

Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Çoğalması Üzerine Patulinin Etkisi¹

M. ARICI

T. Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, TEKİRDAĞ

Turbidimetrik bir metod olan “Bioscreen” kullanılarak patulinin 2, 4, 8, 16, 32, 64 ve 128 µg/ml konsantrasyonlarına karşı değişik 11 laktik asit bakterisinin hassasiyeti incelenmiştir. Sonuçlarına göre patulin 32 µg/ml konsantrasyondan itibaren incelenen bakterilerin çoğalmaları üzerine etkili olmuştur. İncelenen laktik asit bakterilerinden *Enterococcus faecium* BFE 900, *Lactobacillus rhamnosus* BFE 1014 ve *Pediococcus dammosus* BFE 1023 patuline karşı en hassas, iki *Lactobacillus plantarum* (BFE 1021 ve 1027) en dayanıklı suşlar olarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bioscreen, Patulin, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*.

The Effect of Patulin on Growth of Some Lactic Acid Bacteria

Sensibility of different 11 lactic acid bacteria against 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 µg/ml concentrations was examined by using “Bioscreen” known as turbidimetric method. According to the results, levels after than 32 µg/ml concentration of patulin has affected growth of lactic acid bacteria. *Enterococcus faecium* BFE 900, *Lactobacillus rhamnosus* BFE 1014 and *Pediococcus dammosus* BFE 1023 were determined as the most sensitive bacteria and two strains of *Lactobacillus plantarum* (BFE 1021 and BFE 1027) as the most resistant against patulin.

Keywords: Bioscreen, Patulin, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*

Giriş

Laktik asit bakterileri (LAB) asit üretmeleri dolayısıyla gıda maddelerinde ve bazı yerlerde starter kültür olarak kullanılırlar. LAB'nin asitlik geliştirmeleri yanında gıda maddelerinde aroma teşekkülü, gıda maddelerinin bileşiminde bulunan ve insan organizması tarafından kullanılması mümkün olmayan ve toksik etkisi bulunan bileşenleri daha küçük moleküllü, sindirilebilen veya toksik etkisi olmayan moleküllere parçalama özelliği de önemlidir. Bu starter kültürlerin gelişme hızları ya da çoğalmaları ortam şartlarına bağlıdır. Söz konusu ortam şartları direkt enzimatik metabolizma olaylarını etkileyen sıcaklık, pH ve diğer çevre faktörleridir. Gıda maddesinin bileşimi çevre faktörlerinin başında gelmektedir. Gıda maddesi ihtiva ettiği bazı maddeler dolayısıyla starter olarak ilave edilen mikroorganizmanın

gelişmesine engel olabilir. Patulin mikotoksini bunlardan birisidir.

Patulin birçok *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri tarafından üretilen, insan ve hayvanlar için toksik olan bir sekonder metabolittir (Betina, 1989). Birçok gıda maddesinde, özellikle meyve ve sebzelerde tabii kontaminant olarak bulunabilmektedir. Patulin, toksisitesinin yanında fermentasyon sırasında mikroorganizma gelişmesini etkileyebilmektedir (Chain ve ark., 1942; Waksman ve ark., 1942; Waksman ve ark., 1943; Mayer ve Legator, 1969; Stott ve Bullerman, 1975; Lafont ve ark., 1981). Patulin alkol fermentasyonu sırasında mayalar tarafından hemen hemen tamamen parçalanmaktadır (Scott ve ark., 1977; Stinson ve ark., 1978; Sumbu ve ark., 1983; Thonart ve ark., 1985). Fakat laktik asit fermentasyonu sonucu üründe bir miktar kalabilmektedir (Arıcı, 1997).

¹ Bu makale “Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Hygiene und Toxikologie, (BFE/IHT) Karlsruhe-Almanya” da yapılan Doktora tezinden yararlanılarak hazırlanmıştır.

Bu araştırmada patulin laktik asit fermentasyonu ile üretilen birçok gıdada yoğun olarak bulunan bakterilerin çoğalmasında üzerine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve yöntem

Mikroorganizma kültürleri: Araştırmada kullanılan laktik asit bakterileri ve izole edildikleri kaynaklar Çizelge 1'de gösterilmiştir. Araştırmada kullanılan bakteri suşları Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel/Institut für Hygiene und Toxikologie (Almanya)'den temin edilmiştir.

