

TÜRK FERMENTE SUCUĞUNDAN İZOLE EDİLEN LAKTOBASİLLERİN HİDROJEN PEROKSİT VE HİDROJEN SÜLFÜR OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI

DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND HYDROGEN SULPHIDE FORMING PROPERTIES OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM TURKISH FERMENTED SAUSAGES

Haydar ÖZDEMİR

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 06110-Ankara

ÖZET: Bu çalışma Türk fermente sucuğundan izole edilen, bazı laktobasillerin (*L. sake*, *L. curvatus*, *L. plantarum*) H₂O₂ ve H₂S oluşturma özelliklerini saptamak amacıyla yapılmıştır.

Laktobasillerin H₂O₂ oluşturma özellikleri MRS-Pyrolusit agar ile MRS-ABTS-Peroksidaz agarda, H₂S oluşturma özellikleri ise Lead Acetate agar, Lysine Iron agar ve Triple Sugar Iron agarda saptanmıştır.

Test edilen 63 adet *L. sake* suşundan 49'u (%77.7) MRS-Pyrolusit agarda, 52'si ise (%82.5) MRS-ABTS-Peroksidaz agarda, 12 adet *L. curvatus* suşundan 9'u (%75) MRS-Pyrolusit agarda, 8'i (%66.6) MRS-ABTS-Peroksidaz agarda, 3 adet *L. plantarum* suşundan 1'i (%33.3) hem MRS-Pyrolusit agar, hem de MRS-ABTS-Peroksidaz agarda pozitif reaksiyon göstermiştir.

Sonuç olarak Türk fermente sucuğundan izole edilen laktobasillerin genelde H₂O₂ oluşturmalarına karşın H₂S oluşturma özelliklerinin daha düşük düzeyde bulunduğu saptanmıştır. Fermente sucuklarda H₂O₂ ve H₂S oluşumunu minimal düzeye indirmek için, üretimde hijyenik kurallara uyulması ve uygun aktif starter kültürlerin kullanılması gerektiği görüşüne varılmıştır.

ABSTRACT: This study was made with aim to determine H₂O₂ and H₂S forming properties of some lactobacilli (*L. sake*, *L. curvatus*, *L. plantarum*) isolated from Turkish fermented sausages.

H₂O₂ forming properties of lactobacilli were determined in MRS-Pyrolusit agar and MRS-ABTS- Peroxidase agar while, H₂S forming properties were determined in Lead Acetate agar, Lysine Iron agar and Triple Sugar Iron agar.

The 49 strains (77.7%) in MRS-Pyrolusit agar, 52 strains (82.5%) in MRS-ABTS-Peroxidase agar were reacted positive from the total of 63 strains of *L. sake* as tested. Also 9 strains (75%) in MRS-Pyrolusit agar, 8 strains (66.6%) in MRS-ABTS-Peroxidase agar from the total of 12 strains of *L. curvatus* and 1 strain (33.3%) both in MRS-Pyrolusit agar and MRS-ABTS-Peroxidase agar from the total of 3 strains of *L. plantarum* were reacted positive.

As the same 6 (9.5%) the total of 63 *L. sake* strains in Lead Acetate agar, 3 of them (4.7%) in Lysine Iron agar and 1 of them (1.5%) in Triple Sugar Iron agar; 2 (16.6%) of the total *L. curvatus* strains in Lead Acetate agar, 1 of them (8.3%) both in Lysine Iron agar and Triple Sugar Iron agar were shown as positive reaction although *L. plantarum* strains were negative.

As a conclusion, it was determined that, the forming properties of H₂S of lactobacilli isolated from Turkish fermented sausages were more lowest level although generously formed H₂O₂. It was suggested that it should be followed to hygienic precautions and used with suitable active starter cultures in production in order to reduced the minimal levels of H₂O₂ and H₂S forming in fermented sausages.

