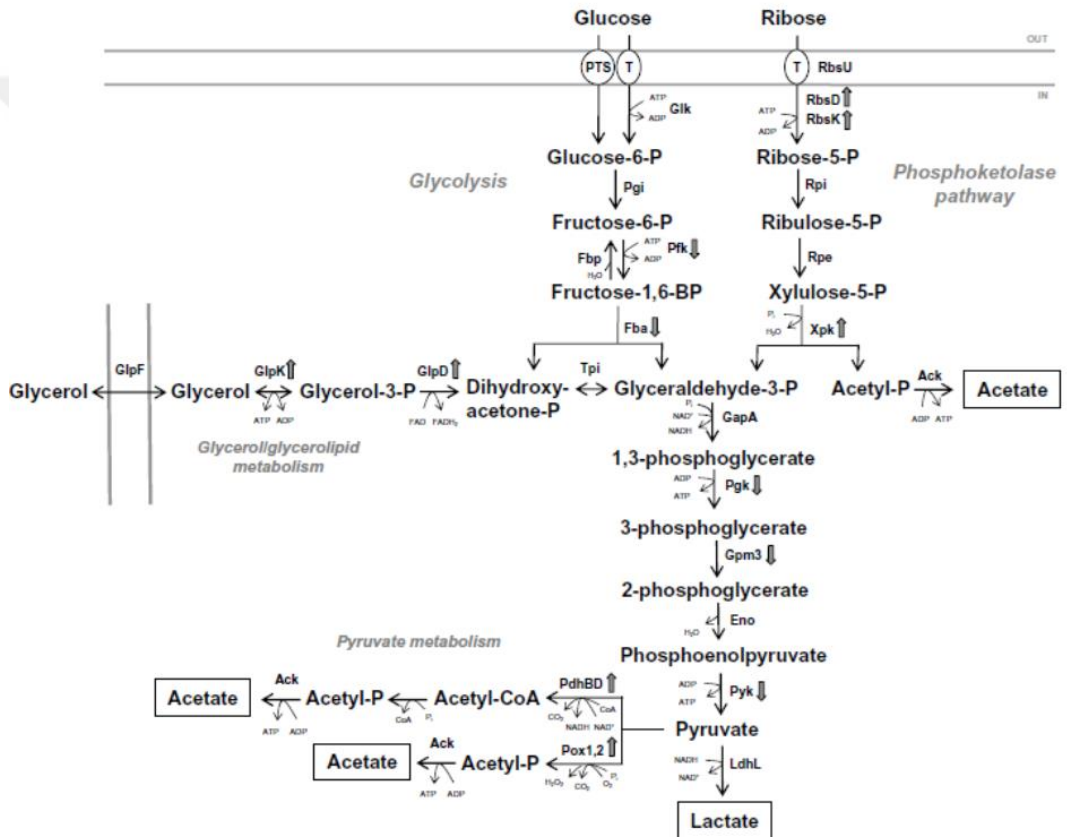
glutamik asitler haricinde tüm amino asitler için oksotrofiktir. Genom analizleri, bu iki amino asidin, sırasıyla asparagin ve glutaminin deaminasyonu ile potansiyel olarak üretilbildiğini göstermektedir (Challiou ve diğ, 2005). Glikoz ve riboz, ette bulunan ana şekerlerdir. Dışarıdan glikoz ve bazen laktoz genellikle fermente et ürünlerinin olgunlaşma sürecini hızlandırmak ve geliştirmek için eklenir. *L. sakei*'nin heksoz fermantasyonu homolaktiktir ve anaerobik glikoliz yoluyla ilerlemektedir. Ortaya çıkan laktik asit oluşumu ve daha sonra pH düşüşü fermente ürünün hijyenik emniyeti ve kalitesi için büyük önem taşımaktadır. Laktoz ve galaktoz da *L. sakei* tarafından fermente edilir. Riboz, arabinoz ve glukonat, fosfoketolaz yolu olarak da adlandırılan heterolaktik yolla fermente edilir. *L. sakei*'de sadece L-laktat dehidrojenaz enzimi mevcut olsa da, şeker fermantasyonu sırasında D- ve L-laktat üretilir (Şekil 2.9) (McLeod ve diğ, 2010).

Lactobasilli ayrıca amino asitlerin dekarboksilasyonu sonucu insanlarda olumsuz etki yaratan biyolojik aminler üretmektedir. Biyojenik aminleri oluşturma kabiliyeti genellikle tür özelliği yerine bir suşa özgü karakteristik olarak kabul edilir. Bu nedenle biyojenik amin üretimi ile mikroorganizma sayısı arasındaki kesin korelasyonları bulmak zordur (Suzzi ve Gardini 2003). *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait birçok laktik asit bakterisi bir veya daha fazla amino asiti dekarboksile edebilmektedir. Fermente et ürünlerinde, starter kültürlerden ziyade kontamine eden mikrofloraların artan biyojenik amin seviyesinin oluşumundan sorumlu olduğuna dair iyi kanıtlar vardır (Stadnik ve Dolatowski, 2010).

L. sakei 'nin et ürünlerinde etkin şekilde hayatta kalması ette bol olan arjinine kullanabilmesinden kaynaklanır. Bu özellik, *L. curvatus*'tan farklılaşmayı mümkün kılar ve arjinin, enerji üretimi için substrat seviyesinde fosforile olan laktik asit bakterilerindeki tek amino asittir. *L. sakei*'deki arjinin ayrışımı, NH_3 ve ATP üretimine yol açan arjinin deaminaz yolu ile düzenlenir. Arjinin katabolizması yalnızca düşük glukoz konsantrasyonunda gözlemlenir. Bu bozulma, sabit faz boyunca bakterinin hayatta kalma şansını arttırması ile ilişkilidir (Champomier-Verges ve diğ, 1999).

Fermente et ürünlerinin teknolojik süreci ile ilişkili çeşitli faktörler, starter suşlar için 'stres' koşullarını temsil eder. *L. sakei*, etin soğutulması sırasında ve kür tuzları (% 3-9 NaCl) varlığında gelişebilme yeteneğine sahiptir. Bu iki süreç, arzu edilen bir depolama ömrü elde etmek için, bazen kombinasyon halinde, yaygın olarak kullanılır.

L. sakei'nin soğuğa ve tuza direnci betain ve karnitin gibi ozmo- ve kriyoprotektif maddeleri etkin olan biriktirme kabiliyetiyle alakalı olabilir (Amadoro ve diğ, 2015). Aynı özellik tuza ve soğuğa direnci ile bilinen bir organizma olan *Listeria monocytogenes*'de bulunana benzerdir. Benzer şekilde, *L. sakei*'nin, diğer laktobasillerden daha fazla soğuk stres proteini vardır, fakat *L. monocytogenes* kadar çoktur. Birkaç çalışma *L. sakei*'nin soğuk direncinin karbonhidrat metabolizmasını değiştirmesi ve oksidatif stresin uyarılması da dahil olmak üzere bir dizi mekanizmanın kombinasyonu sayesinde olduğunu öne sürmüştür (Chaillou ve diğ, 2005).



Şekil 2.9 : *L.sakei* 'deki glikoz ve riboz fermantasyonu için metabolik yolların genel görünüşü (McLeod ve diğ, 2010).

Fermente et ürünlerinin teknolojik süreci ile ilişkili çeşitli faktörler, starter suşlar için 'stres' koşullarını temsil eder. *L. sakei*, etin soğutulması sırasında ve kür tuzları (% 3-9 NaCl) varlığında gelişebilme yeteneğine sahiptir. Bu iki süreç, arzu edilen bir depolama ömrü elde etmek için, bazen kombinasyon halinde, yaygın olarak kullanılır. *L. sakei*'nin soğuğa ve tuza direnci betain ve karnitin gibi ozmo- ve kriyoprotektif maddeleri etkin olan biriktirme kabiliyetiyle alakalı olabilir (Amadoro ve diğ, 2015).

Aynı özellik tuza ve soğuğa direnci ile bilinen bir organizma olan *Listeria monocytogenes*'de bulunana benzerdir. Benzer şekilde, *L. sakei*'nin, diğer laktobasillerden daha fazla soğuk stres proteini vardır, fakat *L. monocytogenes* kadar çoktur. Birkaç çalışma *L. sakei*'nin soğuk direncinin karbonhidrat metabolizmasını değiştirmesi ve oksidatif stresin uyarılması da dahil olmak üzere bir dizi mekanizmanın kombinasyonu sayesinde olduğunu öne sürmüştür (Chaillou ve diğ, 2005).

L. sakei ve *L. curvatus* suşları laktik asit bakterileri, *Clostridium*, *L. monocytogenes* ve *Enterococcus*'a karşı aktif olan sakasin A, K, P, lactosin S ve kurvasin, kurvatisin ve lactosin üretirler. Bakteriosinlerin sucuktaki etkisi sınırlıdır çünkü matrise bağlanırlar ve doku proteazları tarafından bozunabilirler. Bununla birlikte, model sucuklarda *P. acidilactici* ve *L. Sakei* gibi bakteriyosin üreten suşların varlığında *L. monocytogenes*'te 1.5 ila 2.5 log arasında azalma görülmüştür (Talon and Leroy, 2014).

Laktik asit bakterilerinin biyojen amin üretimi ile ilgili birçok bilgi mevcut olmakla beraber aminojenik potansiyel türler ve suşlara bağlıdır. Fermente sucuklardan izole edilen *L. curvatus* suşlarının çoğunun (% 76) tiramin ve feniletilamin ürettiği halde, *L. sakei* suşlarının yalnızca % 2'si tiramin üretebilirken, *L. plantarum* için bu oran % 16'dır. Bu suşlarda tirozin dekarboksilaz geni belirlenmiştir. Starter kültür olarak dekarboksilaz genine sahip olmayan *L. sakei* suşlarının kullanılması, biyojenik amin oluşumu önlediği ve hatta son üründe neredeyse hiç biyojenik amin olmadığını gösterdi (Bover-cid ve diğ, 2001).

Laktik asit bakterilerinin proteolitik faaliyetleri genellikle süt ürünleri için iyi belgelenmiştir, çünkü bu faaliyetler büyümede ve fermente ürünlerin lezzet ve dokusunun geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Fermente edilmiş sucukların olgunlaşma sürecinde peptidlerin ve serbest amino asitlerin açığa çıktığı bilindiğinden *L. sakei*'nin proteolitik aktivitesini incelenmiştir. Yine de, bu protein yıkım ürünlerinin birikiminin mikrobiyal rolünü ve enzimatik rolünü ortaya koymak zor görünmektedir. Domuz etinin sarkoplazmik ve miyofibriller proteinlerinde bazı *L. sakei* türleri için proteinaz ve aminopeptidaz aktiviteleri gösterilmiştir (Fadda ve diğerleri, 1999). Et ekstraktının *L.sakei* inoküle edilmesiyle glutamik asit ve alanin olmak üzere serbest aminoasit birikimi olduğu görülmüştür. Kas myofibriller proteinlerin proteolizi ve aynı zamanda lipoliz ve lipid oksidasyonunun fermente et ürünlerinde lezzet

oluşumunda anahtar faaliyetler olduğu bilinmektedir. Bu tür faaliyetler *L. sakei*'de kısmen tanımlanmış olsa da, veriler oldukça dağınıktır ve *L. sakei* metabolizması ile aroma oluşumu arasındaki ilişki konusunda kesin bir sonuç alınamaz. Diğer türlerin (çoğunlukla *Staphylococci* ve mayanın) endojen et enzimleriyle birlikte aroma gelişiminde önemli bileşenler olduğu açıktır. Bununla birlikte, *L. sakei* metabolizmasının bu yönü halen iyi anlaşılamamıştır (Champomier - Verges, 2002).





3. MATERYAL VE METOT

3.1 Spontane fermente sucukların özelliklerinin belirlenmesi

3.1.1 Örnekler

Bu tez çalışmasının ilk kısmı, starter kültür kullanılmadan üretilen iki farklı endüstriyel olmayan geleneksel İtalyan sucuğunun özelliklerinin belirlenmesini kapsar. İtalya'nın kuzeyindeki Brescia ilinde üretilmiş Bresciano tipi sucuk ve İtalya'nın merkezinde yer alan Emilia-Romagna bölgesinde üretilmiş Romagnolo tipi ile çalışılmıştır.

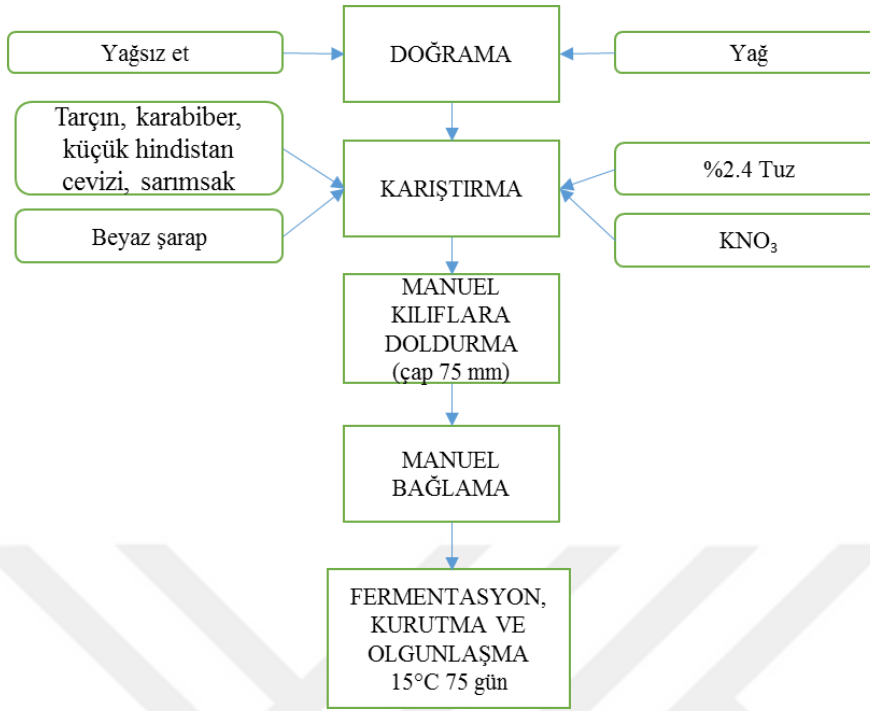
3.1.1.1 Bresciano tipi sucuk

Bresciano tip sucuk (salami Bresciano) soğutulmamış domuz eti kullanılarak üretilir (Şekil 3.1). Etin kaburga, bel, fileto, domuz yağı, iç yağı ve yastığa ait parçaları karkastan ayrılır. Etin geri kalanı yağla beraber doğranır: etin yağsız bölümünün et içeriği %75-80 arasında değişirken, yağ yüzdesi % 20-25 civarındadır. Et karışımına NaCl (%2.4 w/w), KNO₃ (%0.02 w/w) ve üreticinin tercihinine ve tecrübesine göre farklı baharatlar (tarçın, biber, hindistan cevizi), biraz sarımsak ve beyaz şarap eklenir.

Etin doğranmasından sonra (yaklaşık 4 mm), 16-18°C'de hazırlanan karışım el ile doğal kılıflara (üst taraftan çapa kadar 75 mm'ye kadar domuz kolunu) doldurulur. Ardından, ürün (yaklaşık 1 kg'lık başlangıç ağırlığı) sicim ile bağlanır ve yaklaşık üç buçuk aylık bir süre boyunca mahzende asılır, bu süre zarfında ağırlık kaybı yaklaşık % 30-35'dir. Sıcaklıklar, sucuk tüketime hazırlarken kış aylarında 6°C ile ilkbaharda 14-15°C arasında dalgalanmıştır. Şekil 3.2'de sucuğun üretim aşamaları verilmiştir.



Şekil 3.1 : Bresciano tip sucuk.



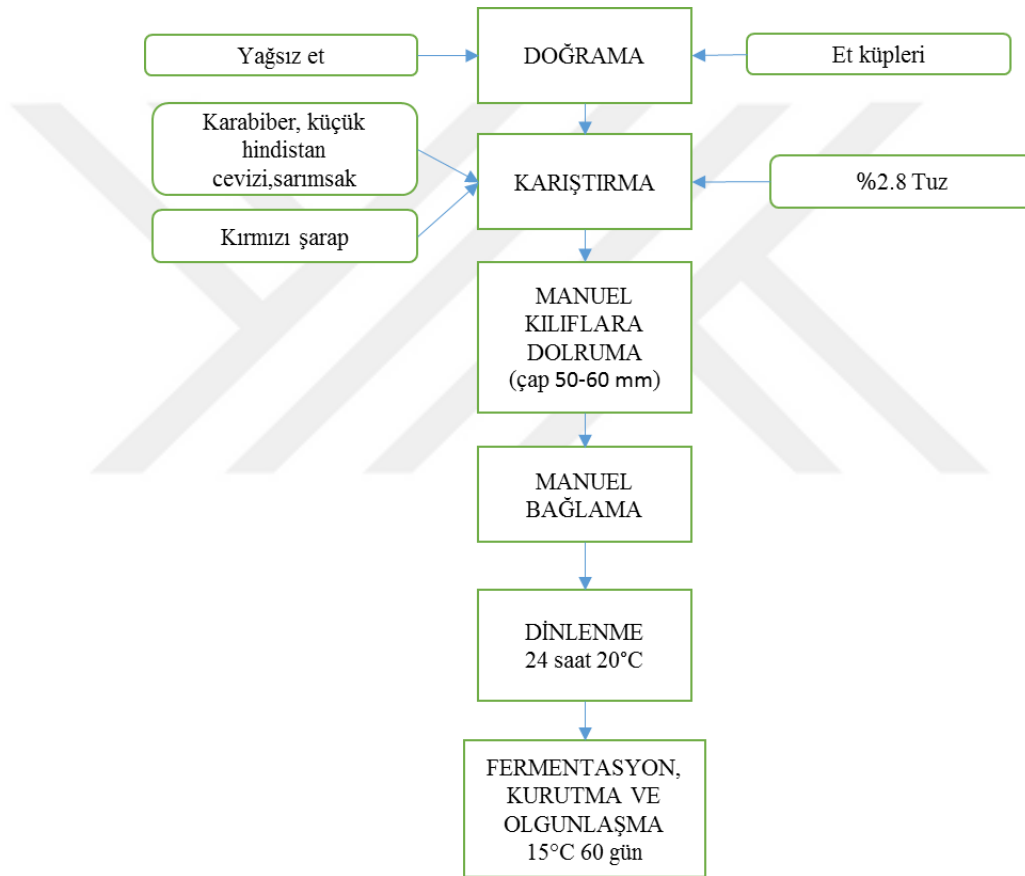
Şekil 3.2 : Bresciano tipi sucuk üretim aşamaları.

3.1.1.2 Romagnolo tipi sucuk

Seçilen domuz eti orta boyutta doğranır ve domuz yağı küpler halinde kesilerek ilave edilir. Son ürün kesildiğinde dilimde açıkça görünen bu küp yağlar, Romagnolo tipi sucuğun (salami Romagnolo) tipik görsel özelliğidir (Şekil 3.3). Bu karışımda %2.8 oranında tuz, biber (toz ve tahıllar halinde) ve soyulmuş ve ezilmiş sarımsak içeren az miktarda kırmızı şarap elekten geçirilir. Önce şarapın içine sarımsak koyulur ve ardından filtre edilir böylece sarımsağın tadı sucuğa geçmiş olur. Karışıma nitrat/nitrit tuzu eklenmez. Yağsız kısım yaklaşık %75-80 ve yağ %20-25 oranındadır. Manuel olarak domuz bağırsağına (50-60 mm çap) doldurulur ve sicim ile bağlanır. Ardından, suyun çıkmasına izin vermek için çatal ile kılıf üzerine küçük delikler açılır. Sucuklar yaklaşık 24 saat boyunca 18-20°C'de dinlenmeye bırakıldığı zaman ağırlığı 1.1-1.5 kg arasında değişir. Daha sonra yaklaşık 3 ay boyunca olgunlaşma için bir mahzende bekletilir ve sıcaklık 8°C-15°C aralığında değişkendir. Bu süre zarfında ürünler ağırlığının yaklaşık %35-38'ini kaybeder. Şekil 3.4'de de sucuğun üretim aşamaları verilmiştir.



Şekil 3.3 : Romagnolo tipi sucuk.



Şekil 3.4 : Romagnolo tipi sucuk üretim aşamaları.

