

TÜRKİYEDE ÜRETİLEN EKŞİ HAMURLARDAN İZOLE EDİLEN LACTOBACİLLUS SUŞLARININ ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ*

DETERMINATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LACTOBACİLLUS STRAINS ISOLATED FROM SOURDOUGHS PRODUCED IN TURKEY

Özay MENTEŞ¹, Recai ERCAN¹, Mustafa AKÇELİK²

¹Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

²Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

ÖZET: Bu çalışmada, Türkiye'nin 3 farklı şehrinde (Ankara, Bursa ve Trabzon) alınan ekşi hamur örneklerinden tanımlanan 150 adet *Lactobacillus* suşunun bakteriyosin üretme yetenekleri ve bu suşların değişik indikatör bakterilere karşı antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Tanımlanan 150 adet *Lactobacillus* suşu içerisinde, 21 adetinin bakteriyosin üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Bu suşların içerisinde antibakteriyel etki spektrumu en geniş olanlar; denenen tüm indikatör suşlara (Gram negatif bakteriler; *E. coli* CFAI, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *Typhimurium* ve *P. fluorescens* de dahil) karşı etkinlik gösteren *Lb. alimentarius* LMO6, LMO7 ve *Lb. plantarum* LMO23, LMO25 ve LMO28 suşları olarak tanımlanmıştır. Bu suşlar, aynı zamanda, ekmeklerde rope etmeni olan *B. subtilis* ve *B. licheniformis*'e karşı da en yüksek inhibitör etki zonunu oluşturmuştur. *Lb. collinoides* LMO33 suşu, 14 farklı indikatör bakteriye karşı en düşük antibakteriyel etki spektrumuna sahip suş olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyosin, *Lactobacillus*, ekşi hamur

ABSTRACT: In this study, the ability of 150 *Lactobacillus* strains identified from the samples of sourdough collected from three different cities in Turkey (Trabzon, Bursa, Ankara) to produce bacteriocin and antibacterial activities of these strains against different indicator bacteria have been investigated. 21 out of the 150 *Lactobacillus* strains were found as bacteriocin producers. It has been determined that *Lb. alimentarius* LMO6, LMO7, *Lb. plantarum* LMO23, LMO25 and LMO28, having antibacterial activity against all indicator bacteria (including Gram negative bacteria; *E. coli* CFAI, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *Typhimurium* and *P. fluorescens*), showed the broadest antibacterial activity spectrum. These strains have also showed maximum inhibition zone against *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* which cause rope in breads. *Lb. collinoides* LMO33 showed the lowest antibacterial activity spectrum against 14 different indicator bacteria.

Key Words: Bacteriocin, *Lactobacillus*, sourdough

GİRİŞ

Laktobasillerin de dahil olduğu laktik asit bakterileri; yoğurt, peynir, sucuk ve ekşi hamur gibi fermente ürünlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bu starter kültürler hem gıdaların organoleptik özelliklerinin gelişiminde hem de mikrobiyel bozulma ve hastalık etmeni organizmaların gelişiminin engellenmesinde aktif rol oynamaktadır (Larsen, Vogensen ve Josephsen 1993, Caplice ve Fitzgerald 1999). Laktik asit bakterilerinde antibakteriyel aktivite; organik asitler, karbondioksit, etanol, hidrojen peroksit, ve diasetil yanında düşük moleküler ağırlıklı peptidleri içeren bakteriyosinlerden ileri gelebilmektedir (De Vuyst ve Vandamme 1994, Gobbetti 1998, Katina, Sauri, Alakomi ve Mattila-Sandholm 2002).

* Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Müdürlüğü (2003-07-11-079) tarafından desteklenen projeden alınmıştır.

¹ E-posta: mentes@eng.ankara.edu.tr

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen, antibakteriyel etkiye sahip ve protein yapıda olan ya da proteinler ile birlikte bazı yan gruplar da içerebilen metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Tagg, Dajani ve Wannamaker 1976, Klaenhammer 1993).

Lactobacillus türleri tarafından üretilen bakteriyosinler, genellikle benzer ekolojik bölgelerde bulunan ve yakın ilişkili olan türlere karşı aktivite göstermektedir. Son zamanlarda; *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Cl. tyrobutyricum*, *Staph. aureus* ve *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) gibi bakterilerin gelişimini engelleyen, geniş konakçı etkinliğine sahip *Lactobacillus* bakteriyosinleri tanımlanmıştır (Klaenhammer 1993, Diep ve Nes 2002). Bazı araştırmalarda ise, laktobasiller tarafından üretilen, ancak henüz kesin tanısı yapılmamış bakteriyosinlerin Gram negatif bakterilere karşı da etkili olduğu tespit edilmiştir (Helander, von Wright ve Mattila-Sandholm 1997, Biet, Berjeaud, Worobo, Enatiempo ve Frémaux 1998, Suma, Misra ve Varadaraj 1998, Gänzle, Hertel, van der Vossen ve Hammes 1999, Paavola, Laitala, Sandholm ve Haikara 1999).

