

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

**SUCUKTAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PCR'A
DAYALI MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE TANIMLANMASI
Proje No:FBY-08-603**

YÜKSEK LİSANS TEZ PROJESİ

SONUÇ RAPORU

**Proje Yürütücüsü
Yrd.Doç.Dr. Zülal KESMEN
Gıda Mühendisliği Bölümü**

**Araştırmacı
Yük. Lis.Öğr. Ahmet Yetiman**

**08/2010
KAYSERİ**

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	3
ABSTRACT	4
GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	5
GENEL BİLGİLER.....	6
3.Gereç ve Yöntem.....	13
3.1. Örnekleme.....	13
3.2. Piyasadan temin edilen sucuk örneklerinde yapılan mikrobiyolojik ve fizikokimyasal analizler	14
3.2.1. Fizikokimyasal analizler	14
3.2.2. Duyusal Analizler	14
3.2.3. Sucuk Örneklerinde Laktik Asit Bakterilerinin Sayımı ve İzolasyonu.....	15
3.3. Piyasadan Toplanan Sucuk Örneklerinde Bulunan Laktikasit Bakterilerinin Kültür Bağımsız Yöntemle (PCR-DGGE) Tanımlanması.....	15
3.3.1. Sucuk örneklerinden DNA İzolasyonu	15
3.3.2. PCR-DGGE Analizi	17
3.4. Kültüre Alınan Laktikasit Bakterilerinin Moleküler Tekniklerle Tanımlanması....	19
3.4.1. Saf Kültürlerden DNA İzolasyonu	19
3.4.2. Saf Kültürlerin Rep-PCR (GTG ₅) Analizi.....	19
3.4.3. 16 S rRNA Geninin Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bankasındaki Dizilerle Karşılaştırılması.....	20
4. BULGULAR	21
4.1. Piyasadan temin edilen sucuk örneklerinde yapılan analizlerin sonuçları.....	21
4.1.1. Fizikokimyasal Analizler.....	21
4.1.2. Duyusal Analiz Sonuçları	21
4.1.3. Sucuk Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin Sayımı ve İzolasyonu.....	22
4.2. Piyasadan Toplanan Sucuk Örneklerinde Bulunan Laktikasit Bakterilerinin Kültür Bağımsız Yöntemle (PCR-DGGE) Tanımlanması.....	23
4.2.1. PCR-DGGE Analiz Sonuçları	23
4.3. Kültüre Alınan Laktikasit Bakterilerinin Moleküler Tekniklerle Tanımlanması....	26
4.3.1. Saf Kültürlerin Rep-PCR (GTG ₅) Analizi	26
4.3.2. 16 S rRNA Geninin Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bankasındaki Dizilerle Karşılaştırılması.....	26

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	27
KAYNAKLAR.....	29
Ek.1. Rep-PCR Analiz Sonuçları.....	34

ÖZET

SUCUKTAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PCR' A DAYALI MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE TANIMLANMASI

Bugün dünyada geleneksel fermente et ürünlerine özgü nitelikleri kazandıran mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler yakından takip edilerek fermentasyonda aktif rol alan bakterilerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu çalışmada, geleneksel et ürünümüz olan sucukta spontan olarak gelişen fermentatif bakteriler, PCR'a dayalı kültür bağımsız (PCR-DGGE) ve kültür bağımlı (rep-PCR ve 16 S rDNA sekans analizi) moleküler teknikler kullanılarak tanımlanmış ve bu fermentatif bakterilerin izole edildikleri sucuklarda bulunma oranı ve sıklığı belirlenmiştir.

Bu amaçla Kayseri ve Afyon piyasından temin edilen ve starter kültür kullanılmadan geleneksel yöntemlerle üretilen toplam 25 adet sucuk örneği incelenmiştir. Sucuk örneklerinden direkt DNA izolasyonu yapılarak gerçekleştirilen PCR-DGGE analizi sonucunda; sırasıyla *L. sakei* (%30), *W. viridescens* (%23), *L. curvatus* (%15) ve *L. brevis* (%5) türleri tespit edilmiştir. Sucuklardan izole edilen bakterilerin 16 S rDNA ve rep-PCR (GTG5) analizi sonucunda ise; *L. sakei* %41,8, *W. viridescens* %6,4, *L. curvatus* %14,5, *L. plantarum* %8,25, *Leuconostoc mesenteroides* %8,2, *L. brevis*'in %6,4 ve *L. farciminis*'in %5,5 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak fermente gıdalarda bulunan fermentatif bakterilerin hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilebilmesi için birden fazla moleküler tekniğin kullanıldığı polifazik bir yaklaşımın uygun olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Sucuk, fermentatif bakteriler, PCR-DGGE, rep-PCR, 16 S rDNA dizi analizi

ABSTRACT

Identification of Lactic Acid Bacteria in Fermented Turkish Sausages using PCR-Based Molecular Techniques

Artisanal sausages are increasingly appreciated by consumers because of their sensory properties and their authenticity. Such artisan fermented sausages are often of superior quality compared to controlled fermentations inoculated with industrial starters and possess distinctive qualities, partly due to the properties of the raw material and the characteristics of the technology used, but also to the specific composition of the house flora. These strains are well adapted to the meat environment and to the specific manufacturing process and thus are capable of dominating the microbiota of products. Above all, a better understanding of the microbiota and population dynamics of artisan fermented sausages could improve the fermentation process and the safety and standardization of such products and hence reduce economic losses, in this way reinforcing their position in a market characterized by ever increasing globalization and industrialization. The identification of microbial diversity using physiological and biochemical methods are notoriously difficult, time consuming and the results are often ambiguous. Alternatives to phenotypic methods to provide rapid and reliable identification, and simplify characterization procedures, molecular methods, have attracted the attention of many researchers in the last decade.

In this study the microbial ecology of 25 sucuk samples obtained from local producers in Kayseri and Afyon were investigated using a polyphasic approach, based on culture-dependent and -independent techniques. DGGE was used for the analysis of PCR products obtained from DNA extracted directly from the sucuk samples. As a consequence the most frequently found bacterial species were *Lactobacillus sakei* (30%), *Wisella viridescens* (23%), *Lb. curvatus* (15%). After molecular identification of 119 LAB strains by using rep-PCR and 16 S rDNA sequencing the species more frequently isolated were *Lactobacillus sakei* (41.8%), *Lactobacillus curvatus* (14.5%). Consequently it is suggested that a polyphasic strategy essentially based on one or more molecular techniques is necessary for accurate species identification in fermented foods.

Keywords: Sucuk, fermentative bacteria, PCR-DGGE, rep-PCR, 16 S rDNA sequencing

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Fermente et ürünlerinin üretiminde starter kültürler tat, aroma ve renk gibi duyuşal özellikleri geliştirmek ve ürün dayanıklılığını artırmak ve olgunlaşma süresini kısaltmak amacıyla Avrupa ve ABD’de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde ise geleneksel fermente et ürünümüz olan sucuk üretiminde ürün kalitesinin artırılması ve korunması amacıyla starter kültür kullanımı tavsiye edilmekte ve giderek yaygınlaşmaktadır. Ancak ülkemizde starter kültür üretilmediğinden sucuk üretiminde batı ülkelerinde değişik fermente et ürünlerinin üretiminde kullanılan starter kültürler kullanılmaktadırlar. Dolayısıyla bu kültürlerden hangilerinin Türk sucuğuna uygun olduğu belli değildir ve kullanımı daha çok yabancı ülkelerdeki starter kültür üreten firmaların önerileri doğrultusunda olmaktadır. Bu da, ürünler ne kadar hijyenik, kaliteli ve standart olursa olsun, tat-aroma özellikleri açısından Türk sucuğu özelliklerine uymayan ürün üretimine neden olmaktadır. Oysa son yıllarda kendine özgü duyuşal özellikler taşıyan geleneksel fermente sosislere olan tüketici talebi giderek artmakta ve dünyada bu konuda ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin Avrupa Birliği desteğı ile hazırlanan projelerle (Tradisausage, QLK1 CT-2002) geleneksel sosislerin zengin aromatik özelliklerinin korunması ve daha güvenli sosis üretiminin sağlanması amaçlanmaktadır. Geleneksel ürünler ile endüstriyel ürünler arasında belirgin farklılıklar olup bu durum özellikle ürüne ilave edilen ticari starter kültürler ile doğal olarak ürüne kontamine olan florada bulunan fermentatif bakterilerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Geleneksel ürünlerdeki yerel flora ürüne daha iyi adapte olduğundan daha yüksek metabolik aktivite göstermekte dolayısıyla daha kaliteli sosis üretimi mümkün olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda geleneksel fermente et ürünlerine özgü nitelikler kazandıran mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler yakından takip edilmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda PCR’a dayalı teknikler özellikle denatüre gradient jel elektroforez (denaturing gradient gel electrophoresis DGGE) sistemi, 16 S rDNA sekans analizi ve rep PCR teknikleri öne çıkmaktadır. Dolayısıyla dünyada bu konuda ortaya çıkan gelişmelere paralel olarak geleneksel et ürünümüz olan sucukta spontan olarak gelişen fermentatif bakterilerin hassas ve güvenilir yöntemlerle belirlenmesi ve bunların starter kültür olarak kullanılabilme potansiyelinin ortaya konulması ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu nedenle tamamlanan projede; Türk sucuğuna özgü geleneksel değerlerin korunduğu, duyuşal ve mikrobiyolojik kalitesi yüksek, teknolojik yönden daha güçlü starter kültür kombinasyonlarının belirlenmesi için;

1. Sucukta spontan olarak gelişen ve Türk sucuğuna özgü tat ve aromayı oluşturan fermentatif bakterilerin belirlenmesi,
2. Sucuk üretim prosesine ve formülasyonuna iyi adapte olamamış, ithal starterlerin aksine daha kolay adapte olabilen metabolik aktivitesi daha yüksek ve patojen bakterilerle daha iyi rekabet eden dominant türlerin tespit edilmesi,
3. Türk sucuğunun fermentatif bakteri çeşitliliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Sucuk geleneksel bir et ürünümüz olup, kıyma makinesi veya cutterde kıyılmış et ve yağın, tuz, şeker, çeşitli baharat ve çok az miktardaki diğer katkı maddeleri ile karıştırılıp, doğal veya yapay kılıflara doldurulması ve belirli bir sıcaklık derecesinde nisbi rutubet, hava cereyanı ve sürede olgunlaştırılması ile elde edilen fermente kuru et ürünleridir (Gökalp ve ark., 2004). Ülkemizde sucuk, diğer işlenmiş et ürünlerine kıyasla daha fazla üretilmekte ve tüketilmektedir.

Sucuk üretimi et ürünleri üretim teknikleri içerisinde en kritik ve zor olanlardan birisidir. Üretimi oldukça fazla teknolojik bilgi birikimi, uygun işletme şartları ve tecrübe gerektirmektedir (Gökalp ve ark., 2004).

Sucuk üretiminde en kritik aşama, fermentasyon ve kurutmayı içeren olgunlaştırma safhasıdır. Fermentasyon süresince azalan pH değeri ile su kaybı hızlanır, kuruma çabuklaşır, arzu edilen tekstür, tat ve aroma oluşur, renk oluşumu hızlanır ve mikrobiyel bozulma önlenir (Bacus 1984, Ramirez ve ark., 1995, Fisher and Palmer 1995, Blom ve ark., 1996). Fermente et ürünleri kendine özgü karakteristik bir lezzete sahiptir. Diğer gıdalarda olduğu gibi, fermente et ürünlerinde de özellikle tüketici açısından büyük önem taşıyan ve uygulanan proses ile ürün formülasyonuna bağlı olarak değişiklik gösteren lezzet, fermentasyon ve olgunlaştırma aşamalarında gerçekleşen mikroorganizma faaliyetleri ve enzim aktiviteleri sonucu oluşur (Dainty and Blom 1995).

Fermente sucuk üretiminde, pH'nın arzulanan şekilde düşüş seyri hamura katılan starter kültürlerle sağlanabilir. Starter kültürler fermente et ürünlerine duyuşal özellikleri geliştirmek, dayanıklılığı artırmak, olgunlaştırma süresini kısaltmak ve kontrol etmek amacıyla katılan, spesifik özellikleri nedeniyle seçilmiş saf veya karışık kültür halindeki mikroorganizmalardır. Fermente sucukların hazırlanmasında mikroorganizmaların kullanılması hususunda 1919 yılından beri öneriler ve patent çalışmaları olmasına karşın, ilk defa strater kültürler 1960'lı yılların başlangıcında piyasaya sürülmüştür. Bugün, teknolojiye gelişmiş ülkelerin çoğunda; fermente, kuru, yarı-kuru sosis ve salamların üretiminde starter kültürlerden faydalanılmaktadır. Starter kültür katımı ile olgunlaşmadaki prosesler daha iyi kontrol edilebilmekte, böylelikle standart ve üstün kalitede ürünler üretmek mümkün olabilmektedir. Ayrıca, kültürlerin kullanımı ile patojen ve toksik mikroorganizmaların inhibisyonu sağlanmakta ve böylelikle de mikrobiyolojik açıdan daha güvenilir ürünler halkın tüketimine sunulmaktadır (Gökalp ve ark., 2004).

Ülkemizde büyük et işletmeleri, sucuk üretiminde batı ülkelerinden ithal ettikleri değişik fermente et ürünleri üretiminde kullanılan starter kültürleri kullanmaktadırlar. Fakat bu kültürlerden hangilerinin Türk sucuğuna uygun olduğu belli değildir ve kullanımı daha çok yabancı ülkelerdeki starter kültür üreten firmaların önerileri doğrultusunda olmaktadır. Bu da, ürünler ne kadar hijyenik, kaliteli ve standart olursa olsun, tat-koku özellikleri açısından Türk sucuğu özelliklerine uymayan ürün üretimine neden olmaktadır (Vural, 1992). İşte bu nedenle sucuk üretiminde uygun starter kültürün belirlenmesi oldukça önemlidir.

Diğer taraftan Türkiye'de sucuk üretiminde bazı entegre işletmeler dışında çoğu işletmelerde teknolojik gelişmelerden uzak geleneksel yöntemlerle ve starter kültür kullanılmadan üretim yapılmaktadır. Bu tür teknolojik yetersizlikler sucuğun olgunlaşmasını olumsuz yönde etkilemekte ve ayrıca sucuğun olgunlaşma süresini uzatarak ekonomik açıdan sorunlar oluşturmaktadır. Olgunlaşma sırasında çoğu durumlarda istenilen aroma elde edilememekte,

sucuk piyasaya sürülemeyecek kalitede üretilmekte ve çoğu kez bu haliyle piyasaya sürülmektedir (Vural, 1992).