3.1.2 Örneklerin su aktivitesi ve pH ölçümü

10 gram örnek 10 ml saf suya eklenmiştir ve homojenizasyon için 2 dakika boyunca stomaker (Seward Lab Blender, Londra, İngiltere) kullanılmıştır. pH ölçümü için Basic 20 pH metre (Crison Instruments, Barselona, İspanya), su aktivitesi içinse AquaLab CX3-TE (Labo-Scientifica, Parma, İtalya) kullanılmıştır. Ölçümler her iki sucuk içinde üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.1.3 Mikrobiyal sayım ve kültür ortamı

Sucukların doğal mikroflorasının tespiti için olgunlaşmanın bitiminden hemen sonra mikrobiyal sayım gerçekleştirilmiştir. Aseptik olarak kılıfın sucuğun üzerinden kaldırılmasından sonra 10 gram örnek 90 ml %0.9 (w/v) NaCl içeren fizyolojik suya konulmuş ve homojenizasyon için 2 dakika boyunca stomakerda tutulmuştur. Tuzlu fizyolojik su ile seri onlu dilüsyonlar hazırlanmış ve seçilen kültür ortamına ekilmiştir. Sayımlar 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

MRS Agar (De Man, Rogosa and Sharpe): MRS agar laktik asit bakterilerinin sayımı için kullanılır. MRS brotha (Oxoid, Basingstoke, UK) bakteriolojik agarın (Oxoid, Basingstoke, UK) (%1.5 agar) eklenmesi ile elde edilir. 30°C 48 saat inkübasyon sonrasında plakalar tanımlanmış *Laktobacillus* izolatlarının kolonilerini içerir. MRS broth içeriği Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 : MRS Broth içeriği.

Bileşenler	g/l
Pepton	10.00
‘Lab-Lemco’ tozu	8.00
Maya ekstraktı	4.00
Glukoz	20.00
Sorbitan mono-oleato	1.00 ml
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.00
Sodium asetat 3H ₂ O	5.00
Triammonyum sitrat	2.00
Magnezyum sülfat 7H ₂ O	0.20
Magnezyum sülfat 4H ₂ O	0.05
pH	6.2 ± 0.2 a 25°C

Baird Parker Agar Base: Önce kolonilerin renklenmesi için gerekli olan Eggy Tellurite Yolk Emulsiyonu (Oxoid, Basingstoke, UK), Baird Parker agara (Oxoid, Basingstoke, UK) eklenerek birlikte sterilize edilir. Sonrasında gram pozitif kokların (*Micrococcaceae* and *Staphylococcaceae*) sayımı için yüzey yayma yöntemi kullanılarak inokülasyon gerçekleştirilir. İnkübasyon koşulları 30°C, 48 saattir. Baird Parker Agar Base içeriği Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Slanetz ve Bartley Agar: Enterokokların saptanması için yüzey yayma yöntemiyle Slanetz ve Bartley Agara (Oxoid, Basingstoke, UK), inokülasyon yapılır. İçeriği Çizelge 3.3’de gösterilmiştir. İnkübasyon koşulları 44 °C ve 24 saattir.

Çizelge 3.2 : Baird Parker Agar Base içeriği.

Bileşenler	g/l
Pankreatik öğütölmüş kazein	10.0
Et ekstaraktı	5.0
Sodyum pirüvat	10.0
Maya ekstraktı	1.0
Glisin	12.0
Lityum klorit	5.0
Agar	20.0
pH	7.2 ± 0.2 a 25°C

Çizelge 3.3 : Slanetz and Bartley Medium içeriği.

Bileşenler	g/l
Tiriptoz	20.0
Maya ekstraktı	5.0
Glukoz	2.0
Di-potasyum hidrojen fosfat	4.0
Sodium azit	0.4
Tetrazolyum klorit	0.1
Agar	10.0
pH	7.2 ± 0.2 a 25°C

3.1.4 Sucuklardaki biyojenik amin tayini

Üründeki biyojenik aminlerin kantitatif tayini, yüksek basınçlı sıvı kromatografi tekniği (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi, HPLC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Lanciotti ve diğ, 2007). İki sucuk içinde farklı noktalardan alınan 3 örnekle tekrarlanmıştır. Sucuklardaki biyojenik amin tayini ekstraksiyon, türevlendirme ve HPLC enjekte etme olarak üç adımda anlatılabilir.

Ekstraksiyon: Aminlerin ekstraksiyonu, Tabanelli ve diğ. (2013) tarafından bildirilen protokol uyarınca gerçekleştirilmiştir. Bir cam kapta 10 g öğütölmüş numune tartılır ve 20 ml trikloroasetik asit (% 5 TCA) (Sigma -Aldrich, St Louis, MO, ABD) eklenir. Su banyosunda 75°C'de 30 dakika boyunca ekstraksiyona bırakılır. Ekstrakt daha sonra 2700rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifuj edilir (rotor JA 25:50, Beckman Coulter, Milano, İtalya) ve 50 ml'lik balon şişe içinde Whatman no.1 filtre kağıdıyla (Sigma Aldrich, St Louis, MO, ABD) filtre edilir. Kalan numuneye daha sonra, bir önceki eşitleme derecesine eşit ikinci bir ekstraksiyon döngüsüne tabi tutulur. Elde edilen süzöntü % 5 TCA çözeltisi ile 50ml'lik hacme tamamlanır. Eklenen miktar dilüsyon faktörü olarak kullanılır. Bu şekilde elde edilen ekstraktlar, türevlendirmeye tabi tutulmadan önce en fazla 7 gün boyunca 4° C'de saklanabilir.

Türevlendirme: Türevlendirme reaksiyonu, Martuscelli ve diğ (2001) tarafından bildirilen protokole uygun gerçekleştirilmiştir. 10 ml'lik bir cam balona 1 ml'lik ektrakte edilmiş numune, 300 µL doymuş NaHCO₃ çözeltisi, 100 µL'lik 500 ppm'lik standart çözeltisi (1,7-diaminoeptano, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD) ve numuneyi 11.50 ± 0.01 pH değerine getirmek için değişen bir miktarda 1M KOH çözeltisi eklenir. Türevlendirilecek her numuneye HPLC için 4 mg aseton içinde 20 mg dansilklorur çözeltisi (Sigma-Aldrich, St Louis, MO., ABD) çözülerek elde edilen karışımdan 4 ml eklenir. Numuneler, karanlıkta 45 dakika boyunca (195 vuruş) 40° C'de su banyosunda karıştırmaya yerleştirilir. Bu 45 dakikanın sonunda reaksiyon, 400 µL'lik bir amonyak çözeltisi (%30 NH₃) eklenerek durdurulur. Numuneler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karanlıkta bekletilir ve daha sonra HPLC için 10ml'e gelene kadar asetonitril eklenir. Numuneler daha sonra naylon filtreler (Ø 0.22 µM) (Incofar, Modena, İtalya) ile süzülür ve küçük şişelere konur, ışıktan korunarak -20 ° C'de maksimum 7 gün saklanabilir.

HPLC'ye enjeksiyon: Numuneler, 20 µl'lik döngü ile Rheodyne manuel enjektör sistemi olan HPLC Jasco PU-2089 Plus modeline enjekte edilir. Ön-kolon(Waters Spherisorb S5 ODS2, 4,6x10mm) ve C18 ters fazlı bir kromatografik kolon (Waters Spherisorb ODS-2, 150x4,6 mm, 3 µm) kullanılır. Maksimum 25MPa basınç, 0.1 ml/min'den 0.8 ml/min'e ulaşan akış hızı ve izokratik teknik kullanır. Belirlemeler, 254 nm'de bir UV-VIS dedektörü olan Jasco UV-2070 Plus kullanılarak yapılır. HPLC analizi sırasında kullanılan eluentlerin konsantrasyon gradyenleri Çizelge 3.4'de gösterilmektedir. 3 farklı eluent kullanılmıştır bunlar buffer K₂HPO₄, HPLC için kullanılan su ve asetonitrildir (VWR Chemicals, France). Tüm numuneler için, analiz süresi, her yeni enjeksiyondan önce 10 dakika dengeleme süresi ile 25 dakika sürmektedir. Aminlerin kuantifikasyonu, farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 30, 50, 75 ve 100 ppm) standart çözeltiler olan aminler (histamin, 2-feniletilamin, tiramin, putresin, kadavrain, spermin ve spermidin) ile elde edilen external kalibrasyon eğrileri kullanılarak yapılır. Ayrıca türevlendirmenin doğru bir şekilde yapıldığından emin olmak için internal standartla oranlama yapılır. Amin miktarı mg/kg olarak ifade edilir.

Çizelge 3.4 : HPLC analizi sırasında kullanılan eluentlerin konsantrasyon gradyenleri.

Zaman (dakika)	CH₃CN (%)	K₂HPO₄ (%)	H₂O (%)
0.0	65	35	0
1.0	65	35	0
5.0	80	20	0
5.1	80	0	20
6.0	90	0	10
15.0	90	0	10
20.0	65	35	0
25.0	65	35	0

3.1.5 Sucuklarda organik asit içeriğinin belirlenmesi

Organik asitlerin tayini, bir ekstraksiyon işleminin sonucu olarak HPLC'de gerçekleştirilmiştir (Tabanelli ve diğ, 2016).

Ekstraksiyon: 10 g örneğe 20 ml 0.01 N H₂SO₄ eklenir, Omni Mikser Homojenizatör (Omni International, Warrenton, VA, ABD) ile 30 dakika 30C'de dakikada 195 vuruşla homojenize edilir bu işlemden sonra ekstraktlar Whatman no.1 filtre kağıdıyla (Sigma Aldrich, St Louis, MO, ABD) filtre edilir. Kalan numuneye daha sonra, bir önceki eşitleme derecesine eşit ikinci bir ekstraksiyon döngüsüne tabi tutulur. Elde edilen ekstrat 0.01 N H₂SO₄ ile 50ml'lik cam balonun limit çizgisine kadar doldurulur. Fazladan eklenen miktar dilüsyon faktörü olarak kullanılır.

- HPLC analizi: Ekstraktlar olduğu gibi veya opsiyonel olarak seyreltilerek enjekte edilir ve 20 µl'lik bir döngü ile Rheodyne model manuel enjektör sistemi ve bir kromatografik sütun olan Bio-Rad Aminex HPX-87H (300x7.8mm) (Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, İngiltere) ile HPLC Jasco PU-2089 Plus'da analizlenir.

Analiz, izokratik koşullar altında mobil faz 0.005M H₂SO₄, 0.6 mL/dak akış hızı ve 65°C sıcaklıkta gerçekleştirilir. Kullanılan dedektör bir UV türüdür ve analiz 210 nm'de gerçekleştirilir. Kromatografik pikler, farklı organik asitlerin (laktik asit, piruvik asit, sitrik asit, malik asit, asetik asit, osalik, formik, süksinik, propanik, butirik, alfa-chetoglutarico, fumarik) standart çözeltilerin (Sigma Aldrich, St Louis, MO, ABD) alıkonma süresi ile karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Ölçme, external standartla gerçekleştirildi.

3.1.6 Sucukların aroma profillerinin belirlenmesi

Fermente sucukta olgunlaşma esnasında oluşan uçucu bileşikler, bir katı faz mikro ekstraksiyonu ile birleştirilmiş GC-MS kullanılarak izlenmiştir (GC-MS-SPME) (Montanari ve diğ, 2016). 3 gram numune 10 mL'lik sterilize edilmiş cam balonlara yerleştirilir, PTFE/silikon septayla sızdırmaz hale getirildi ve su-buhar dengesine daha hızlı ulaşması için lif yerleştirmeden önce 10 dakika süreyle 45°C'de ısıtılır. 75 mm karboksilen polidimetil siloksan tarafından kaplanmış silica fiber (CAR/PDMS StableFlex) (Supelco, Steinheim, Almanya) baş alana yerleştirilir ve 40 dakika 45°C ısıtılmaya devam edilir. Böylece aromatik moleküllerin uygun yüzey emilimine imkan tanınır. Son konsantrasyonu 33 mg/kg olacak şekilde her numuneye ilave edilen 4-metil-2-pentanol internal standart olarak kullanılmıştır. Fiber gas kromatograf injektörüne (Agilent Technology 6890N, Network GC System), enjekte edilir. Adsorplanmış moleküller, gaz kromatografisinde 10 dakika boyunca gerçi çıkarılır. Pik tespiti için bir MS detektör 5970 MSD (Hewlett-Packard, Cenevre, İsviçre) ve bir Varian (50mx320µmx1.2µm) erimiş silika kılcal sütun ile donatılmış Agilent Hewlett Packard 6890 GC gaz kromatografisi kullanılmıştır.

Koşullar: 250 ° C enjeksiyon sıcaklığı; 250 ° C dedektör sıcaklığı ; Taşıyıcı gaz (He) akış hızı, 1 mL/dakika.

Fırın sıcaklığı aşağıdaki şekilde programlandı: 1 dakika boyunca 50°C; 4.5°C/dak'da artış hızıyla 50°C ila 65°C arası; 10 °C / dak'da artış hızıyla 65°C'den 230 °C'ye, daha sonra 25 dakika boyunca 230°C'de tutulur. Uçucu piklerin tespiti, kütle spektrum verilerinin Agilent Hewlett-Packard NIST 98 ve Wiley versiyon veri tabanında bulunan bileşiklerin bilgisayarla eşleştirilmesi ile gerçekleştirildi. Her sucuk için üç tekrar yapılmış ve GC-SPME sonuçları internal standartla oranlanarak ifade edilir.

3.2 *Lactobacillus* Suşlarının Karakterizasyonu

3.2.1 *Lactobacillus* suşlarının izolasyonu ve tanımlanması

Başlangıçta Bresciano sucuğundan 50 koloni, Romagnolo sucuğundan 100 koloni *Lactobacillus* izole edilmiştir. Her bir suş, MRS brotha (Oxoid, İngiltere) inoküle edildi ve 30°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra, hücre süspansiyonu 10 ml'lik bir plastik tüp içine aktarıldı ve Rotofix 32'de (Hettich, Tuttlingen, Almanya) 10 dakika için 3000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant elendi, pelet 1ml Skim milk (Oxoid,

Basingstoke, İngiltere) ile yeniden süspanse edildi ve böylece hücre süspansiyonu - 80°C'de tutulabilen kriyovyalarda aktarıldı. İzolatlar, aşağıda tarif edildiği gibi genetik tarama ve sonra teknolojik ve fizyolojik testler için kullanılmıştır.

3.2.1.1 DNA ekstraksiyonu

Dereceli olarak numaralandırılan saf izolatlardan DNA ekstrakte edilmiştir. Bu ekstraksiyon, 10 ml ortamda (MRS broth) 24 saat inkübe edilen saf koloniden başlayarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, 1 ml bakteri süspansiyonundan başlayarak, QIAamp DNA Stool Mini Kiti (Qiagen, West Sussex, İngiltere) kullanılarak genomik DNA çıkarılmıştır. Çıkarılan DNA, son kullanım zamanına kadar -20° C'de saklanmıştır.

3.2.1.2 RAPD parmak izi analizi

RAPD-PCR analizi, Bologna Üniversitesi Tarım, Gıda Bilimleri ve Teknolojileri Departmanı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Daha önce farklı çalışmalarda bildirildiği gibi izole edilmiş laktik asit suşlarından ekstrakte edilmiş DNA, primer M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') kullanılarak RAPD-PCR analizine tabi tutulmuştur (Cocolin ve di.,2009; Urso ve diğ, 2006; Rosetti ve diğ, 2005). Reaksiyonlar son hacim 20 µl olacak şekilde; 1,2 µl MgCl₂ (1.5 mM) (Sigma, Madrid, İspanya), 10 µl HotStarTaq Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya), 2 µl primer M13 (2µM), 5,8 µl RNase içermeyen su water (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) and 1 µl template DNA gerçekleştirilir. Amplifikasyon döngüsü şöyledir: 45 tekrar 94°C'de 1 dakika, 34°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika. 94°C'de 3 dakikada ilk denatürasyon ve 72 ° C'de son 7 dakika boyunca son uzatma gerçekleştirilir ve daha sonra örnekler, Mastercycler gradyanında (Eppendorf, Madrid, İspanya) 4°C'de tutulur. RAPD-PCR ürünleri, EtBr ile sağlanan %2 (w/v) agaroz jelleri üzerinde, 120V'de 1X Tris/Borate/EDTA'de 4 saat boyunca elektroforez ile analiz edilmiştir.

3.2.1.3 Gel Compar II kullanarak Kümeleşme

Jel görüntüleri, BioImaging System GeneGenius Sistemi (SynGene, Cambridge, İngiltere) kullanılarak dijital olarak yakalanmıştır. Bant model analizi, Gel Karşılaştırma sürüm 4.1 ile yapıldı (Applied Maths, Kortrijk, Belçika). Bant profillerinde benzerliklerin hesaplanması Dice korelasyonu ile gerçekleştirildi. Dendrogram, kümeleme aritmetik ortalamasının algoritması kullanılarak Unweighted

Pair Group Method (UPGMA) kullanılarak elde edildi. % 80'lik benzerlik korelasyon katsayısı kümeleri ayırt etmek için keyfi olarak seçilmiştir.

3.2.1.4 İzolatların moleküler tanımlanması

16S geni 2 Universal Primer kullanılarak amplifiye edildi:

27F- 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

1492R- 5'GGTTACCTTGTTACGACTT (Eurofins MWG Operon).

Elde edilen sekanslar şu çevrimiçi devre dışı bırakılabilir yazılım tarafından işlenmiştir: BioEdit Sequence Alignment Editör forward ve reverse sekansların hizalamak için Nükleotid BLAST adı verilen ilgili DNA dizisini, bilinen dizilerin olduğu bir veritabanıyla karşılaştırır, böylece benzerlikler vasıtasıyla ilgili suşun soyunun tanımlanmasını mümkün kılar.

3.2.2 Suşların farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişme ve asidifikasyon karakteristiği

Bu deneyin amacı dört farklı (%0, %2.0, %4.0 and %6.0) tuz konsantrasyonunda *Lactobacillus* suşlarının gelişme ve asidifikasyon karakteristiğini anlamaktır (Vermeiren ve diğ, 2004, Amadoro ve diğ, 2015).

İzolatlar 30°C'de 24 saat MRS brotta inkübe edilmiş ve 24 saatin sonunda vortexlendikten sonra steril pipetle 100µl inokulum alınıp yeni MRS brota inoküle edilir ve 30°C'de gece boyu inkübasyona bırakılır. İnkübasyon periyodu sonunda canlı hücre sayımı her suş için plate count metotla belirlenmiştir. Gece boyu inkübe edilen suşların 8 log CFU/ mL olduğu sayılmıştır. Bu deneyde kullanılmak amacıyla suşlar 6 log CFU/mL'e kadar seyreltilmiştir.

Farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişme kabiliyetini anlamak amacıyla %0, %2.0, %4.0 ve %6.0 NaCl ile ayarlanmış MRS brotlar 96 well microarray plakalara (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) aktarılır. Bu mikropalakalar 12 dikey, 8 yatay olmak üzere 96 küçük bölgeden oluşmaktadır. Her bir yatay sıra bir suşa tanımlanmış ve 3 kontrol olduğundan 3 dikey sıra bir konsantrasyon için kullanılmıştır. 200 µl farklı konsantrasyondaki MRS broth her bölgeye aktarılmış ve her suş için 20µl inokula ekilmiştir. T₀(0.saat) için mikropalete ekilmiş her suştan 100 µl eppendorflara aktarılıp PBS solusyonu (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) ile seyreltildikten sonra dörte ayrılmış MRS agara farklı seyreltme seviyelerinde 10µl ekilerek 30°C inkübasyona

bırakılmıştır. T₂₄ (24 saatlik inkübasyon sonrası) içinse yine T₀ için gerçekleştirilen seyreltme işlemleri yapılmıştır. Ayrıca Basic 20 pH metre (Crison Instruments, Barselona, İspanya) ile 24 saat sonundaki pH değişimleri takip edilmiştir. Bazı suşlar için 48 saatteki gelişme ve pH değişimleri de takip edilmiştir.