GİRİŞ

Et ve et ürünlerinde laktobasillerin bulunuşu üzerine yapılan birçok çalışmada (REUTER, 1970; KAGERMEIER, 1981; SCHILLINGER ve LÜCKE, 1987; MORISHITA ve SHIROMIZU, 1986; SANZ ve ark. 1988; ÖZDEMİR, 1995; ÖZDEMİR ve ark. 1996), laktobasil türleri içerisinde *L. sake* ve *L. curvatus*'un mik florada dominant olarak bulunduğu bildirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin önemli temsilcileri olan laktobasiller, oluşturdıkları değişik metabolizma ürünleriyle fermente sucukların olgunlaşmasında etkin rol oynarlar. Bu metabolik ürünler içerisinde laktatlar önemli olup, bazı laktobasil türleri laktatların oksidasyonuna bağlı olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) oluştururlar. Laktobasiller metabolik aktiviteleri sonucu oluşan H₂O₂'nin antibakteriyel etkisi olmasına karşın, özellikle fermente sucuklarda hatalı renk ve ransiditeye neden olmasından dolayı arzu edilmez (REUTER, 1970; HECHELMANN, 1986; LÜCKE ve ark. 1986).

Bununla birlikte oluşan H_2O_2 , katalaz enzimine sahip bakteriler (stafilkok ve mikrokok türleri) tarafından parçalanarak etkisiz hale getirilir. Fermente sucuk üretiminde laktatların oksidasyonunu önlemek için, mümkün olduğu kadar sucuk hamurundan oksijenin uzaklaştırılması ve katalaz enzimine sahip starter kültür niteliğindeki stafilkok ve mikrokok türlerinin üretimde kullanılması gerektiği bildirilmiştir (LÜCKE ve ark. 1986; WEBER, 1993).

Laktobasillerin H_2O_2 oluşturma özellikleri dışında, düşük oranda da olsa bazı türlerin uygun koşullarda (düşük pH, anaerob ortam, düşük karbonhidrat miktarı) hidrojen sülfür (H_2S) oluşturmalarına bağlı olarak, yeşilimsi renk bozukluğuna neden oldukları bildirilmiştir (SHARPE ve FRANKLIN, 1962). LEE ve SIMARD (1984) çalışmalarında test ettikleri değişik laktobasil türlerinin çoğunun H_2S ürettiklerini bildirmişlerdir. Aynı şekilde EGAN ve ark. da (1989) yaptıkları çalışmada *L. sake* L13 suşu ile kontamine edilen vakum paketlenmiş etlerde pH 6.4-6.6'da H_2S oluşumu 9. günde gözlenirken, 250 µg glikoz ilave edilmiş ya da normal pH4'lü etlerde (5.6-5.7) H_2S 'in 19. günde oluşturduğunu bildirmişlerdir. Yine SHAY ve EGAN (1981) *L. sake* L13 suşu ile kontamine edilen vakumla paketlenmiş etlerde, bu suşun arzu edilmeyen koku oluşumuna neden olduğunu ve ortamda glikozun bulunmadığı ve pH'nın yüksek olduğu durumlarda sisteni enerji kaynağı olarak kullanabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışma Türk fermente sucuğundan izole edilen laktobasil türlerinin H_2O_2 ve H_2S oluşturma özelliklerini saptamak amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada, ÖZDEMİR (1995) ve ÖZDEMİR ve ark. (1996) tarafından Türk fermente sucuklarından izole edilen *L. sake* (63 suş), *L. curvatus* (12 suş) ve *L. plantarum*'dan (3 suş) oluşan toplam 78 adet laktobasil suşu test edilmiştir.

Suşların H_2O_2 oluşturma özelliklerini saptamak için, MRS-Pyrolusit agar (CORETTI, 1958; REUTER, 1970) ile MRS-ABTS-Peroksidaz agar (MÜLLER, 1985) kullanılmıştır. Bu amaçla suşlar, MRS broth'a ekilerek 30°C'de 24 saat süreyle anaerob ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra suşlardan MRS-Pyrolusit agar ve MRS-ABTS- Peroksidaz agara çizme yöntemiyle ekim yapılmıştır. MRS-Pyrolusit agara ekilen petripler ise 30°C'de 48 saat süreyle anaerob, bunu takibinde 6 saat süreyle aerob ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası koloni etrafında fazla veya az miktarda mavi-viyole renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (CORETTI, 1958; REUTER, 1970; MÜLLER, 1985).