Bu çalışmada, üç farklı şehirdeki fırınlardan sağlanan ekşi hamur örneklerinden, izole edilerek tanımlanan *Lactobacillus* suşlarının bakteriyosin üretim özellikleri ve bu suşların farklı indikatör bakterilere karşı antibakteriyel etki spektrumları belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırmada Ankara, Bursa ve Trabzon'da bulunan yerel fırınlardan alınan ekşi hamur örneklerinden izole edilerek tanımlanan *Lactobacillus* suşları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan indikatör bakteriler Prof. Dr. Ingolf Nes (Department of Genetics and Biochemistry, University of Norway, As/ Norway)'den sağlanmıştır.

Yöntem

Bakteriyosin üretimi

Tanımlanan laktobasil suşlarında bakteriyosin üretimi, *Micrococcus luteus* NCIMB8166 bakterisinin duyarlı suş olarak kullanılması suretiyle ve plak diffüzyon yöntemi esas alınarak saptanmıştır. Bu sonuçlar ayrıca steril kürdanlar aracılığı ile nokta ekim yapılan MRS alt tabaka agar ortamlarında kontrol edilmiştir (Geis, Singh ve Teuber 1983, Franz, Du Toit, Von Holy ve Holzapfel 1997). Bakteriyosin üretimi tanımlanan suşlarda üretilen bakteriyosinlerin etki spektrumları, tür içi ve türler arası indikatör bakteriler kullanılarak belirlenmiştir. Üretilen bakteriyosinlere değişik enzimlerin etkisi; nötralize edilmiş kültür filtratlarına, son konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde α -kemotripsin (pH 7.0 Sigma Chem. Co. USA, No C-6423), proteinaz-K (pH 7.0 Sigma Chem Co.USA, No P-0390), α -amilaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co. USA, Tip VIIA), lipaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co. USA, No L-17714), katalaz (pH 7.0 Sigma Chem Co.USA, No C-10) ve lizozim (pH 7.0 Sigma Chem Co.USA, No L-7651) enzimleri uygulanarak araştırılmıştır. Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi ise, nötralize edilmiş kültür filtratlarının 100 °C'de 5, 10, 15 ve 20 dakika süreyle bekletildikten sonra indikatör bakteriye (*M. luteus* NCIMB8166) karşı denemesi suretiyle saptanmıştır. (Geis vd. 1983).

Plazmid analizi

Lactobacillus suşlarında plazmid izolasyonunda Anderson ve McKay (1983) tarafından önerilen alkali denatürasyon yöntemi bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Liziz aşamasından önce tüplere 120 μ L (20 mg/mL) lizozim çözeltisi ilave edilmiş ve 37 °C'de su banyosunda 1 saat tutulmuştur. Bu sürenin sonunda tüpler 30 dakika buzda bekletilmiştir. Elektroforez uygulamasından önce RNaz A stok çözeltisinden 4 μ L ilave edilerek 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. Agaroz jellerde plazmid büyüklüklerinin saptanmasında moleküler büyüklükleri bilinen ccc DNA (plazmid DNA) marker'larının elektroforetik hareketlilikleri ile büyüklüklerinin logaritmalari arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanılmıştır (Macrina, Kopecko, Jones, Ayers ve McCoven 1978, Southern 1979, Schaffer ve Sederoff 1981).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Ekşi hamur örneklerinden izole edilerek tanımlanan 150 adet *Lactobacillus* suşunun antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesinde, ilk aşamada, indikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* NCIMB8166 kullanılmıştır. İkinci aşamada, aralarında *Lactococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* ve *Listeria* türlerinin bulunduğu farklı indikatör mikroorganizmalar kullanılarak üretici suşların antibakteriyel aktivite spektrumları saptanmıştır. İnhibitör aktivitelerin tanımlanmasında, agar diffüzyon ve koloni inhibisyon yöntemlerinden yararlanılmıştır. Antibakteriyel aktivite zonları ve bakteriyosin aktiviteleri (IU/mL), agar diffüzyon testlerinin sonuçları esas alınarak tespit edilmiştir. Bu testler sonucunda, 150 adet *Lactobacillus* suşundan 21 adetinin antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu suşların içerisinde antibakteriyel etki spektrumu en geniş olanlar; denenen tüm indikatör suşlara (Gram negatif bakteriler; *E. coli* CFAI, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *Typhimurium* ve *P. fluorescens* de dahil) karşı etkinlik gösteren *Lb. alimentarius* LMO6, LMO7 ve *Lb. plantarum* LMO23, LMO25 ve LMO28 suşları olarak tanımlanmıştır. Bu suşlar, aynı zamanda, ekmeklerde rope etmeni olan *B. subtilis* ve *B. licheniformis*'e karşı da en yüksek inhibitör etki zonunu oluşturmuştur. 14 adet indikatör bakterinin kullandığı denemelerde yalnız üç indikatör mikroorganizmaya karşı inhibitör etki gösteren *Lb. collinoides* LMO33 suşu, en düşük etki spektrumuna sahip suş olarak belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. *Lactobacillus* suşlarının nötralize edilmiş kültür üst sıvılarının değişik indikatör bakterilere karşı etkinliği