Bu araştırmada mikotoksin ve diğer toksinlerin toksisitesinin tesbitinde mikroorganizmaların kullanıldığı agar difüzyon testi yerine turbidimetrik bir metod kullanılmıştır. Çizelge 1'de verilen bakteri izolatlarının MRS-Broth'daki kültürleri kullanılmıştır. Araştırmada laktik asit bakterilerinin, patulinin (Sigma P 1639) çeşitli konsantrasyonlarına karşı hassasiyeti Bioscreen C (Labsystem) kullanılarak test edilmiştir. Bu alet substrat olarak kullanılan besin ortamındaki renk değişimi veya bulanıklığı ölçmek sureti ile mikroorganizma gelişmesi ve sayısı hakkında bilgi vermektedir (Mattila, 1987; Jacob ve ark., 1989; Becker ve Holzapfel, 1997; Becker ve ark., 1999; Lack ve ark., 1999; Lambert ve van der Ouderaa, 1999). Mikroorganizmalar, üzerinde küçük çukurlar bulunan özel "Microtiter plate"deki sıvı besin ortamına inoküle edilerek "Biyokütle" (Biomass) oluşumu ölçülmektedir. Bioscreen C sistemi, bir ölçme aleti (spektrofotometre), bilgisayar, yazıcı ve özel programdan oluşmaktadır (Venus ve ark., 1991).

Testin Yapılışı: MRS-Broth (pH 6,0) içerisinde patulinin 2, 4, 8, 16, 32, 64 ve 128 µg/ml (ppm)'lik dilüsyonları hazırlanmıştır. İçerisinde patulin bulunan MRS-Broth, microtiter plate çukurlarına

270 µl ilave edilmiş, üzerine 10⁻²'lik bakteri dilüsyonundan 30 µl pipetlenmiş, bakteri sayısı kültürel metotla belirlenmiştir (yaklaşık 10⁶ cfu/ml olacak şekilde). Ayrıca bakteri dilüsyonundan kontrol olarak patulin ihtiva etmeyen MRS Broth'a da inoküle edilmiştir. Bioscreen, sıcaklık 30°C'a ayarlanarak 48 saat süreyle çalıştırılmıştır. Testte kullanılan parametreler Çizelge 2'de verilmiştir.

Test süresince yapılan bütün ölçümler bilgisayarda otomatik olarak kaydedilmiş, bu süre sonunda grafik olarak gösterilmiştir. Grafikler daha sonra Excel bilgisayar programında düzenlenmiştir. Grafiklerin düzenlenmesinde 4 saatlik periyotlarda alınan veriler kullanılmıştır.

Sonuçlar ve tartışma

Patulinin araştırmada kullanılan laktik asit bakterilerinin, toksin konsantrasyonuna bağlı olarak çoğalma parametrelerine yaptığı etki şekillerde görülmektedir. Patulinin 2, 4, 8 ve 16 µg/ml konsantrasyonlarının test edilen laktik asit bakterilerinin çoğalmaları üzerine dikkate değer bir etkisi bulunmamıştır. Dolayısıyla grafiklerde 32 µg/ml'nin üstündeki konsantrasyonların etkileri gösterilmiştir. Patulin 32 µg/ml'den itibaren test edilen bakterilerin çoğalmasında üzerinde etkili bulunmuştur. Laktik asit bakterilerinin patuline karşı hassasiyet derecesi farklılıklar göstermiştir. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (BFE 1007)'in gelişmesi 32 µg/ml patulin konsantrasyonundan itibaren kısmen inhibe edilmiştir (Şekil 1). Diğer *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* suşunun (BFE 1011) BFE 1007'ye göre patuline daha dayanıklı olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 2). *Lactobacillus pentosus* (BFE 1010) 32 µg/ml patulin konsantrasyonundan itibaren oldukça zayıf bir çoğalma gösterebilmiştir (Şekil 3).

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan LAB ve izole edildikleri kaynaklar.