Suşların H_2S oluşturma özelliklerini saptamak için ise, Lead Acetat agar (Difco), Lysine Iron agar (Difco), Lysine Iron agar (Difco) ve Triple Sugar Iron agar (Difco) kullanılmıştır. Bu amaçla suşların 24 saatlik sıvı kültürlerinden besiyerlerine sürme yöntemiyle ekim yapılarak, 30°C'de 2 hafta süreyle inkübasyona bırakılmış ve besi yerinde siyah renk oluşumu günlük olarak kontrol edilmiştir (LEE ve SIMARD, 1984).

ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada H_2O_2 ve H_2S oluşturma özellikleri yönünden test edilen laktobasil suşlarının, H_2O_2 oluşturma özelliklerine ilişkin sonuçlar Çizelge 1'de, H_2S oluşturma özelliklerine ilişkin sonuçlar ise Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Laktobasil Suşlarının MRS-Pyrolusit Agar ve MRS-ABTS Agarda H_2O_2 Oluşturma Özellikleri

Tür	Suş sayısı	MRS-Pyrolusit agarda		MRS-ABTS-Peroksidaz agarda	
		pozitif suş sayısı	%	pozitif suş sayısı	%
<i>L. sake</i>	63	49	77.7	52	82.5
<i>L. curvatus</i>	12	9	75	8	66.6
<i>L. plantarum</i>	3	1	33.3	1	33.3

Çizelge 1'de görüldüğü gibi, 63 adet *L. sake* suşundan 49'u (%77.7) her iki besiyerinde de pozitif reaksiyon göstermesine karşın, MRS-Pyrolusit agarda negatif reaksiyon österen 3 suş MRS-ABTS-Peroksidaz agarda pozitif reaksiyon göstermiştir. Aynı şekilde *L. curvatus* suşlarından 9'u (%75) MRS-Pyrolusit agarda pozitif reaksiyon göstermesine karşın, aynı suşların 8'i (%66.6) MRS-ABTS-Peroksidaz agarda pozitif reaksiyon göstermiş ve 1 suş MRS-Pyrolusit agarda pozitif reaksiyon göstermesine karşın, aynı suş MRS-ABTS-Peroksidaz agarda negatif reaksiyon göstermiştir. *L. plantarum* suşlarının ise sadece 1'i (%33.3) her iki besiyerinde pozitif reaksiyon göstermiştir.

Çizelge 2. Laktobasil Suşlarının Lead Acetat Agar, Lysine Iron Agar ve Triple Sugar Iron Agarda H₂S Oluşturma Özellikleri.

Tür	Suş sayısı	Lead Acetat agarda pozitif suş sayısı	%	Lysine Iron agarda pozitif suş sayısı	%	Triple Sugar Iron agarda pozitif suş sayısı	%
<i>L. sake</i>	63	6	9.5	3	4.7	1	1.5
<i>L. curvatus</i>	12	2	16.6	1	8.3	1	8.3
<i>L. plantarum</i>	3	-	-	-	-	-	-

Çizelge 2'de görüldüğü gibi, 63 adet *L. sake* suşundan 6'sı Lead Asetat agarda pozitif reaksiyon göstermesine karşın, suşlardan 3'ü Lysine Iron agarda, 1'i de Triple Sugar Iron agarda pozitif reaksiyon göstermiştir. Yine test edilen 12 adet *L. curvatus* suşundan 2'si Lead Asetat agarda pozitif reaksiyon göstermesine karşın, aynı suşlardan 1'i Lysin Iron agar ve Triple Sugar Iron agarda pozitif reaksiyon göstermiş, diğerleri ise her 3 besiyerinde de negatif reaksiyon göstermiştir. *L. plantarum* suşları ise her 3 besiyerinde de negatif reaksiyon göstermiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada test edilen laktobasil türleri genelde H₂O₂ oluşturmaya karşın, H₂S oluşturma özellikleri ise daha düşük oranda bulunmuştur.