Laktobasiller	İndikatör Mikroorganizmalar ve İnhibisyon Zon Çapları (mm)													
	NCIMB8166	NCDO2714	CFAI	LMG2813	LMG2908	SIK83	IL1403	<i>L. plantarum</i>	LMG2907	SL1344	PI	LMG2708	BS12	BL40
<i>Lb. alimentarius</i> LMO1	13	-	-	10	3	4	5	-	4	-	-	5	17	13
<i>Lb. alimentarius</i> LMO2	13	-	-	10	3	4	5	-	4	-	-	5	17	13
<i>Lb. curvatus</i> LMO3	20	-	-	14	3	3	4	-	8	-	-	4	11	14
<i>Lb. alimentarius</i> LMO4	13	-	-	10	3	4	5	-	4	-	-	5	17	13
<i>Lb. buchneri</i> LMO5	16	-	-	20	-	7	9	-	-	-	-	3	17	12
<i>Lb. alimentarius</i> LMO6	10	11	15	12	9	3	7	10	14	16	12	3	24	17
<i>Lb. alimentarius</i> LMO7	10	11	15	12	9	3	7	10	14	16	12	3	24	17
<i>Lb. plantarum</i> LMO8	18	-	-	16	12	6	7	3	-	-	-	7	14	13
<i>Lb. alimentarius</i> LMO11	13	-	-	10	3	4	5	-	4	-	-	5	17	13
<i>Lb. agilis</i> LMO18	26	-	-	10	7	10	10	-	15	-	-	7	16	14
<i>Lb. plantarum</i> LMO23	19	8	17	20	11	9	9	8	10	18	7	9	25	20
<i>Lb. sake</i> LMO24	18	-	-	16	4	8	4	-	4	-	-	6	9	12
<i>Lb. plantarum</i> LMO25	19	8	17	20	11	9	9	8	10	18	7	9	25	20
<i>Lb. curvatus</i> LMO 27	24	-	-	14	5	5	-	-	-	-	-	6	18	12
<i>Lb. plantarum</i> LMO28	19	8	17	20	11	9	9	8	10	18	7	9	25	20
<i>Lb. fermentum</i> LMO29	14	-	-	10	6	4	-	-	-	-	-	5	12	12
<i>Lb. collinoides</i> LMO33	19	-	-	-	-	2	-	-	4	-	-	-	-	-
<i>Lb. amylophilus</i> LMO41	11	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	4	21	14
<i>Lb. sake</i> LMO49	15	-	-	-	5	2	-	-	5	-	-	4	18	10
<i>Lb. brevis</i> LMO55	17	-	-	-	8	4	-	-	2	-	-	-	8	8
<i>Lb. amylovorus</i> LMO91	19	-	-	-	2	-	-	-	3	-	-	2	15	12

NCIMB8166: *Micrococcus luteus* NCIMB8166, NCDO2714: *Lactobacillus sake* NCDO2714, CFAI : *Escherichia coli* CFAI (ETEC), LMG2813: *Listeria innoqua* LMG2813, LMG2908: *Lactococcus lactis* LMG2908, SIK83: *Lactococcus lactis* SIK83 (nisin üreticisi), IL1403: *Lactococcus lactis* IL1403 LMG 2907: *Lactococcus lactis* LMG2907 (laktisin üreticisi), SL1344 : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *Typhimurium* SL1344, PI: *Pseudomonas fluorescens* PI, LMG2708: *Enterococcus faecalis* LMG2708, BS12: *Bacillus subtilis* BS12, BL40: *Bacillus licheniformis* BL40

Laktik asit bakterileri; fermente gıdaların yapısal ve aromatik özelliklerinin gelişiminden sorumlu başlıca ajanlar olması yanında, gıda bozulmaları ve gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimlerinin engellenmesinde etkin rol oynamaları açısından da önem taşımaktadır. Bu nedenle starter kültürlerde inhibitör etki spektrumu en geniş olan suşların kullanımı dikkate alınan en önemli kriterlerden biri olmaktadır (Larsen vd 1993, Helander vd 1997, Rosenquist ve Hansen 1998, Thompson, Waites ve Dodd 1998). Laktik asit bakterilerinin inhibitör aktivitesi; genelde laktik asit, asetik asit, formik asit gibi organik asitler, diasetil, hidrojen peroksit ve karbondioksit başta olmak üzere, değişik birincil metabolik ürünlerden ve bazı suşların ürettiği bakteriyosinlerden kaynaklanmaktadır. Birincil metabolik son ürünler, homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterilerine ve bu bakterilerin kullandığı modifiye metabolik yollara bağlı olarak bazı değişiklikler gösterebilmekle birlikte, genellikle benzer inhibitör özelliklere sahiptir. Bu etkiyi güçlendiren ve diğer suşlardan farklı kılan, söz konusu bakterilerin bakteriyosin üretme yetenekleridir (Larsen vd 1993, Suma vd 1998, Gänzle vd 1999, Messi, Bondi, Sabia, Bottini ve Manicardi 2001, Neysens, Messens ve De Vuyst 2003, Dicks, Mellett ve Hoffman 2004, Elegado, Guerra, Mayacan, Mendoza ve Lirazan 2004). Bakteriyosinler, üretici laktik asit bakterilerinin antibakteriyel etkilerini güçlendirmeleri ve konakçı spektrumlarını genişletme yetenekleri yanında, söz konusu organizmalar kullanılmak suretiyle endüstriyel üretimlerinin yapılması ve bu yolla doğrudan gıda koruyucuları olarak kullanım potansiyeline sahip olmaları açısından da önem taşımaktadır (van Reenen, Dicks ve Chikindas 1998, Bonade, Murelli, Vescovo ve Scolari 2001, Tomas, Bru, Wiese, de Ruiz Holgado ve Nader-Macias 2002, Chen ve Hoover 2003, De Vuyst vd 2004).