Fermentasyon ve kurutma işlemleri eti uzun süre muhafaza etmek ve yeni ürün üretmek amacıyla kullanılan en eski yöntemlerdir. Fermentasyon işlemi mikroorganizma, et ve teknolojinin bulunduğu bir prosestir (Molly ve ark., 1997, Incze 1998, Caplice ve Fitzgerald 1999, Nassu ve ark., 2003, Sakhare ve Rao 2003). Fermente et ürünü üretim tekniği etin muhafazası için daha az enerji gerektirir ve yüksek kaliteli ürün üretimini sağlar. Fermente et ürünleri arasında en çok üretilen ürün olan fermente sucuklar, üretim esnasında fermentasyon işlemi uygulanması ve buna bağlı olarak da son ürünün farklı bir tekstür ve lezzet kazanması gibi nedenlerden dolayı, diğer sosis tiplerinden farklılık gösterirler (Korel, 1996).

Ülkemizde yaygın olarak üretilen ve tüketilen bir et ürünü olan sucuk da bir fermente sosis çeşididir. Geleneksel üretimde, uzun süreli kurutma işleminden sonra ürüne ısıl işlem uygulanmazken, endüstriyel üretimde olgunlaştırma olarak bilinen kısa süreli kurutma işleminden sonra ürün ısıl işleme tabi tutulur (Coşkun, 2002).

Fermente sucuk hamurunun ana bileşeni olan et kesim aşamasından itibaren çeşitli mikroorganizmalarla kontamine olur. Kontamine olan mikroflora fermente edici ve fermente edici olmayan mikroorganizmaları bir arada içermektedir. Et yüksek besleyici özelliği, su aktivitesi değeri ve yaklaşık olarak 7,0 olan pH değeri nedeniyle mikrobiyel gelişmeye uygun bir ham materyaldir (Kröckel, 1995). Fermente sucuk üretiminde spontan fermentasyon sonucu ete kontamine olan mikroorganizmalar zengin bir ortamda gelişme göstererek arzu edilmeyen tat, yapı ve renk gelişimine de neden olurlar.

1950'lerden itibaren starter kültürlerin fermente sucuk üretiminde önemli bir katkı olarak kullanımı artış göstermiştir (Jessen 1995). Şöyle ki; fermente sucuk üretiminde starter kültürler; gıda güvenliğini ve ürün stabilitesini artırmak, bozulmaya neden olan mikroorganizmaların gelişmesini ve diğer değişimleri engellemek, arzu edilen yapı ve renge sahip, çeşitli özellikte ve sağlıklı ürün üretimini sağlamak amacıyla kullanılır (Vignolo ve ark., 1989, Ramirez ve ark., 1995, Garriga ve ark., 1996, Larroure ve ark., 2000, Lücke 2000, Deumier and Collignan 2003, Sakhare and Rao 2003). Fermente et ürünleri üretiminde arzu edilir ve güvenilir mikrofloranın gelişimi için uygun olan koşulların belirlenmesi ve uygulanması önem taşır (Campbell-Plat 1995).

Starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmalar gıdaların duyu özelliklerini artırdıkları gibi *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* gibi arzu edilmeyen mikroorganizmaların gelişmesini engelleyerek koruyucu özellik de gösterirler (Girard ve Bucharles 1992, Hammes and Knauf 1994, Caplice and Fitzgerald, 1999, Candoğan, 2000). Daly ve ark., (1973) farklı starter kültürlerin etkisini araştırdıkları deneylerinde starter kültür olarak *Lactobacillus-Micrococcus* suşlarını kullanmışlardır. Ürettikleri fermente sucuklarda enterotoksin oluşumunun önlenmesinde *Micrococcus* suşlarının etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Masters ve ark., (1981) ürettikleri fermente yaz sosislerinde starter kültür olarak *Lactobacillus plantarum*'u kullanarak *Salmonella newport* ve *Salmonella typhimurium*'u tamamen elemine etmişlerdir. Sakhare and Rao (2003) yaptıkları çalışmada; model sistemde kullandıkları laktik asit bakterileri ile yüksek sıcaklıklarda fermentasyon işlemi sonucunda hızla düşen pH değerinin bozulma yapan ve patojen olan mikroorganizmaların gelişimlerini önlediğini belirtmişlerdir. Yine Gonzalez ve Diez (2002) *Lactobacillus sake* kullanarak ürettikleri chorizoda (İspanyol kuru fermente sosisi) elde ettikleri benzeri sonuçları düşük pH değeri yanında *L. sake*'nin antimikrobiyel etkisine de bağlamışlardır.

Fermente et ürünlerinde laktik asit bakterilerinin kullanımı bakteriyosinler açısından da önemlidir. Bakteriyosinler antimikrobiyel peptit veya proteinlerdir. Nisin gıda katkı maddesi olarak direkt kullanılabilen bir bakteriyosin olup, *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilmektedir. Nisin birçok patojen mikroorganizma içeren gram pozitif bakteri grubunun gelişimini önler ve ayrıca *Clostridium* sporlarının gelişmesini de engeller. Fermente sucuklarda nisin kullanımı patojen bakteri gelişimine karşı korunma açısından çok başarılı olmasa da kütleme ajanı olarak kullanılan nitrit oranını düşürmektedir (Lindgren ve Dobrogosz 1990, Caplice and Fitzgerald, 1999, Lücke, 2000). Şöyle ki et ürünlerinde *Clostridium botulinum* sporlarının gelişmesi üzerine 75 IU g⁻¹ nisin ve 40 ppm nitrit kullanımının 150 ppm düzeyindeki nitrit kullanımından daha etkili olduğu gözlenmiştir (Vanderbergh 1993).

Fermente et ürünlerinde kullanılan bakteriyel starter kültürler; *Pediococcus* ve *Lactobacillus* gibi laktik asit bakterileri ile Aktinobakterler ve *Micrococcaceae* familyasına ait bakterilerdir. Starter kültürler liyofilize edilmiş veya dondurulmuş konsantratlar olarak ikili veya üçlü karışımlar halinde kullanılır (Montel ve ark., 1993, Korel, 1996, Candoğan, 2000). Starter kültür kullanımı ile ürünün hijyenik kalitesi artırıldığı gibi aynı zamanda iyi bir tekstür ve lezzet gelişimi ile daha uzun raf ömrüne sahip yüksek kaliteli bir ürün üretimi de gerçekleştirilir (Vignolo ve ark., 1989, Hammes ve Knauf 1994, Candoğan 2000, Lücke 2000).

Fermentasyonda laktik asit bakterilerinin kullanımı üretimin başarılı bir şekilde tamamlanmasını etkilemektedir (Candoğan 2000). Laktik asit bakterileri, şekerleri metabolize etmelerine göre homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki gruba ayrılırlar (Caplice ve Fitzgerald 1999) (şekil 2.1.). Üretimde genellikle homofermantatif laktik asit bakterileri tercih edilmekte ise de ticari olarak kullanılan laktobasiller fakültatif heterofermantatif grup dahilindedir. Fermente sucuk üretiminde starter kültür olarak kullanılan ve üzerinde birçok araştırmalar yürütülen laktobasiller; *L. acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sake* ve *L. lactis*'tir. Fermente sucuk üretiminde starter kültür olarak en çok kullanılanları ise mezofil olan *L. plantarum* ve psikrofilik olan *L. sake* ve *L. curvatus* suşlarıdır (Girard and Bucharles 1992, Hammes and Knauf 1994). Bu suşların fermente ettikleri karbonhidrat sayıları *L. plantarum* > *L. sake* > *L. curvatus* sırasını izlemektedir. Bununla beraber, fermente sucuk üretiminde kütleme ajanı olarak kullanılan nitrat, bu suşlar arasında sadece *L. plantarum* tarafından nitrite indirgenir (Kröckel 1995). Diğer bir laktik asit bakterisi olan Pediokokların, fermente sucuk üretiminde kullanımının asıl nedeni homofermantatif olarak laktat üretmesidir fakat laktobasillere kıyasla üründe keskin tat oluşumu üzerine daha az etki eder (Jessen, 1995, Candoğan, 2000).

Pediokoklardan *P. acidilactici* ve *P. pentosaceus* olmak üzere iki suş starter kültür olarak kullanılır (Candoğan 2000). *P. acidilactici* kolay liyofilize edilmesi, tekrar aktive olması ve depolanabilmesi gibi özelliklerinden dolayı fermente et ürünü üretiminde kullanılan ilk ticari starter kültürdür (Kröckel 1995). *P. acidilactici* hızlı fermentasyon işleminde genellikle starter kültür olarak kullanılır ve düşük sıcaklık derecelerinde asit üretimi de azalır (Hammes ve Knauf 1994, Kröckel 1995). Johansson ve ark., (1994), yaptıkları çalışmada starter kültür olarak *P. pentosaceus* ve *S. xylosus*'u birlikte kullanmışlar ve olgunlaşma döneminde meydana gelen asit tadın D-laktik asit ve asetik asitten kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin asıl rolü, sosis hamuruna katılmış olan şekerlerden hızla ve güvenli bir şekilde laktik asit üretmektir. Laktik asit üründe pH değerini düşürürken, ekşi tat oluşumuna da neden olur. Ayrıca mikroorganizmalar tarafından üretilen laktik asitin neden

olduğu bu pH düşüşünün etkisiyle, et proteinlerinin denatürasyonu sonucu meydana gelen yapısal değişiklikler son ürün tekstürünün oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Smith and Palumbo 1983, Vignolo ve ark., 1989, Johansson ve ark., 1994, Dainty and Blom 1995, Hagen ve ark., 1996).

Micrococcaceae familyası içinde fermente et ürünlerinde en çok kullanılan suşlar *S. carnosus* ve *S. xylosus*'tur. Fermente sucuklarda bunların kullanımı, son üründe dallanmış aldehitler, metil ketonlar ve etil esterlerin yüksek oranlarda oluşumuna ve kürlenmiş ürün kokusunun artmasına neden olur. Ürün lezzeti üzerine önemli etkiye sahip olan uçucu bileşikler bu mikroorganizmaların amino asitleri katabolize etmeleri sonucu oluşur (Girard ve Buchard 1992, Stahnke 1999a). Bu starter kültürler ürünün lezzet ve renk özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılır (Smith ve Palumbo 1983, Vignolo ve ark., 1989, Sanz ve ark., 1997a,b, Sondergaard and Stahnke 2002). Stahnke, (1994), yaptığı araştırmada starter kültür olarak *S. xylosus*'u kullanmıştır. Araştırmacı, ürettiği fermente sucuklarda starter kültür kullanılmayan kontrol grubuna kıyasla fermente sucuk aromasının daha iyi geliştiğini ve kontrol grubunun hoş olmayan ransit bir kokuya sahip olduğunu rapor etmiştir. Stahnke (1999), starter kültür olarak *S. xylosus* ve *S. carnosus*'u kullanmış ve üründe oluşan aromatik bileşiklerin, bu bakterilerin amino asitleri katabolize etme özelliklerinden kaynaklandığını belirtmiştir. *S. xylosus*'un oluşturduğu aromatik bileşikler içinde ketonlar, aseton, 3- ve 4-metil-2-peptanon, sülfidler, dimetilsülfid ve dimetiltrisülfid gibi bileşiklerin çoğunlukta olduğunu ve *S. carnosus*'un oluşturduğu bileşikler arasında ise metil dallanmış kısa zincirli aldehitlerin ve asitlerin çoğunlukta olduğunu tespit etmiştir. Sondergaard and Stahnke (2002), model sistemde yaptıkları çalışmada *Staphylococcus* suşlarının gelişim ve aroma oluşturma özelliklerini etkileyen faktörleri incelemişler ve *S. carnosus* suşunun fermente sucuk aroma gelişimi için önemli olan aromatik bileşikler daha çok ürettiğini ve bu bileşiklerin özellikle lösin, izölösün ve valinden kaynaklanan esterler, asitler ve metil dallanmış aldehitler olduğunu rapor etmişlerdir.

Ülkemizde ve dünyada bazı küçük üreticiler fermente sucukların kendine özgü tat ve aromasını korumak amacıyla starter kültür kullanmadan doğal fermentasyon metodunu halen sürdürmektedirler. Bu durumda gerekli olan mikroorganizmalar hammadde ve ortamda bulunan ve yerli flora (house flora) olarak isimlendirilen floradan ileri gelmektedir.

Diğer taraftan geri ekleme (back-slopping) kullanılarak başarılı olmuş bir önceki partiden alınan bir porsiyon eklenerek yeni fermentasyon prosesinin başlaması kolaylaştırılabilir (Campbell-Platt and Cook, 1995). Bu tip fermente sucuklar çoğu zaman daha endüstriyel starter kültürlerin inokule edildiği kontrollü fermente sucuklarla karşılaştırıldığında daha üstün kaliteye sahiptirler ve kalite farklılığı hammaddenin özellikleri ve kullanılan teknoloji yanında yerli floranın spesifik kompozisyonu nedeniyle. Bu durum hammadde ve katkı maddeleri ve üretimde kullanılan teknolojiye iyi adapte olamamış endüstriyel starterlerin aksine ortama doğal olarak adapte olmuş bakterilerin metabolik aktivitesi ve diğer arzu edilmeyen mikroflora ile rekabet etme gücü daha yüksek olması ile açıklanmıştır.

Diğer taraftan ticari et starter kültürlerinin uygunluğu farklı tip ürünler için farklıdır. Yani bir fermente sosis tipi için iyi sonuç veren bir kültür diğer tip için mutlaka etkili olmayabilir. Örneğin ticari kültürlerin esas olarak Kuzey Avrupa ülkelerinde üretildiği için Güney Avrupa ülkelerindeki et işletmelerinde kolonize olmuş yerel florayı tamamen bulundurmadığı için arzu edilen duyusal özelliklerin kaybına yol açtığı ileri sürülmüştür (Samelis ve ark., 1998). Dolayısıyla çevresel faktörler ve üretim prosesi bakterilerin rekabet gücünü etkileyeceğinden

sis hamurunun spesifik formülasyonu ve fermentasyon teknolojisine uygun kültürler seçilmek zorundadır (Rebecchi ve ark., 1998).

Bugün dünyada geleneksel fermente et ürünlerine özgü nitelikleri kazandıran mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler yakından takip edilerek fermentasyonda aktif rol alan bakterilerin tanımlanmasında kullanılmaktadır.