Bakteri	İzole edildiği kaynak
<i>Lb. pentosus</i> BFE 1010*	Salamura yeşil zeytin
<i>Lb. rhamnosus</i> BFE 1014*	Şalgam
<i>Lb. plantarum</i> BFE 1021*	Şalgam
<i>Lb. plantarum</i> BFE 1027*	Şalgam
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> BFE 1024*	Şalgam
<i>Lb. reuteri</i> SA 41	Domuz bağırsak sistemi
<i>Lc. mesenteroides</i> ssp. <i>mes.</i> BFE 1007*	Salamura siyah zeytin
<i>Lc. mesenteroides</i> ssp. <i>mes.</i> BFE 1011*	Salamura yeşil zeytin
<i>P. damnosus</i> BFE 1023*	Şalgam
<i>E. faecium</i> BFE 900	Salamura yeşil zeytin

*(Arıcı, 1997) *Lb.*: *Lactobacillus*, *Lc.*: *Leuconostoc*, *P.*: *Pediococcus*,
mes.: *mesenteroides* *E.*: *Enterococcus*

Çizelge 2. Bioscreen testinde kullanılan parametreler.

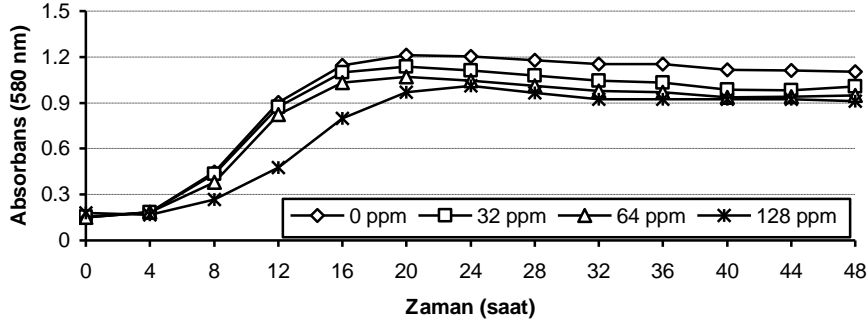
Toplam test süresi	48 saat
Ölçüm periyodu	30 dakika
İnkubasyon sıcaklığı	30°C
Ön ısıtma süresi	5 dakika
Filtre	580 nm
Çalkalama süresi	30 saniye

Lactobacillus paracasei ssp. *paracasei* (BFE 1024) test edilen bakteriler arasında patuline karşı nisbeten hassas, *Enterococcus faecium* (BFE 900) en hassas suş olarak belirlenmişlerdir (Şekil 4 ve 5). *Enterococcus faecium* (BFE 900) hiçbir patulin konsantrasyonunda gelişme gösterememiştir. *Lactobacillus plantarum* suşları (BFE 1021 ve 1027) bütün patulin konsantrasyonlarında gelişerek patuline karşı en dirençli suşlar olarak ortaya çıkmışlardır (Şekil 6 ve 7). Test edilen *Lactobacillus reuteri* suşlarının (SA 41 ve DSM 20016) patuline karşı nisbeten dirençli oldukları ancak yüksek toksin konsantrasyonlarında çoğalmalarının az da olsa inhibe edildiği tesbit edilmiştir (Şekil 8 ve 9). Patuline karşı test edilen *Lactobacillus rhamnosus*'un (BFE 1014) karşı en hassas izolatlardan olduğu, 32 µg/ml toksin konsantrasyonunda gelişme gösterdiği, ancak yüksek konsantrasyonlarda gelişmesinin inhibe olduğu belirlenmiştir (Şekil 10).

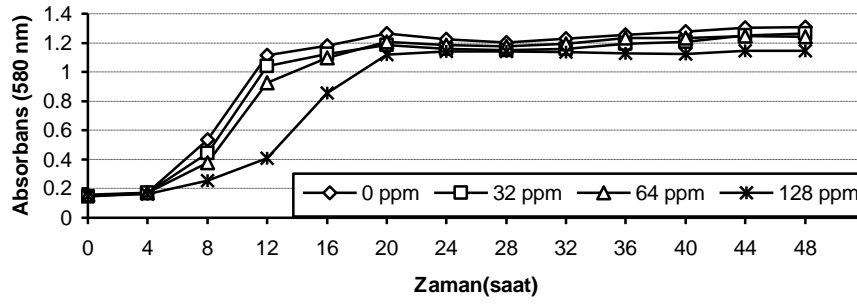
Pediococcus damnosus (BFE 1023) izolatu için de benzer bulgular tesbit edilmiştir (Şekil 11).