Yukarıda özetlenen bilgiler ışığında, antibakteriyel aktivite özelliği tanımlanan 21 adet *Lactobacillus* suşunda, söz konusu aktivitelerin bakteriyosinlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırılmıştır. Bakteriyosinler, lipit ya da karbonhidrat yan gruplar da içerebilen, protein yapıdaki inhibitör bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Diep ve Nes 2002, De Angelis vd 2003). Bu nedenle üretilen inhibitör maddelerin tanısında ilk aşama, protein yapılara karşı yaygın bir etki özelliği gösteren proteinaz K uygulaması olarak seçilmiştir. Proteinaz K uygulaması, bütün suşların nötrale edemiş üst sıvılarında inhibitör aktivitenin tamamen kaybına yol açmıştır (Çizelge 2). Bu bulgular, 21 adet *Lactobacillus* suşunun tümünün ürettiği inhibitör bileşiklerin bakteriyosin olduğunu kanıtlamaktadır.

Ekşi hamur örneklerinden izole edilerek tanımlanan ve bakteriyosin üretim yeteneği belirlenen 21 adet *Lactobacillus* suşunun ürettiği bakteriyosinlerin ileri düzeyde karakterizasyonu için; fiziksel, kimyasal ve enzimatik testler yapılmıştır (Çizelge 2 ve3).

Bakteriyosin üreticisi olarak tanımlanan 21 *Lactobacillus* suşunun tümünün ürettiği bakteriyosinler, proteinaz K (Sigma, No P-0390) yanında α -kemotripsin (Sigma, No C-6423) uygulaması sonucunda da tamamen aktivite kaybına uğramıştır. Yalnız *Lactobacillus sake* LMO24 suşunda, bu iki proteolitik enzime ilave olarak α -amilaz (Sigma, Tip VIIA) muamelesi sonucunda da bakteriyosin aktivitesi kaybolmuştur (Çizelge 2). Bu sonuçlar, LMO24 suşu hariç, diğer 20 suşta bakteriyosinlerin sadece peptit yapıda olduğuna işaret etmektedir. LMO24 suşunda bakteriyosin aktivitesinin proteolitik enzimler yanında amilolitik enzim muamelesinden de etkilenmesi, protein yapının karbonhidrat yan grupları içerdiğini kanıtlamaktadır. Laktik asit bakterilerinin değişik cinsleri tarafından üretilen bakteriyosinlerin agregatlar oluşturarak biyolojik etkinliklerini gösterdiği, değişik araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. Agregat yapılar, peptit zincirlerinin lipit ya da karbonhidrat özellikteki yan gruplar tarafından birbirine bağlanması sonucunda oluşturulmaktadır (Rollan ve Valdez 2001, Diep ve Nes 2002, Ogunbanwo, Sanni ve Onilude 2003). LMO24 suşunun ürettiği bakteriyosinin saflaştırılarak agregat özelliğinin araştırılması, benzer bakteriyosinlerin biyoaktivitelerinin esasının tanımlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Zira bu yan grupların bakteriyosin biyoetkinliğinin temel ajanlarından biri olduğunun kesinlik kazanması, peptitlere deneysel koşullarda yan grupların bağlanması ve aktivitelerinin artırılmasını beraberinde getirecektir.

Çizelge 2. *Lactobacillus* suşlarının ve nisin üreticisi şahit bakteri *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC7962'nin nötralize edilmiş kültür üst sıvılarının değişik enzimler ve ısı uygulamalarından sonra ölçülen aktivite düzeyleri