Özellikle gıdalarda bulunan fermentatif bakterilerinin tanımlanmasında rutin olarak kullanılan fenotipik tiplendirme metodlarının temel dezavantajı mikroorganizmaların fenotipik özelliklerini değiştirme eğilimleridir. Fenotipik özelliklerde meydana gelen bu değişiklikler değişen çevre koşullarına bir yanıt olabilir ve önceden fark edilmemektedir. Ayrıca tek bir nükleotitte meydana gelen değişiklik fenotipten sorumlu olan herhangi bir genin fonksiyonunu bozabilmektedir. Böylece genotipik olarak farklı fakat fenotipik olarak ayırt edilmez izolatlar meydana gelebilmektedir (Aygün, 2008). Ayrıca fenotipik yöntemlerin iş yükünün fazla olması, uzun zaman alması ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması nedeniyle genotipik yöntemlere olan ilgi giderek artmaktadır (Temmerman, 2004).

Özellikle 1990'lerden sonra DNA'ya dayalı pekçok tabanlı tanımlama metodu geliştirilmiştir (Ercolini, 2004; Temmerman ve ark., 2004). Özellikle polimer zincir reaksiyonuna (polymerase chain reaction, PCR) dayanan yöntemler mikroorganizmaları karakterize etmek ve tiplendirmek için hızlı, güvenilir ve basit yöntemler olarak öne çıkmıştır. PCR temelli tiplendirme metodları mikrobiyal genom yapısının tamamını veya bir kısmını tarama yeteneğine sahiptir (Tekeli ve Ustaçelebi, 2006). Bu yöntemle çoğaltılan herhangi bir DNA molekülünün hedef fragmentleri, daha sonraki analiz basamaklarında kullanılmaktadır. Yüksek oranda korunmuş bölgelerin çoğaltılması ile akrabalık ilişkileri tanımlanabilir. Değişken DNA segmentlerinin çoğaltılması ise, yakın ilişkili türler arasındaki farklılıkları belirlemede kullanılmaktadır (Cocolin ve ark., 2001).

PCR'a bağlı DNA fingerprinting teknikleri; Randomly Amplified Polimorfik DNA (RAPD), repetitive extragenic palindrom (rep)-PCR, PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Amplified rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (ARDRA)'yı içerir (Temmerman ve ark., 2004; Singh ve ark., 2009)

Mikroorganizmaların tespit edilmesi ve tanımlaması için, 16S rRNA, ya da onu kodlayan gen gibi bazı moleküler markırların (işaretleyicilerin) kullanıldığı moleküler biyolojik teknikler, mikrobiyel çeşitliliği araştırmak ve mikrobiyal toplulukların yapılarını analiz etmek için artık daha sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla bir gıda matriksindeki bakteriyel izolatların cins seviyesinin ötesinde, tür seviyesinde tanımlanması için, 16S rRNA üzerinde türe özgü primerler dizayn edilebilmektedir (Mannu ve ark., 2002).

Mikroorganizmaların tür seviyesinde tanımlanması ve filogenetik analizlerinin yapılmasında 16S rRNA'nın değişken V1-V3 bölgelerinin dizi analizi giderek yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [Aman ve ark., 1995]. Ancak *Lb. plantarum*, *Lb. paraplaturum*, *Lb. pentosus* gibi yakın ilişkili türlerin ayrılması için 16S rRNA tam sekans analizi yeterli değildir. Alternatif olarak arasında tRNA genlerinde bulunduğu 16S-23S rRNA bölgesi dizi analizi daha uygun bir seçenek olabilmektedir [Gurtler ve Stanisich, 1996; Cocolin ve ark., 2001].

Rep-PCR tekniği prokaryotik genomdaki karakteristik bölgelerde bulunan tekrarlanan DNA elemanlarına yönelik primerler kullanılmaktadır. Tekrarlanan bakteriyel DNA elementlerinin PCR amplifikasyonu, yüksek ayırma gücü ve hızı, düşük maliyeti nedeni ile PCR tabanlı güçlü bir tanımlama tekniği olarak ortaya çıkmıştır. Berthier ve Beuvier (2001) yaptıkları bir çalışmada, Rep-PCR ile sosiste bulunan ve 16 rRNA dizi analizi ile ayıramayan *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* ve *Lb. alimentarius* ve *Lb. paralimentarius* türlerinin ayrımını yapabilmışlerdir.

Şüphesiz, bu metotların en önemli avantajlarından birisi mikroorganizmaların büyüme koşullarından bağımsız olmalarıdır. Genotip metotlar tür seviyesinden suş ve biyovaryete seviyesine kadar çeşitli seviyelerde ayırım yapabilme gücüne sahiptirler (Singh ve ark., 2009).

Hızla gelişen bir bilim dalı olan moleküler biyoloji alanında mikroorganizmaların doğal ekosistemde gözlemlenmesi ve tanımlanmasına dayalı metotların geliştirilmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla genellikle kültürel olmayan metotlara kullanılmaktadır. Kültürel olmayan tekniklerin tercih edilmesindeki temel neden, birçok bakterinin geliştiği doğal ortamla ilgili bilginin yetersiz olması ve bu ortamlara benzer şartların sağlanma zorluğudur. Birçok bakterinin çoğaldıkları doğal ortamlarıyla ilgili ayrıntılı bilgiler mevcut değildir. Bu yüzden bazı mikroorganizmaların doğal ortamlarına benzer şartların sağlanması zordur. Son yıllarda bu tür negatif etkilerin ortadan kaldırılması amacıyla kültürel olmayan teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerden en yaygın kullanılanı Denaturant gradient jel elektroforez tekniği (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)'dir. PCR tekniğinin DGGE ile kombinasyonu aynı boyuttaki fakat farklı dizilimdeki DNA parçaları arasındaki farklılıkların bulunmasına imkan sağlamaktadır. Bu parmak izi tanımlama tekniği, temelde çok yönlüdür ve tıp, çevre, ziraat ve gıda gibi pek çok alanda mikrobiyal popülasyonların dinamikleri ve ekolojilerinin tanımlanması ve gruplandırılmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Ercolini, 2004).

DGGE tekniğinde çift sarmallı DNA (dsDNA) molekülünün doğrusal denaturantlar (üre ve formamit karışımı) gradiyenti içeren poliakrilamid jellerdeki azalan elektroforetik mobilitesi bu ayırımın nedenidir (Muyzer ve Smalla, 1998). PCR tabanlı bu teknik amplifiye edilmiş DNA parçalarından oluşmuş karışımın, denatüre edici bileşenler içeren poliakrilamid jel içinde ayrılmasını sağlar. Normalde agaroz ya da akrilamid jel elektroforezinde her bir DNA parçasının elektronik mobilitesi onun boyutu ile orantılıdır. DGGE'de aynı boyuttaki DNA parçaları denaturasyon profillerine göre jel üzerinde ayrılır. Çift zincirli DNA (dsDNA) artan denatürasyon şartlarına maruz kalınca tek zincirli DNA (ssDNA) haline dönüşür (Wilson, 1997). dsDNA'nın denatürasyonunda fragmentler erime bölgeleri denen yerlerde kademe kademe denatüre olurlar ve sonuçta dsDNA, ssDNA'ya dönüşür. Erime bölgeleri, aynı sıcaklıkta eriyen baz dizilerinin oluşturduğu alanlardır. Denature edici gradiyent jelin belli bir noktasındaki erime sıcaklığı çift zincirli DNA'nın erime sıcaklığına ulaştığı zaman sarmallar kısmi olarak açılır ve molekülün ilerleyişi pratik olarak durur. Sekans varyasyonu erime sıcaklıklarının farklı olmasına neden olur ve farklı dizilime sahip moleküllerin ilerleyişi jelin değişik noktalarında sonlanır ve böylelikle farklı jel görüntüleri oluşturur. dsDNA parçalarının eriyip tek zincirli haline geldiği nokta nükleotid dizilimine ve G-C yüzdesine bağlıdır (Muyzer ve Smalla, 1998; Temmerman ve ark., 2004; Ercolini, 2004).

Pek çok ülkede geleneksel olarak üretilen fermente sosislerin mikrobiyal popülasyonunu tanımlamak amacıyla PCR-DGGE dayalı birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin; Fontanaa ve ark., (2005), PCR-DGGE tekniği kullanılarak fermente Arjantin sosislerinin mikrobiyal yükünün tanımlamışlardır. Yine birçok araştırmacı tarafından İtalyan sosislerinin

fermantasyon sırasındaki mikrobiyal kompozisyonu PCR-DGGE tekniği ile izlenmiştir (Cocolin ve ark., 2001; Aquilanti ve ark., 2007).

Sonuç olarak son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler yakından takip edilerek fermentasyonda aktif rol alan bakterilerin tanımlanması mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Ülkemizde sevilerek tüketilen geleneksel fermente et ürünümüz olan sucukta doğal olarak kontamine olan fermentatif bakterilerin moleküler biyolojik teknikleri ile tanımlanmasına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer taraftan ülkemizde starter kültür üretilmediğinden sucuk üretiminde batı ülkelerinden ithal edilen ve değişik fermente et ürünlerinin üretiminde kullanılan starter kültürler kullanılmaktadırlar. Dolayısıyla bu kültürlerden hangilerinin Türk sucuğuna uygun olduğu belli değildir ve kullanımı daha çok yabancı ülkelerdeki starter kültür üreten firmaların nerileri doğrultusunda olmaktadır. Bu da, ürünler ne kadar hijyenik, kaliteli ve standart olursa olsun, tat-koku özellikleri açısından Türk sucuğu özelliklerine uymayan ürün üretimine neden olmaktadır. İşte bu nedenle geleneksel et ürünümüz olan sucukta spontan olarak gelişen ve sucuğa karakteristik nitelikler kazandıran fermentatif bakterilerin hassas ve güvenilir yöntemlerle tanımlanması ve bunların starter kültür olarak kullanılabilme potansiyelinin belirlenmesi gerekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnekleme

Çalışmada, starter kültür katılmadan geleneksel yöntemle üretilen sucuklarda spontan olarak gelişerek fermantasyonda aktif rol alan ve sucuğa karakteristik özellikler kazandıran bakterilerin tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla Kayseri ve Afyon piyasasında satışa sunulan geleneksel yöntemle üretilmiş toplam 25 farklı marka ve üretim yerinden sucuk örnekleri satın alınmıştır. Üretici ve satıcılar tarafından kısa süreli bir ısıl işlem (pastörizasyon) uygulandığı beyan edilen örnekler ısıl işlem uygulanmadığı bildirilen örneklerden ayrılarak iki farklı grup oluşturulmuştur. Örneklerin üzerindeki etiket bilgileri (içerik, üretim tarihi, parti no vs) dikkatlice not edilmiştir.

Sucuk örneklerinin etiket bilgilerine göre tamamında; sığır eti, sığır eti yağı, kırmızı toz biber, sarımsak, tuz, kimyon, karabiber, yenibahar, antioksidan (E 300) ve antimikrobiyal (E 250) mevcut olup bunun dışında kullanılan ingredientler Tablo 3.1’de verilmiştir. Isıl işlem uygulanmış sucuklarda ise üretici firma ile görüşülerek uygulanan ısıl işlemin derece ve süresi hakkında bilgi alınmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. Piyasadan toplanan sucuk örneklerinin temel bileşenleri dışında bileşiminde yer alan diğer ingredientler.

Örnek No	İngredientler
1	Sodyum Kazeinat, Emülsifiye edici E452, Malto Dextrin, Aroma Arttırıcı E 621, Dekstroz, Asit düzenleyici E 575, Laktoz
2	Soya Proteinini, Dekstroz, Asitlik Düzenleyici (E 575), Emülgatör (E 450) Tarçın, Maltodekstrin, Aroma Arttırıcı (E 621)
3	Dekstroz, Stabilizatör (E 452)
4	Dekstroz, Malto Dekstrin, Monosodyum Glutamat (E 621), Aroma arttırıcı, Askorbik asit, Sodyum Nitrit (E 250)
5	Texture soya proteinini, Sodyum kazeinat, Karabiber, Tarçın, Carmin E120, Emülgatör E452, Aroma arttırıcı E621, Dekstroz, Asit Düzenleyici E575
6	Soya Proteinini(%70’lik), Emülgatör E 452, Lezzet Düzenleyici E621
7	Malto Dextrin, Asitlik Düzenleyici (E 575), Sodyum Kazeinat, Dekstroz,
8	Sodyum Nitrit (E 250), Emülgatör E 452, Lezzet Düzenleyici E621
9	Stabilizatör (E 452), Monosodyum Glutamat (E 621), Aroma Arttırıcı E 621,
10	Malto Dextrin, Stabilizatör (E 452), Monosodyum Glutamat (E 621), Soya Proteinini, Sodyum Nitrit (E 250)
11	Soya Proteinini, Aroma Arttırıcı E 621, Sodyum Nitrit (E 250), Sodyum Kazeinat,
12	Asitlik Düzenleyici (E 575), Emülgatör (E 450), Monosodyum Glutamat (E 621)
13	Emülgatör (E 450), Askorbik asit, Laktoz, Malto Dextrin,
14	Malto Dextrin, Aroma Arttırıcı E 621, Sodyum Nitrit (E 250), Dekstroz
15	Emülgatör (E 450), Monosodyum Glutamat (E 621), Sodyum Nitrit (E 250)
16	Asitlik Düzenleyici (E 575), Emülgatör (E 450), Lezzet Düzenleyici E621
17	Soya Proteinini, Aroma Arttırıcı E 621, Sodyum Nitrit (E 250), Sodyum Kazeinat
18	Malto Dextrin, Asitlik Düzenleyici (E 575), Sodyum Nitrit (E 250)
19	Stabilizatör (E 452), Lezzet Düzenleyici E621, Askorbik asit,
20	Malto Dextrin, Stabilizatör (E 452), Sodyum Nitrit (E 250), Laktoz
21	Sodyum Kazeinat, Emülsifiye edici E452, Dekstroz,
22	Asitlik Düzenleyici (E 575), Emülgatör (E 450), Sodyum Nitrit (E 250)
23	Asitlik Düzenleyici (E 575), Emülgatör (E 450), Dekstroz,
24	Askorbik asit, Sodyum Nitrit (E 250), Laktoz, Stabilizatör (E 452)
25	Asitlik Düzenleyici (E 575), Emülgatör (E 450), Lezzet Düzenleyici E621

Tablo 3.2. Piyasadan toplanan sucuk örneklerine uygulanan ısıl işlem parametreleri

Örnek No	Fırın Sıcaklığı (°C)	Hedef Alınan Merkez Sıcaklık (°C)	Süre
1	70-75	62-65	1-2 saat
2	80	63-68	1-2 saat
3	75	62-65	1-1,5 saat
4	72-75	65	1 saat
5	70	62-65	1-2 saat
6	70-75	65	1 saat
7	70	65	45 dk- 1 saat
8	70-75	62-65	2 saat

3.2. Piyasadan temin edilen sucuk örneklerinde yapılan fizikokimyasal analizler

Kayseri ve Afyon piyasasında temin edilen sucuk örneklerinde bazı fizikokimyasal ve duyuşal testler yapılmıştır.