Sonuç

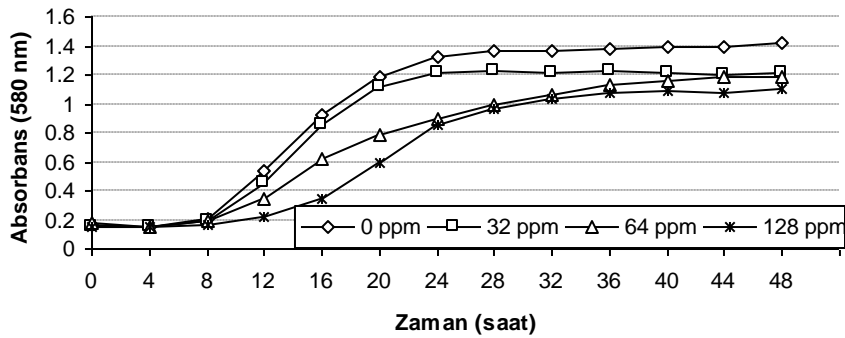
Araştırmada incelenen laktik asit bakterilerinin çoğunluğu gıdalardan izole edilmiş olup, bunlar gıdaların fermentasyonunda önemli rolleri olan mikroorganizmalardır. Dolayısıyla bu gıdalarda starter kültür olarak kullanılma potansiyeli mevcuttur. Patulin bulunan sebze veya meyvelerin fermentasyonu sırasında mikroorganizmaların gelişmeleri toksin konsantrasyonuna bağlı olarak az veya çok engellenebilir. Bu da fermentasyon süresinin uzamasına sebep olabilir. Araştırma sonuçları patuline dayanıklılık bakımından *Lactobacillus plantarum* suşlarının ön plana çıktığını göstermiştir. Fakat özellikle turşu fermentasyonunun ilk aşamasında önemli olan *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* suşlarının patuline karşı kısmen hassas olduğu belirlenmiştir. Hammaddede patulin bulunması halinde asitliğin düşük kalması dolayısıyla istenilen kalitede üretim yapılamaması söz konusu olabilir. Çok yaygın olmamakla birlikte bu tip gıdaların üretiminde de starter kültür kullanılmaktadır (Krämer, 1992). Araştırmada incelenen LAB izolatları içerisinde *Lactobacillus*