Isı ve Enzim Uygulamaları	Aktivite (IU/mL)*										
	ATCC7962	LMO1	LMO2	LMO3	LMO4	LMO5	LMO6	LMO7	LMO8	LMO11	LMO18
Kontrol	14600	12400	12000	8400	12000	6400	14400	14400	8200	12200	7600
Proteinaz K (Sigma, No P0390)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α- Kemotripsin (Sigma, No C-6423)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α- Amilaz ((Sigma, Tip VIIA)	14600	12400	12000	8400	12000	6400	14400	14400	8200	12200	7600
Lipaz (Sigma, No L-1714)	14600	12400	12000	8400	12000	6400	14400	14400	8200	12200	7600
Katalaz (Sigma, No C-10)	14600	12400	12000	8400	12000	6400	14400	14400	8200	12200	7600
Lizozim (Sigma, No L-7651)	14600	12400	12000	8400	12000	6400	14400	14400	8200	12200	7600
100 °C 5 dk	14600	12400	12000	5800	12000	6400	14400	14400	8200	12200	7600
100 °C 10 dk	14600	8200	8400	1200	8800	5800	14400	14400	4600	8400	1800
100 °C 15 dk	14600	6400	6600	-	6200	5200	14400	14400	3400	6600	-
100 °C 20 dk	3200	4200	4600	-	4400	5200	13800	13800	1200	4600	-

* IU/mL : Enternasyonel ünite/mL (İndikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* NCIMB8166 suşu kullanılmıştır)

- : aktivite belirlenmedi

Çizelge 2 (devam)

Isı ve Enzim Uygulamaları	Aktivite (IU/mL)*										
	LMO23	LMO24	LMO25	LMO27	LMO28	LMO29	LMO33	LMO41	LMO49	LMO55	LMO91
Kontrol	10800	8400	10800	6400	10800	13200	5400	7400	12800	13400	9600
Proteinaz K (Sigma, No P0390)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α- Kemotripsin (Sigma, No C-6423)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α- Amilaz ((Sigma, Tip VIIA)	10800	0	10800	6400	10800	13200	5400	7400	12800	13400	9600
Lipaz (Sigma, No L-1714)	10800	8400	10800	6400	10800	13200	5400	7400	12800	13400	9600
Katalaz (Sigma, No C-10)	10800	8400	10800	6400	10800	13200	5400	7400	12800	13400	9600
Lizozim (Sigma, No L-7651)	10800	8400	10800	6400	10800	13200	5400	7400	12800	13400	9600
100 °C 5 dk	10800	8400	10800	3200	10800	12800	1800	7400	4200	13400	9200
100 °C 10 dk	4600	8200	4600	-	4600	5400	-	2600	-	13400	6400
100 °C 15 dk	2400	4600	2600	-	2200	1400	-	-	-	8600	2200
100 °C 20 dk	1400	-	1200	-	1200	-	-	-	-	3600	-

*IU/mL: Enternasyonel ünite/mL (İndikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* NCIMB8166 suşu kullanılmıştır)

- : aktivite belirlenmedi

Bakteriyosin üreticisi *Lactobacillus* suşları, enzimatik uygulamalara olduğu gibi sıcaklık uygulamalarına da oldukça benzer yanıtlar vermiştir. 100 °C'de 5 dk ısı uygulamasında bakteriyosin aktivitesi tamamen kaybolan hiçbir suş tanımlanmamıştır. Ancak, *Lb. curvatus* LMO27, *Lb. collinoides* LMO33 ve *Lb. sake* LMO49 suşlarının bakteriyosinlerinde 100 °C'de 10, 15 ve 20 dk sonunda, *Lb. curvatus* LMO3, *Lb. agilis* LMO18 ve *Lb. amylophilus* LMO41 suşlarında 100 °C'de 15 ve 20 dk sonunda ve *Lb. sake* LMO24, *Lb. fermentum* LMO29 ve *Lb. amylovorus* LMO91 suşlarında ise 100 °C'de 20 dk sonunda biyoaktivite belirlenmemiştir. *Lb. buchneri*, *Lb. alimentarius* LMO6 ve LMO7 hariç, ısı stabil bakteriyosinler üreten diğer suşlarda ise; özellikle 100 °C'de 10, 15 ve 20 dk test süreleri sonunda bakteriyosin aktivitelerinde ~ % 90 oranına varan düşmeler meydana gelmiştir. *Lb. alimentarius* LMO6 ve LMO7 suşlarında ise 20 dk sonunda ~ % 4.2 oranında bir düşme saptanmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 3. *Lactobacillus* suşlarının ve nisin üreticisi şahit bakteri *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC7962'nin kültür üst sıvılarının değişik pH değerlerinde gösterdiği aktivite düzeyleri

pH	Aktivite (IU/mL)*										
	ATCC7962	LMO1	LMO2	LMO3	LMO4	LMO5	LMO6	LMO7	LMO8	LMO11	LMO18
2	28400	3800	12400	-	3200	-	5800	5600	-	3000	-
3	28400	12200	11600	2400	10400	400	13400	13400	1200	9200	1400
4	28400	16800	16400	9600	17200	5800	17600	17200	8400	16400	8200
5	25800	13200	15000	9200	13800	6200	17400	17000	8200	14000	8000
6	17600	12400	12000	8400	11600	6200	14200	14400	8200	12000	7800
7	6800	12400	12000	8400	12000	6400	14400	14400	8200	12200	7600
8	2600	8000	7600	3200	7800	4200	8800	8800	4600	6400	2600
9	1800	2200	2000	-	1800	4200	3200	3400	400	1600	200
10	1800	600	200	-	400	-	1000	1200	-	200	-
11	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* : IU/mL : Enternasyonel ünite/mL (İndikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* NCIMB8166 suşu kullanılmıştır)