3.2.1. Fizikokimyasal analizler

a. % Nem içeriği: Örneklerin kuru madde ve nem miktarları nikel kaplarda tartılan 10g analiz numunesinin 100°C’de kurutma dolabında sabit tartım elde edilinceye kadar kurutulması ile belirlenmiştir.

b. Tuz İçeriği: Sucuk örneklerinden 10’ar g alınmış ve üzerlerine 10 ml doymuş borax çözeltisi ve 50 ml sıcak saf su eklenerek Ultra-Turrax’da 60 sn homojenize edilmistir. Daha sonra 50 ml su ile yıkanarak, toplam hacime ilave edilmistir. 15 dak kaynayan su banyosunda tutulduktan sonra soğutulmuştur. Üzerine 2 ml Carrez I ve 2 ml Carrez II çözeltileri ilave edilmiş ve 200 ml’ye saf su ile tamamlanmıştır. Filtre kağıdından süzöldükten sonra bu süzöntüden 20 ml alınarak %10 (g/g)’luk potasyum kromat indikatörü eşliğinde 0,1 N AgNO₃ ile zayıf kalıcı kırmızı renk elde edilinceye kadar titre edilmiş ve % tuz miktarı, aşğıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Tuz} = \frac{\text{ml (0.1N AgNO}_3\text{) } \times F(\text{AgNO}_3) \times 5.8448}{\text{Örnek miktarı (g)}}$$

Burada;

ml: titrasyonda harcanan 0,1 N AgNO₃ ‘ın ml cinsinden miktarı,

F: Titrasyonda harcanan 0,1 N AgNO₃ ‘ın faktörü’dür.

c. a_w değeri: Örneklerin a_w değeri, a_w cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Cihaz kullanılmadan önce altı farklı tuz çözeltisi ile kalibre edilmiştir. Örneklerin bulunduğu özel plastik kapların kapakları açılarak cihazın ölçme kabinine yerleştirilmiş ve a_w değeri belirlenmiştir.

d. pH değeri: Homojen hale getirilmiş örneklerden 10’ar gram paralelli olarak tartılıp üzerine 100 ml saf su ilave edilerek Ultra – Turrax ile 1 dak. homojenize edildikten sonra pH değerleri pH–metre ile okunarak belirlenmiştir. pH metre kullanılmadan önce uygun tampon çözeltiler (pH 4.0 ve pH 7.0) ile kalibre edilmiştir.

3.2.2. Duyusal Analizler

Piyasadan temin edilen sucukların duyuşal olarak değerlendirilmesi on panelist tarafından yapılmış ve hedonik tip skala (1-9) kullanılmıştır. Sucuklar panelistlere dilimlenerek çiğ ve pişirilmiş olarak sunulmuştur. 8-10 kişiden oluşan panele, her gruba ait dilimlenmiş sucuk örnekleri kodlanarak verilmiş, çiğ ve pişirilmiş örneklerin ayrı ayrı belirlenmiş parametreler üzerinden puan ortalamaları alınmıştır.

3.2.3. Sucuk Örneklerinde Laktik Asit Bakterilerinin Sayımı ve İzolasyonu

Kayseri ve Afyon piyasasından temin edilen sucuk örneklerinde PCR-DGGE analizi ile tespit edilen laktik asit bakterilerinin saf kültürlerini elde etmek amacı ile ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir. İzolasyon için; 25 g sucuk örneği 225 ml distile su ile steril blender içerisinde homojenize edilmiştir. Elde edilen 10^{-1} 'lik dilüsyondan içerisinde 9 ml'lik steril distile su içeren tüplerde 10^{-8} 'e kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm dilüsyonlardan MRS ve M17 agarlara yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekim işlemleri tamamlanan M17 agarlı petriler, 30 °C' de aerobik ortamda, MRS agarlı petriler ise 30 °C' de anaerobik ortamda 48– 72 saat süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyon süreci tamamlandıktan sonra bu petrilerden; tek düşen, morfolojik olarak birbirinden farklı olan ve laktik asit bakterisi olduğu düşünülen koloniler (mat, krem rengi, beyaz, küçük koloniler) öze yardımı ile alınarak yeni MRS ve M17 agar petrilere çizgi ekim yöntemi ile aktarılmıştır. Ekim yapılan petriler elde edildikleri ortam koşullarında 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen izolatların tam olarak saflığı sağlanana kadar izolatlar çizgi ekim yöntemi ile MRS ve M17 agar petrilerinde pasajlanmıştır. Saf kültür haline getirilen izolatların ilk etapta gram boyama ve katalaz aktivitelerine bakılmış; gram pozitif, katalaz negatif olan kültürlerden DNA izolasyonu yapılarak 16 S rRNA dizi analizinde kullanılmıştır. Kültürler ayrıca antimikrobiyal aktivite ve diğer testlerde kullanılmak üzere %20' lik gliserol içerisinde stoklanmıştır. Ayrıca laktik asit bakteri sayısını tespit etmek için sucuk örneklerinden hazırlanan dilüsyonlardan MRS agara dökme plak yöntemine göre ekim yapılmış ve 30 ile 300 arasında koloni içeren petriler sayılmıştır.

3.3. Piyasadan Toplanan Sucuk Örneklerinde Bulunan Laktikasit Bakterilerinin Kültür Bağımsız Yöntemle (PCR-DGGE) Tanımlanması

3.3.1. Sucuk örneklerinden DNA İzolasyonu

Kayseri ve Afyon piyasasından temin edilen fizikokimyasal ve duyuusal analizleri yapılan sucuklardan DNA izolasyonu yapılmıştır. DGGE ön denemelerde görülen zayıf bantların şiddetlendirilmesi amacıyla ticari DNA izolasyon kit (Qiagen) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre; 10 g örnek stomacher torbası içerisinde 10 ml ringer çözeltisi ile birlikte homojenize edildikten sonra 2 ml homojenat 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Tüpler 5000xg'de 10 dak santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek tekrar 2 ml daha homojenat çökelti üzerine ilave edilmiş ve 5000xg de 10 dak santrifüj yapılmıştır. Oluşan pellet 180 µl lizozimli izolasyon solüsyonu (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8, 0.3mM lizozim) ile süspanse edilmiştir. Süspansiyon 37°C de 45 dak inkübe edildikten sonra 20 µl Proteinaz K ve 200 µl AL Buffer (Qiagen) eklenerek kısa süreli bir karıştırma işlemi uygulanmıştır. Tüpler önce 56°C de 30 dk sonra 95°C de 15 dk inkübe edilmiş ve daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur. Tüplere 200 µl etanol eklenip kısa bir karıştırıldıktan sonra tüp içerikleri spin kolonlara alınmıştır. Spin klonlar 6000xg de 1 dak santrifüj edilerek DNA'nın silika membranda tutulması sağlanmıştır. Spin klonlar önce 500 µl AW₁ Buffer (Qiagen) daha sonra ise yine 500 µl AW₂ Buffer (Qiagen) ile yıkanmıştır. 2000xg de 3 dak .santrifüj edilen tüpler oda sıcaklığında yaklaşık 30 dak kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin sonunda spin kolonlara 50 µl elüsyon buffer eklenip 6000xg de 3 dak santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elüe edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrede (Shimadzu 1700) ölçülerek belirlenmiştir. Örneklerle ait DNA'ların konsantrasyonları ve DNA/protein oranları Tablo 3.3'de verilmiştir.

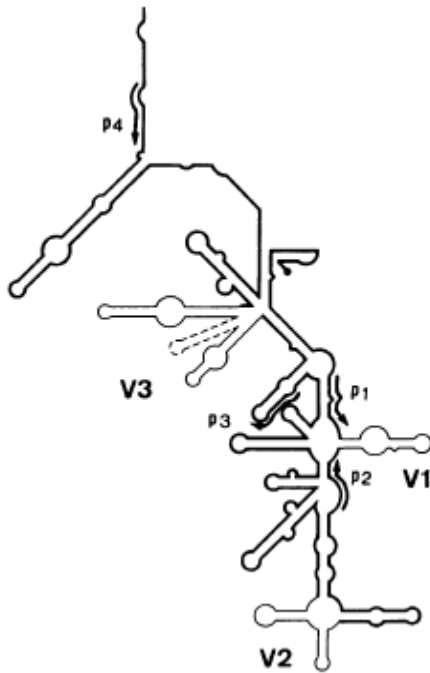
Tablo 3.3. Sucuk örneklerinden izole edilen DNA'ların konsantrasyonları ve DNA/protein oranları

Örnek No	DNA ng/μl	DNA/Protein	Örnek No	DNA ng/μl	DNA/Protein
1	390	1.85	14	480	1.75
2	960	1.78	15	1680	2.00
3	360	1.71	16	2370	2.00
4	480	1.60	17	1560	1.92
5	360	1.50	18	930	2.00
6	300	1.67	19	960	1.99
7	540	1.80	20	840	2.00
8	750	1.92	21	780	2.04
9	300	1.50	22	1080	1.97
10	480	1.78	23	750	1.90
11	210	1.50	24	540	1.85
12	1440	1.92	25	960	1.71
13	330	1.57			

3.3.2. PCR-DGGE Analizi

3.3.2.1. PCR primerleri

Sucuk florasına giren fermentatif bakterilerin belirlenmesi amacıyla PCR-DGGE analizi yapılmıştır. Son yıllarda 16S rRNA dizileri mikroorganizmaların tespiti ve filogenetik analizinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. V3 bölgesinin değişkenliği, pek çok fermentatif bakterinin birbirinden ayrılmasını sağlayacak PCR primerlerinin dizaynı için yeterli seviyededir. Bu amaçla 16s rRNA geni üzerinde yaklaşık 193 bç'lik bir fragmenti amplifiye (V3 bölgesi) etmek üzere Tablo 3.4'deki primerler kullanılmıştır. Denaturant gradient jel üzerinde yürütülen PCR ürününün çift zincirli yapısını korumak için ileri primerlerin 5' ucuna bir yüksek G-C içerikli bir GC clamp eklenmiştir.



Şekil 3.1. 16S rRNA geninin ikincil yapısının 5' bölgesinin şematik gösterimi. Korunmuş bölgeler koyu, değişken bölgeler ise ince çizgilerle gösterilmiştir (kesikli çizgi yapısı yalnızca birkaç mikroorganizmada mevcuttur). 16S rRNA'nın bu bölgesi V1, V2 ve V3 değişken bölgelerini içerir. Bu çalışmada V1 bölgesini amplifiye etmek için kullanılan primerler P1/P2 primerleri gösterilmiştir (Klijn et al., 1991).

Tablo 3.4. PCR Primerleri

Hedef Bölge	Primerler	Sequence (5'→3')	Amplikon uzunluğu	Literatür
16S	V3f	5'ACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'		Muyzer
V3	V3r	5'ATTACCGCGGCTGCTGG-3'		ve ark.,
	GC klamp	5'CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGG C-3'	193 bp	1993

3.3.2.2. PCR Karışımı ve Termal Döngü Şartları

Bakteriyel DNA'yı amplifiye etmek amacıyla 20 µl Taq PCR mix (Qiagen), 500 ng template DNA ve 0.8 µM ileri ve geri primerden oluşan toplam 50 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Termal döngü şartları touchdown prosedürüne göre; 95 °C'de 4 dak. ilk denatürasyon ve 95 °C'de 1 dak, denatürasyondan sonra annealing sıcaklığı 61 °C'den 51 °C'ye 0.5°C/döngü hızla düşürülmüş, 51 °C'de 10 döngü daha gerçekleştirilmiştir, her döngüde 72 °C'de 2.5 dak. ekstensiyon uygulanmıştır. PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığı 1.5% (w/v) jelde ve 0.5×TBE buffer içerisinde agaroz elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir.

3.3.2.3. DGGE Analizi

PCR ürünlerinin DGGE analizinde Dcode sistem (BioRad) kullanılmıştır.

3.3.2.3.1. Çözeltilerin Hazırlanması

% 40 lık akrilamid/bis (37.5:1) hazırlanması: 38.93 g akrilamid (Sigma/ A9099) ve 1.07 g bis-akrilamid (Sigma/ M7279) tartılmıştır ve dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.45µl'lik filtreden geçirilerek 4 °C'de muhafaza edilmiştir

50 x TAE tamponunun hazırlanması: 242 g tris base (Sigma/ T6066), 57.1 ml glacial asetik asit (SigmaA 9977), 100 ml 0.5 M EDTA (Sigma/ E5134) (pH 8.0), dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım 120 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1 x TAE yürütme tamponunun hazırlanması: 140 ml 50 x TAE tamponuna 6860 ml dH₂O ilave edilerek toplam hacim 7.000 ml tamamlanmıştır.

% 10 luk amonyum persulfat hazırlanması: 1 g amonyum persulfat (Sigma/ A9164) tartılıp dH₂O ile 10 ml' ye tamamlanmıştır, -20 °C'de muhafaza edilmiş ve bir hafta boyunca kullanılmıştır.

Dcode Boyama Solüsyonunun hazırlanması: 0.1 g bromfenol blue-xylene cyanol (Sigma/ B3269), 1 x TAE tamponu ile 10 ml'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Dcode 2x Jel Yükleme Boyası Solüsyonu hazırlanması: 0.50 ml %2lik bromfenol blue-xylene cyanol (Sigma/ B3269), 7 ml gliserol (Sigma /G5516), 2.5 ml dH₂O ile 10 ml' ye tamamlanmıştır.