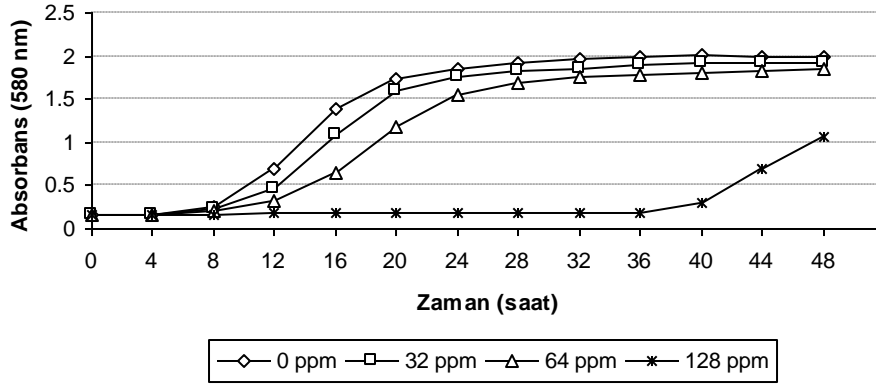
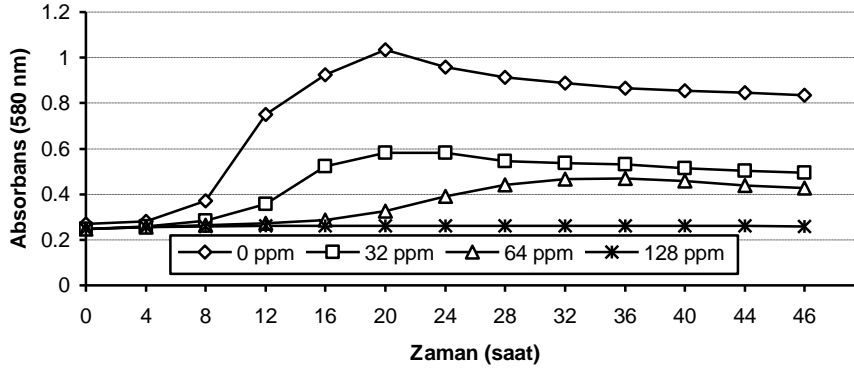
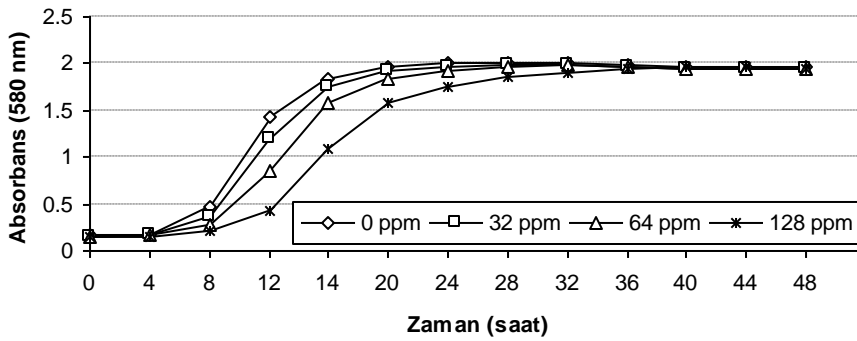
Şekil 1. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (BFE 1007)'in patuline karşı hassasiyeti.

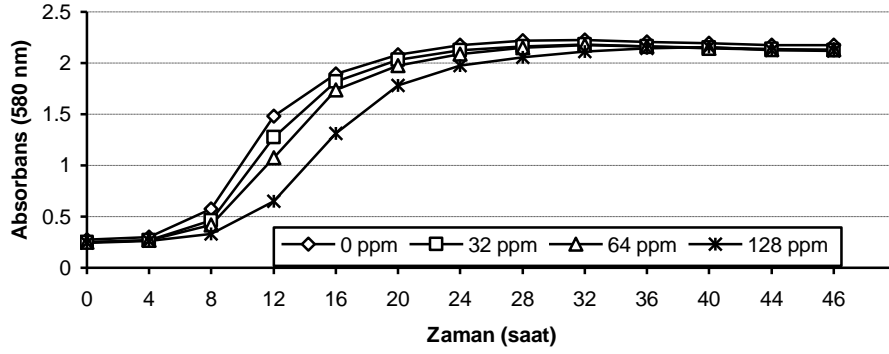
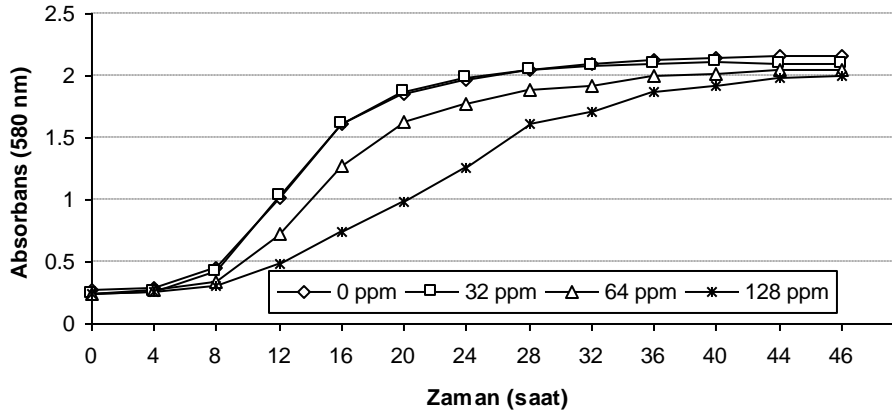
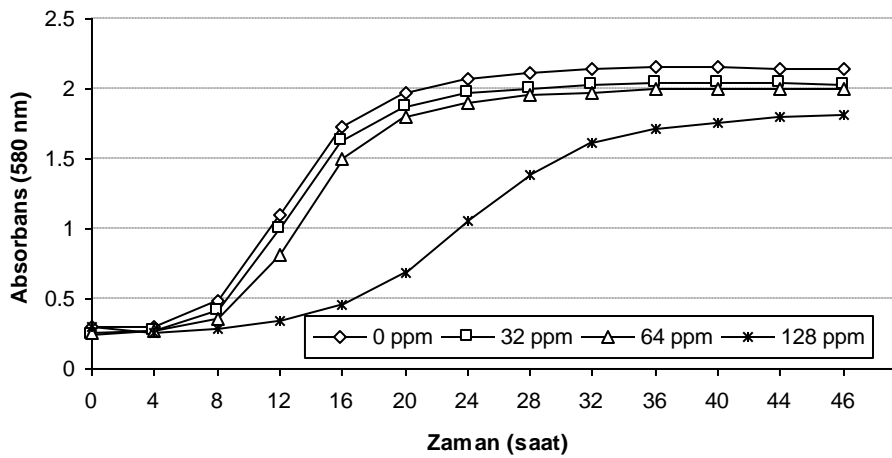