Çizelge 3 (devam)

pH	Aktivite (IU/mL)*										
	ATCC7962	LMO1	LMO2	LMO3	LMO4	LMO5	LMO6	LMO7	LMO8	LMO11	LMO18
	LMO23	LMO24	LMO25	LMO27	LMO28	LMO29	LMO33	LMO41	LMO49	LMO55	LMO91
2	1600	1600	1600	1600	1400	4000	-	-	1000	-	1800
3	7200	8400	8400	4200	7800	5200	400	1400	3800	2200	4400
4	15600	16600	16600	12800	16600	14600	6800	7600	16400	17400	17400
5	14800	15200	15200	11400	15000	14400	6400	7400	16200	16000	15200
6	10600	10800	10800	7200	10600	13800	5400	7600	13200	13200	9600
7	10600	10800	10800	6400	10600	13200	5400	7400	12800	13400	9600
8	8000	7200	7200	2800	7600	1400	1200	2000	2400	5800	6200
9	2400	2800	2800	-	3000	200	-	400	-	600	3400
10	400	600	600	-	400	-	-	-	-	-	1200
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* : IU/mL : Enternasyonel ünite/mL (İndikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* NCIMB8166 suşu kullanılmıştır)

Lactobacillus suşları tarafından üretilen bakteriyosinler ısı stabiliteyi bakımından farklılık göstermektedir. Genellikle 100 °C ısı uygulamalarına karşı belirli düzeylerde aktivite kaybına uğramalarına rağmen, inhibitör etkilerini sürdürebilirler. Ancak, bazı *Lactobacillus* bakteriyosinleri ısı işleme karşı oldukça duyarlıdır (Diep ve Nes 2002, Garneau, Martin ve Vederas 2002, De Vuyst vd 2004).

Bu araştırmada, *Lactobacillus* suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin sıcaklık muamelesine karşı davranışları, literatür verileri ile paralellik göstermiştir. Endüstriyel üretim süreçlerinde kullanılan ısı uygulamaları dikkate alındığında, ısı stabil bakteriyosin üretiminin kritik bir önem taşıdığı ortaya çıkmaktadır.

Lactobacillus suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin pH değişimlerine karşı gösterdiği stabilite, söz konusu bakteriyosinlerin kullanımında çeşitliliği belirleyen ana unsurdur. Zira, sadece asidik koşullarda aktivitesini sürdüren bakteriyosinler asit gıdalarda ya da bazik koşullarda aktivitesini sürdüren bakteriyosinler de bazik

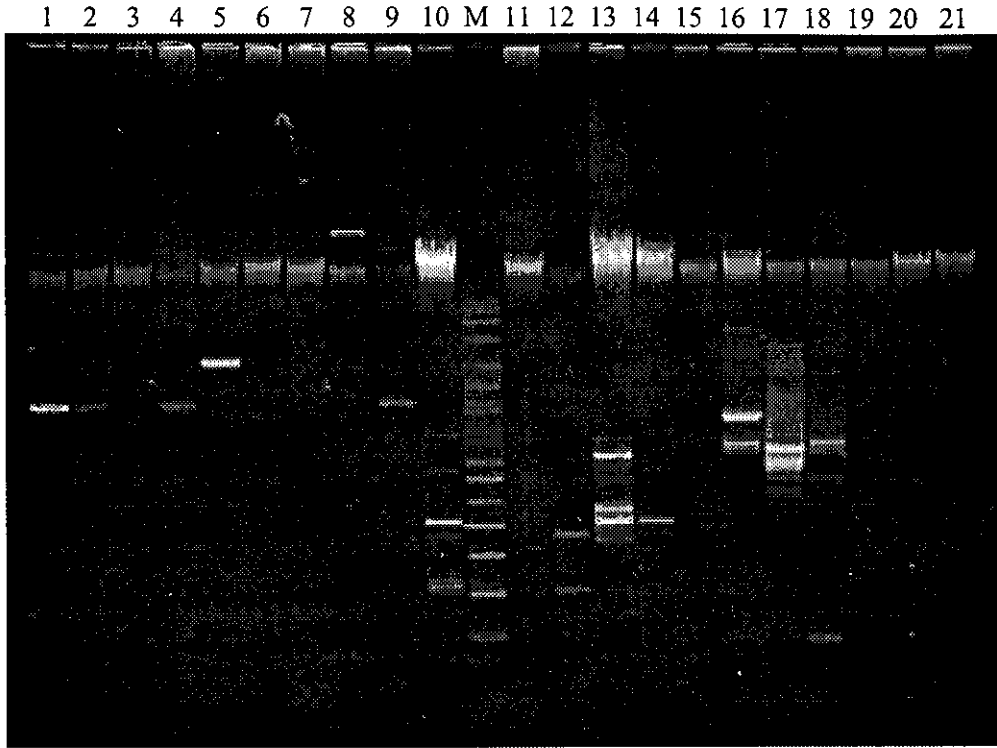
özelliik gösteren gıdalarda kullanım olanağı bulabilmektedir. Hem asidik ve hem de bazik pH değerlerinde stabilitesini koruyabilen bakteriyosinler ise, geniş bir ürün yelpazesinde kullanılabildikleri için, endüstriyel açıdan daha önemlidir (Vaughan, Eijsink, O'Sullivan ve O'Hanlon 2001, Dicks vd 2004, Elegado vd 2004). Bu literatür verileri doğrultusunda, 21 *Lactobacillus* suşunun ürettiği bakteriyosinlerin pH 2.0-11.0 arasındaki stabiliteyi araştırılmıştır. *Lb. amylovorus* LMO5 suşu hariç, diğer tüm *Lactobacillus* suşlarında en yüksek bakteriyosin aktivitesi pH 4.0'da saptanmıştır. *Lb. amylovorus* LMO5 suşunda ise, optimum bakteriyosin aktivitesi pH 7.0'da belirlenmiştir. *Lb. curvatus* LMO3, *Lb. buchneri* LMO5, *Lb. plantarum* LMO8, *Lb. agilis* LMO18, *Lb. collinoides* LMO33, *Lb. amylophilus* LMO41 ve *Lb. brevis* LMO55 suşlarının ürettiği bakteriyosinler pH 2.0'da antibakteriyel aktivitelerini tamamen kaybetmiştir. Aynı şekilde, Tüm suşlarda pH 7.0'dan başlayarak alkali pH değerlerine doğru gidildikçe bakteriyosin aktiviteleri hızlı bir şekilde azalmıştır (Çizelge 3).