% 8 lik % 55 denatürant içeren jelin (high jel) hazırlanması: 20 ml % 40 akrilamid / bis (37.5:1), 22 ml deiyonize formamid (Sigma/ F9036), 23.1 g üre (Sigma/ U5378) ve 2 ml 50 x TAE tamponu dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ultrasonik su banyosunda 20 dakika degaz edilmiş ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

% 8 lik % 15 denatürant içeren jelin (low jel) hazırlanması: 20 ml % 40 akrilamid / bis (37.5:1), 6 ml deiyonize formamid, 6.3 g üre ve 2 ml 50 x TAE tamponu, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ultrasonik su banyosunda 20 dakika degaz edilmiş ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. D-code mutasyon tespit sistemi

3.2.3.2.2. Poliakrilamid jelin hazırlanması

Yüksek konsantrasyonlu (% 55) ve düşük konsantrasyonlu (%15) solüsyonların her birinden 20 ml kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyonlu solüsyona jeli renklendirerek görünürliğini sağlamak amacı ile 400 µl Dcode Boyama Solüsyonu ilave edilmiştir. Her iki solüsyonada jelleşmeyi sağlamak amacı ile 14 µl TEMET (Tetrametilendiamin/ Sigma) ve 140 µl % 10'luk APS (Amonyum Persülfat/ Sigma) eklenmiştir.

Gradient jel oluturmak için DGGE (Dcode Universal Mutation Detection System /BioRad) sisteminin özel jel dökme aparatından faydalanılmıştır. 30 ml'lik enjektörlerden birine %15, diğerine %55 denatürant içeren jel enjektörle çekilerek gradiyenti jel oluşturacak olan aparata yerleştirilmiştir. Denatürant konsantrasyonu jelin altından üstüne doğru azalacak (%55 → %15) şekilde cam plakalar arasına yaklaşık 10 ml/dak hızla jel dökülmüş ve ardından kuyucukları oluşturacak olan tarak yerleştirilmiştir. Jelin polimerleşmesi için minimum 2 saat beklenmiştir. Diğer taraftan DGGE tankına 7 litre 1 x TAE tampon konulmuş ve 60 °C sabit sıcaklığa ulaşıncaya kadar ısıtılmıştır. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki tarak çıkarılarak tanka yerleştirilmiş ve oluşan kuyucuklar önce 1 x TAE tamponla yıkanmıştır. Daha sonra 40 µl PCR ürünleri ve 7 µl jel yükleme boyası karışımı kuyucuklara sırası ile yüklenmiştir. Tampon sıcaklığı 60 °C'ye ayarlanmış ve sistemin pompa çalıştırılmıştır. Sistem güç kaynağına bağlanarak örnekler önce 50 V'da 10 dakika ardından 200 V'da 3.5 saat elektrik akımı uygulanmıştır. Elektroforez sonunda tanktan çıkarılan jel 50 µg/ml etidyum bromide (Sigma / E1510) içeren 1xTAE buffer içerisinde 20 dakika bekletildikten sonra 5 dakika saf

içerisinde bekletilerek yıkanmıştır. Oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (GelDoc XR/BioRad) görüntülenmiştir.

3.3.2.3.3. DGGE Bantlarının Dizi Analizi

Her bir sucuk örneğine ait DGGE bantları, tek tek steril bir pipet ucu ile kesilerek içerisinde 50 µl steril su bulunan tüplere aktarılmıştır. Bantlar su içerisinde 4°C’de 1 gece bekletilerek DNA’nın suya geçmesi sağlanmıştır. Su içerisine elüe olan DNA solusyonundan 2 µl kullanılarak tekrar PCR yapılmış ve tekrar DGGE sisteminde yürütülmüştür. Oluşan tek bantlar alınarak 50 µl steril su içerisinde 4°C’de 1 gece bekletilmiş ve DNA’nın elüe olması sağlanmıştır. Bu işlem bir kez daha tekrar edilerek tek bantların saflaşması sağlanmıştır. Son aşamada GC clamp bulunmayan V3f ve V3r primerleri kullanılarak tekrar PCR yapılmış ve PCR ürünleri ticari purifikasyon kiti (Qiagen) ile saflaştırılarak dizi analizi için RefGen (Teknokent, ODTÜ, Ankara)’e gönderilmiştir. Refgen’den gönderilen dizi analiz sonuçları Gen Bankası’nın verileri ile karşılaştırılarak her bir bantı oluşturan bakteri tanımlanmıştır.

3.4. Kültüre Alınan Laktik asit Bakterilerinin Moleküler Tekniklerle Tanımlanması

Kayseri ve Afyon piyasasından temin edilen sucuk örneklerinden MRS ve M17 agara ekim yapıldıktan sonra morfolojik özelliklerine göre laktik asit bakterisi olduğu düşünülen koloniler, çizgi ekim yöntemi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan kültürlerden gram pozitif ve katalaz negatif özellik gösteren toplam 125 izolatın aşağıda verilen yöntem takip edilerek DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra repPCR (GTG₅) ve 16 SrRNA sekans analizi ile tanımlanmıştır.

3.4.1. Saf Kültürlerden DNA İzolasyonu

Saf kolonilerden öze ile 2-3 loop alınarak 2 ml’lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Tüplere 180 µl lizozimli izolasyon solüsyonu (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8, 0.3mM lizozim) ilave edilerek süspanse edilmiştir. Süspansiyon 37°C de 45 dak inkübe edildikten sonra 20 µl Proteinaz K ve 200 µl AL Buffer (Qiagen) eklenerek kısa süreli bir karıştırma işlemi uygulanmıştır. Tüpler önce 56°C de 30 dk sonra 95°C de 15 dk inkübe edilmiş ve daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur. Tüplere 200 µl etanol eklenip kısa bir karıştırıldıktan sonra tüp içerikleri spin kolonlara alınmıştır. Spin klonlar 6000xg de 1 dak santrifüj edilerek DNA’nın silika membranda tutulması sağlanmıştır. Spin klonlar önce 500 µl AW₁ Buffer (Qiagen) daha sonra ise yine 500 µl AW₂ Buffer ile yıkanmıştır. 2000xg de 3 dak .santrifüj edilen tüpler oda sıcaklığında yaklaşık 30 dak kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin sonunda spin kolonlara 50 µl elüsyon buffer eklenip 6000xg de 3 dak santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elüe edilen DNA’ların konsantrasyonları spektrofotometrede (Shimadzu 1700) ölçülerek belirlenmiştir.

3.4.2. Saf Kültürlerin Rep-PCR (GTG₅) Analizi

Genom üzerinde tekrarlayan dizilerin PCR ile amplifikasyonuna dayanan (rep-PCR) fingerprint yöntemi, yakın ilişkili türlerin veya tür içerisindeki farklı suşların başarılı bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır. Proje kapsamında tüm örneklerden toplam 125 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların tanımlanmasında 16 S rRNA geninin tüm baz dizisinin dizi analizi ile ortaya çıkarılmasına ilave olarak rep PCR (GTG₅) yöntemi ile fingerprint analizi gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, aynı türe ait izolatların bir çok defa dizi analizinin

yapılması maliyeti artıracak için rep-PCR analizi ile aynı türler arasında bir ön eleme yapılması da mümkün olmuştur. Bu amaçla 15 µl Taq PCR mix (Qiagen), 100 ng her bir saf kültürden izole edilen template DNA ve 0.8 µM GTG₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') primerden oluşan toplam 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Termal döngü şartları; 95 °C'de 10 dak. ilk denatürasyon ve 94 °C'de 1 dak, denaturasyondan sonra 40°C'de 1 dak. annealing ve her döngüde 65 °C'de 8 dak ekstensiyon uygulanmıştır. Toplam 32 döngü uygulanmış olup en son ekstensiyon aşaması 65 °C'de 16 dak. olarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri daha sonra %2'lik agaroz jelde 20 X 20 cm'lik bir yatay elektroforez tankında 50 V'luk sabit voltajda 4 °C'de 16 saat yürütüldükten sonra görüntülenmiştir. Jel görüntülerinin daha sonra Bionumerics software kullanılarak cluster analizi yapılmıştır.

3.4.3. 16 S rRNA Geninin Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bankasındaki Dizilerle Karşılaştırılması

Rep-PCR analizi ile izolatların akrabalık ilişkileri ortaya çıkarılmıştır. Farklı türden oldukları belirlenen izolatların her birinden en az iki adet seçilmiş ve yaklaşık 1500 bazlık 16 S rRNA geninin tüm dizisi ortaya çıkarılarak tanımlanmıştır. Bu amaçla 25 µl Taq PCR mix (Qiagen), 500 ng her bir saf kültürden izole edilen template DNA ve 0.8 µM ileri primer LPW57 (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 0.8 µM geri primerden LPW205 (5'-CTTGTTACGACTT CACCC-3') oluşan toplam 50 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Termal döngü şartları; 95 °C'de 10 dak. ilk denatürasyon ve 94 °C'de 1 dak, denaturasyondan sonra 58°C'de 1 dak annealing ve her döngüde 72 °C'de 2 dak ekstensiyon uygulanmıştır. PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığı 1'lik % (w/v) jelde ve 1 ×TBE buffer içerisinde agaroz elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. Oluşan PCR ürünleri ticari purifikasyon kiti (Qiagen) ile saflaştırılarak dizi analizi için RefGen (Teknokent, ODTÜ, Ankara)'e gönderilmiştir. Refgen'den gönderilen dizi analiz sonuçları Gen Bankası'nın verileri ile karşılaştırılarak her bir izolat tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

Projede, starter kültür kullanılmadan geleneksel yöntemlerle üretilen sucuklarda spontan olarak gelişen fermantatif bakterilerin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması, oranlarının belirlenmesi, bu fermantatif bakteriler sucuklardan izole edildikten sonra sucuklarda bulunma oranı, sıklığı ve kompozisyonu dikkate alınarak model starter kültür kombinasyonlarının oluşturulması ve model starter kültürler kullanılarak üretilen sucuk örneklerinin duyuşal, mikrobiyolojik ve kimyasal kalite özelliklerinin incelenerek ticari starter kültürlerin kullanıldığı örneklerle kıyaslanması hedeflenmiştir.

4.1. Piyasadan temin edilen sucuk örneklerinde yapılan analizlerin sonuçları

4.1.1. Fizikokimyasal Analizler

Projede Kayseri ve Afyon piyasasında satışa sunulan geleneksel yöntemle üretilmiş toplam 25 sucuk örneğinin incelenmesi öngörülmüştür. Bu amaçla 1. rapor döneminde her iki ilimizdeki farklı marka ve üretim yerlerinden toplam 25 sucuk örneği satın alınmış ve çalışma için uygun olduğu belirlenen örneklerin ortalama % kurumadde içeriği, %tuz içeriği, aw ve pH değerleri belirlenmiştir. piyasadan toplanan sucuk örneklerinde yapılan fizikokimyasal analizlerin sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Piyasadan toplanan sucuk örneklerinin fizikokimyasal analizlerin sonuçları

Örnek No	Nem (%)	pH	aw	Tuz (%)	Örnek No	Nem (%)	pH	aw	Tuz (%)
1	20,6	4,57	0,912	3	14	36,24	5,08	0,85	3
2	35,3	4,57	0,914	2,82	15	39,6	5	0,83	2,98
3	40,2	4,67	0,901	3,15	16	32,8	4,95	0,863	3,03
4	38,1	4,7	0,885	2,4	17	24,52	5,12	0,862	4,22
5	36	5,02	0,872	2,33	18	34,1	4,76	0,901	4,08
6	20,6	4,91	0,862	2,5	19	29,41	4,78	0,885	4,13
7	23,5	5,15	0,876	3,6	20	26,46	4,88	0,855	2,49
8	38	5,17	0,858	3,25	21	26,89	5,17	0,857	3,18
9	29,3	4,57	0,8	2,78	22	24,26	4,96	0,842	3,02
10	35,4	4,7	0,801	3	23	29,67	4,98	0,821	3,35
11	41,3	5,1	0,875	2,32	24	26,34	5,1	0,841	3,16
12	28	5,03	0,858	3,5	25	20,67	5,15	0,82	3,32
13	29,47	4,85	0,88	3,01	Ortalama	31.29217	4.899565	0.863478	3.09

4.1.2. Duyusal Analiz Sonuçları

10 kişiden oluşan panele, her gruba ait dilimlenmiş sucuk örnekleri kodlanarak verilmiş, ayrı ayrı çiğ ve pişirilmiş örnekler belirlenmiş parametreler üzerine puan ortalamaları alınmıştır. Sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Piyasadan toplanan sucuk örneklerinin duyuşsal analiz sonuçları

Örnek No	Kesit Yüzey Rengi	Dış Yüzey Rengi	Tekstür	Tat ve Koku	Genel Kabuledilebilirlik
1	6,9	6,8	6,8	7	6,2
2	5,9	6,1	7,9	5,98	6,8
3	6,8	6,7	8,2	6,08	7,3
4	7,3	7,6	8	8,2	7,6
5	5,8	5,9	7,65	7,35	7
6	6,1	6,1	7,6	9	8
7	8,6	8,6	7,5	7,2	7,4
8	7,6	7,8	7,65	6,9	7,2
9	7,1	7,1	8,8	8,2	8,5
10	7,6	7,5	6,4	7,5	7,3
11	7,6	7	9,2	8	7,6
12	6,9	6,5	7,08	6,55	6,88
13	8,6	8,1	7	6,02	7,09
14	6,9	6,5	6	6,08	6,5
15	7,4	7,8	7,2	7,5	7,9
16	7,2	7,9	8,95	6,08	7,66
17	8,4	8,6	7,2	6,03	6,98
18	6,8	6,9	7,8	7,9	7,8
19	7,6	7	6,8	5,9	6,02
20	8,6	8,6	8,3	7,4	7,9
21	8,3	8,1	8,05	6,65	7,7
22	7,6	7,6	6,9	8,5	8,02
23	6,8	6,9	7,5	7,54	7,9
24	7,2	7,9	8,95	6,08	7,66
25	5,6	5,9	7,3	7,05	8,2
Ortalama	7.248	7.26	7.6292	7.0676	39.1636

4.1.3. Sucuk Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin Sayımı ve İzolasyonu

Kayseri ve Afyon piyasasından temin edilen sucuk örneklerinde PCR-DGGE analizi ile tespit edilen laktik asit bakterilerinin saf kültürlerini elde etmek amacı ile ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir. Laktik asit bakteri sayısını tespit etmek için sucuk örneklerinden hazırlanan dilüsyonlardan MRS agara dökme plak yöntemine göre ekim yapılmış ve 30 ile 300 arasında koloni içeren petriler sayılmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kayseri ve Afyon piyasasından temin edilen sucuk örneklerinin Laktik asit bakteri sayısı

Örnek No	Laktik Asit Bakteri (log kob/g)	Örnek No	Laktik Asit Bakteri (log kob/g)
1	8.49	14	8.46
2	8.67	15	7.98
3	8.32	16	8.52
4	8.45	17	7.95
5	8.12	18	8.72
6	8.56	19	7.56
7	7.65	20	8.32
8	8.43	21	8.65
9	7.52	22	8.72
10	8.43	23	8.56
11	7.67	24	7.89
12	8.73	25	8.67
13	8.52	Ortalama	8.3024