3.2.3 Suşların biyojen amin üretme kabiliyeti

Tanımlanan suşlar, Bover-Cid broth vasıtasıyla biyojenik aminlerin üretimi için taramaya tabi tutulmuştur (Bover-Cid & Holzapfel, 1999). MRS broth temel alınarak geliştirilen yeni brotha, biyojenik amin oluşumundan kaynaklanan pH artışının etkisini yok edebilecek aşırı asit üretimini önlemek için glikoz konsantrasyonun %0.05'e düşürülmüştür. Ayrıca, tuz konsantrasyonu biraz daha düşüktür. Laktik asit bakterilerinin gelişimini arttırmak için Mg (% 0.02), Mn (% 0.005) ve Fe (% 0.004), Tween 80 (% 0.1) ve amonyum sitrat (% 0.2) gibi metal sülfatlar dahil edilmiştir. Bazı *Lactobacillus* suşları (özellikle heterofermentatif LAB), gelişmek için tiamine ihtiyaç duyduğundan % 0.001 oranında tiamin eklenmiştir. Tampon etkisini arttırmak ve üretilen asit nötralize etmek için % 0.2 di-potasyum fosfat ve % 0.01 kalsiyum karbonat ilave edilmiştir. Ayrıca, dekarboksilasyon reaksiyonu için bir kofaktör olarak varlığı aminoasit dekarboksilaz etkinliği üzerinde güçlü bir arttırıcı etkiye sahip olduğu için, piridoksal-5-fosfat dekarboksilaz ortamına dahil edilmiştir. Yeni tasarlanan bovercid brotha 4 farklı beherde %1 konsantrasyonda histidin, ornitidin, lizin ve tirosin, fenilalanin karışımı eklenmiştir. 4M HCl ile pH 5.3'e ayarlandıktan sonra 121° C'de 10 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra, 4 farklı amino asit içeren beherlerden 5ml falcon tüplerine aktarılmıştır. Daha önceden 30°C'de 24 saat inkübe edilmiş *Lactobacillus* suşlarından 200µl falcon tüplerine (histidin, ornitidin, lizin ve tirosin, fenilalanin içeren dört ayrı falcon tüpü) inoküle edilmiş ve 48 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. Bu işlemin dört kez tekrarlanmasından sonra üç farklı adım izlenmiştir. İlk olarak son tekrardan alınan 200 µl suş yeni aminoasit eklenmiş 7 ml bover-cid brotha inkübe edilir. İkinci adımda son tekrardaki her falcon tüpünden 50µl alınarak toplam 200 µl beş amino asidin karışımı olan inoculum, MRS içeren falcon tüpüne konur. Bu işlem her suş için gerçekleştirilir ve aslında ilk aşamanın kontrolü olarak yapılır. Son aşamada ise son tekrardan alınan 100 µl suşlar farklı aa içeren Bover-sid (%2 agar) plakalarına yayılır biyolojik amin üretimi arasındaki farkı anlamak için hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında inkübe edilir. Bu aşamaların sonucunda eğer mor renk görülürse bu bize aminoasitlerden biyojenik amin

oluşturduğunu gösterir. Mor renkteki tüp 6000rpm 10 min santrifüjlenir. Bu mor renkteki biyojenik amin üretici olduğu tahmin edilen pozitif suşların supernatantları türevlendirilir ve pozitiflik teyidi için sucukta biyojenik amin analizi prosedüründeki aynı koşullarla HPLC'de analizlenir.

3.2.4 Suşların aromatik profili

İzole edilen *Lactobacillus* suşları MRS brotha 48 saat 30°C'de inkübe edildikten sonra 5ml yeni MRS brotha her suş için 50µl transfer edilir. Dikkat edilmesi gereken nokta, son konsantrasyonun 3×10^6 CFU/mL olmasıdır. Bu aşamadan sonra sucuktaki aromatik profil için kullanılan analiz prosedürü kullanılır. SPME-GC-MS kullanılarak aromatik profil belirlenir. Her suş için üç tekrar yapılmıştır.

3.2.5 Bresciano sucuğundan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

İndikatör suşlar (*Listeria monocytogenes* DPC 1768, *Listeria innocua* DPC 3572, *Clostridium perfringens* DSM 756, *Clostridium difficile* DPC 6534, *Salmonella enterica* spp. *Typhimurium* DPC 6046, *E.coli* DPC 6054) Bologna Üniversitesi Tarım, Gıda Bilimleri ve Teknolojileri Departmanına ait kütüphaneden alınmıştır.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi spot test ve cell free supernatant test olarak iki farklı yöntem gerçekleştirilmiştir. İndikatör suşların gelişimi için BHI broth, *Lactobacillus* suşları için MRS ve modifiye MRS broth kullanılmıştır (Oxoid, Basingstoke, UK).

3.2.5.1 Spot test

Antagonistik aktivitenin tespiti için spot agar test kullanılmıştır (Mezaini ve diğ, 2009). Dondurulmuş kültürlerden az miktarda steril bir inokülasyon halkası kullanarak MRS agara yayılır ve gece boyunca (18-20s) 30°C'de inkübe edilir. Gece boyunca inkübe edilen MRS agardan bir koloni MRS brotha transfer edilir ve 30°C 24 saat inkübe edilir. Aynı işlem *L. innocua*, *L.monocytogenes*, *Salmonella* ve *E.coli* indicator suşları için BHI broth (BHI, Fisher Scientific, ON, Kanada) kullanılarak uygulanır ve gece boyunca 37°'de inkübasyona bırakılır. Belirlenen inkübasyon periyodundan sonra canlı hücre sayıları plaka sayımı yöntemi ile tespit edilir.

Antimikrobiyal bileşiğin üretimi için test edilecek MRS brothdaki *Lactobacillus* izolatları 10 dakika süreyle 30000 rpm'de santrifüj edilir. Supernatant atılır. Plaka

kurduğunda 10 µl izolat peleti MRS agar plakalarının yüzeyine steril pipetle halka halinde ve 24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilir.

Her indikatör suşun (yaklaşık 9 log CFU/mL) 100 µl'si 10 ml yumuşak %0.7 BHI agara aşılanmış ve homojenleştirmeden sonra MRS plakaları üzerine dökülmüştür.

Kontrol olarak spot test uygulanmamış MRS plakalarının üzerine, indikatör içeren BHI yumuşak agar dökülür. Böylece MRS agarın, BHI yumuşak agara inoküle edilmiş patojenler üzerinde antimikrobiyal etkinliği olup olmadığı tespit edilir. Tüm plakalar 37 ° C'de 24 saat inkübe edildi ve daha sonra inhibitör zonlarının mevcudiyeti kontrol edildi. İnhibisyon, üretici suşun kolonileri etrafındaki berrak bölgenin genişliği 0,5 mm veya daha büyükse, pozitif olarak puanlandı.

3.2.5.2 Cell free supernatant test

Üretilen bakteriyosinlerin tespiti, cell free supernatant test kullanılarak incelendi (Yang ve diğ, 2012, Schillinger ve diğ, 1989). Bakteriyosin üretimi için en iyi koşulları optimize etmek için farklı koşullar ve kültür ortamları denenmiştir. Deney, 25°C ve 30°C'lik iki farklı sıcaklıkta ve iki farklı ortamda MRS ve mMRS broth gerçekleştirildi. Suşların stres altında bakteriyosin üretiminin arttığı bilindiği için düşük glikoz içeren mMRS broth kullanılmış ve 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. MRS içinse farklı inkübasyon sıcaklıkları ve dereceleri denenmiştir bunlar 18 saat için 25 ve 30°C'de, 24 saat için 30°C'dir.

Supernatant elde için MRS/mMRS'e inkübe edilmiş suşlar inkübasyondan sonra 10 dakika 15000 rpm'de santrifüjlenir. Supernatant, 1 N NaOH ile pH 7'ye nötralize edilir ve 0.22mm filtre kullanılarak (membran GV Millipore - 0.22 mm) sterilize edildi.

Bu test optimizasyon aşamasında olduğu için sadece iki indikatör suşla çalışılmıştır. Dökme plakalar, 10µ CFU/mL *L. innocua*, *L.monocytogenes* BHI agara (%1 agar) ekilmiştir. Steril halkalarla plakalara delikler açılır. Bu delikler kültür 50µl izolatların supernatantlarıyla doldurulur. Plakalar gece boyunca 30°C'de inkübe edilir. İnhibisyon, supernatantla ile doldurulmuş halka şeklindeki deliklerin etrafındaki zonların varlığıyla tespit edildi.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, aşağıdaki paketleri kullanarak R yazılımı ile gerçekleştirildi: lattice, graphics, lawstat, car, agricolae, foreign, dunn.test, ggplot2 (R Çekirdek Ekip,

2016). Normal ve homojen veriler tek yönlü ANOVA ve Bonferroni düzeltmeli Tukey post-hoc testi ile analiz edildi. Normal olmayan homojen veriler nonparametrik Kruskal-Wallis testi ve Dunn's post-hoc testi ile Bonferroni düzeltmesi ile analiz edildi. MRS ortamındaki her bir suş için tespit edilen aroma profili ile ilgili olarak, principal component analyses (PCA) Statistica 8.0 (StatSoft Italy srl, Vigonza, İtalya) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm analizler 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Spontane Fermente Sucukların Özellikleri

Bu tez çalışması, starter kültür kullanılmadan üretilen iki farklı endüstriyel olmayan sucuğun karakterizasyonunu kapsar. İtalya'nın kuzeyindeki Brescia ilinde hazırlanmış Bresciano tipi sucuk (Örnek B) ve İtalya'nın merkezinde yer alan Emilia-Romagna bölgesinde hazırlanmış Romagnolo tipi sucuk (Örnek R) ile çalışılmıştır. Çizelge 4.1 bu sucukların özelliklerini göstermektedir. Romagnolo tipi sucuk, nitrat/nitrit içermezken, Bresciano tipi sucuğa %0.02 KNO₃ eklenmiştir. Ayrıca, örnek R'nin daha küçük boyutundan (80 mm çaplı numune B yerine, 55 mm çapında) dolayı, olgunlaşma süresi 75 gün yerine 60 gündür. Sucuğun boyutu doğal kılıf türüne bağlıdır: Bresciano için domuz kolonu ve Romagnolo için domuz rektumu kullanılmıştır. Bresciano'da yağ ve yağsız kısım homojen biçimde dağılırken diğer sucukta domuz yağı küp formunda bulunur. İki sucuğu da baharat ve şarap eklenmiştir ancak şeker eklenmemiştir.

Çizelge 4.1 : Üretimden hemen sonra Bresciano tipi sucuğun (örnek B) ve Romagnolo tipi sucuğun (örnek R) özellikleri. Yüzdelere ve karışımındaki oran olarak gösterilir.

Özellikler	Örnek B	Örnek R
Çap (mm)	80	55
% NaCl (w/w)	2.4	2.8
nitrate/nitrite	KNO ₃ (0.02%)	-*
Yağ oranı (%)	25	20 (küp katı yağ)
Kıyma boyutu (mm)	4	3
Olgunlaşma süresi (gün)	75	60
Olgunlaşma sonunda ağırlık kaybı	30%	35%
Kılıf tipi	Doğal kılıf (domuz kolonu)	Doğal kılıf (domuz rektumu)
Kullanılan baharatlar	Tarçın, karabiber, hindistan cevizi, sarımsak	Karabiber, hindistan cevizi, sarımsak
% Baharat (w/w)	0.7%	0.8%
Şarap (w/w)	Beyaz şarap (0.8%)	Kırmızı şarap (1.2%)

Çizelge 4.2’de bazı mikrobiyolojik parametreler, pH ve a_w , laktik ve asetik asit konsantrasyonu ile iki sucuktaki biyojenik amin konsantrasyonunu gösterilmektedir. Romagnolo’da (0.853) su aktivitesi özellikle düşük, Bresciano’da ise (0.908) daha yüksektir. Romagnolo’da su aktivitesinin düşük olmasının sebebi yarıçapının daha küçük olmasından kaynaklanıyor olabilir (Parente ve diğ, 2001). İki sucuk yapımında da şeker kullanılmadığı ve yavaş fermentasyon gerçekleştiği için başlangıçtaki pH düşüşü kısıtlı olmuştur bu nedenle de Bresciano (6.19), Romagnolo (6.01) gibi yüksek pH değerlerine sahiptir. Akdeniz bölgesinde üretilen tipik fermente sucukların son pH değerleri genellikle 5.3-6.2 arasındadır (Aymerich ve diğ, 2003). Comi ve diğerlerinin (2003), domuz eti, yağı, sodyum klorür karışımı, kara biber, nitrit/nitrat ve şeker kullanıp starter kültür kullanmadan kuzeydoğu İtalya’da olarak geleneksel tekniklerle ürettiği sucukların son pH’ı ve su aktivitesi sırasıyla 5.6-5.7 ve 0.91-0.92 aralığındadır. Romagnolo’nun Bresciano’ya göre daha düşük pH’a sahip olmasının nedeni eklenen şarap miktarı ile ilişkilendirilebilir. Coloretto ve diğ.(2013) çalışmasında %7.5 beyaz şarap içeren sucuğun pH değeri (5.7) ve olgunlaşma sonundaki ağırlık kaybı (%41) %15 beyaz şarap içeren sucuğun pH değeri (yaklaşık 6.0) ve ağırlık kaybından (%47) daha düşüktür. Bu fark daha fazla şarap içeren sucuğun yüksek su içeriğinden kaynaklanır. Organik asitlerin varlığı pH değerlerini teyit eder: iki sucuğun laktik asit konsantrasyonu benzerdir, asetik asit konsantrasyonuna bakıldığında ise Romagnolo daha yüksek bir asetik asit konsantrasyonu (0.37 g/kg) gösterir; Bresciano da ise bu asitin daha düşük bir konsantrasyonda olduğu görülür (0.08 g/kg). Mikrobiyolojik parametrelere bakıldığında ise Bresciano’da yüksek konsantrasyonda laktik asit bakterileri (9.09 log CFU/g); Romagnola da ise aynı bakterilerin daha düşük bir konsantrasyonda olduğu görülür (7.79 log CFU/g). Bu fark muhtemelen bu ürünlerin arasında su aktivitesi farkından kaynaklanır. Stafilocok içinse analiz edilen iki sucuk değerleri istatistiksel olarak farklı olmasına rağmen yaklaşık değerler (yaklaşık 7 log CFU/g) bulundu, oysa Enterokoklar sadece B örneğinde (4.23 log CFU/g) bulunur. Akdeniz bölgesindeki geleneksel fermente et ürünlerinin doğal mikrobiyotası laktik asit bakterilerinden Laktobasil, Enterokok ve koagülaz negatif Stafilokoklardan oluşur. Et fermentasyonunda Enterokok popülasyonu kullanılan etin zayıf hijyenik kaliteye sahip olduğuna işaret eder. Martin ve diğ. (2001) çalışmasında kuzey İspanya’da farklı marketlerden alınmış 31 doğal fermente edilmiş sucuktaki Enterokok popülasyonu 1.3 ile 4.48 log cfu/g ve toplam laktik asit popülasyonu 7.12 ile 9.07 log cfu/g arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.2 : Mikrobiyolojik sayımlar, kimyasal-fiziksel özellikler ve organik asit ve biyojenik amin içeriği. Parantez içinde standart sapma rapor edilmiştir. ANOVA’da fark anlamlı ($p < 0.05$) olduğu zaman yıldız(*) ile gösterilmiştir.

Genel özellikler	Örnek B	Örnek R
Laktik asit bakterisi (log CFU/g)*	9.09 (± 0.06)	7.79 (± 0.22)
Staphylococci (log CFU/g)*	6.75 (± 0.11)	7.09 (± 0.04)
Enterococci (log CFU/g)*	4.23 (± 0.37)	<1
pH	6.19 (± 0.04)	6.01 (± 0.03)
Aw	0.908 (± 0.003)	0.853 (± 0.002)
Tiramin (mg/Kg)*	170.77 (± 2.69)	141.59 (± 4.59)
Putresin (mg/Kg)*	129.37 (± 3.97)	110.03 (± 3.23)
Kadaverin (mg/Kg)*	93.47 (± 0.56)	53.73 (± 3.34)
Feniletilamin (mg/Kg)	9.32 (± 0.67)	9.08 (± 0.40)
Laktik asit (mg/Kg)	4440.3 (± 98.09)	4283,03 (± 43.19)
Asetik asit (mg/Kg)*	106.7 (± 8.66)	391.35 (± 23.32)

Genel olarak, Bresciano'daki tüm aminlerin değerleri Romagnolo'dan biraz daha yüksektir. Bu iki sucuk için eklenen tuz miktarlarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Tuz dekarboksilaz aktivitesine sahip istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini önlemek ve beraberinde biyojenik amin oluşumu minimize etmek için et endüstrisinde yaygın olarak kullanılır (Suzzi ve Gardini, 2003). Laranjo ve diğ. (2017) çalışmasında görülmüştür ki sadece işleme sürecinde değil son üründe de tuz miktarının azaltılması biyojenik amin oluşumunun artmasına neden olur. Ayrıca Bresciano'nun çapının daha geniş olması da yüksek amin miktarına sahip olmasına neden olabilir. Parente ve diğ (2001) yaptığı çalışmada sucuk çağıının büyük olması fermentasyon prosesini etkilediği daha fazla anaerobik ortam sağladığı bu sebeple de daha fazla biyojenik amin oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Tiramin, putresin, kadaverin değerleri istatistiksel olarak farklı çıkmıştır. İki sucukta da histamine rastlanmamıştır. EFSA(2011) bilimsel çalışmasında araştırılan Avrupa’da üretilen sucuklardaki ortalama tiramin ve putresin değeri sırasıyla 136 mg/kg ve 84.2-84 mg/kg’dır. Bu değerler Romagnolo ve Bresciano örneklerindeki tiramin ve putresin değerlerinden daha fazla olmakla beraber zararlı seviyede değildir. Tiramin genel olarak fermente sucuklarda en sık görülen ve bol miktarda bulunan biyojenik amindir (De mey ve diğ., 2014). Fermente sucuklarda tiramin çoğunlukla laktik asit bakterileri

ve nadiren koagülaz stafilokoklardan oluşan fermentatif mikrobiyal popülasyon tarafından üretilir (Talon ve Leroy, 2011). Ansorena ve diğ. (2002) çalışmasına göre Kuzey Avrupadaki et ürünlerindeki tiramin seviyesi Akdeniz ülkelerine göre daha düşüktür. Çalışmada İtalyan sucuklarındaki tiramin konsantrasyonu ortalama 187 mg/kg bulunmuştur. Bu İtalyan sucuklarında tiramin üretiminden sorumlu starter olmayan laktik asit bakterileri ve pediokoklardan kaynaklı olabilir. Suzzi ve Fausto (2003) çalışmasında kuru fermente İspanyol sucuklarında tiramin konsantrasyonu 200 mg/kg, putresin konsantrasyonu ise 450 mg/kg 'a kadar çıkabilmiştir. Putresin ve kadaverinin oluşumu da oldukça yaygındır ancak tiramine göre daha değişkendir. Kadaverin ve putresin sırasıyla lisin ve ornitin genellikle enterobakterler tarafından ve dekarboksilaz aktiviteye sahip laktik asit bakterileri tarafından dekarboksilasyonu ile ilişkilendirilir (Martin ve diğ., 2006). Bakterilerin amino asitleri dekarboksile etme kabiliyeti türden daha çok suşa bağlı olarak değişir (Duru-Özkaya ve diğ., 2001). Örneklerdeki feniletilamin miktarı düşük seviyededir. Feniletilamin ve triptamin fermente sucuklarda oluşan minör aminlerdir. Birikimleri, bazı laktik asit veya koagülaz negatif stafilokoklardan kaynaklanan yüksek tiramin içeriğinin görülmesine bağlı olarak oluşmaktadır (Vidal-Carou ve diğ., 2007). İyi hijyen koşullarının ve üretim proseslerinin eksikliğinden kaynaklı istenmeyen mikrobiyal aktiviteyle alakalı olarak değişen hijyenik index biyojenik aminlerin oluşumunu etkilemektedir (Latorre-Moratalla ve diğ., 2010). Fermente et ve et ürünlerinde biyjenik amin oluşumunu etkileyen bir çok faktör vardır bunlar hammadde (etin kompozisyonu, boyutu, sucuğun formülasyonu), katkı maddeleri (tuz, şeker, nitritler), üretim prosesi (pH, redox potansiyeli, sıcaklık), starter kültür kullanımı fermantasyon süresi, saklama koşullarıdır. Bu faktörler mikrobiyal gelişimi ve mikroorganizmalara arasındaki etkileşimi etkilediği gibi asidifikasyon, proteolizi ve dekarboksilaz enzim aktivitesini de etkiler (Ruiz-Capillas ve diğ, 2012, Latorre-Moratalla ve diğ., 2012). Parente ve diğ (2001) yaptığı çalışma göstermiştir ki starter kültür kullanarak üretilmiş endüstriyel sucuklardaki biyojenik amin birikimi starter kültür kullanılarak geleneksel yöntemlerle üretilen sucuklardan daha düşük değildir ve ticari starter kültürler her zaman biyojenik amin oluşumunu engellemez.