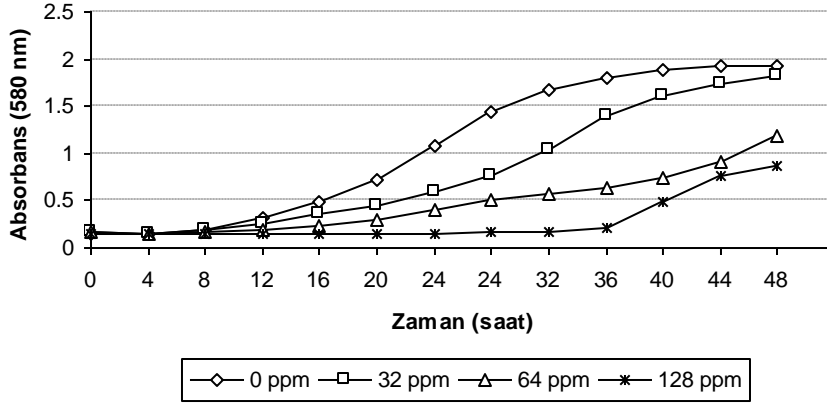
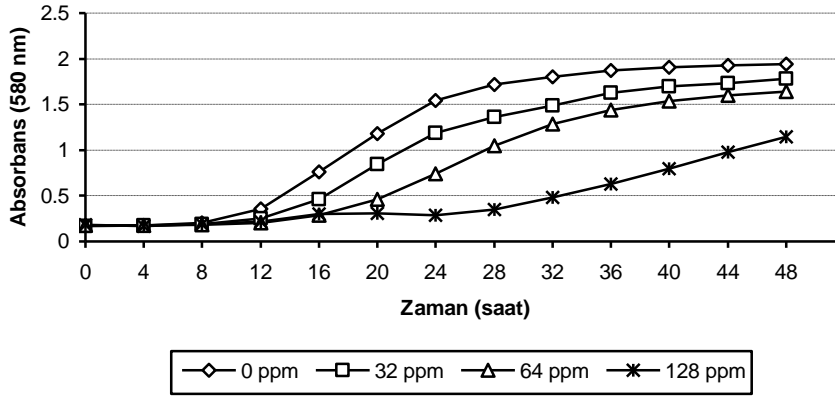
Şekil 2. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (BFE 1011)'in patuline karşı hassasiyeti.



Şekil 3. *Lactobacillus pentosus* (BFE 1010)'un patuline karşı hassasiyeti.

Şekil 4. *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (BFE 1024)'nin patuline karşı hassasiyeti.Şekil 5. *Enterococcus faecium* (BFE 900)'un patuline karşı hassasiyeti.Şekil 6. *Lactobacillus plantarum* (BFE 1021)'un patuline karşı hassasiyeti.