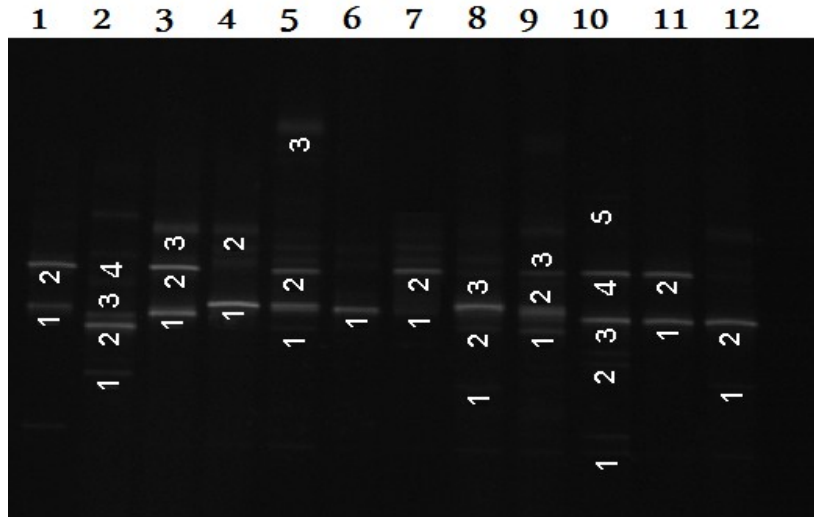
4.2. Piyasadan Toplanan Sucuk Örneklerinde Bulunan Laktikasit Bakterilerinin Kültür Bağımsız Yöntemle (PCR-DGGE) Tanımlanması

4.2.1. PCR-DGGE Analiz Sonuçları

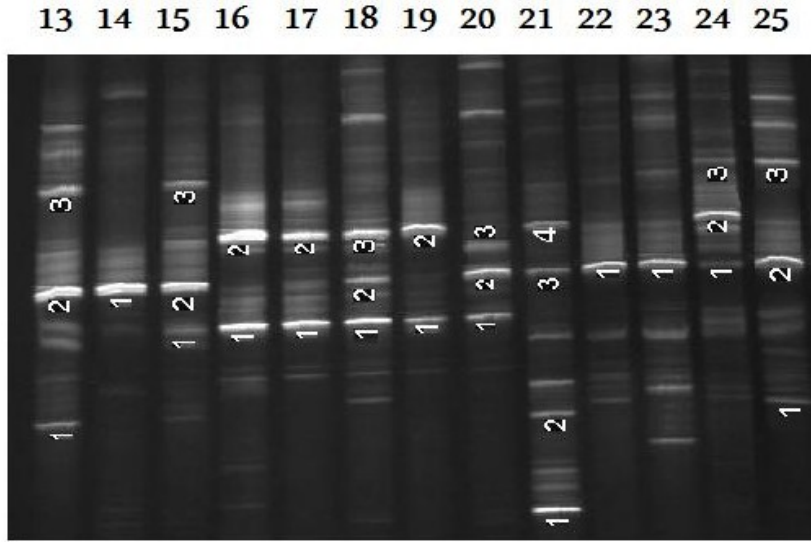
Sucuk florasına giren fermentatif bakterilerin belirlenmesi amacıyla PCR-DGGE analizi yapılmıştır. Bu amaçla 16s rRNA geninin V3 bölgesi üzerinde yaklaşık 193 bp'lik bir fragment amplifiye edilmiştir.

Sucuk florasını oluşturan farklı türlerdeki bakterilerin PCR ürünleri farklı baz dizilimleri dolayısıyla farklı Tm değerine sahip olduğu için DCode sistem (BioRad) kullanılarak, jelde farklı noktalarda denature olarak birbirlerinden ayrılmıştır.

Oluşan tek bantlar alınarak tekrar PCR yapılmış ve PCR ürünleri ticari purifikasyon kiti (Qiagen) ile saflaştırıldıktan sonra dizi analizi için RefGen (Teknokent, ODTÜ, Ankara)'e gönderilmiştir. Dizi analiz sonuçları Gen Bankası'nın verileri ile karşılaştırılarak her bir bantı oluşturan bakteri tanımlanmıştır (Tablo 4.4).



Şekil 4.1a. Sucuk örneklerinin 16sRNA V3 bölgesine göre DGGE profili (1- 12. örnekler)



Şekil 4.1b. Sucuk örneklerinin 16sRNA V3 bölgesine göre DGGE profili (13- 25. örnekler)

Tablo 4.4. 16 S rRNA'nın V3 Bölgesinin DGGE analizi ile tanımlanan bakteriler

Örnek No	Bant No	Bakteri	BLAST Benzerliği (%)
1	1	<i>Lactobacillus sakei</i>	98
	2	<i>Weissella viridescens</i>	99
2	1	<i>Brochothrix thermophacta</i>	100
	2	<i>Psychrobacter spp.</i>	98
	3	<i>L. curvatus</i>	98
	4	<i>Staphylococcus lentus</i>	99
3	1	<i>L. curvatus</i>	100
	2	<i>Weissella viridescens</i>	100
	3	<i>L. sakei</i>	98
4	1	<i>L. sakei</i>	100
	2	<i>Weissella viridescens</i>	100
5	1	<i>L. sakei</i>	98
	2	<i>Weissella viridescens</i>	100
	3	<i>Weissella spp.</i>	99
6	1	<i>L. sakei</i>	98
7	1	<i>L. sakei</i>	98
	2	<i>Weissella viridescens</i>	98
8	1	<i>L. namurensis/acidifarinae/zymae</i>	100
	2	<i>S. succinus</i>	98
	3	<i>L. sakei</i>	99
9	1	<i>S. succinus</i>	98
	2	<i>L. sakei</i>	100
	3	<i>W. viridescens</i>	98
10	1	<i>Uncultured bacterium isolate</i>	100
	2	<i>S. piscifermentas</i>	98
	3	<i>L. curvatus</i>	99
	4	<i>W. viridescens</i>	99
	5	<i>W. halotolerans</i>	98

11	1	<i>L. curvatus</i>	98
	2	<i>W. viridescens</i>	99
12	1	<i>Brochothrix thermophacta</i>	100
	2	<i>L. curvatus</i>	98
	3	<i>L. sakei</i>	100
13	1	<i>L. brevis</i>	100
	2	<i>L. sakei</i>	98
		<i>L. alimentarius</i>	99
14	1	<i>L. sakei</i>	99
15	1	<i>W. viridescens</i>	98
	2	<i>L. sakei</i>	99
	3	<i>L. alimentarius</i>	98
16	1	<i>W. viridescens</i>	100
	2	<i>L. curvatus</i>	98
17	1	<i>W. viridescens</i>	98
	2	<i>L. curvatus</i>	99
18	1	<i>W. viridescens</i>	99
	2	<i>L. sakei</i>	100
	3	<i>L. curvatus</i>	99
19	1	<i>W. viridescens</i>	98
	2	<i>L. curvatus</i>	99
20	1	<i>W. viridescens</i>	98
	2	<i>L. sakei</i>	100
	3	<i>Streptococcus spp.</i>	97
21	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98
	2	<i>L. brevis</i>	99
	3	<i>L. sakei</i>	100
	4	<i>L. curvatus</i>	99
22	1	<i>L. sakei</i>	100
23	1	<i>L. sakei</i>	97
24	1	<i>L. sakei</i>	100
	2	<i>W. viridescens</i>	98
	3	<i>L. alimentarius</i>	97
25	1	<i>L. brevis</i>	98
	2	<i>L. sakei</i>	100
	3	<i>L. alimentarius</i>	98

Tablo 4.5. V3 Bölgesine Göre Tespit edilen bakterilerin genel olarak bulunma sıklığı

Bakteri	Bulunma sıklığı (%)
<i>L. sakei</i>	30
<i>W. viridescens</i>	23
<i>L. curvatus</i>	15
<i>L. brevis</i>	5
<i>L. alimentarius</i>	6
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4
<i>S. piscifermentas</i>	2
<i>S. succinus</i>	4
<i>S. lentus</i>	2
<i>W. halotolerans</i>	2
<i>L. namurensis/acidifarinae/zymae</i>	2
<i>Brochothrix thermophacta</i>	4
<i>Psychiobacter spp.</i>	2

4.3. Kültüre Alınan Laktikasit Bakterilerinin Moleküler Tekniklerle Tanımlanması

Kayseri ve Afyon piyasasından temin edilen sucuk örneklerinden MRS ve M17 agara ekim yapıldıktan sonra saflaştırılan kültürlerden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra repPCR (GTG5) ve 16 SrRNA sekans analizi ile tanımlanmıştır.

4.3.1. Saf Kültürlerin Rep-PCR (GTG5) Analizi

Tüm örneklerden toplam 110 izolat elde edilmiştir. Aynı türe ait izolatların bir çok defa dizi analizinin yapılması maliyeti artıracığı için rep-PCR analizi yapılarak aynı türler arasında bir ön eleme yapılmıştır. GTG5 (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') primeri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünleri yatay elektroforez tankında 50 V'luk sabit voltajda 4 °C'de 16 saat yürütüldükten sonra görüntülenmiştir. Jel görüntülerinin daha sonra Bionumerics software kullanılarak cluster analizi yapılmıştır. Bu analize ait sonuçlar Ek 1'de verilmiştir.

4.3.2. 16 S rRNA Geninin Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bankasındaki Dizilerle Karşılaştırılması

Rep-PCR analizi ile izolatların akrabalık ilişkileri ortaya çıkarılmıştır. Farklı türden oldukları belirlenen izolatların her birinden en az iki adet seçilmiş ve yaklaşık 1500 bazlık 16 S rRNA geninin tüm dizisi ortaya çıkarılarak tanımlanmıştır. Oluşan PCR ürünleri ticari purifikasyon kiti (Qiagen) ile saflaştırılarak dizi analizi için RefGen (Teknokent, ODTÜ, Ankara)'e gönderilmiştir. Refgen'den gönderilen dizi analiz sonuçları Gen Bankası'nın verileri ile karşılaştırılarak her bir izolat tanımlanmıştır (Tablo 4.5).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Projede geleneksel fermente Türk sucuğunun tat ve aroma gibi karakteristik özelliklerinin korunması, teknolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve hijyenik kalitesinin artırılması amacıyla spontan olarak gelişen fermantatif bakterilerin starter kültür olarak kullanım potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla; starter kültürler kullanılmadan geleneksel yöntemlerle üretilen sucuklarda spontan olarak gelişen fermantatif bakteriler moleküler teknikler kullanılarak tanımlanmış ve sucukta bulunma oranlarının belirlenmiştir.

Kayseri ve Afyon piyasasından toplam 25 adet sucuk temin edilmiş ve fermantatif bakteriler moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Sucukların PCR-DGGE analizine göre sucuklarda *L. sakei* %30, *W. Viridescens* %23, *L. curvatus* %15 ve *L. brevis*'in %5 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Sucuklardan izole edilen bakterilerin 16 S rDNA ve rep-PCR (GTG5) analizi sonucunda ise, *L. sakei* %41,8, *W. Viridescens* %6,4, *L. curvatus* %14,5, *L. plantarum* %8,25, *Leuconostoc mesenteroides* %8,2, *L. brevis*'in %6,4 ve *L. farciminis*'in %5,5 oranında bulunduğu tespit edilmiştir.

Cocolin ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada geleneksel yöntemlerle laboratuvar koşullarında ürettikleri taze sucuk örneklerinin üretimin birinci, üçüncü, altıncı ve onuncu günlerdeki mikrobiyel içeriklerini hem klasik hem de moleküller yöntemlerle analiz etmişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışma sonucunda son zamanlarda laktik asit bakterilerinin karakterizasyonunda sıkça kullanılmaya başlanan rep-PCR yönteminin RAPD-PCR yöntemine göre izolatlar arasındaki ayrımı ortaya koymada daha başarılı bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır.

Gevers ve ark.¹¹⁷, laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında hızlı ve tekrarlanabilir bir genomik parmak izi analiz metodu olan rep-PCR (REP-PCR, BOX-PCR) yöntemlerinin uygulanabilirliğini tespit amacıyla yapmış oldukları çalışma sonucunda farklı fermente sucuk örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerini tür, alt tür hatta suş seviyesinde ayırmada bu yöntemin çok uygun bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da literatür sonucuna benzer olarak test izolatlar arasındaki ayrımı ortaya koymada bu yöntemin uygulanabilirliğinin yüksek olduğu görülmüştür.

Olive ve Bean ¹⁴⁷, yaptıkları bir araştırma sonucunda rep-PCR yönteminin, 16S-23S spacer bölgelerinin analiz yöntemine göre bakteriler arasındaki ayrımı ortaya koymada daha etkin olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, rep-PCR analiz yöntemi olan BOX-PCR metodunun türler arasındaki ayrımı ortaya koymada 16S-23S rRNA PCR'na göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmada *L.sakei*'nin baskın tür olarak belirlenmesi bazı çalışmalarla benzerlik (Özdemir ve ark., 1999; - Parente ve ark., 2001; Conter ve ark., 2005; Greco ve ark., 2005; Comi ve ark., 2005; Garcia-Fontan ve ark., 2007) gösterirken dominant türün *L. plantarum* olarak belirlendiği bazı çalışmalarla (Toksoy ve ark., 1999; Kaban 2007; Drosinos ve ark., 2007), paralellik arz etmemektedir. Yapılan çalışmada *L. sakei* baskın tür olarak bulunurken diğer çalışmalarda baskın tür olarak tespit edilen *L.plantarum* 'un örneklerde bulunamaması, sucuğun üretim teknolojisi, olgunlaştırma ve muhafaza şartları ile fermantasyon sıcaklıklarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak küreselleşmenin giderek yaygınlaştığı günümüzde uluslararası pazarda tutunabilmenin en önemli yolu farklılaşmak olmuştur. Bu nedenle de 21. yüzyılda dünya

küreselleşse de, bu olguya karşılık yükselen trend, “gelenekselleşmek” olmuştur. Özellikle gelişmiş ülkeler hem küreselleşme ve gelişen dünyada tutunabilmek, hem de değerlerini korumak adına geleneksele doğru bir yola girmişlerdir. Bu yöneliş gıda üretiminde de kendini göstermekte ve AB ülkelerinde geleneksel gıdaların üretim ve pazarlamasının ekonomik boyutları giderek büyümektedir. AB geleneksel ürünlere olan talebi değerlendirmek ve bu ürünlerin üretiminin çeşitlenerek sürdürülebilirliğini sağlamak adına önemli mevzuat düzenlemelerine gitmiştir. Öyleki yürütülen Tradisausage, (QLK1 CT-2002) isimli bir proje ile fermente sosislerin geleneksel özelliklerinin korunarak kalitesinin yükseltilmesi ve üretimiminin standardize edilmesi hedeflenmiştir. Ülkemize ise fermente Türk sucuğunun korunmasına yönelik çalışmaların yapılması ve sucuk, pastırma gibi ülkemize özgü ürünlerin ihraç edilerek yurtdışında da bir damak tadı oluşturulmasına yönelik çalışmalar desteklenmelidir. Bu amaçla sucuğa özgü geleneksel nitelikleri kazandıran en önemli faktörlerden birisi olan yerel mikrofloranın güvenilir ve hassas yöntemlerle tanımlanması ülkemize özgü değerlerin korunması ve yaşatılması açısından önem taşımaktadır.