4.1.1 Sucukların aroma profili

Çizelge 4.3'te sucukların aroma profili verileri verilmiştir. Veriler, pik alan ile 33 mg/kg konsantrasyonda eklenen internal standart (4-metil-pentanol) arasındaki oran olarak ifade edilmiştir. Bu profiller birbirinden oldukça farklı olmasına rağmen iki sucukta da lipit oksidasyonu sırasında üretilen yüksek miktarda aldehit görülmektedir (Bianchi ve diğ., 2007). Özellikle, Bresciano'da (örnek B) en önemli aroma bileşiği, aromatik aminoasitlerin metabolizmasından gelen benzenasetaldehittir (Bolumar ve diğ., 2006). Bresciano'da yüksek konsantrasyona sahip diğer bileşikler fenetilalkol ve benzaldehittir. Aromatik bir aldehit olan benzaldehit sucuğa badem ve keskin kokuyu veren bileşiktir (Montel ve diğ., 1998). Fenilalanin önce aminotransferaz ile fenilpiruvik asite sonrada bu ketoasit benzaldehite dönüşür (Nierop ve diğ., 1998). Masson ve diğ. (1999) çalışmasında görülmüştür ki bu dönüşüm mikroorganizmalar tarafından sağlanmaktadır. Romagnolo'da ise en temsili bileşikler benzenasetaldehit ve etanoldür. Bresciano'dan farklı olarak, bu sucukta yüksek miktarda ester bulunmuştur. Bu, kısmen et karışımına şarap eklenmesiyle açıklanabilir (daha düşük miktarda olsa bile Bresciano türüne de eklenir) (Feng ve diğ., 2016); ester varlığının bir başka nedeni, yüksek asit konsantrasyonu ve özellikle asetik asit ve 3-metil-bütanoik asit ile ilişkilendirilebilir. 3-metil-bütanoik asit dallanmış zincirli amino asidin metabolizmasından türetilir (Montanari ve diğ., 2016). Etil asetat ve etil bütanat, alkol oksidasyonundan ya da alkollerin ve asitlerin esterifikasyonundan açığa çıkabilir (Edwards ve diğ., 1999) ve lezzete olgun ve meyveli not vererek katkıda bulunur (Demeyer ve diğ., 2000). Romagnolo'dan farklı olarak, Bresciano'da 4-metil-2-hekzanon, 4-metil-3-penten-2-on, benzaldehit, 2-bütanol, 1-okten-3-ol, 2-etil-1-hekzanol bileşikleri görülmüştür. 1-okten-3-ol, mantar benzeri kokudan sorumludur (Olivares ve diğ., 2009) ve genellikle lipit hidroperoksitlerin bozunumundan kaynaklanmaktadır (Meynier ve diğ., 1999). Buna ek olarak, aseton ve etanol yüksek konsantrasyonlarda tespit edildi ve bunların varlığı, amino asitler, laktik asit veya lipitlerin karıştığı birkaç metabolik yoldan gelebilmektedir (von Wright ve Axelsson, 2011). İzolösin ve lösin, Stecker degradasyonu ile oluşan dallanmış kısa zincirli aldehitler olan önemli aroma bileşikler 2- ve 3-metilbutanalın öncül maddeleri olarak kabul edilir (Demeyer ve diğ., 2000). 3-metil-butanal kuru fermente sucukların malt ama meyveli lezzetinin önemli bir olarak kabul edilir (Montel ve diğ., 1998). Oksidasyon belirteci olarak görülebilen hekzanal en doymuş doymuş lineer aldehittir

(Bianchi ve diğ., 2007). Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında sentezlenir ve yeşil yaprak kokusu verir (Flores ve Olivares, 2007).

Çizelge 4.3 : Spontan fermente edilmiş sucuklardaki aroma bileşikleri, SPME-GC-MS tekniği ile tespit edilmiştir. Parantez içinde standart sapma rapor edilmiştir. ANOVA anlamlı olduğunda ($p < 0.05$) yıldız bildirilmiştir.

Uçucu bileşikler	Örnek B	Örnek R
Aseton	3.50 (± 0.60)	2.78 (± 0.26)
2-butanon	0.58 (± 0.12)	0.32 (± 0.05)
2-pentanon	0.14 (± 0.07)	0.19 (± 0.05)
Metil isobutil keton	0.63 (± 0.24)	0.29 (± 0.03)
4-metil-2-hekzanon*	0.13 (± 0.03)	-
4-metil-3-penten-2-on*	0.27 (± 0.10)	-
Ketonlar	5.26 (± 1.12)	3.58 (± 0.31)
3-metil butanal	0.33 (± 0.07)	0.28 (± 0.10)
Hekzanal*	0.26 (± 0.04)	1.58 (± 0.58)
Benzaldehit*	2.98 (± 0.02)	-
Benzeneasetaldehit*	22.26 (± 2.78)	12.24 (± 2.33)
Aldehitler	25.82 (± 2.78)	14.10 (± 2.82)
Isopropil alkol	0.33 (± 0.07)	0.35 (± 0.17)
Etil alkol	4.70 (± 0.20)	6.12 (± 1.06)
2-butanol*	0.56 (± 0.07)	-
1-okten-3-ol*	0.57 (± 0.09)	-
2-etil-1-hekzanol*	1.91 (± 0.50)	-
Feniletil alkol*	3.10 (± 0.26)	0.77 (± 0.25)
Alkoller	11.18 (± 1.00)	7.24 (± 1.47)
Etil asetat*	-	0.17 (± 0.05)
Etil butanoat*	-	0.12 (± 0.04)
3-metil butanoat*	-	0.44 (± 0.13)
Esterler	-	0.73 (± 0.22)
Asetik asit*	-	1.23 (± 0.02)
3-metil butanoik asit*	-	3.18 (± 0.81)
Asitler	-	4.41 (± 0.81)

4.2 *Lactobacillus* Suşlarının Karakterizasyonu

4.2.1 *Lactobacillus* suşlarının izolasyonu ve tanımlanması

Kümeleme analizi DICE katsayısı ile gerçekleştirildi ve UPGMA kümeleme algoritması için % 80 benzerlik oranı seçildi. Bresciano sucukinden izole edilen 50 izolattan kümeleme analizinden sonra, 6 küme ve 5 tek suş elde edildi ve daha sonra 11 suş seçildi (Şekil A.1). 9 *Lactobacillus sakei* ve 2 *Lactobacillus curvatus* tanımlandı. Romagnolo sucuğundan izole edilmiş 100 izolattan kümeleme analizinden sonra, 20 küme elde edildi ve daha sonra 20 suş seçildi (Şekil A.2). 16 *Lactobacillus sakei* ve 4 *Lactobacillus curvatus* tanımlanmıştır (Şekil 4.1).

Comi ve diğ.(2005) yaptığı çalışmada İtalya'nın Friuli Venezia Giulia bölgesinde starter kültür eklenmeden üretilmiş geleneksel fermente sucuklardan 150 laktik asit bakterisi izole edilmiş ve moleküler metotlarla bu suşlar *L. sakei* ve *L.curvatus* olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızdaki sonuçlar daha önceki araştırmalarla uyumlu olarak *L.sakei* ve *L.curvatus*'un fermente sucuk ortamına en iyi adapte olan türler olduğunu göstermiştir (Aymerich ve diğ, 2003, Parente ve diğ, 2001, Papamanoli ve diğ, 2003).

4.2.2 Suşların farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişme ve asidifikasyon karakteristiği

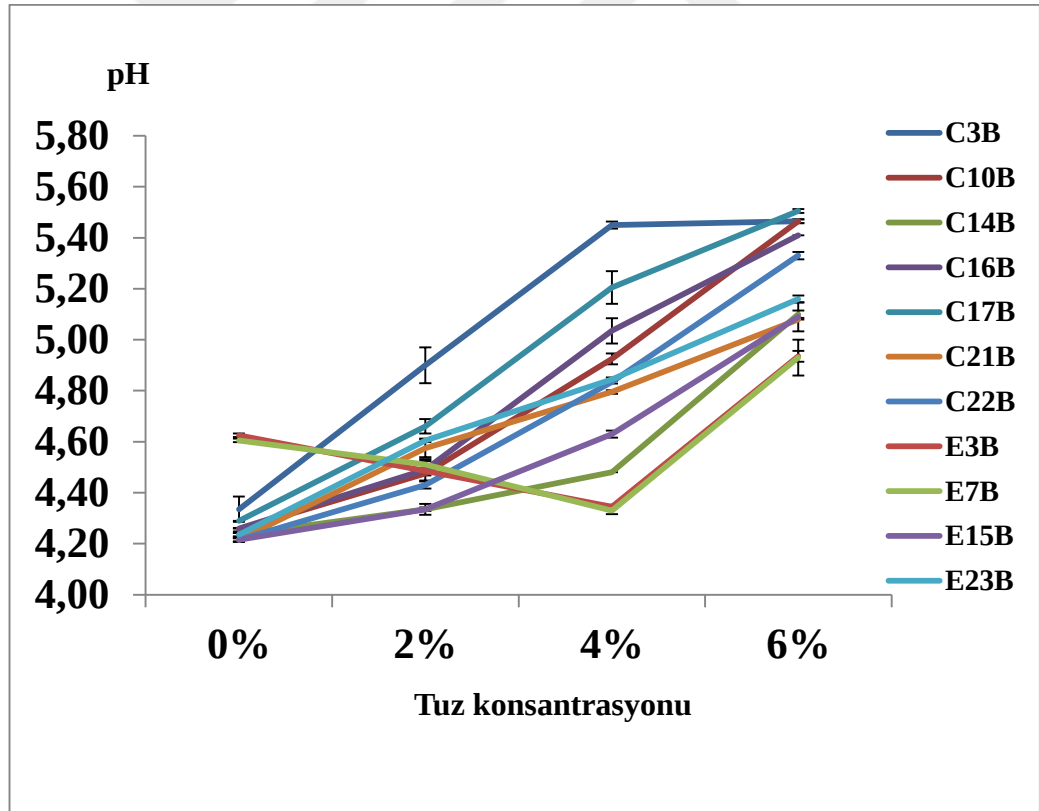
24 saatlik inkübasyon sonunda Bresciano suşundan izole edilen suşların %0, %2, %4, %6 NaCl içeren MRS brotundaki pH değişimleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2'te gösterilmiştir. Her suş için üç tekrar yapılmıştır ve tabloda tekrarların ortalamaları ve standart sapmaları gösterilmiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarıyla ayarlanmış MRS brothun pH ile karşılaştırıldığında tüm suşların brothun pH'ını düşürdüğü yani ortamı asitlendirdiği görülmektedir. E3B ve E7B dışındaki tüm suşların artan tuz konsantrasyonuyla ters orantılı olarak asidifikasyon aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir. E3B ve E7B %4 tuz konsantrasyonuna kadar asitliği arttırırken %6'da asitliği azaltmıştır. Bu olay E3B ve E7B'nin farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimine bakıldığında da görülmektedir (Çizelge 4.5). Ancak MRS broth ile karşılaştırıldığında %6 tuz konsantrasyonunda ortamı en iyi asitlendiren de yine bu suşlardır. Tüm suşlar için gelişme arttıkça asitlenme artmış ve pH düşmüştür.

Kod	Brescia’ndan izole edilen <i>Lactobacillus</i> türleri	Kod	Romagnolo’ndan izole edilen <i>Lactobacillus</i> türleri
C3B	<i>Lactobacillus sakei</i>	C10G	<i>Lactobacillus sakei</i>
C10B	<i>Lactobacillus sakei</i>	C12G	<i>Lactobacillus sakei</i>
C14B	<i>Lactobacillus sakei</i>	C16G	<i>Lactobacillus sakei</i>
C16B	<i>Lactobacillus sakei</i>	C21G	<i>Lactobacillus sakei</i>
C17B	<i>Lactobacillus sakei</i>	C22G	<i>Lactobacillus sakei</i>
C21B	<i>Lactobacillus sakei</i>	C26G	<i>Lactobacillus curvatus</i>
C22B	<i>Lactobacillus sakei</i>	C27G	<i>Lactobacillus sakei</i>
E3B	<i>Lactobacillus sakei</i>	C45G	<i>Lactobacillus sakei</i>
E7B	<i>Lactobacillus curvatus</i>	C48G	<i>Lactobacillus sakei</i>
E15B	<i>Lactobacillus sakei</i>	E1G	<i>Lactobacillus sakei</i>
E23B	<i>Lactobacillus curvatus</i>	E3G	<i>Lactobacillus sakei</i>
		E8G	<i>Lactobacillus curvatus</i>
		E13G	<i>Lactobacillus sakei</i>
		E15G	<i>Lactobacillus sakei</i>
		E17G	<i>Lactobacillus curvatus</i>
		E18G	<i>Lactobacillus curvatus</i>
		E19G	<i>Lactobacillus sakei</i>
		E22G	<i>Lactobacillus sakei</i>
		E26G	<i>Lactobacillus sakei</i>
		E28G	<i>Lactobacillus sakei</i>

Şekil 4.1 : Brescia ve Romagnolo sucuklarından izole edilen suşlar arasından seçilen sekanslanmış suşlar.

Çizelge 4.4 : 24 saatlik inkübasyon sonunda Bresciano suşundan izole edilen suşların MRS brotundaki pH değişimlerinin ortalaması ve standart sapmaları.

	%0	%2	%4	%6
C3B	4.34(±0.05)	4.90(±0.07)	5.45(±0.01)	5.47(±0.01)
C10B	4.26(±0.01)	4.48(±0.01)	4.93(±0.02)	5.47(±0.01)
C14B	4.24(±0.01)	4.34(±0.02)	4.48(±0.00)	5.10(±0.01)
C16B	4.26(±0.00)	4.49(±0.04)	5.04(±0.05)	5.41(±0.00)
C17B	4.29(±0.00)	4.66(±0.03)	5.21(±0.06)	5.51(±0.01)
C21B	4.22(±0.01)	4.58(±0.04)	4.80(±0.01)	5.08(±0.00)
C22B	4.22(±0.01)	4.43(±0.01)	4.84(±0.01)	5.33(±0.01)
E3B	4.63(±0.01)	4.49(±0.01)	4.35(±0.01)	4.94(±0.02)
E7B	4.61(±0.01)	4.51(±0.01)	4.33(±0.01)	4.93(±0.07)
E15B	4.22(±0.01)	4.34(±0.01)	4.63(±0.01)	5.09(±0.06)
E23B	4.24(±0.01)	4.61(±0.01)	4.85(±0.01)	5.16(±0.01)
MRS	5.75	5.59	5.58	5.52



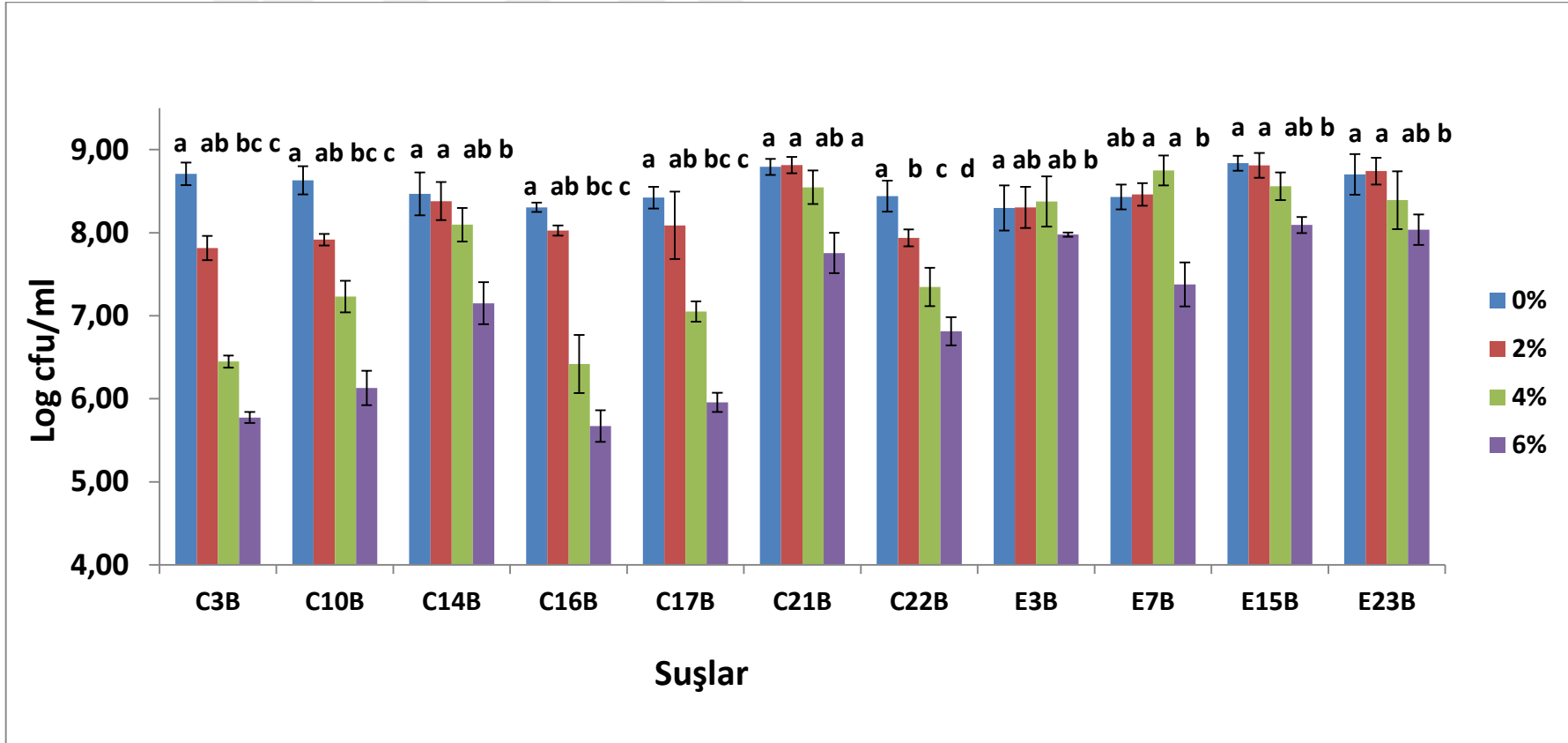
Şekil 4.2 : Farklı tuz konsantrasyonlarında Brescianodan izole edilen suşların MRS brotdaki pH değişimleri.

Çizelge 4.5 : 24 saatlik inkübasyon sonunda Bresciano suşundan izole edilen suşların MRS agarda sayımı. Değerler log CFU/g olarak verilmiştir.

Suşlar	%0	%2	%4	%6
C3B	8.71(±0.13)	7.82(±0.15)	6.45(±0.07)	5.77(±0.07)
C10B	8.63(±0.17)	7.92(±0.07)	7.23(±0.19)	6.13(±0.21)
C14B	8.47(±0.26)	8.38(±0.23)	8.10(±0.20)	7.15(±0.25)
C16B	8.31(±0.06)	8.02(±0.06)	6.42(±0.35)	5.67(±0.19)
C17B	8.42(±0.13)	8.09(±0.41)	7.05(±0.12)	5.96(±0.12)
C21B	8.79(±0.10)	8.81(±0.10)	8.55(±0.20)	7.76(±0.24)
C22B	8.44(±0.19)	7.94(±0.10)	7.35(±0.23)	6.81(±0.17)
E3B	8.30(±0.27)	8.30(±0.25)	8.38(±0.30)	7.98(±0.03)
E7B	8.43(±0.15)	8.46(±0.14)	8.75(±0.18)	7.38(±0.27)
E15B	8.84(±0.09)	8.81(±0.15)	8.56(±0.17)	8.09(±0.10)
E23B	8.70(±0.24)	8.74(±0.16)	8.39(±0.35)	8.04(±0.18)

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.3'te görüleceği gibi E3B ve E7B dışındaki suşlarda tuz oranı arttıkça gelişmelerde 1 veya 2 log CFU/g düşüş yaşanmıştır. Ancak genel olarak tüm suşlar için %0 ve %2'deki gelişmeleri arasındaki fark önemli bir fark değildir. Ve %6 tuz konsantrasyonundaki gelişme diğer tuz oranlarındanki gelişmelere göre önemli derecede farklıdır. E15B ve E23B %6 tuz konsantrasyonunda en yüksek gelişme düzeyine sahip olan suşlardır ve %0 tuz konsantrasyonuyla karşılaştırıldığında gelişmelerinde büyük bir düşüş gözlenmemiştir. Seçilen bazı suşlar için 48 saat sonundaki pH değişimine bakılmış ve koloni sayımı yapılmıştır. 48 saat sonunda tüm suşlarda 24 saate göre pH'da düşüş görülmüştür ve gelişmenin de arttığı görülmüştür.