LÜCKE ve ark. (1986) yaptıkları çalışmada H₂O₂ oluşturma özellikleri yönünden test ettikleri laktobasil türlerinin genelde yüksek oranda H₂O₂ oluşturduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında H₂O₂ oluşumunu saptamak için kullandıkları farklı besiyerleri içerisinde MRS-Pyrolusit ve MRS-ABTS-Peroksidaz agarın sonuçlar yönünden benzerlik göstermekle birlikte, MRS-ABTS agarın H₂O₂'in kantitatif saptanmasında daha uygun olacağı görüşünde olduklarını bildirmişlerdir. Buna ilaveten CORETTI (1958), MRS-Pyrolusit agarda, pozitif durumlarda koloni etrafında oluşan açık zon çapının asit oluşumuna bağlı olduğunu bildirmiştir.

Aynı şekilde bu çalışmada H₂O₂ yönünden test edilen, 3 adet *L. plantarum* suşundan 2'si her iki besiyerinde de negatif reaksiyon göstermesine karşın, 1'i pozitif reaksiyon göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarından da anlaşılacağı gibi, genelde *L. sake* ve *L. curvatus* suşları H₂O₂ oluşturmalarına karşın, *L. plantarum* suşlarında bu özelliğin daha düşük düzeyde olduğu saptanmış olup, bu özellik GÖTZ ve ark.'nın (1980) bildirdiği gibi, bazı *L. plantarum* suşlarının laktatların oksidasyonu sonucu, H₂O₂ yerine su ve piruvat oluşturma özelliklerine bağlanabilir.

LÜCKE ve ark. (1986), H₂O₂ oluşturma özellikleri yönünden test ettikleri laktobasil türlerinin (*L. sake*, *L. curvatus*) genelde MRS-Pyrolusit ve MRS-ABTS-Peroksidaz agarda benzer sonuç göstermekle birlikte, 2 adet *L. sake* suşunun MRS-Pyrolusit agarda negatif reaksiyon göstermesine karşın, MRS-ABTS-Peroksidaz agarda pozitif reaksiyon gösterdiğini, aynı şekilde 1 adet *L. curvatus* suşunun MRS-ABTS-Peroksidaz agarda negatif reaksiyon göstermesine karşın, MRS-Pyrolusit agarda pozitif reaksiyon gösterdiğini bildirmiş olup, araştırmacıların sonuçlarıyla bu çalışmanın sonuçları uyum göstermektedir.

LEE ve SIMARD (1984) yaptıkları çalışmada, test ettikleri 41 adet laktobasil türünden 30'unun Lead Acetat agarda pozitif reaksiyon göstermesine karşın, 11'inin negatif reaksiyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bazı laktobasil türlerinin her üç besiyerinde de benzer sonuç vermekle birlikte, bazı türlerin Lead

Acetat ve Lysine Iron agarda pozitif, Triple Sugar Iron agarda ise negatif sonuç verdiğini, bunun da özellikle Triple Sugar Iron agarın diğer besiyerlerle oranla daha yüksek düzeyde sakaroz, dekstroz ve laktöz içermesinden kaynaklandığını bildirmiştir. Araştırmacıların sonuçlarıyla bu çalışmanın sonuçları arasında farklılık bulunmakta olup, bu farklılığın muhtemelen gerek test edilen laktobasil türlerinin gerekse, suşlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

EROL ve ark. (1994), dumanlanmış ve vakumla paketlenmiş fermente sucuklarda paketlenmeyi takiben 2. ve 4. günlerde paketin açılmasıyla birlikte az veya belirgin, H₂S kokusu saptandığını ve izole edilen laktobasillerin içerisinde 10³-10⁴ kob/g seviyesinde H₂S oluşturma yeteneğinde olan *L. curvatus* identifiye ettiklerini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak Türk fermente sucuğundan izole edilen, laktobasillerin genelde H₂O₂ oluşturmaya karşın, H₂S oluşturma özelliklerinin daha düşük düzeyde bulunduğu saptanmıştır. Fermente sucuk üretiminde H₂O₂ ve H₂S oluşumuyla, buna bağlı olarak arzu edilmeyen renk, koku ve lezzet oluşumunu minimal düzeye indirmek için, işletmelerde hijyenik kuralların yanı sıra sucuk hamurundan mümkün olduğunca oksijenin uzaklaştırılmasına ve üretimde aktif starter kültürlerin kullanılması gerektiği görüşüne varılmıştır.