Şekil 7. *Lactobacillus plantarum* (BFE 1027)'un patuline karşı hassasiyeti.Şekil 8. *Lactobacillus reuteri* (SA 41)'nin patuline karşı hassasiyeti.Şekil 9. *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016)'nin patuline karşı hassasiyeti.

Şekil 10. *Lactobacillus rhamnosus* (BFE 1014)'un patuline karşı hassasiyeti.Şekil 11. *Pediococcus damnosus* (BFE 1023)'un patuline karşı hassasiyeti.

plantarum suşları, patulin mikotoksinine dayanıklı olması dolayısıyla bitkisel

fermentasyonlarda starter kültür olarak kullanılmaya potansiyeline sahiptirler.

Kaynaklar

- Arıcı, M. 1997. Untersuchungen zum fermentativen Abbau von Patulin mit ausgewählten Milchsäurebakterien aus südeuropäischen fermentierten Lebensmitteln. Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften, Universität Karlsruhe, Deutschland, p. 140.
- Becker, B., W.H. Holzapel. 1997. Microbiological risk of prepacked sprouts and measures to reduce total counts. Archiv für Lebensmittelhygiene. 48:81-84.
- Becker, B., H. Huber, W.H. Holzapel. 1998. Comparative studies on the growth of

some food associated pathogenic bacteria in selected media using turbidimetric measurement. Archiv für Lebensmittelhygiene. 49:51-54.

- Betina, V. 1989. Mycotoxins - chemical, biological and environmental aspects. Elsevier Publishing, Amsterdam.
- Chain, E., H.W. Florey, M.A. Jennings. 1942. An antibacterial substance produced by *Penicillium claviforme*. Brit. Exp. Pathol. 23:202-205.
- Jacob, R., S. Ripert, J. Baumgart. 1989. Automated turbidimetry for the rapid differentiation and enumeration of bacteria of in foods. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 189:147-148.

- Krämer, J. 1992. *Lebensmittelmikrobiologie*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.
- Lack, W.K., B. Becker, W.H. Holzapfel. 1999. Turbidimetry as a rapid method for enumeration of microorganisms in raw vegetables. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 50:136-140.
- Lafont, J., A. Romand, P. Lafont. 1981. Effects de mycotoxines sur l'activité fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycopathologia*. 74:119-123.
- Lambert, R.J.W., M.L.H. Van Der Ouderaa. 1999. An investigation into the differences between the Bioscreen and the traditional plate count disinfectant test methods. *J. Appl. Microbiol.* 86:689-694.
- Mayer, W.M., M.S. Legator. 1969. Production of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by patulin. *J. Agric. Food Chem.* 17:454-456.
- Mattila, T. 1987. Automated turbidimetry - a method for enumeration of bacteria in food samples. *J. Food Protec.* 50:640-642.
- Scott, P.M., T. Fuleki, J. Harwig. 1977. Patulin content of juice and wine produced from moldy grapes. *J. Agric. Food Chem.* 25:434-437.
- Stinson, E.E., S.F. Osman, C.N. Huhtanen, D.D. Bills. 1978. Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:620-622.
- Stott, W.T., L.B. Bullerman. 1975. Patulin: A mycotoxin of potential concern in foods. *J. Milk Food Technol.* 38:695-705.
- Sumbu, Z.L., P. Thonart, J. Bechet. 1983. Action of patulin on a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:110-115.
- Thonart, P., J. Bechet, S. Sene, Z.L. Sumbu. 1985. Action of patulin on the glutathione pool in a yeast. *Book of abstracts, 6th JUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins*, Pretoria, SA, 49.
- Venus, J., C. Albrecht, W. Schade. 1991. Einsatz des Gerätsystems Bioscreen zur Selektion von Milchsäurebakterien für biotechnologische Prozesse. *Biotechnologie*. 38:41-42, 63-64.
- Waksman, S.A., E.S. Horning, E.L. Spencer. 1942. The production two antibacterial substances, fumigacin and clavacin. *Science*. 96:202-203.
- Waksman, S.A., E.S. Horning, E.L. Spencer. 1943. Two antagonistic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus clavatus*, and their antibiotic substances. *J. Bacteriol.* 45:233-248.