24 saatlik inkübasyon sonunda Romagnolo suşundan izole edilen suşların %0, %2, %4, %6 NaCl içeren MRS brotundaki pH değişimleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Her suş için 3 tekrar yapılmıştır. Genel olarak tüm suşlar MRS Broth ile karşılaştırıldığında ortamı asidite etmişlerdir. Veriler Çizelge 4.9'daki koloni sayımlarıyla karşılaştırıldığında tuz konsantrasyonu arttıkça gelişimin azaldığı ve pH'ın düştüğü görülmektedir.

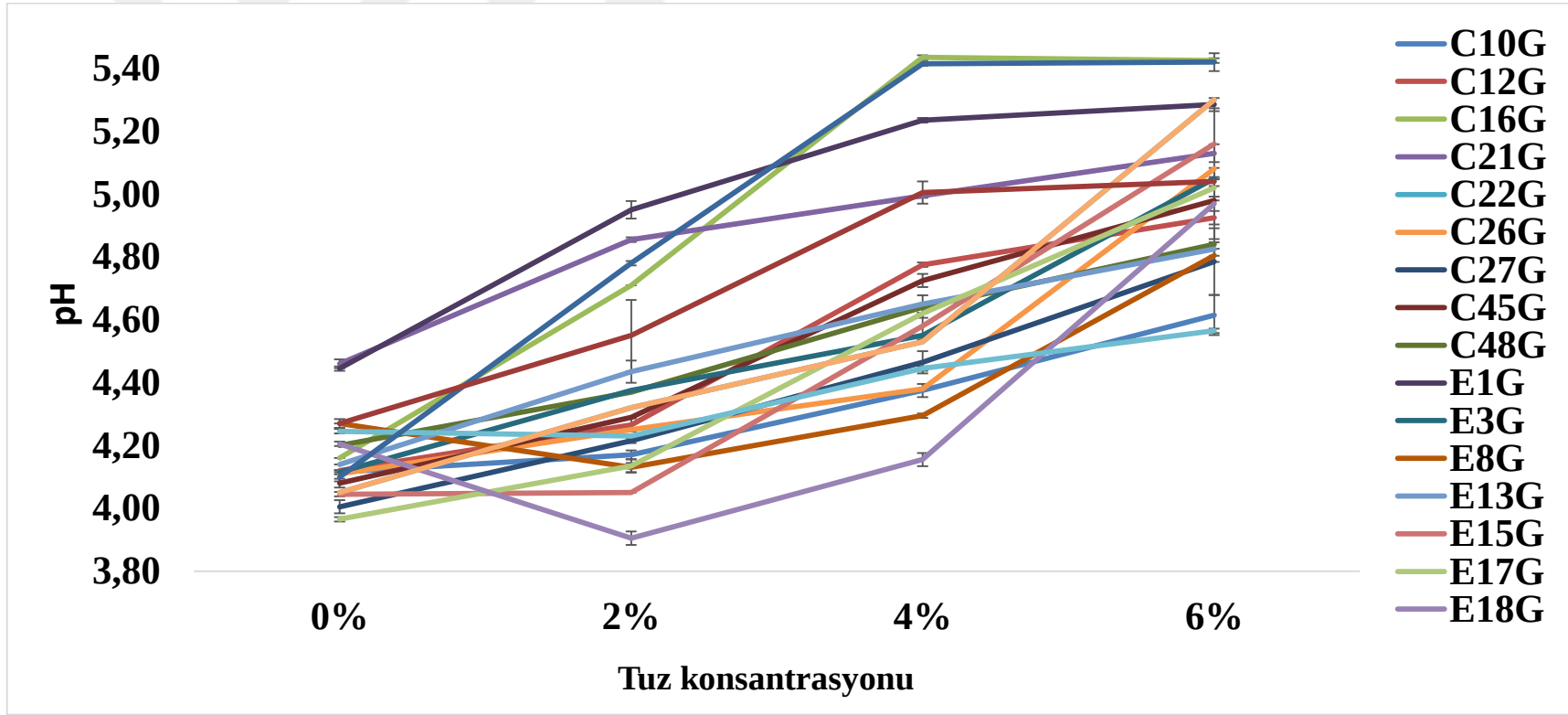


Şekil 4.3 : Brescianodan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının farklı 24 saat sonunda % NaCl gelişimleri. Gelişimler log CFU/g olarak ifade edilmiştir. Normal ve homojen veriler tek yönlü ANOVA ve Tukey post-hoc testi ile normal olmayan homojen veriler nonparametrik Kruskal-Wallis testi ve Dunn's post-hoc testi ile analiz edildi.

E8G ve E18G suşları diğer suşlardan farklı olarak %0 ile %2 tuz konsantrasyonu karşılaştırıldığında asitliği arttırdığı görülmüştür. Bu iki suшта *L.curvatus* olarak tanımlanmıştır. %6 tuz konsantrasyonunda ortamı en iyi asitlendiren suş C10G'dir. Bu suşun gelişimine bakıldığında da %6 tuz konsantrasyonunda diğer suşlara göre iyi gelişim göstermiştir.

Çizelge 4.6 : 24 saatlik inkübasyon sonunda Romagnolo suşundan izole edilen suşların MRS brotundaki pH değişimlerinin ortalaması ve standart sapmaları.

Suşlar	%0	%2	%4	%6
C10G	4.12(±0.01)	4.17(±0.01)	4.38(±0.02)	4.62(±0.06)
C12G	4.12(±0.00)	4.27(±0.02)	4.78(±0.01)	4.93(±0.02)
C16G	4.16(±0.00)	4.71(±0.00)	5.43(±0.01)	5.42(±0.01)
C21G	4.46(±0.01)	4.86(±0.01)	5.00(±0.01)	5.13(±0.03)
C22G	4.05(±0.01)	4.32(±0.01)	4.53(±0.03)	5.30(±0.07)
C26G	4.11(±0.00)	4.25(±0.00)	4.38(±0.01)	5.08(±0.01)
C27G	4.01(±0.02)	4.22(±0.01)	4.47(±0.04)	4.79(±0.11)
C45G	4.08(±0.01)	4.29(±0.00)	4.73(±0.02)	4.98(±0.00)
C48G	4.20(±0.01)	4.37(±0.04)	4.64(±0.01)	4.84(±0.01)
E1G	4.44(±0.01)	4.95(±0.03)	5.23(±0.01)	5.28(±0.02)
E3G	4.12(±0.02)	4.38(±0.02)	4.55(±0.03)	5.05(±0.14)
E8G	4.27(±0.01)	4.13(±0.01)	4.30(±0.01)	4.81(±0.01)
E13G	4.14(±0.00)	4.44(±0.04)	4.65(±0.03)	4.83(±0.03)
E15G	4.04(±0.01)	4.05(±0.01)	4.58(±0.04)	5.16(±0.02)
E17G	3.96(±0.01)	4.13(±0.02)	4.62(±0.01)	5.02(±0.11)
E18G	4.20(±0.01)	3.90(±0.02)	4.15(±0.02)	4.97(±0.03)
E19G	4.25(±0.01)	4.23(±0.00)	4.45(±0.01)	4.57(±0.01)
E22G	4.05(±0.03)	4.32(±0.42)	4.53(±0.03)	5.30(±0.11)
E26G	4.10(±0.03)	4.78(±0.07)	5.41(±0.02)	5.42(±0.00)
E28G	4.27(±0.00)	4.55(±0.11)	5.01(±0.04)	5.04(±0.01)
MRS	5.75	5.59	5.58	5.52

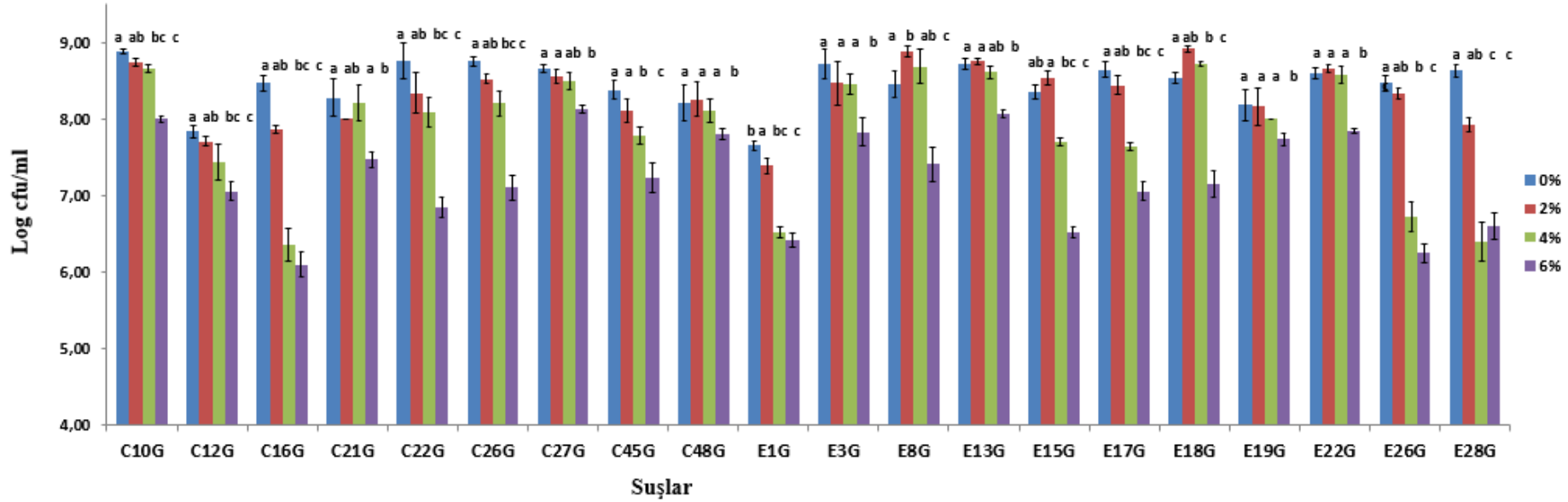


Şekil 4.4 : Farklı tuz konsantrasyonlarında Romagnolodan izole edilen suşların MRS brothdaki pH değişimleri.

Romagnolo sucuğundan izole edilen suşların farklı konsantrasyonlarda gelişimlerine Çizelge 4.7 ve Şekil 4.5’de bakıldığında tuz konsantrasyonu ile gelişimlerin ters orantılı olduğu görülür. Neredeyse tüm suşların gelişimlerinde %6 tuz konsantrasyonu diğer tuz konsantrasyonlara göre önemli bir fark göstermiştir.

Çizelge 4.7 : 24 saatlik inkübasyon sonunda Romagnolo suşundan izole edilen suşların MRS agarda sayımı. Değerler log CFU/g olarak verilmiştir.

Suşlar	0%	2%	4%	6%
C10G	8.87(±0.03)	8.74(±0.04)	8.67(±0.05)	8.00(±0.04)
C12G	7.84(±0.08)	7.71(±0.07)	7.43(±0.23)	7.05(±0.12)
C16G	8.47(±0.10)	7.86(±0.05)	6.36(±0.21)	6.10(±0.16)
C21G	8.28(±0.25)	8.00(±0.00)	8.21(±0.24)	7.47(±0.10)
C22G	8.76(±0.24)	8.34(±0.27)	8.08(±0.19)	6.84(±0.13)
C26G	8.75(±0.06)	8.52(±0.06)	8.20(±0.16)	7.10(±0.16)
C27G	8.0 (±0.05)	8.56(±0.09)	8.49(±0.11)	8.13(±0.06)
C45G	8.38(±0.13)	8.10(±0.16)	7.78(±0.12)	7.23(±0.19)
C48G	8.21(±0.24)	8.26(±0.22)	8.10(±0.16)	7.81(±0.07)
E1G	7.65(±0.05)	7.39(±0.10)	6.52(±0.06)	6.42(±0.09)
E3G	8.72(±0.2)	8.47(±0.29)	8.46(±0.14)	7.83(±0.18)
E8G	8.45(±0.17)	8.88(±0.07)	8.69(±0.22)	7.41(±0.23)
E13G	8.72(±0.07)	8.75(±0.04)	8.61(±0.08)	8.06(±0.06)
E15G	8.36(±0.09)	8.53(±0.09)	7.70(±0.06)	6.52(±0.06)
E17G	8.64(±0.11)	8.44(±0.12)	7.63(±0.05)	7.05(±0.12)
E18G	8.54(±0.07)	8.92(±0.04)	8.71(±0.03)	7.15(±0.16)
E19G	8.18(±0.21)	8.16(±0.25)	8.00(±0.00)	7.73(±0.08)
E22G	8.60(±0.07)	8.65(0.05)	8.57(±0.11)	7.84(±0.04)
E26G	8.47(±0.10)	8.33(±0.07)	6.73(±0.19)	6.25(±0.12)
E28G	8.63(±0.09)	7.92(±0.09)	6.40(±0.25)	6.60(±0.17)



Şekil 4.5 : Romagnolo'dan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının farklı % NaCl gelişimleri. Gelişimler log CFU/g olarak ifade edilmiştir. Normal ve homojen veriler tek yönlü ANOVA ve Tukey post-hoc testi ile normal olmayan homojen veriler nonparametrik Kruskal- Wallis testi ve Dunn's post-hoc testi ile analiz edildi.

Fermente sucukta başlangıçtaki et hamurundaki tuz konsantrasyonu % 2.2-2.5 (a_w % 0.96-0.98) iken son üründe % 4-6'ya (% 0.85-0.90) ulaşabilir (Lücke, 2016). Bu çalışmada sucuklardan izole edilen *L.sakei* ve *L.curvatus* suşlarının % 0, 2, 4 ve 6 tuz konsantrasyonlarındaki gelişimlerini incelenmiştir çünkü İtalyan sucuğunda en yüksek NaCl konsantrasyonu yaklaşık % 5 olarak belirtilmiştir (Coppola ve diğ., 1988).

Urso ve diğ. (2006b) çalışmasında bakteriosin üreten *L. sakei* suşu tuz konsantrasyonu %2'den %3.5'e yükseldiğinde gelişimine devam etmiş ancak ürettiği bakteriyosin miktarının çok düşük olduğu gözlemlenmiştir. Tuz konsantrasyonu %5'e çıktığında ise suş sadece biraz büyüme göstermiş ve bakteriosin üretimi olmamıştır.

Coppola ve diğ (1998) çalışmasında sucuktan çoğunlukla *L.sakei* ve azınlığı *L. brevis* olan 183 suş izole etmiştir. %8 ve %10 NaCl ile desteklenmiş MRS brotunda tuz tolerans testi gerçekleştirilmiş ve ayrıca MRS brotta pH düşüşüne bağlı olarak asidifikasyon kapasitesi gözlemlenmiştir. Tüm suşlar % 8 NaCl konsantrasyonunda büyümeyi başarmış ve büyük bir çoğunluk % 10 NaCl konsantrasyonunda da varlığını sürdürmüştür. *L. sakei*'nin, NaCl ve nitritlere karşı direncinin taranması pH düşüşü olarak MRS broth ile karşılaştırıldığında incelenen suşların asitleştirme kapasitesi üzerinde hiçbir etki göstermezken, nitrit/NaCl kombinasyonu hem asitleştirme kapasitesini hem de asitlenme oranını yüksek oranda etkilemiştir.

Fontana ve diğ.(2016) 15°C'de NaCl toleransı ile ilgili olarak yaptığı çalışmaya göre ise, çoğu geleneksel yöntemlerle üretilmiş fermente et ürünlerinden izole edilmiş *L.sakei* suşlarının %42.5'i %5 NaCl konsantrasyonunda gelişebildiği ancak yüksek tuz konsantrasyonunda *L.sakei* suşlarında gelişimin azaldığı görülmüştür. Fransız ve Yunan geleneksel kuru fermente sucuklardan izole edilen suşlar için benzer sonuçlar bildirilmiştir (Ammor ve diğ., 2005; Papamanoli ve diğ., 2003).

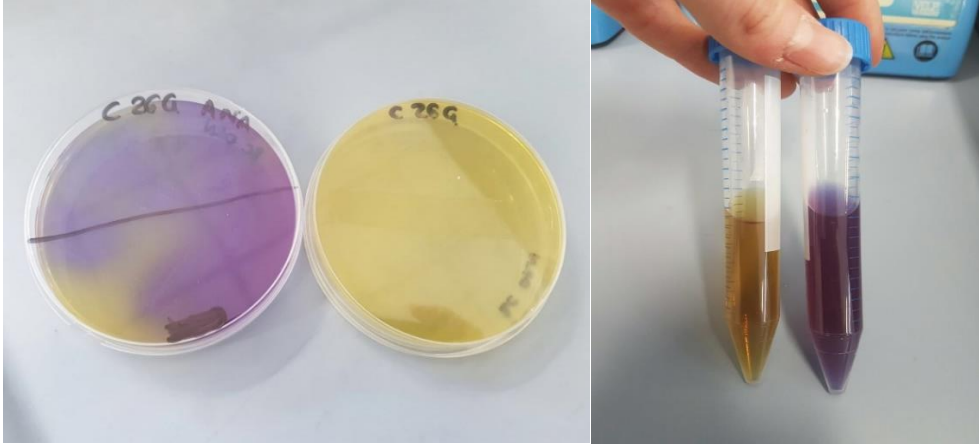
Papamanoli ve diğ. (2003), çalışmasında kuru fermente Yunan sucuklarından izole edilen 49 *L.sakei*, 24 *L.curvatus* ve 7 *L.plantarum* suşunun, % 6.5, 8 ve % 10'luk NaCl konsantrasyonlarını içeren MRS brotunda gelişimleri incelenmiştir. Sonuçlar, *L.sakei* suşlarının %80'inin, tüm *L.curvatus* ve *L. plantarum* suşlarının %6.5 NaCl'de büyüebileceğini göstermiştir. Bütün *L. plantarum* suşları tüm tuz konsantrasyonlarında gelişebilirken, *L. sakei* ve *L. curvatus* suşlarının gelişimi değişkenlik göstermektedir.

Bütün bu sonuçlar, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimin suşa bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada edindiğimiz sonuçlar göz önünde bulundurulursa, Bresciano sucuğundan izole edilen C21B, E3B, E7B, E15B ve E23B ve Romagnolo'dan izole edilen C12G, C27G, C48G, E3G, E13G, E19G ve E22G suşları tuz toleransı ve asitleşme özelliklerine bakıldığında sucuk üretiminde kullanılabilecek potansiyel sahibi starter kültürlerdir. Bu çalışma sadece izole edilen iyi teknolojik özellikler gösteren suşları tespit edebilmek için bir ön çalışma niteliğindedir.

Sucuk karmaşık bir ortam olduğu ve suşların laboratuvar performanslarına göre farklı şekillerde davrandıkları için izole edilen suşlar MRS broth yerine gerçek sistemde yani sucuk karışımında da test edilecektir. Fermente et ürünlerinden izole edilen *L.sakei* türünün ekolojik yaşam alanına kolay adapte olması ve bu alan için özelleşmiş olması ispat edilmiştir. *L.sakei* için laboratuvar koşullarında hücre ölümü stationary faza ulaştıktan hemen sonra hızlıca gerçekleşmesine rağmen gerçek sistemlerde(sucuk) bu türler çok dirençli ve bütün olgunlaşma prosesi boyunca, bu haftalar hatta aylar alıyor olsa bile, mikrobiyotayı domine etmeye devam eden bir davranış sergiler (Chaillou ve diğ., 2005)

4.2.3 Sucuklardan izole edilen suşların biyojenik amin üretme kabiliyeti

Tüm izolatlar, Bover-Cid ortamı kullanılarak dekarboksillenme potansiyeli test edildi. Özellikle, tirosin, histidin, ornitin, lisin ve fenilalanin dekarboksilatlama yeteneği incelenmiştir. Romagnolo sucuğundan izole edilen, *Lactobacillus curvatus* olarak tanımlanan C26G suşu haricinde, bu yeteneği izolatların hiçbiri göstermemiştir. Bu suşun süpernatantı daha önce açıklanan metot ile HPLC’de biyojenik amin içeriği test edilmiştir. Bu analiz büyük miktarda putresin biriktirme kapasitesi olduğunu teyit etmiştir. Peynir, süt ürünleri, et ve sucuk ile yapılan farklı çalışmalarda *L.curvatus*’un 10-10000mg/L aralığında putresin ürettiği tespit edilmiştir (Wunderlichova ve diğ, 2014). Bu üretimin ornitin dekarboksilatma yoluyla değil laktik asit bakterilerinin agmatin deaminasyonu yoluyla üretebileceği çalışmalarda görülmüştür (Köse,2017).



Şekil 4.6 : Bover-Cid agar ve Bover-Cid brothta C26 suşunun putresin ürettiğini gösteren mor renkli kültür ortamları.