Ülkemizde bazı işletmeler ticari starter kültürlerin Türk sucuğuna özgü tat ve aromayı vermediği gerekçesi ile bu kültürlerin kullanımından kaçınmaktadır. Ancak bu şekilde üretilen sucuklarda bazı görülen bazı teknolojik problemler ve mikrobiyolojik bozulmalar ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dolayısıyla sucuk hammadresi ve üretim teknolojisine iyi adapte olmuş fermantatif bakterilerin starter kültür olarak kullanımının bu tür ekonomik kayıpları önleyeceği ve üretim potansiyelini artıracığı düşünülmektedir.

Günümüzde hayvansal protein tüketimi gelişmişlik ölçüsü olarak kabul edilmektedir. Beslenmemizde önemli bir yeri olan hayvansal proteinlerin büyük bir bölümü et ve et ürünleri tüketilerek sağlanmaktadır. Tüketicilerin arzu ettiği tat ve lezzette ve teknolojik olarak daha yüksek kalitede üretilecek sucuğun tüketiminin daha da artacağı tahmin edilmektedir. Bu durum tüketicilerin beslenmesi üzerinde olumlu etkide bulunacağı gibi sucuk üretiminin artırılmasına ve buna bağlı olarak bu alanda faaliyet gösteren sektöre dolayısıyla ülke ekonomisine ve istihdama katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Diğer taraftan geleneksel gıda ürünleri bir ülkenin tanıtımında rol oynayan önemli kültür miraslarıdır. Dolayısıyla bu ürünlerin korunması ve tanıtılması tarihi değerlerimize sahip çıkılması ve turizm potansiyelimizin artırılması açısından da önemli bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

AMAN, RI., Ludwig, W., Schleifer, KH., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143–169,(1995).

AQUILANTI, L., Santarelli, S., Silvestri G., Osimani, A., Petruzzelli, A., Clementi F., The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. International Journal of Food Microbiology Volume 120, Issues 1-2, 136-145,(2007).

AYGÜN, G., Hastane Enfeksiyonlarının Kontrolünde Mikrobiyoloji Laboratuvarının Rolü. I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Etkinlikleri. Hastane Enfeksiyonları. Koruma Ve Kontrol, Sempozyum Dizisi No:60, s207-212,(2008).

BACUS, J. 1984. Update: Meat fermentation., Food Technology, June, 59-63,(1984).

BERTHIER, F., Beuvier, E., Dasen, A., Grappin, R. X., Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comte' cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. International Dairy Journal, 11, 293–305,(1996).

BLOM, H., Hagen, B.F, Pedersen,B.O., Holck, A.L., Axelsson, L. and Naes, H., Accelerated production of dry fermented sausage. Meat Science, 43 (Suppl.); S229-S242,(1996).

CAMPBEL-Plat, G., Fermented meats- a world perspective. “*Fermented Meats*”, Ed. Campbel-Plat, G. and Cook, P.E. s. 39-52, Chapman and Hall, New york, NY,(1995).

CANDOĞAN, K., Bacterial starter cultures, aging and fermentation effects on some characteristics of fermented beef sausages. Clemson University, Thesis of Doctor of Philosophy of Food Tecnology, Clemson, USA,(2000).

CAPLICE, E. and Fitzgerald, G.F.; Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 50; 131-149,(1999).

COCOLIN, L., Manzano, M., Aggio, D., Anovel Cantoni, C., Comi, G., A novel polymerase chain reaction (PCR) - denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. Meat Science, Volume 58, Issue 1, 59-64(2001).

COCOLIN L, Rantsiou K, Iacumin L, Urso R, Cantoni C, Comi G. Study of Fresh Sausages and Characterization of Populations of Lactic Acid Bacteria by Molecular Methods. Applied and Environmental Microbiology 2004; 70(4), 1883-1894 .

COMI G, Urso R, Iacumin L, Rantsiou K, Cattaneo P, Cantoni C, Cocolin L. Characterisation of Naturally Fermented Sausages Produced in the North East of Italy. Meat Science 2005; 69, 381-392.

CONTER M, Muscariello T, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Campanini G, Ianieri A. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From an Italian Dry Fermented Sausage. Ann Fac Medic Vet Di Parma, 2005; Vol XXV. Pag. 167-174.

COŞKUNER, Ö. , Türk sucuğunda lipid oksidasyonuna ve serbest yağ asitleri oluşumuna ısıl işlemin etkisi. Ankara Üniversitesi,Yüksek Lisans Tezi,(2002).

DAINTY, R.H. and Blom, H., Flavor chemistry of fermented sausages. “*Fermented Meats*”, Ed. Campbell-Plat, G. and Cook, P.E. s. 176-193. Chapman and Hall, New York, NY,(1995).

DALY, C., Chance, N., Sandine, W.E. and Elliker, P.R. Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by starter culture and chemical acidulation. Journal of Food Science, 38; 426-430,(1973).

DEUMIER, F. and Collignan, A., The effects of sodium lactate and starter cultures on pH, lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. levels in pure chicken dry fermented sausage. Meat Science, 65; 1165-1174,(2003).

DROSINOS EH, Paramithiotis S, Kolovos G, Tsikouras I, Metaxopoulos I. Phenotypic and Technological Diversity of Lactic Acid Bacteria and *Staphylococci* isolated From Traditionally Fermented Sausages in Southern Greece. Food Microbiology 2007; 24, 260-270

ERCOLINI, D., PCR-DGGE Fingerprinting: Novel Strategies For Detection Of Microbes In Food. J. Microbiol. Methods 56, 297–314,(2004).

FISHER, S. and Palmer, M., Fermented meat production and consumption in the European Union. “*Fermented Meats*”, Ed. Campbell-Plat, G. and Cook, P.E. s.217-233. Chapman and Hall, New York, NY,(1995).

FONTANAA, C., Vignoloa, G., Cocconcelli P. S., PCR–DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. Journal of Microbiological Methods. Vol. 63, no3, pp. 254-263,(2005).

GARCIA-FONTAN MC, Lorenzo JM, Parada A, Franco I, Carballo J. Microbiological Characteristics of androlla , a Spanish Traditional Pork Sausage. Food Microbiology 2007; 24, 52-58.

GARRIGA, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M.T., Arnau, J. and Monfort, J.M., Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 32; 173-183,(1996).

GEVERS D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR Fingerprinting for Identification of *Lactobacillus* Species. FEMS Microbiology Letters 2001; 205, 31-36.

GIRARD, J.P. and Bucharles, C., Acid fermentation. “*Technology of Meat and Meat Products*” Ed. Girard, J.P.A., s.138-164. Ellis Horwood, London, England,(1992).

GONZALEZ, B. and Diez, B., The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of “chorizo” – a Spanish dry cured sausage. Meat Science, 60:295-298,(2002).

GÖKALP, H.Y. Değişik olgunlaşma sıcaklıklarında farklı starter kültür ilave edilerek Türk tipi sucuk üretiminde metot geliştirilmesi. Doğa Vet. Hay., Seri D1, 8, 2; 116-128,(1984).

GRECO M, Mazzette R, De Santis EPL, Corona A, Cosseddu AM. Evolution and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated During the Ripening of Sardinian Sausages. Meat Science 2005; 69, 733-739.

GURTLE, V., Stanisich, V. A., New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. Microbiology Reviews, 142, 3–16,(1996).

HAGEN, B.F., Berdague, J.L., Holck, A.L., Naes, H. and Blom, H. Bacterial proteinase reduces maturation time of dry fermented sausages. *Journal of Food Science*, 61(5); 1024-1029,(1996).

HAMMES, W.P. and Knauf, H.J. Starters in the processing of meat products. *Meat Science*, 49 (Suppl.1); S125-S138,(1994).

INCZE, K., Dry fermented sausages. *Meat Science*, 49(Suppl.); S169-S177,(1998).

JESSEN, B. Starter cultures for meat fermentation. “*Fermented Meats*”, Ed. Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. s. 130-159, Chapman and Hall, New York, NY,(1995)

JOHANSSON, G., Berdagué, J.L, Larsson, M., Tran, N. and Borch, E., Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science*, 38; 203-218,(1994).

KABAN G. Geleneksel Olarak Üretilen Sucuklardan Laktik Asit Bakterileri ile Katalaz Pozitif Kokların zolasyonu- identifikasyonu, Üretimde Kullanılabilirlik imkanları ve Uçucu Bileşikler Üzerine Etkileri. Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği, Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi Erzurum, 2007.

KOREL, F., Analyses of fermented sausages and the use of starter cultures and carbohydrate substrates in fermented turkey sausage. Clemson University, Thesis of Master of Science Animal and Food Industries. Clemson, USA,(1996).

KRÖCKEL, L., Bacterial fermentation of meat. “*Fermented Meats*”, Ed. Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. s. 69-109, Chapman and Hall, New York, NY.(1995).

LARROUTURE, C., Ardaillon, V, Pepin, M. and Montel, M.C. Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an HPLC method. *Food Microbiology*, 17; 563-570,(2000).

LINDGREN, S.E. and Dobrogosz, W.J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 87; 149-164,(1990).

LÜCKE, F.K., Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 56; 105-115,(2000).

MANNU, L., Riu, G., Comunian, R., Fozzi, M. C., Scintu, M. F., A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewes' milk cheese: PCR identification and evolution during ripening. *International Dairy Journal*, 12: 17–26,(2002).

MASTERS, B.A., Oblinger, J.L, Goodfellow, S.J., Bacus, J.N. and Brown, W.L., Fate of *Salmonella newport* and *Salmonella typhimurium* inoculated into summer sausage. *Journal Food Protection*, 44; 527-530,(1981).

MOLLY, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. and Geenen, I., The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chemistry*, 59(4); 539-545,(1997)

MONTEL, M.C., Talon, R., Beragué, J.L. and Cantonnet, M., Effects of starter cultures on biochemical characteristics of French dry sausages. *Meat Science*, 35; 229-240,(1993)

MUYZER, G., Smalla, K., Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127–141,(V)

NASSU, R.T., Gonçalves, L.A.G., Silva, M.A.A.P. and Beserra, F.J., Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. *Meat Science*, 63; 43-49,(2003)

OLIVE DM, Bean M. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(6); 1661-1669.

ÖZDEMİR H, Çelik HÇ, Erol I, Yurtyeri A. Türk Fermente Sucuğundan izole Edilen Laktobasillerin Biyokimyasal ve Fiziksel Özellikleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1999; Cilt:42, Say :3 , s. 317-321.

PARENTE E, Griego S, Crudele MA. Phenotypic Diversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Sausages Produced in Basilicata (Southern Italy). *J Appl Microbiol* 2001; 90, 943-952.

RAMIREZ, J., Guerrero, I., Ponce, E. and Prado, A., Changes in flavor attributes during ripening of fermented sausages. *Journal of Muscle Foods*, 6; 257-269,(1995).

SAKHERE, P.Z. and Rao, D.N., Microbial profiles during lactic fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures. *Food Control*, 14; 1-5,(2003).

SAMELIS, J., Aggelis, G. and Metaxopoulos, J., Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of greek dry sausages. *Meat Science*, 35; 371-385,(1993).

SANZ, Y., Flores, J, Tolra, F and Feria, A., a. Effect of pre-ripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausages. *Food Microbiology*, 14; 575-582,(1997).

SANZ, Y., Vila, R., Toldra, F, Nieto, P. and Flores, J., b. Effect of nitrat and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 37; 225-229,(1997).

SINGH, S., Goswami, P., Singh, R., Heler, K., Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Science and Technology*. 42, 448–457,(2009).

SMITH, J.L. and Palumbo, S.A., Use of starter cultures in meats. *Journal of Food Protection*, 46(11); 997-1006,(1983)

SONDERGAARD, A.K. and Stahnke, L.H. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum*- a comparative study in model systems. *International Journal of Food Microbiology*, 75; 99-109,(2002)

STAHNKE, L.H., Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Science*, 38; 39-53,(1994).

STAHNKE, L.H., Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels-Part I. Chemical and bacterial data. Meat Science 41(2); 179-191,(1995).

TEKELİ, A., Ustaçelebi,Ş., PCR Amplifikasyon temelli mikrobiyal tiplendirme. Moleküler Mikrobiyoloji: tanı prensipleri ve uygulamaları,(2006).

TEMMERMAN, R., Huys,G., Swings,J. Identification of lactic acid bacteria:culture-dependent and culture independentmethods. Trends in Food Science and Technology, 15: 348-359,(2004).

TOKSOY A, Beyatlı Y, Aslım B. Sucuk ve Sosislerden zole Edilen *Lactobacillus plantarum* Sucularının Baz Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin ncelenmesi. Turk J Vet Anim Sci 1999; 23, 533-540.