Asit üretim düzeyleri (3.56-4.11), proteolitik aktiviteleri (Menteş, Akçelik ve Ercan 2004), bakteriyosin etki spektrumları (Çizelge 1) ve ürettikleri bakteriyosinlerin kimyasal, fiziksel ve enzimatik uygulamalara (Çizelge 2 ve 3) karşı oluşturdukları benzer yanıtlar esas alınarak, bakteriyosin üretici suşlardan üç grup oluşturulmuştur. İlk grup *Lb. alimentarius* LMO1, LMO2, LMO4 ve LMO11 suşlarını, ikinci grup *Lb. alimentarius* LMO6 ve LMO7 suşlarını ve üçüncü grup ise *Lb. plantarum* LMO23, LMO25 ve LMO28 suşlarını içermektedir. Ürettikleri bakteriyosinlerin konakçı etki spektrumları ve stabilite özellikleri benzer olan *Lactobacillus* suşları ile yürütülen plazmid analizi denemelerinde de, bu suşların plazmid içerikleri bakımından aynı özellikleri gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 1). Tüm bu bulgular birlikte yorumlandığında, her bir grubun üyelerinin tek bir suş olduğu ortaya çıkmaktadır. Plazmid analizleri, *Lactobacillus* suşlarında moleküler büyüklükleri 2 ile 33.1 kb arasında değişen, 1-8 adet plazmid bulunabildiğini göstermiştir (Şekil 1).

Değişik araştırmacılar, farklı ürünlerin fermentasyonuna katılan *Lactobacillus* suşlarında plazmid varlığını tespit etmiş ve bu plazmidlerin bazı metabolik özellikleri kodladığını belirlemiştir (Boris, Jimenez-Diaz, Caso ve Barbes 2001, Ogunbanwo vd 2003). Plazmidler, bakterilerde ve düşük organizasyonlu ökaryotik canlılarda bulunan, kromozom dışı, stabil olmayan DNA yapılarıdır. Buldukları organizmayı kodladıkları özellikler bakımından pozitif hale sokarlar. Starter suşlarında endüstriyel açıdan önem taşıyan bir özelliğin plazmidler tarafından kodlanması, stabilitesinin tam anlamıyla gerçekleştirilememesi nedeniyle dezavantaj oluşturur. Ancak deneysel düzenlemelere olanak sağlaması da starter kültür geliştirme çalışmaları açısından büyük önem taşımaktadır (Foschino, Arrigoni, Picozzi, Mora ve Gali 2001). Bu açıdan bakıldığında, özellikle bakteriyosin üreticisi *Lactobacillus* suşlarında plazmid içeriklerinin belirlenmesi; suş tanısının yapılmasına yardımcı olması yanında, endüstriyel öneme sahip özelliklerin genetik determinantlarının belirlenmesi bakımından da önem taşımaktadır. Bu suşlarda yürütülecek plazmid eliminasyonuna dayalı mutant seçme ve tanımlama çalışmaları; laktöz fermentasyonu, proteolitik aktivite, faj dirençlilik ve bakteriyosin üretimi ve dirençlilik gibi özelliklerin genetik doğasının belirlenmesini mümkün hale getirecektir. Günümüzde, herhangi bir fenotipik özelliğin genetik doğasının tespit edilmesi, söz konusu özelliğin deneysel olarak ve arzu edilen doğrultuda değiştirilmesi çalışmalarının temel hareket noktasını teşkil etmektedir. Bu nedenle plazmid içerikleri belirlenmiş olan bakteriyosin üretici suşlar, ileri genetik analizler için iyi bir biyomateryal özelliği taşımaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Müdürlüğü (2003-07-11-079) tarafından desteklenmiştir.