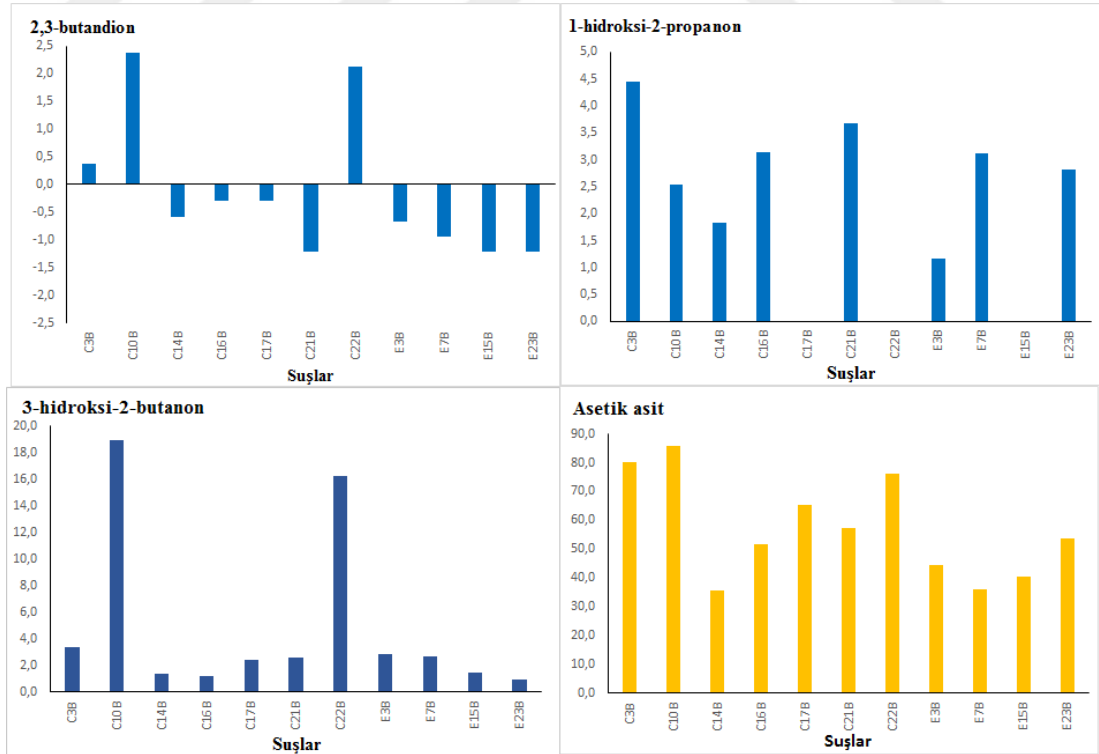
4.2.4. Sucuklardan izole edilen suşların aroma profili

Suşların çeşitli metabolizmalar sonucu ürettiği, tükettiği veya birbirine dönüştürdüğü çeşitli uçucu organik bileşikler gözlemleyerek aroma profilleri çıkarıldı. Özellikle, MRS ortamında 72 saat inkübasyondan sonra 20 suş (Bresciano'dan 10 suş ve Romagnolo'dan 10 suş) aroma profili analiz edildi. Bresciano suşu için yaklaşık 100, Romagnolo suşları içinse yaklaşık 60 farklı uçucu organik bileşik tanımlanmıştır. Herhangi bir aroma bileşiğinin mevcut olabileceği bu ortamın karmaşıklığı göz önüne alındığında, bu tarama, her bir bileşiğin konsantrasyonu ile inoküle edilmemiş ortamdaki (MRS broth) aynı bileşiğin (son) konsantrasyonu arasındaki fark göze alınarak yapılmıştır. Bunun nedeni, sucuğun organoleptik profilinde önemli olabilecek uçucu organik bileşiklerin üretimi ile ilgili izolatların farklı davranışlarını kanıtlamaktır. Analizler 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.7’de , bu bileşiklerin bazıları için Bresciano izolatlarında gözlenen davranışlar rapor edilmiştir. Bresciano sucuğundan izole edilen suşlar için 2,3-butanedione, 1-hidroxy-2-propanone, 3-hidroxy-2-butanone, acetic acid, 2-methyl-butanal, 3-methyl-butanal, benzaldehyde, benzeneacetaldehyde, 3-methyl-1-butanol, 3-methyl-2-buten-1-ol uçucu organik bileşikler için veriler verilmiştir.

Bununla birlikte, bu bileşiklerin 5 tanesi (2,3-butanedione, acetic acid, 2-methyl-butanal, 3-methyl-butanal, benzaldehyde) suş inoküle edilmemiş MRS broth da zaten mevcuttu, grafiklerdeki rapor edilen değerler aynı molekülün inoküle edilmiş ve edilmemiş ortamdaki farkını temsil eder. Pozitif/negatif sonuçlardan bağımsız olarak, izolatların bazı bileşiklere yanıtlarında büyük bir değişkenlik olmadığı görülmüştür. Örnek olarak, C22B suşu 3-hidroxy-2-butanone (asetoin) ve 2,3-butanedione

(diasetil) varlığını önemli ölçüde artırabilmektedir; diğer izolatlar ise 2,3-butanedione (diasetil) konsantrasyonunu düşürmektedir. 1-hidroksi-2-propanon MRS'de mevcut değildir, ancak 72 saatlik inkübasyondan sonra izolatlar tarafından son derece değişken miktarlarda üretilmiştir. 2-methyl-butanal ve 3-methyl-butanal, dallanmış zincir aminoasit metabolizmasından türetilir ve izolatlar göre değişken bir davranış gösterir. Benzaldehit, mikrobiyal büyümeyi takiben genel olarak artarken benzenasetaldehid, inkübe edilmemiş MRS'de yoktur ve birçok suş tarafından biriktirilmiştir bu da aromatik amino asitlerin güçlü bir metabolizmasını gösterir. İnkübe edilmemiş ortamda bulunmayan ve tüm suşlar tarafından önemli miktarlarda üretilen 3-metil-1-bütanol ve yine bazı suşlar tarafından önemli miktarda üretilen 3-metil-2-buten-1-ol'u gözlemlemek mümkündür. Asetik asit miktarı, aşılınmamış ortamdaki varlığına göre belirgin şekilde artmıştır ve izolatlar arasında büyük bir değişkenlik görülür. *L.curvatus* türüne ait sadece iki izolat (E7B ve E23B) olması nedeniyle rolleri konusunda yorum yapmak imkansızdır. Bununla birlikte, bu iki suşun benimsenen koşullar altında benzenasetaldehit üretemediğini gözlemlemek mümkündür.

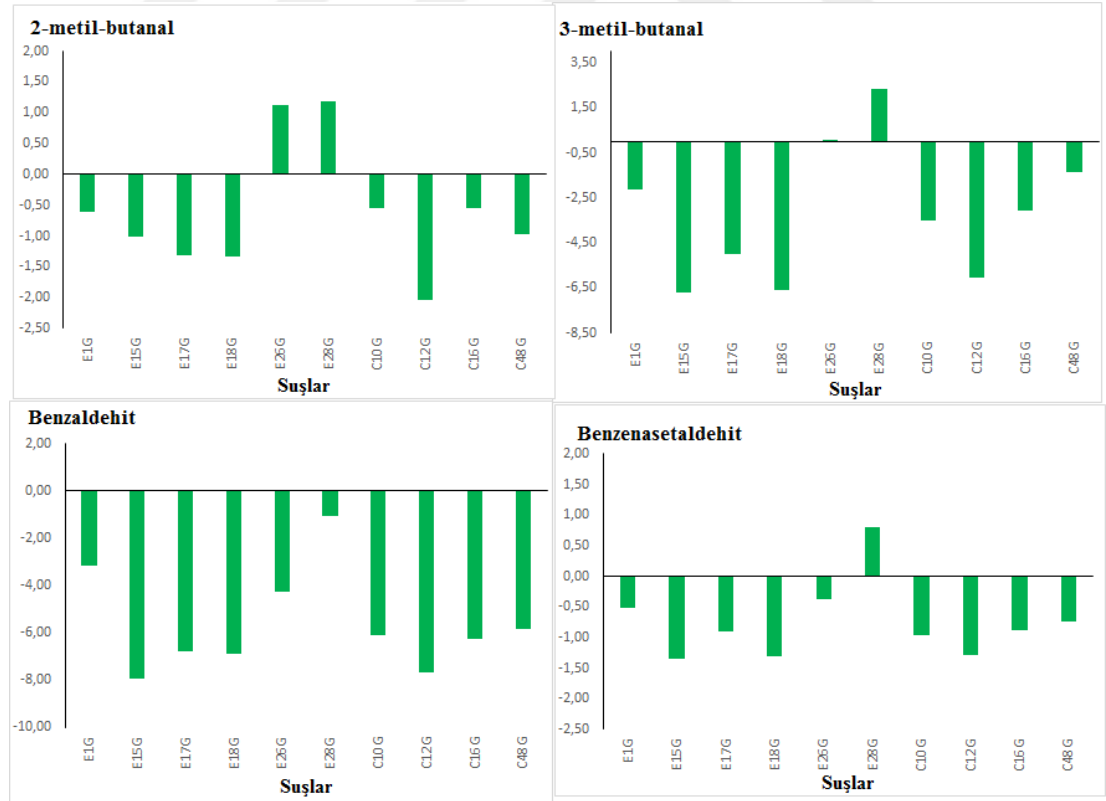




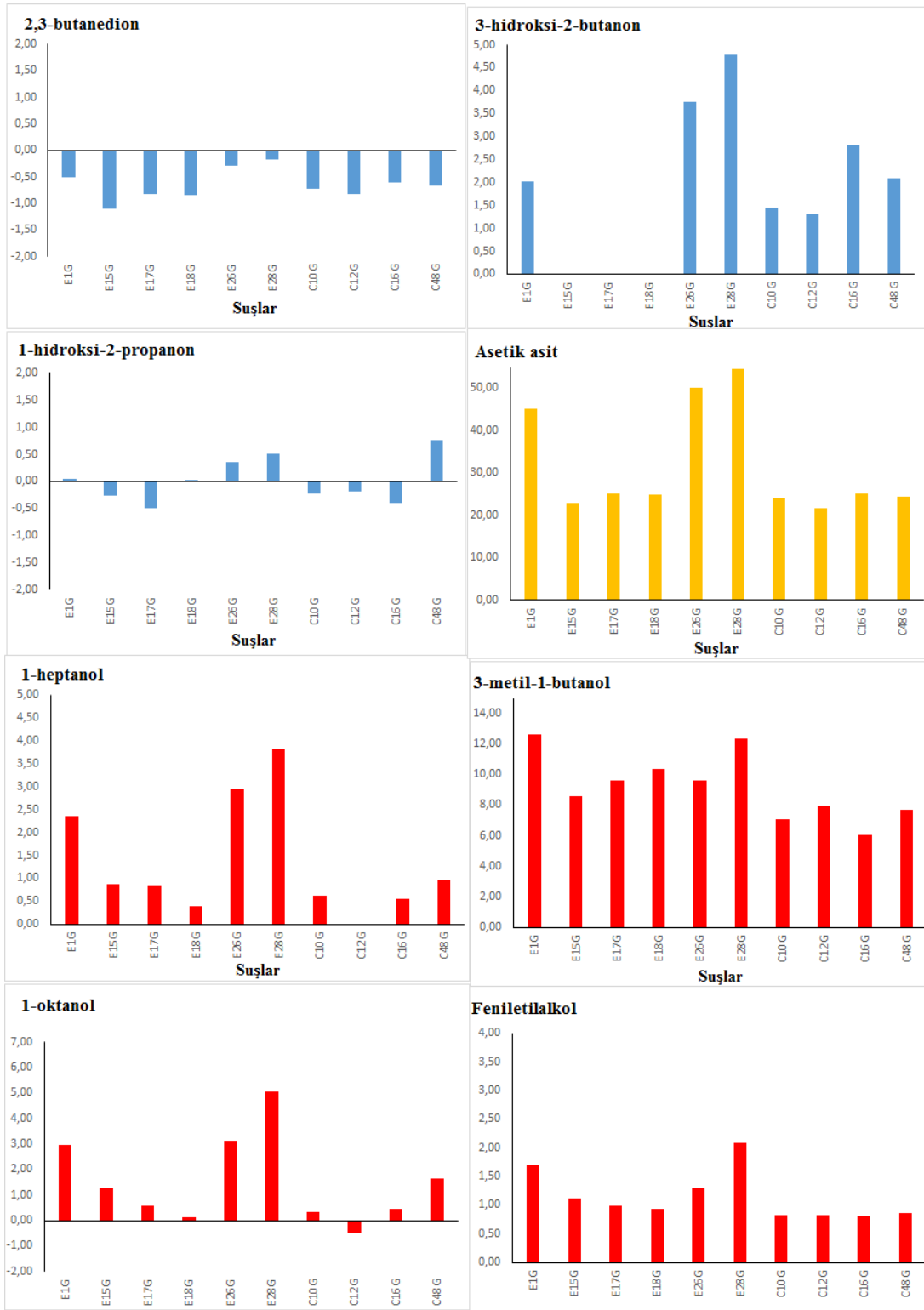
Şekil 4.7 : Bresciano sucuğundan izole edilen suşların aroma profili.

Şekil 4.8’de uçucu organik bileşiklerin bazıları için Romagnolo’ dan izole edilmiş on suşun davranışları rapor edilmiştir. Saptanan başlıca bileşiklerin yedisi Bresciano izolatlarının ortakdır bunlar 2,3-butanedione, 3-hydroxy-2-butanone (asetonil), 2-methyl-butanal, 3-methyl-butanal, acetic acid, benzaldehyde, benzenaeetaldehyde ve 3-methyl-1-butanoldür. Buna ilaveten, Bresciano izolatlarında saptanamayan üç bileşiğin (1-octanol, 1-heptanol, phenylethyl alcohol) davranışları da dahil edilmiştir. Bu izolatlarda ayrıca suşlar arasında yüksek değişkenlik olduğu gösterilmiştir. Tekli bileşiklerin pozitif/negatif varyasyonlarından bağımsız olarak, daha fazla miktarda uçucu bileşik üreten iki suş (E26G ve E28G) vardır. Ayrıca E1G suşu da benzer bir eğilim sergilemektedir. 3-hydroxy-2-butanol, 2-methyl-butanol, 1-octanol, 1-heptanol ve asetik asit için bu husus belirgindir. Üstelik bu izolatlar, propanoic acid, pentanoic acids, butanoic acid, hexanoic acid, asetik asitin esteri (1butanol-3-methylacetate) gibi

Bresciano izolatlarında ve MRS brothda bulunmayan çeşitli asitleri üretmişlerdir (grafiklerde belirtilmemiştir.). İzole edilen suşların hepsi asetik asit ve 3-metil-1-butanal üretti veya biriktirdi. Romagnolo suşlarının tamamı 1-oktanal, 1-heptanal, 1-feniletıl alkol üretti veya biriktirdi. İzolösın ve lösınin enzimatik olmayan Strecker reaksiyonu (Meynier ve diğ., 1999) veya mikroorganizmalar (Di Cagno ve diğ., 2008) tarafından degradasyonuyla sırasıyla 2-metil-butanal ve 3-metil-bütanal açığa çıkar. Tereyağı, karamel ve acı koku 2-metilbutanal’a atfedilmiştir (Meynier ve diğ., 1999; Stahnke, 1995). Daha önceki çalışmalarda, yüksek oranda 3-metil-butanal bulunmuştur ve kuru sucuk veya jambondaki baskın ekşi, peynirimsi aromadan sorumlu olarak tanımlanmıştır (Flores ve Olivares, 2007). 2,3-butandion (diasetil) ve 3-hidroksi-2-bütanon (asetoin) ketonları, laktik asit bakterileri tarafından şeker ve sitrik asit metabolizmasına bağılı olan pirüvat metabolizması yoluyla üretililebilir (Bartowsky ve Henschke, 2004). Ardö (2006) çalışmasında, *Lactobacillus spp.*’nin bir aminoasit olan aspartik asiti önce oksalasetata sonrasında asetoin ve diasetile katabolize edebildiğini, artan piruvat oluşumunda (örneğin sitrat varlığında) diasetil asetoin ve lösın için bir ön-madde olan asetolaktat oluşturabildiğini göstermiştir.



Şekil 4.8 : Romagnolo sucuğundan izole edilen suşların uçucu organik bileşiklere yanıtları.



Şekil 4.8 (devamı) : Romagnolo sucuğundan izole edilen suşların uçucu organik bileşiklere yanıtları.

Asetik asit kuru fermente sucuğun tipik bir aroma bileşiğidir (Freiding ve diğ., 2011). Demeyer ve diğ.(2000) çalışmasında diasetil, asetik asit ve heksanal, sırasıyla tereyağı, sirke ve yeşil koku notlarıyla ilişkilendirdi. 3-metil-1-butanol, 2-

metilpropanoik asit ve 3-metilbütanoik asit sırasıyla dallanmış zincirli amino asitler izolösün, lösün ve valinden türeyebilir (Montel ve diğ., 1998). 2-metilpropanoik asit ve 3-metilbutanoik asit, Romagnolo sucuğundan izole edilen tüm suşlar tarafından üretildi veya biriktirildi (Şekil 4.8'de gösterilmemiştir). Her üç bileşik de kuru fermente sucukların ana uçucu bileşiklerindendir (Meynier ve diğ., 1999) Irigoyen ve diğ. (2007) çalışması 3-metil-1-butanol ve 2-metilpropanoik asit miktarının fermantasyon laktobasiller ile gerçekleştirildiğinde daha yüksek olduğunu göstermiştir. 3-metil-1-bütanol meyvemsi, viski ve balzamik lezzet verir (Olivares ve diğ., 2009). Heksanal, heptanal ve nonanal sırasıyla linoleik asit, n-6 ve n-9 gibi çoklu doymamış yağlı asitlerin oksidasyonundan gelir. 1-heptanol, 1-oktanol *Lactobacillus* spp. tarafından gerçekleştirilen lipid otooksidasyonu ile açığa çıkar. (Moretti ve diğ., 2004)

4.2.5 Bresciano sucuğundan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

4.2.5.1 Spot agar test

Bresciano sucuğundan izole edilen suşların indikatör mikroorganizmalara karşı gösterdiği antimikrobiyal aktiviteyi anlamak için spot agar test yapıldı. İnhibisyon, üretici suşun kolonileri etrafındaki berrak bölgenin genişliği 0,5 mm veya daha büyükse, pozitif olarak kabul edildi. Çizelge 4.8'de ve Şekil 4.10'da görülebileceği gibi tüm suşların spot agar test ile kullanılan indikatör mikroorganizmalara karşı direnci vardır ve genel olarak berrak bölgelerin çapı 1 cm kadardır. Bu antimikrobiyal aktivite, hidrojen peroksit, bakteriyosin, organik asitler gibi çeşitli antimikrobiyal bileşiklerden kaynaklanıyor olabilir (Luo ve diğ., 2011). Literatüre bakıldığında yapılan çalışmalarda katalaz eklenerek organik asit ve hidrojen peroksitten kaynaklanan antimikrobiyal aktivite elimine edilmiştir (Mezaini ve diğ., 2009). Ancak bu çalışma için katalaz eklenmediğinden spot agar testte görülen berrak bölgenin organik asit veya hidrojen peroksitten kaynaklandığı düşünülmektedir. Gaamouche ve diğ. (2014) çalışmasına göre geleneksel yeşil sofr zeytininden izole edilmiş 65 laktik asit bakterisi bazı indikatör mikroorganizmalara karşı inhibisyon bölgesi yani berrak bölge yaratmıştır. 40 izolatin *L.monocytogene*'e karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bunlardan 8'inin *E.coli* O157:H7'ye direnç gösterebildiği görülmüştür Gram pozitif bakteriler her zaman bakterisidal aktiviteye daha hassas olmuşturbunun nedeni gram

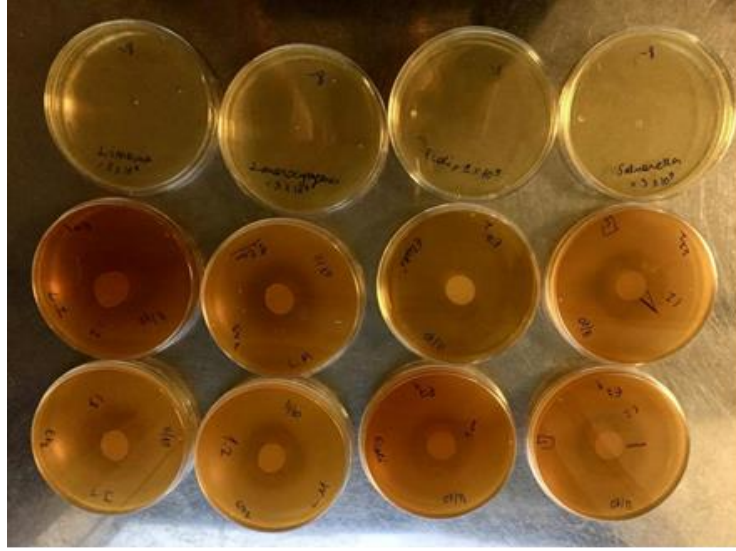
negatif bakterilerinin lipopolisakkarit ve lipidlerden oluşan ve hücreyi koruyan dış zarının olmasıdır (Matagaras ve diğ., 2003)

4.2.5.2 Cell free supernatant test

Bresciano sucuğundan izole edilen suşların *L.monocytogenes* ve *L.innocua* indikatör mikroorganizmalarına karşı gösterdiği antimikrobiyal aktiviteyi anlamak için cell-free supernatant test yapılmıştır. Sadece iki indikatör mikroorganizmanın seçilmesinin nedeni bu testin optimizasyon aşamasında olmasından kaynaklanıyor. Cell-free supernatant testinin amacı suşların bakteriosin üretme kabiliyetlerini anlamak olduğu için bakteriosin üretiminin maksimum olabileceği en iyi ortam koşulları anlaşılmaya çalışılmıştır. Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'de de görülebileceği gibi MRS ve mMRS broth kullanılmıştır. Ancak mMRS broth'un *L.monocytogenes* ve *L.innocua* için kendisinden gelen bir antimikrobiyal etkisi olduğu kontrol plakalarında görülmüştür. (Şekil 4.12). Suşlar içinse mMRS broth kullanıldığında herhangi bir antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir (Çizelge 4.9).