VANDENBERGHG, P.A., Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Reviews, 12; 221-238,(1993)

VIGNOLO, G.M., Holgado, A.P.R. and Oliver, G., Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausages. Journal of Food Protection, 52(11); 787-791,(1989)

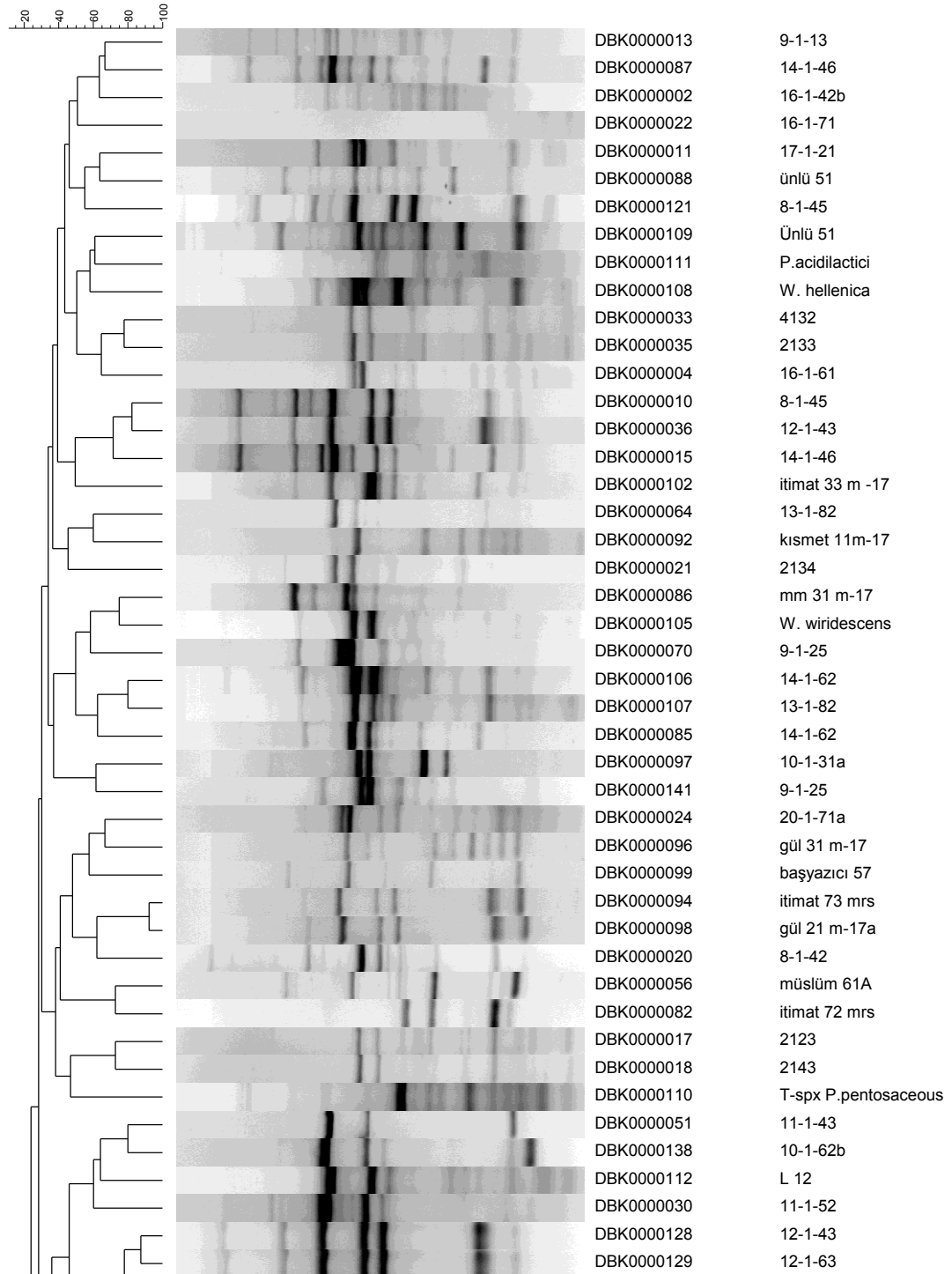
VURAL, H. Türk fermente sucuk üretiminde starter kültür kullanımı üzerine araştırmalar. Hacettepe Üniversitesi, Doktora Tezi,(1992)

WILSON, I.G., Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3741– 3751,(1997).

Ek 1. REP-PCR Analiz Sonuçları

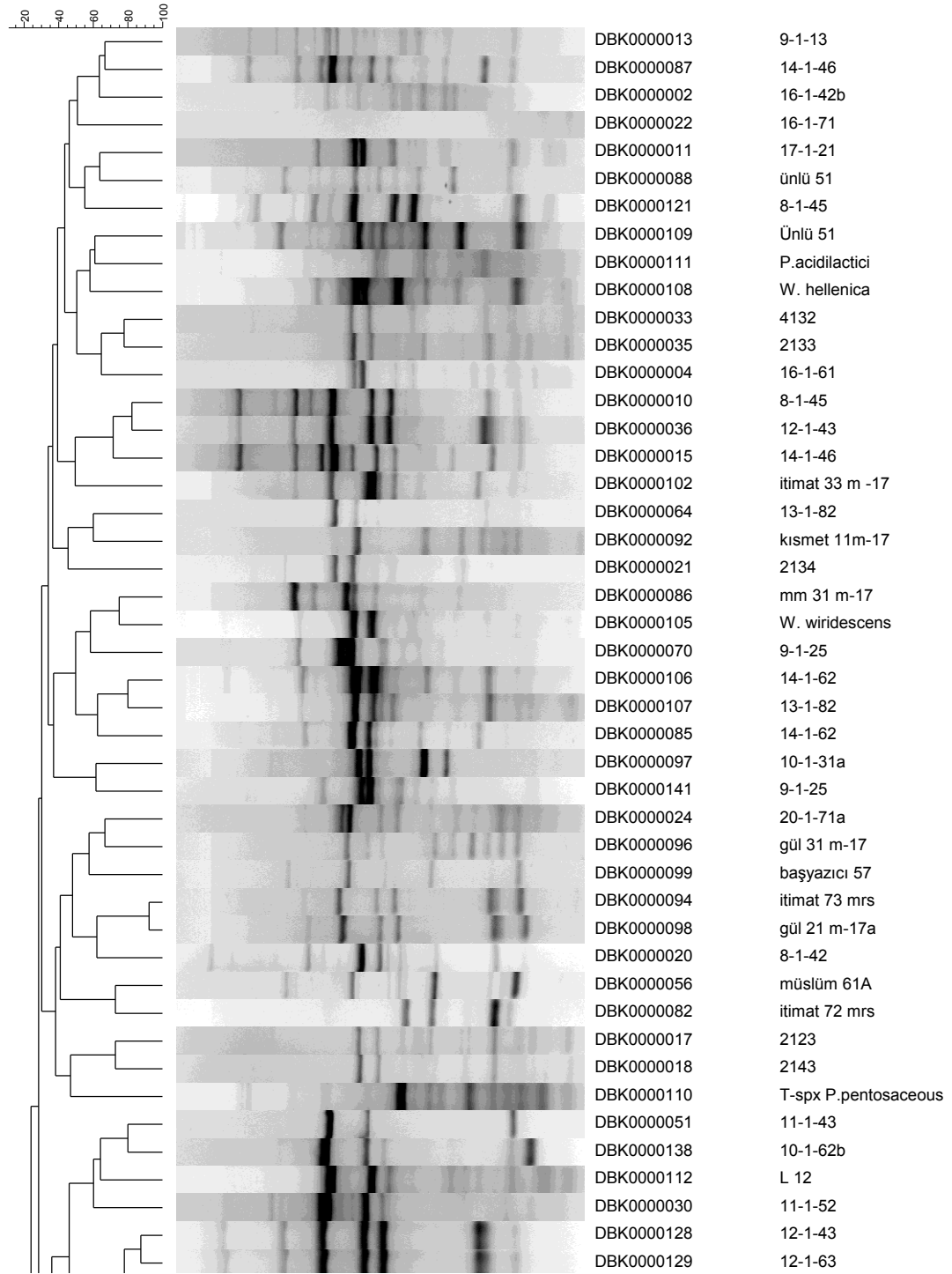
GTG

GTG



	DBK0000128	12-1-43
	DBK0000129	12-1-63
	DBK0000124	itimat 73 mrs
	DBK0000126	MM 53 mrs
	DBK0000127	kismet 51 mrs
	DBK0000025	6131
	DBK0000125	kismet 12 m17
	DBK0000131	11-1-42
	DBK0000046	11-1-21
	DBK0000050	10-1-21
	DBK0000080	12-1-63
	DBK0000045	ünlü 62 m-17
	DBK0000133	müslim 42
	DBK0000132	9-1-12
	DBK0000040	9-1-12
	DBK0000083	müslüm 61a
	DBK0000084	mm 32 m-17
	DBK0000091	itimat 35 m-17
	DBK0000122	11-1-71
	DBK0000143	14-1-46
	DBK0000057	14-1-11
	DBK0000058	10-1-12b
	DBK0000103	10-1-86
	DBK0000100	kismet 12 m-17
	DBK0000023	16-1-42a
	DBK0000142	10-1-84
	DBK0000067	14-1-104
	DBK0000067/#1	14-1-104
	DBK0000073	10-1-41
	DBK0000069	10-1-51
	DBK0000047	10-1-31A
	DBK0000076	14-1-62
	DBK0000006	2132a
	DBK0000007	2132
	DBK0000016	8-1-62
	DBK0000037	20-1-62
	DBK0000028	17-1-107a
	DBK0000034	11-1-45
	DBK0000008	11-1-83b
	DBK0000041	10-1-85
	DBK0000026	11-1-61
	DBK0000014	2124
	DBK0000104	BFL-06 L.Sakei
	DBK0000027	17-1-62
	DBK0000130	10-1-41
	DBK0000137	17-1-81
	DBK0000001	4112
	DBK0000134	11-1-83b
	DBK0000052	14-1-64
	DBK0000089	14-1-54
	DBK0000049	11-1-107 b
	DBK0000039	14-1-54
	DBK0000063	ünlü 62 A
	DBK0000043	13-1-33
	DBK0000071	10-1-63b

		DBK0000043	13-1-33
		DBK0000071	10-1-63b
		DBK0000072	10-1-81
		DBK0000066	9-1-41
		DBK0000090	imam 81
		DBK0000135	20-1-74
		DBK0000038	20-1-51
		DBK0000055	korkmaz 61
		DBK0000003	20-1-58
		DBK0000079	20-1-74
		DBK0000019	14-1-81
		DBK0000005	14-1-53
		DBK0000032	2142
		DBK0000012	20-1-38
		DBK0000029	8-1-31
		DBK0000048	11-1-83a
		DBK0000095	korkmaz 71
		DBK0000059	14-1-61
		DBK0000060	korkmaz 71
		DBK0000053	11-1-106
		DBK0000116	11-1-106
		DBK0000077	ünlÜ 51
		DBK0000031	11-1-51
		DBK0000044	10-1-87
		DBK0000042	10-1-52
		DBK0000139	10-1-52
		DBK0000117	11-1-42
		DBK0000119	10-1-62a
		DBK0000054	11-1-42
		DBK0000009	6171
		DBK0000081	nazo 41-1
		DBK0000061	10-1-72
		DBK0000062	10-1-86
		DBK0000136	10-1-31a
		DBK0000068	imam 73
		DBK0000078	14-1-44
		DBK0000140	14-1-61
		DBK0000113	L 16
		DBK0000101	10-1-87
		DBK0000120	11-1-51
		DBK0000114	L 1a
		DBK0000123	2142
		DBK0000118	17-1-51
		DBK0000065	10-1-82
		DBK0000115	L21
		DBK0000074	nazo 41-1
		DBK0000093	nazo 41-2
		DBK0000075	10-1-62A



	DBK0000128	12-1-43
	DBK0000129	12-1-63
	DBK0000124	itimat 73 mrs
	DBK0000126	MM 53 mrs
	DBK0000127	kismet 51 mrs
	DBK0000025	6131
	DBK0000125	kismet 12 m17
	DBK0000131	11-1-42
	DBK0000046	11-1-21
	DBK0000050	10-1-21
	DBK0000080	12-1-63
	DBK0000045	ünlü 62 m-17
	DBK0000133	müslim 42
	DBK0000132	9-1-12
	DBK0000040	9-1-12
	DBK0000083	müslüm 61a
	DBK0000084	mm 32 m-17
	DBK0000091	itimat 35 m-17
	DBK0000122	11-1-71
	DBK0000143	14-1-46
	DBK0000057	14-1-11
	DBK0000058	10-1-12b
	DBK0000103	10-1-86
	DBK0000100	kismet 12 m-17
	DBK0000023	16-1-42a
	DBK0000142	10-1-84
	DBK0000067	14-1-104
	DBK0000067/#1	14-1-104
	DBK0000073	10-1-41
	DBK0000069	10-1-51
	DBK0000047	10-1-31A
	DBK0000076	14-1-62
	DBK0000006	2132a
	DBK0000007	2132
	DBK0000016	8-1-62
	DBK0000037	20-1-62
	DBK0000028	17-1-107a
	DBK0000034	11-1-45
	DBK0000008	11-1-83b
	DBK0000041	10-1-85
	DBK0000026	11-1-61
	DBK0000014	2124
	DBK0000104	BFL-06 L.Sakei
	DBK0000027	17-1-62
	DBK0000130	10-1-41
	DBK0000137	17-1-81
	DBK0000001	4112
	DBK0000134	11-1-83b
	DBK0000052	14-1-64
	DBK0000089	14-1-54
	DBK0000049	11-1-107 b
	DBK0000039	14-1-54
	DBK0000063	ünlü 62 A
	DBK0000043	13-1-33
	DBK0000071	10-1-63b

		DBK0000043	13-1-33
		DBK0000071	10-1-63b
		DBK0000072	10-1-81
		DBK0000066	9-1-41
		DBK0000090	imam 81
		DBK0000135	20-1-74
		DBK0000038	20-1-51
		DBK0000055	korkmaz 61
		DBK0000003	20-1-58
		DBK0000079	20-1-74
		DBK0000019	14-1-81
		DBK0000005	14-1-53
		DBK0000032	2142
		DBK0000012	20-1-38
		DBK0000029	8-1-31
		DBK0000048	11-1-83a
		DBK0000095	korkmaz 71
		DBK0000059	14-1-61
		DBK0000060	korkmaz 71
		DBK0000053	11-1-106
		DBK0000116	11-1-106
		DBK0000077	ünlÜ 51
		DBK0000031	11-1-51
		DBK0000044	10-1-87
		DBK0000042	10-1-52
		DBK0000139	10-1-52
		DBK0000117	11-1-42
		DBK0000119	10-1-62a
		DBK0000054	11-1-42
		DBK0000009	6171
		DBK0000081	nazo 41-1
		DBK0000061	10-1-72
		DBK0000062	10-1-86
		DBK0000136	10-1-31a
		DBK0000068	imam 73
		DBK0000078	14-1-44
		DBK0000140	14-1-61
		DBK0000113	L 16
		DBK0000101	10-1-87
		DBK0000120	11-1-51
		DBK0000114	L 1a
		DBK0000123	2142
		DBK0000118	17-1-51
		DBK0000065	10-1-82
		DBK0000115	L21
		DBK0000074	nazo 41-1
		DBK0000093	nazo 41-2
		DBK0000075	10-1-62A