KAYNAKLAR

- CORETTI, K. 1958. Rohwurstfehlfabrikate durch Laktobazillen. Fleischwirtsch. 10, 218-225.
- EGAN, A.F., SHAY, B., J., ROGERS, P.J. 1989 Factor affecting the production of hydrogen sulphide by *Lactobacillus sake* L13 growing on vacuum-packaged beef. J. Appl. Bacteriol. 67 (3), 255-262.
- EROL, İ., HILDEBRANT, G., WIEGNER, J. 1994. Dumanlanmış ve vakumla paketlenmiş fermente sucuklarda H₂S oluşum nedeni olarak *Lactobacillus curvatus*'un izolasyon ve identifikasyonu. Gıda 19 (4), 271-275.
- GOTZ, F., SEDEWITZ, B., ELSTNER, E.F. 1980. Arch. Microbiol. 125, 209. Alınmıştır: LÜCKE, F.K., POPP, J. und KREUTZER, R. 1986. Bildung von Wasserstoffperoxid durch Laktobazillen aus Rohwurst und Brühwurstaufschnitt. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 10, 78-81.
- HECHELMANN, H. 1986. Mikrobiell verursachte Fehlfabrikate bei Rohwurst und Rohschinken. Fleischwirtsch. 66 (4), 515-528.
- KAGERMEIER, A. 1981. Taxonomie und Vorkommen von Milchsäurebakterien in Fleischprodukten. Diss. rer. nat. Uni. München.
- LEE, B.H. and SIMARD, R.E. 1984. Evaluation of methods for detecting the production of H₂S, volatile sulfides and greening by lactobacilli. J. Food Sci. 49, 981-983.
- LÜCKE, F.K., POPP, J. und KREUTZER, R. 1986. Bildung von Wasserstoffperoxid durch Laktobazillen aus Rohwurst und Brühwurstaufschnitt. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 10, 78-81.
- MORISHITA, Y. and SHIROMIZU, K. 1986. Characterization of lactobacilli isolated from meats and meat products. Int. J. Food Microbiol. 3, 19-29.
- MÜLLER, H.E. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidase medium. Zbl. Bakt. Hyg. A 259, 151-154.
- ÖZDEMİR, H. 1995. Türk Fermente Sucuğunun Florasındaki Dominant Laktobasil Türlerinin Sucuğun Organoleptik Nitelikleri ile İlişkisi. Doktora Tezi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- ÖZDEMİR, H., ÇELİK, T.H., EROL, İ., ŞİRELİ, U. T., SIRIKEN, B. 1996. Yüksek Sıcaklık Derecesinde Olgunlaştırılan Türk Fermente Sucuklarında Laktobasillerin Seyir, İzolasyon ve İdentifikasyonu. Gıda 21 (6), 465-470.
- REUTER, G. 1970. Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischwaren. 1. Mitteilung: Vorkommen und Bedeutung. Fleischwirtsch. 50 (7), 951-954.
- SANZ, B., SELGAS, D., PAREJO, I. And ORDONEZ, A.J. 1988. Characteristics of Lactobacilli Isolated from dry Fermented sausages. Int. J. Food. Microbiol. 6, 199-205.
- SCHLINGER, U. and LÜCKE, F.K. 1987 Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiol. 4, 199-208.
- SHARPE, M.E. and FRANKLIN, J.G. 1962. Production of hydrogen sulfide by lactobacilli with special reference to strains isolated from cheddar cheese. (Abst.) 8th Int. Cong. Microbiol. 46.
- SHAY, B.J., EGAN, A.F. 1981. Hydrogen sulphide production and spoilage of vacuum-packaged beef by *Lactobacillus*. In Psychotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. Eds. ROBERTS, T.A., HOBBS, G., CHRISTIAN, J.H.B., SKOVGAARD, N. Academic Press, London, p. 241.
- WEBER, H. 1993. Rohwurstherstellung: Zur Bedeutung sogenannter Schutzkulturen und deren Stoffwechselprodukten Fleischwirtsch. 73 (7), 726-733.