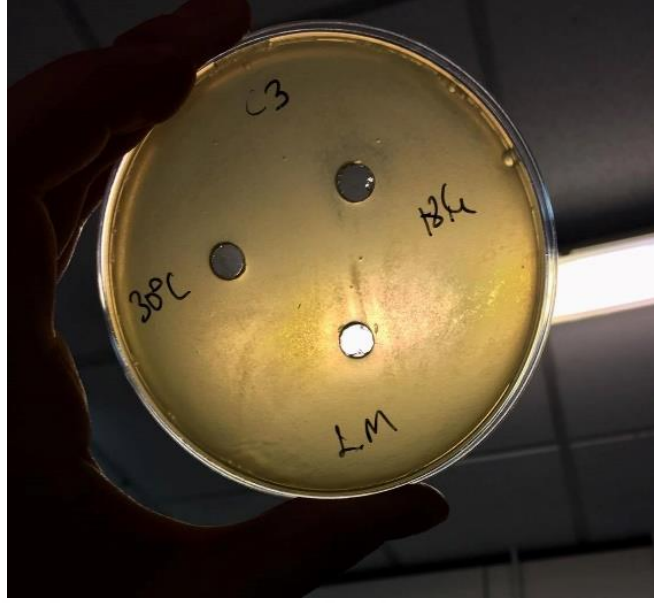
Çizelge 4.8 : Farklı koşullarda suşların spot agar test ile indikatör mikroorganizmalara karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.

Suşlar	16S	<i>Listeria monocytogenes</i> DPC 1768	<i>Listeria innocua</i> DPC 3572	<i>Salmonella enterica ssp. Typhimurium</i> DPC 6046	<i>E.coli</i> DPC 6054
C3B	<i>L. sakei</i>	1.1 cm	1.55 cm	1 cm	1.05 cm
C10B	<i>L. sakei</i>	1.25 cm	1.3 cm	1.1 cm	1.4 cm
C14B	<i>L. sakei</i>	1.1 cm	1.55 cm	1.1 cm	1.2 cm
C16B	<i>L. sakei</i>	1 cm	1.15 cm	0.85 cm	1.1 cm
C17B	<i>L. sakei</i>	1.05 cm	1.4 cm	1 cm	1.2 cm
C21B	<i>L. sakei</i>	1.1 cm	1.2 cm	0.75 cm	1.05 cm
C22B	<i>L. sakei</i>	1.1 cm	1.5 cm	1.05 cm	1 cm
E3B	<i>L. sakei</i>	0.9 cm	0.95 cm	1.2 cm	0.75 cm
E7B	<i>L.curvatus</i>	1.2 cm	1.25 cm	1.2 cm	1 cm
E15B	<i>L. sakei</i>	0.9 cm	1 cm	1.1 cm	1 cm
E23B	<i>L.curvatus</i>	1 cm	1.2 cm	1.05 cm	1,1 cm

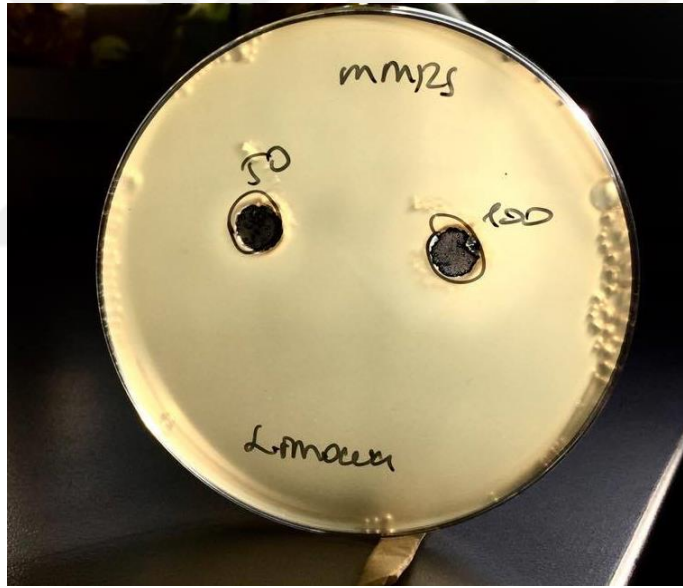


Şekil 4.9 : İndikatör mikroorganizmaların başlangıçtaki inokulum seviyeleri ve E7B suşunun spot agar test sonucu gösterdiği antimikrobiyal aktivite.

MRS broth için ise *L.innocua*'ya karşı herhangi bir direnç görülmemekle beraber *L.monocytogenes* için bazı suşlarda özellikle 25°C 18 saat inkübe edilmiş suşlarda antimikrobiyal aktivite görülmüştür. 30°C 18 saat inkübe edilmiş C3B suşunun *L.monocytogenes*'e karşı gösterdiği direnç kısmen fark edilebilir berrak bölgeyle Şekil 4.11'de görülebilir. Goomuche ve diğ.(2014) çalışmasında geleneksel yeşil sofrayeztininden izole ettiği 65 suşun katalaz eklenerek nötralize edilmiş cell free ekstraktlarından sadece 8i *L.monocytogenes* ve *E.coli* O157:H7 karşı önemli inhibe edici etki göstermiştir. Ammor ve diğ.(2005) çalışmasında 36 izolattan sadece bir *L.sakei* izolatı *L.innocua* ATCC 33090'a karşı antibakteriyal aktivite göstermiş hiçbir izolat *S.aureus* E1S-5'e karşı direnç göstermemiştir. Jones ve diğ. (2008) çalışmasında ise etten izole edilen 75 laktik asit bakterisinden sadece altı tanesi agar-stab sonucunda bir veya birden fazla indikatör suşa yüksek sayılabilecek seviyede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. 18saat 24°Clik inkübasyonun sonunda 3 *L.sakei* suşundan iki tanesi *L.monocytogenes*'e karşı 100mm'den daha büyük inhibasyon alanı yaratmışsa da kalan diğer suş hiçbir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Laktik asit bakterilerinin patojenlere karşı inhibasyon mekanizması bir veya birden fazla etmenin sinergistik etkisiyle olabilir bunlar; besleyici maddeler için rekabet, pH düşüşü, laktik asit üretimi, asetik asit, hidrojen peroksit, atmosferin gaz bileşimi veya bakteriyosinler gibi antimikrobiyal maddelerdir (Matagaras ve diğ., 2003).



Şekil 4.10 : 30°C 18 saat inkübe edilmiş C3B suşunun *Listeria monocytogenes*'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.



Şekil 4.11 : Açılan deliklere konulmuş mMRS brothun *Listeria innocua*'ya karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.

Çizelge 4.9 : mMRS broth kullanılarak farklı koşullarda inkübe edilmiş suşların *L.monocytogenes* ve *L.innocua* mikroorganizmalarına karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.

Strains	16S	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Listeria innocua</i>	
		<i>DPC 1768</i>		<i>DPC 3572</i>	
		Medium (CFS)	30°C /48h	Medium (CFS)	30°C /48h
C3B	<i>L. sakei</i>	mMRS	-	mMRS	-
C10B	<i>L. sakei</i>	mMRS	-	mMRS	-
C14B	<i>L. sakei</i>	mMRS	-	mMRS	-
C16B	<i>L. sakei</i>	mMRS	-	mMRS	-
C17B	<i>L. sakei</i>	mMRS	-	mMRS	-
C21B	<i>L. sakei</i>	mMRS	-	mMRS	-
C22B	<i>L. sakei</i>	mMRS	-	mMRS	-
E3B	<i>L. sakei</i>	mMRS	-	mMRS	-
E7B	<i>L.curvatus</i>	mMRS	-	mMRS	-
E15B	<i>L. sakei</i>	mMRS	-	mMRS	-
E23B	<i>L.curvatus</i>	mMRS	-	mMRS	-
		mMRS	+	mMRS broth	+

+: kısmen fark edilebilir berrak bölge

Çizelge 4.10 : MRS broth kullanılarak farklı koşullarda inkübe edilmiş suşların *L.monocytogenes* ve *L.innocua* mikroorganizmalarına karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.

Suşlar	16S	<i>Listeria monocytogenes</i>				<i>Listeria innocua</i> <i>DPC 3572</i>			
		<i>DPC 1768</i>							
		Medium (CFS)	25°C /18h	25°C /24h	30°C/18h	Medium (CFS)	25°C /18h	25°C/18h	30°C /18h
C3B	<i>L. sakei</i>	MRS broth	-	-	+	MRS broth	-	-	-
C10B	<i>L. sakei</i>	MRS broth	-	-	-	MRS broth	-	-	-
C14B	<i>L. sakei</i>	MRS broth	+	+	-	MRS broth	-	-	-
C16B	<i>L. sakei</i>	MRS broth	++	-	-	MRS broth	-	-	-

C17B	<i>L. sakei</i>	MRS broth	-	-	-	MRS broth	-	-	-
C21B	<i>L. sakei</i>	MRS broth	+	-	-	MRS broth	-	-	-
C22B	<i>L. sakei</i>	MRS broth	-	-	-	MRS broth	-	-	-
E3B	<i>L. sakei</i>	MRS broth	-	-	-	MRS broth	-	-	-
E7B	<i>L. curvatus</i>	MRS broth	-	-	-	MRS broth	-	-	-
E15B	<i>L. sakei</i>	MRS broth	++	-	-	MRS broth	-	-	-
E23B	<i>L. curvatus</i>	MRS broth	++	-	++	MRS broth	-	-	-
		MRS broth (pH 6)	-	-	-	MRS broth (pH 6)	-	-	-

+: kısmen fark edilebilir berrak bölge ++: fark edilebilir berrak bölge

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu ön çalışma iki farklı bölümden oluşmaktadır. İlk kısım starter kültür kullanılmadan üretilen iki farklı geleneksel İtalyan sucuğunun karakterizasyonu, ikinci kısım ise izole edilmiş *Lactobacillus* suşlarının karakterizasyonudur. İki farklı fermente sucuk ile çalışılmış olup bunlardan Bresciano tipi sucuk, diğeri ise Romagnolo tipi sucuktur. Her iki örnekte yavaş fermentasyon ve şeker yerine şarabın kullanılması nedeniyle başlangıçtaki pH düşüşü sınırlı olup yüksek pH değerleri görülmüş. Mikrobiyolojik sayım sonucunda Bresciano'da yüksek konsantrasyonda laktik asit bakterisi (9.09 log CFU/g) Romagnolo'da ise daha düşük konsantrasyonda laktik asit bakterisi (7.79 log CFU/g) sayılmıştır. Bu farklılığın nedeninin sucukların farklı su aktivitelerinden kaynaklabileceği saptanmıştır. Örneklerin biyogenik amin miktarları birbirinden farklıdır ve Bresciano, Romagnolo'ya kıyasla biraz daha yüksek amin içeriğine sahiptir. İki sucukta da histamine rastlanmamıştır. Farklı tuz yüzdesinde gelişme ve ortamı asitleştirme davranışlarına bakıldığında, suşların çoğu MRS suyunun pH'sını düşürme eğilimindedir. Bütün sonuçlar incelendiğinde farklı tuz konsantrasyonlarında büyümenin suşa bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Büyük miktarlarda putresin üreten C26G haricinde, diğer suşlar biyogenik amin üretmezler. Aroma profili incelenen tüm suşlar asetik asit ve 3-metil-1-bütanal üretmiştir. Bresciano suşlarının hepsi, spot agar testinde *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *Salmonella spp.*, *E. coli* O157'ye karşı direnç göstermiş ve bunun organik asit ve hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal bileşiklerin üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu ön çalışma, Bresciano ve Romagnolo sucuk arasındaki mikrobiyolojik, fizyolojik parametreler ve aromatik profilleri ile izolatlarının büyüme davranışı, asitleşme profili, aromatik profilleri, patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite açısından farklılıklarına ilişkin bazı yönleri açıklığa kavuşturmuştur. Ve ayrıca bu çalışma sayesinde, starter kültür olarak istenilen teknolojik özelliklere sahip olmayan pek çok suş elimine edilmiştir. Ancak suşların aromatik profili ve antimikrobiyal aktivitesini daha iyi anlayabilmek için gerçek sistemlerde ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- Adams, M.** (2010). Fermented meat products. In J.P. Tamang ve diğ(Eds.), *Fermented Foods and Beverages of the World* (1st ed, Vol 1., pp. 309-319). New York: CRC Press.
- Amadoro, C., Rossi, F., Piccirilli, M., Colavita, G.** (2015). Features of *Lactobacillus sakei* isolated from Italian Sausages: Focus on strains from Ventricina del Vastesa. *Italian Journal of Food Safety*, 4(4), 5449.
- Ammor, S., Dufour, E. Zagorec, M., Challiou, S., Chevallier, I.** (2005). Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology* 22, 529–538.
- Andrés, A., Barat, J., Grau, R., Fito, P.** (2007). Principles of drying and smoking. In F.,Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 37-48). Iowa: Blackwell Publishing.
- Ansorena, D., Montel, M. C., Rokka, M., Talon, R., Eerola, S., Rizzo, A., Raemaekers, M., Demeyer, D.** (2002). Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, 61, 141–147.
- Ardö, Y.** (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, 24, 238-242.
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., 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, 4583-4594
- Balev, D., Vulkova, T., Dragoev, S., Zlatanov, M., Bahtchevanska, S.** (2005). A comparative study on the effect of some antioxidants on the lipid and pigment oxidation in dry-fermented sausage. *International Journal of Food Science Technology*, 40, 977 – 983.
- Barbut, S.** (2007). Texture. In F.,Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 201-226). Iowa: Blackwell Publishing.
- Bartowsky, E. J. & Henschke, P. A.,** (2004). The "buttery" attribute of wine -diacetyl -desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 235-252.
- Berardo, A., De Maere, H., Stavropoulou, D.A., Rysman, T., Leroy, F., De Smet S.** (2016). Effect of sodium ascorbate and sodium nitrite on protein and lipid oxidation in dry fermented sausages. *Meat Science*, 121, 359-364.

- Berthier, F., Ehrlich, S.D.** (1999). Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3), 997-1007.
- Bianchi, F., Cantoni, C., Careri, M., Chiesa, L., Musci, M., Pinna, A.** (2007). Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta*, 72, 1552-1563
- Bolumar, T., Sanz, Y., Flores, M., Aristoy, M.-C., Toldra, F., Flores, J.** (2006). Sensory improvement of dry-fermented sausages by the addition of cell-free extracts from *Debaryomyces hansenii* and *Lactobacillus sakei*. *Meat Science*, 72, 457-466
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.** (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 33-41.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C.** (2001). Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *Journal of Food Protection*, 64, 367-373.
- Casaburi, A., Aristoy, M. C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., Villani, F.** (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, 76, 295-307.
- Casaburi, A., Martino, V., Ferranti, P., Picariello, L., 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.
- Centeno J. A., Carbollo, J.** (2014). Starter and Adjunct Microbial Cultures Used in the Manufacture of Fermented and/or Cured or Ripened Meat and Dairy Products. In V. Ravishankar and Bai Jamun (Eds.), *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*, (pp. 35-54). New York: CRC Press.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A., Dudez, A., Martin, V., Beaufils, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec, M.** (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology*, 23 (12).
- Champomier-Vergès, M., Chaillou, S., Cornet, M., Zagorec, M.** (2002). *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Research in Microbiology*, 152(10), 839-48.
- Champomier-Vergès, M.C., Zuñiga, M., Morel-Deville, F., Perez-Martinez, G., Zagorec, M.** (1999). Relationship between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*, *FEMS Microbiology Letters*, 180, 297-304.

- Chevallier, I., Ammor, S., Laguet, A., Labayle, S., Castanet, V., Dufour, E., Talon, R.** (2006). Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control*, 17, 446–453.
- Chi, S. P., Wu, Y.C.** (2007). Spices and seasonings. In F., Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 87-100). Iowa: Blackwell Publishing.
- Cocconcelli, P.S., Fontana, C.** (2010). Starter cultures for meat fermentation. In F., Toldra (Eds.), *Handbook of Meat processing* (1st ed, Vol 1, pp.199-219). Iowa: Blackwell publishing.
- Cocolin, L., Rantsiou, K.** (2012). Meat Fermentation. In Hui, Y.H. (Eds.), *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology* (2nd, pp. 533-543) New York: CRC Press.
- Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K., Urso, R., Cantoni, C., Comi, G.** (2009). Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Science*, 82, 125-132
- Coloretti, F., Tabanelli, G., Chiavari, C., Lanciotti, R., Grazia, L., Gardini, F., Montanari C.** (2014). Effect of wine addition on microbiological characteristics, volatile molecule profiles and biogenic amine contents in fermented sausages. *Meat Science*, 96, 1395-1402.
- Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P. Cantoni, C., Cocolin, L.** (2004). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*, 69, 381-392
- Coppala, R., Giagnacovo, B., Iorizzo, M., Grazia, L.** (1998). Characterization of lactobacilli involved in the ripening of soppressata molisana, a typical southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology*, 15, 347-353
- Dainty, R., Blom, H.** (1995). Flavour chemistry of fermented sausages. In G. Campbell-Platt ve diğ (Eds.) *Fermented Meats* (pp. 176-193). Dordrecht: Springer Science-Business Media.
- Davidson P. M.** (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M, Doyle (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (4th ed, pp.520-556). Washington, D.C: ASM Press.
- De Vuyst, L., Leroy, F.** (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194–199.
- De Mey, E., De Klerck, K., De Maere, H., Dewulf, L., Derdelinckx, G., Peeters, M.C., Fraeye, I., Vander Heyden, Y., Paelinck, H.** (2014). The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *Meat Science*, 96, 821–828.
- Demeyer, D.** (2004). Meat fermentation: Principles and applications. In H, Hui (Eds.), *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology* (pp.353-369). New York: Marcel Dekker.
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., Brink, B.** (2000). Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first

results of a European project. *Food Research International*, 33, 171-180.

- Demeyer, D., Stahnke, L.** (2002). Quality control of fermented meat products. In J. Kerry (Eds.), *Meat processing: Improving quality* (pp. 359–393) Cambridge: Woodhead Publishing.
- Demeyer, D., Toldra, F.** (2004). Fermentation. In W.,Jensen ve diğ.(Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences* (1st ed, pp. 467–474). London: Academic Press.
- Di Cagno, R., Lopez, C. C., Tofalo, R., Gallo, G., De Angelis, M., Paparella, A., Hammes, W., Gobbetti, M.** (2008). Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Science*, 79, 224–235.
- Dicks, L.M.T., Mellet, F.D., Hoffman, L.C.** (2004). Use of bacteriocin producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*, 66, 703–708.
- Drosinos, E., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I., 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.
- Durlu-Özkaya, F., Ayhan, K., Vural, N.** (2001) Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. *Meat Science*, 58, 163-166
- Estevez, M., Morcuende, D., Ventanas, S.** (2008). Determination of Oxidation. In L. Nollet ve diğ(Eds.),. *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*, (pp.141-163). New York: CRC Press.
- European Comission** (2011). Commission regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending annex II to regulation (EC) No 1333/2008 of the European parliament and of the council by establishing a union list of food additives. Official Journal of European Union L295, 1–177.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G., Toldra, F.** (1999). Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus*, *Applied Environmental Microbiology*, 65, 578–584.
- Fadda, S., Vignolo, G.** (2007). Central and South American products. In F.Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 387-393) Iowa : Blackwell Publishing.
- Feng, X., Sebranek, J.G., Lee, H.Y., Ahn, D.U.** (2016). Effects of adding red wine on the physicochemical properties and sensory characteristics of uncured frankfurter-type sausage. *Meat Science*, 121, 285-291
- Flores, M., Olivares, A.** (2007). Flavor. In F.,Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* 2nd ed, Vol 3, pp. 218-225). Wiley Blackwell
- Feiner, G.** (2009). Colour in fresh meat and in cured meat products. In G.Feiner (Ed.), *Meat Products* (pp. 142-157) New York: CRC Press.

- Fernandez-Gines, J., Fernandez-Lopez, J., Sayas-Barbera and Perez-alvarez, J.** (2005). Meat products as functional foods: A review. *Journal of Food Science*, 703, 37-43.
- Freiding, S., Gutsche, K. Amelie, Ehrmann, M.A., Vogel, R.F.** (2011). Genetic screening of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* strains for their peptidolytic system and amino acid metabolism, and comparison of their volatilomes in a model system. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 311-320.
- Gaamouche, S., Arakrak, A., Bakkali, M., Laglaou, A.** (2014). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (11), 657-666.
- Gandemer, G.** (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62, 309-321.
- Giraffa, G.** (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215–222.
- Gonzalez-Fernandez, C., Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J.** (2003). Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology*, 20, 275–284.
- Guerin, C.** (2016). From Muscle to Meat and Meat Products. In R. Jeantet, T. Croguennec, P. Schuck and G. Brulé (Eds.), *Handbook of Food Science and Technology 3: Food Biochemistry and Technology* (pp. 65-115). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Hammer, W.P., Haller, D., Ganzle, M.G.** (2008). Fermented Meat. In E.R., Farnworth (Eds.), *Handbook of Fermented Functional Foods* (2^{ed}, pp.251-269) New York: CRC Press.
- Honikel, K. O.** (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68 – 76.
- Hospital, X.F., Hierro, E., Stringer, S., Fernandez, M.** (2016). A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 66-70.
- Hufner, E., Markieton, T., Chaillou, S., Crutz-Le Coq. A.M.** (2007). Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Applied Environmental Microbiology*, 73, 2522–2531.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T.** (2003). Functionality of Enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 223–233.
- Incze, K.** (2007). European Products In F.,Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 307-318). Iowa: Blackwell Publishing.
- Irigoyen, A., Ortigosa, M., Juansaras, I., Oneca, M., Torre, P.** (2007). Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile

compounds in a Roncal-type ewe's-milk cheese. *Food Chemistry*, 100, 71–80.

- Jones, R.J., Hussein H.M., Zagorec, M., Brightwell, G., 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
- Köse, S.** (2017). Biogenic Amines. In A., Witczak, Sikorski, Z.(Eds.), *Toxins and Other Harmful Compunds in Foods* (pp. 85–152). New York: CRC Press
- Lachowicz, K., Zochowska-Kujawskaand, J., Sobczak, M.** (2012). Fermented Meat Products. In M., Bhavbhuti (Eds.), *Fermentation Effects on Food properties* (pp.309-345). New York: CRC Press
- Latorre-Moratalla M.L., Bover-Cid S., Talon R., Garriga M., Zanardi E., Ianieri A., Fraqueza M.J., Elias M., Drosinos E.H., Vidal-Carou M.C.** (2010). Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *Food Science and Technology*, 43, 20-25.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M.T., Vidal-Carou, M.C.** (2012). Control of biogenic amines in fermented sausages: role of starter cultures. *Frontiers in Microbiology*, 169(3).
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Guerzoni, M. E., Suzzi, G., Belletti, N., & Gardini, F.** (2007). Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chemistry*, 104 (2), 693–701.
- Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A.C., Potes, M. E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Rocha, J.M., Roseiro, L.C., Fernandes, M.J., Fraqueza, M.J., Elias, M.** (2017). Impact of salt reduction on biogenic amines, fatty acids, microbiota, texture and sensory profile in traditional blood dry-cured sausages. *Food Chemistry*, 218, 129-136
- Lebert, I., Leroy, S., Talon, R.** (2007). Microorganisms in traditional fermented meats In F., Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 111-124). Iowa: Blackwell Publishing.
- Leistner, L.** (2013). Stable and safe fermented sausages world-wide. In G. Campbell-Platt (Eds.), *Fermented Meats* (pp. 160-182) New York: Springer Science and Business Media.
- Leroy, F., De Vuyst, L.** (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67–78.
- Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L.** (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 270 – 285.
- Luo, F., Feng, S., Sun, Q., Xiang, W., Zhao, J., Zhang, J., Yang, Z.** (2011). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai Tibet plateau. *Food Control*, 22, 50-53.

- Lücke, F-K.** (1998). Fermented Sausage. In B.,Wood (Eds.), *Microbiology of Fermented Foods* (2nd ed, Vol 1, pp. 441-483). London: Thomson Science.
- Lücke, F-K.** (2000). Fermented Meats, In B., Lund ve diğ(Eds.), *Microbiological Safety and Quality of Food* (1st ed, Vol 1, pp. 420-434). Maryland: Aspen Publishers.
- Lücke, F-K.** (2015) Quality improvement and fermentation control in meat products. In W., Holzapfel (Eds.), *Advances in Fermented Foods and Beverages* (pp. 357-376). Kidlington: Woodhead Publishing.
- Lücke, F-K.** (2016) Fermented Meat Products-An overview. In N, Zdolec (Eds.), *Fermented Meat Products: Health Aspects* (1 ed, pp. 1-15). New York: CRC Press.
- Mainar, M.S., Stavropoulou, D. A., Leroy, F.** (2017). Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 24–37.
- Marco, A., Navarro, J.L., Flores, M.** (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*, 73(4), 660-673.
- Marco, A., Navarro, J.L., Flores, M.** (2008). The sensory quality of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents. *European Food Research and Technology*, 226, 449-458.
- Martin, B., Aymerich, M.T., Garriga, M., Monfort, J.M., Hugas, M.** (2001). Determinacion de comunidades microbianas en embutidos fermentados de baja acidez mediante tecnicas de PCR. I Congreso Nacional de Ciencia y Tecnologia de los Alimentos. Granada.
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-cid, S., Veciana-Nogues, M.T., Aymerich, T.** (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *Internatonal Journal of Food Microbiology*, 10, 148-158
- Martuscelli, M., Crudele, M. A., Gardini, F., & Suzzi, G.** (2000). Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 228–232.
- Masson, F., Hinrichsen, L., Talon, R., Montel, M.C.** (1999). Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Food Microbiology*, 49, 173-178
- Matagaras, M., Drosinos, E.H., Metaxopoulos, J.** (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4°C, *Food Microbiology*, 20, 250-265
- McLeod, A., Zagorec, M. Champomier-Verges, M., Naterstad, K. Axelsson, L.** (2010). Primary metabolism in *Lactobacillus sakei* food isolates by proteomic analysis. *BioMedCentral Microbiology*, 10,12.

- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R. and 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.
- Meynier, A., Novelli, E., Chizzolini, R., Zanardi, E., Gandemer, G.** (1999). Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Science*, 51, 175-183
- Mezaini, A. Chihib, N., Bouras, A., Nedjar-Arroume ,N., Hornez, J. P.** (2009). Antibacterial Activity of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from an Algerian Dairy Product. *Journal of Environmental and Public Health*, 2009, 6.
- Montanari, C., Bargossi, E., Gardini, A., Lanciotti, R., Magnani, R., Gardini, F., Tabanelli, G.** (2016). Correlation between volatile profile of Italian fermented sausages and their size and starter culture. *Food Chemistry*, 192,736-744.
- Montel, M.C., Masson, F., Talon, R.** (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, 49, 111-123.
- Morales, R., Guerrero, L., Serra, X., Gou, P.** (2007). Insturemantal evaluation of defective texture indry-cured hams. *Meat Science*, 76(3),536-542.
- Moretti, V.M., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M.A., Panseri, S., Pirone, G., Gandini, G.** (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Science*, 66, 845–854.
- Nierop Groot, M.N., De Bonti J.A.M.** (1998). Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3009-3013
- Noonpakdee,W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., 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(2),137-45.
- Olaoye, O.A., Idowu, O.A.** (2010). Features and functional properties of lactic acid bacteria used as biological preservatives of meat processing: A review article. *Journal of Agricultural Technology*, 6(3),449-460.
- Olesen, P.T., Stahnke, L.H.** (2000). The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat Science*, 56, 357–368.
- Olivares, A., Navarro, J.L., Flores, M.** (2009). Establishment of the contribution of volatile compounds to the aroma of fermented sausages at different stages of processing and storage. *Food Chemistry*, 115, 1464–1472.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 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.

- Paramithiotis, S. , Drosinos,E.H., Sofos, J.N. ,Nychas,G.E.** (2010) Fermentation: Microbiology and Biochemistry In F., Toldra (Eds.), *Handbook of Meat processing* (1st ed, Vol 1, pp.185-199). Iowa: Blackwell publishing.
- Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M.A., Suzzi, G.** (2001). Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 882-891.
- Pelser, W.M., Linnsen, J.P.H., Legger, A., Houben, J.H.** (2007). Lipid oxidation in n – 3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages. *Meat Science*, 75, 1-11.
- Puolanne, E.** (2010). Cooked Sausages In F., Toldra (Eds.), *Handbook of Meat processing* (1st ed, Vol 1, pp.313-327). Iowa:Blackwell Publishing.
- Roncalés , P.** (2007). Additives. In F.,Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 77-86) Iowa: Blackwell Publishing.
- Roncales, P., Aguilera, M., Beltran, J. A., Jaime, I., Peiro, J. M.** (1991) The effect of natural and artificial casing on the ripening and sensory quality of a mould-covered dry sausage. *Internation Journal of Food Science and Technology*, 26,83–89.
- Rossetti, L., Giraffa, G.** (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 135-144.
- Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Herrero, A.M., Rodrigues-Salas, L., Jimenez-Colmenero, F.** (2012) Konjac gel as pork backfat replacer in dry fermented sausages: Processing and quality characteristics. *Meat Science*, 92, 144-150.
- Rust , R.** (2007). U.S. products . In F.,Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 301-306) Iowa: Blackwell Publishing.
- Samelis, J., Sofos, J.** (2003). Yeasts in meat and meat products . In T.,Boekhout ve diğ (Eds.), *Yeasts in Foods* (pp.239-267) Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E.** (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11, 621– 647.
- Schillinger, U., Lücke, F-K.** (1989). Antibacterial Activity of *L.sakei* Isolated from Meat. *Applied and Enviornmental Microbiology*, 55(8), 1901-1906.
- Sinz, Q., Schwab, W.** (2012) Metabolism of amino acids, dipeptides and tetrapeptides by *Lactobacillus sakei*. *Food Microbiology*, 29, 215-223.
- Smit, B.A., Engels,W.J.M., Smit, G.** (2009). Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 987-999.
- Söllner, K., Schieberle, P.** (2009). Decoding the key aroma compounds of a Hungarian-type salami by molecular sensory science approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4319-4327.

- Spotti, E., Berni, E.** (2007). Starter cultures: Molds. In F., Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 171-176). Iowa: Blackwell Publishing.
- Stadnik, J., Dolatowski, Z.J.** (2010) Biogenic amines in meat and fermented meat products *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9(3), 251-263.
- Stahnke, L.H.** (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. *Meat Science*, 41, 193-209
- Sunesen, L.O., Trihaas, J., Stahnke, L.H.** (2004). Volatiles in a sausage surface model influence of *Penicillium nalgiovense*, *Pediococcus pentosaceus*, ascorbate, nitrate and temperature. *Meat Science*, 66, 447–456.
- Suzzi, G., Gardini, F.** (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54.
- Tabanelli, G., Bargossi, E., Gardini, A., Lanciotti, R., Magnani, R., Gardini, F., Montanari, C.** (2016). Physico-chemical and microbiological characterisation of Italian fermented sausages in relation to their size. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 2773-2781.
- Tabanelli, G., Montanari, C., Grazia, L., Lanciotti, R., Gardini, F.** (2013). Effects of aw at packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. *Meat Science*, 94, 177-186.
- Talon, R., Leroy, S.** (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentation. *Meat Science*, 89, 303–309.
- Talon, R., Leroy, S.** (2014). Fermented Foods: Fermented meat products and the role of starter cultures. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1, 870-874.
- Toldra, F.** (2008). Biotechnology of Flavor Generation in Fermented meats. In *Meat Biotechnology* (pp.199-215). New York: Springer Science and Business.
- Toldra, F., Flores, M., Sanz, Y.** (2001). Meat fermentation technology. In Y.H., Hui ve diğ. (Eds.), *Meat Science and Applications* (pp.537-561) New York: Marcel Dekker.
- Trüpper, H.G., de Clari, L.** (1997). Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantive (nouns) in apposition. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47, 908–909.
- Urso, R., Comi, G., Cocolin, L.** (2006). Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: Isolation, identification, and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 671–680.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., and Cocolin, L.** (2006a). Sequencing and expression analysis of the sakacin P bacteriocin produced by a *Lactobacillus sakei* strain isolated from naturally fermented sausages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 480–485.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., and Cocolin, L.** (2006b). Technological characterization of a bacteriocin-producing

Lactobacillus sakei and its use in fermented sausage production. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 232–239.

- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J.** (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 149–164.
- Vidal-Carou, M. C., Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T., and Bover-Cid, S.** (2007). Biogenic amines: risks and control. In F. Todrà, Y. H. Hui, I. Astiasarán, Wai-Kit Nip, J. G. Sebranek, E. T. F. Silveira, L. H. Stahnke, and R. Talon (Eds.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 455-468). Oxford: Blackwell Publishing
- Vignolo, G., Fontana, C., Fadda, S.** (2010). Semidry and Dry fermented Sausages. In F., Toldra (Eds.), *Handbook of Meat processing* (1st ed, Vol 1, pp.379-399). Iowa:Blackwell publishing.
- Von Wright, A., Axelsson, L.** (2011). Lactic acid bacteria: an introduction. In: S. Lahtinen (Eds). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press, Boca Raton. USA pp.1-16
- Vural, H., Özvural, E.** (2007). Fermented sausages from other meats. In F.,Toldra (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed, Vol 1, pp. 369-374) Iowa: Blackwell Publishing.
- Wunderlichova, L., Bunkova, L., Koutry, M., Jancova, P., Bunka, F.** (2014) Formation, Degradation, and Detoxification of Putrescine by Foodborne Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*,13.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S.** (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2,48.
- Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A., Chizzolini, R.** (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, 66 (2), 415-423.
- Zhao, G.M., Tian, W., Liu, Y.X., Zhou G.H., Xu, X.L., Li, M.Y.** (2008). Proteolysis in biceps femoris during Jinhua ham processing. *Meat Science*, 79 (1),39-45.
- Zhao, G.M., Zhou, G.H., Wang, Y.L., Xu, X.I., Huan, Y.J., Wu, J.Q.** (2005). Time-related changes in cathepsin B and L activities during processing of Jinhua ham as a function of pH, salt and temperature. *Meat Science*, 70 (2), 381-388.

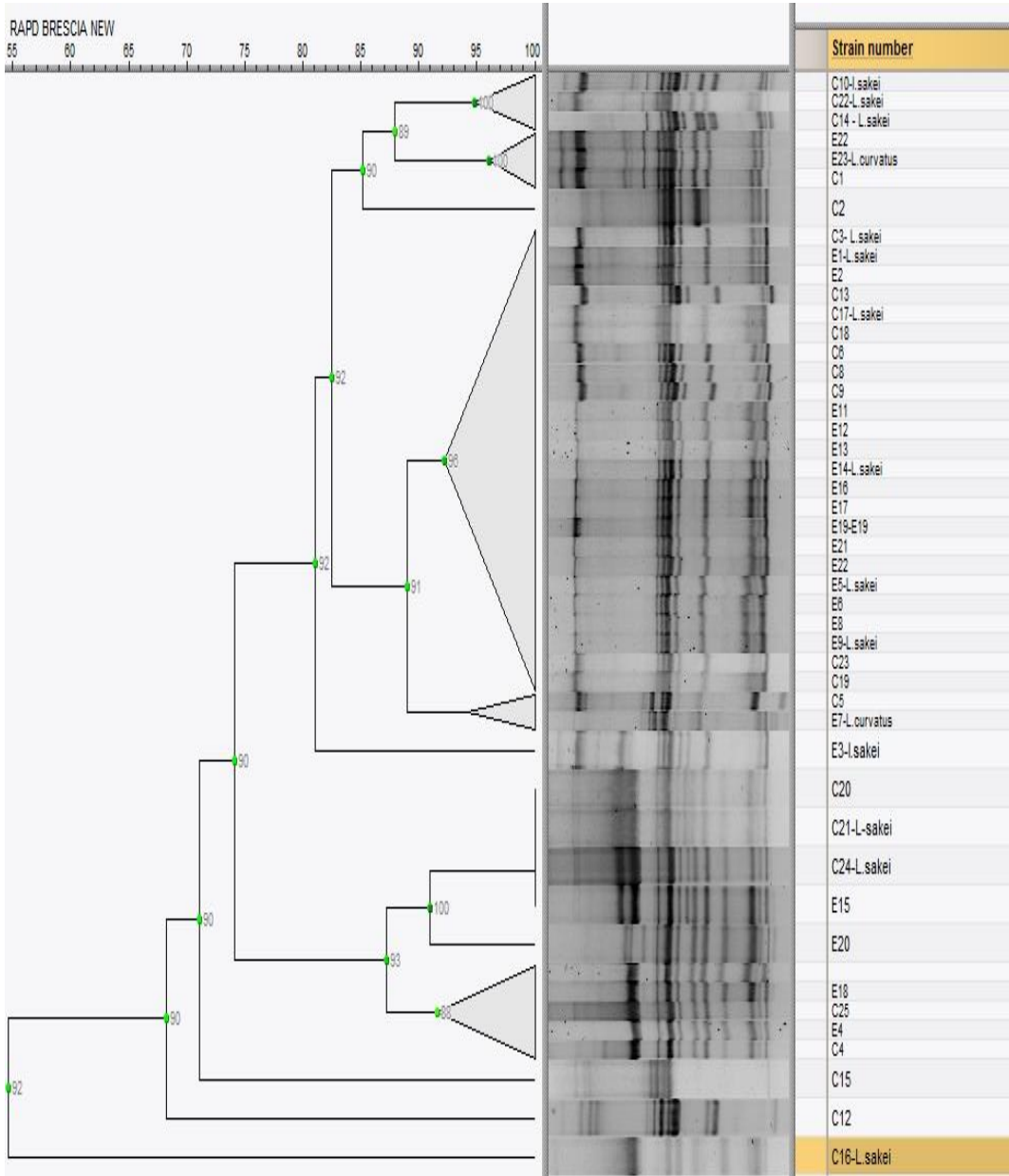


EKLER

EK A: Suşların RAPD karşılaştırması ve kümelenmesi



EK A: Suşların RAPD karşılaştırması ve kümelenmesi



Şekil A. 1 Bresciano sucuğundan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının RAPD karşılaştırması ve kümelenmesi (UPGMA yöntemi: Aritmetik Ortalamayla Ağırlanmamış Eş Grup Yöntemi) ile elde edilen dendrogram. Ölçek benzerlik katsayısını (%) göstermektedir.



ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Merve Ece Arabacı

Doğum Tarihi ve Yeri : 08/09/1992 İstanbul

E-posta : m.ecearabaci@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Yükseklisans** : 2017, İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Temmuz 2017'den beri Perfetti Van Melle şirketinde Ruhsatlandırma ve Yasal işler mühendisi olarak çalışıyorum.
- Mart 2015- Temmuz 2016 yılları arasında Coca-Cola Company'de Bilimsel ve Yasal İşler departmanında uzun dönem stajyerlik yaptı.
- Haziran 2014- Temmuz 2014 tarihleri arasında Perfetti Van Melle üretim ve laboratuvar stajını tamamladı.
- Ağustos 2013- Eylül 2013 tarihleri arasında Efes Pilsen Anadolu Grup'ta üretim ve laboratuvar stajını tamamladı.