Şekil 1. Bakteriyosin üreticisi *Lactobacillus* suşlarının plazmid içerikleri

1	LMO1	(kb) : 30.4, 26.1, 10.3
2	LMO2	(kb) : 30.4, 26.1, 10.3
3	LMO3	(kb) : 25.6
4	LMO4	(kb) : 30.4, 26.1, 10.3
5	LMO5	(kb) : 26.7, 14.0
6	LMO6	(kb) : 27.3
7	LMO7	(kb) : 27.3
8	LMO8	(kb) : 33.1, 26.1
9	LMO11	(kb) : 30.4, 26.1, 10.3
10	LMO18	(kb) : 27.9, 12.8, 8.5, 6.7, 5.1, 4.4, 3.1
M	ccc Plazmid DNA Marker	(kb) : 16.2, 14.1, 12.2, 10.2, 8.0, 7.2, 6.0, 5.0, 4.0, 2.9, 2.1
11	LMO23	(kb) : 26.7
12	LMO24	(kb) : 26.1, 5.1, 4.5, 3.1
13	LMO49	(kb) : 27.9, 7.6, 6.9, 6.3, 5.3, 5.1, 4.2
14	LMO27	(kb) : 27.9, 6.9, 5.3, 4.8
15	LMO28	(kb) : 26.7
16	LMO29	(kb) : 27.9, 17.7, 14.9, 9.7, 7.8
17	LMO33	(kb) : 26.7, 15.6, 14.9, 13.7, 7.7, 7.0, 6.4, 5.9
18	LMO41	(kb) : 26.7, 17.7, 14.9, 7.8, 6.4, 2.0
19	LMO25	(kb) : 26.7
20	LMO55	(kb) : 27.9
21	LMO91	(kb) : 28.5

KAYNAKLAR

- Anderson, D.G. and McKay, L.L. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Env. Microbiol.*, 46: 549-552.
- Biet, F., Berjeaud, J.M., Worobo, R.W., Enatiempo, Y. and Fremaux C.1998. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y 105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology*, 144: 2845-2854.
- Bonade, A., Murelli, F., Vescovo, M. and Scolari, G. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 153-158.
- Boris, S., Jimenez-Diaz, R., Caso, J.L. and Barbes, C. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 328-333.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.
- Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 82-100.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Facia, M., Giovine, M. and Gobbetti, M. 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Science*, 87: 259-270.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994 . *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria; Microbiology Genetics and Applications*. Blackie Academic and Professional, 536 p., London.
- De Vuyst, L., Avonts, L., Neysens, P., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J. and Callewaert, R. 2004. The lactobin A and amylovorin L471 encoding genes are identical and their distribution seems to be restricted to the species *Lactobacillus amylovorus* that is interesting for cereal fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 90: 93-106.
- Dicks, L.M. T., Mellett, F.D. and Hoffman, L. C. 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*, 66: 703-708.
- Diep, D.B. and Nes, I.F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Current Drug Targets*, 3: 107-122.
- Elegado, F. B., Guerra, M.A.R.V., Mayacan, R.A., Mendoza, H. A. and Lirazan, M.B. 2004. *Int. J. Food Microbiol.*, (In Press).
- Franz, C.M.A.P., Du Toit, A., Von Holy, U. and Holzapfel, W.H. 1997. Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J. Basic Microbiol.* 37: 187-196.
- Foschino, R., Arrigoni, C., Picozzi, C., Mora, D. and Gali, A. 2001. Phenotypic and genotypic aspects of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdough in Italy. *Food Microbiology*, 18: 277-285.
- Gänzle, M.G., Hertel, C., van der Vossen, J.M.B.M. and Hammes, W.P.1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Esherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. Food Microbiol.*, 48: 21-35.
- Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas J. C. 2002. Two-peptid bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84: 577-592.
- Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. 1983. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Env. Microbiol.*, 45: 205-211.
- Gobbetti, M. 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Food Science and Technology*, 9: 267-274.
- Helander, I. M., von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T. M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 146-150.
- Katina, K., Sauri, M., Alakomi, L. and Mattila-Sandholm, T. 2002. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *Lebensm.Wiss. U. Technol.* 35: 38-45.
- Larsen, G.A., Vogensen, F.K. and Josephsen, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *J. Appl. Microbiol.*, 75: 113-122.
- Macrina, F.L., Kopecko, D.J., Jones, K.R., Ayers, D.S. and McCoven, S.M. 1978. A multiple plasmid containing *Esherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*, 1: 417-420.
- Menteş, Ö., Akçelik, M. ve Ercan, R. 2004. Türkiyede üretilen ekşi hamurlardan *Lactobacillus* suşlarının izolasyonu, identifikasyonu ve bu suşların temel endüstriyel özellikleri. *Gıda*, 5: 337-343.

- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Bottini, R. and Manicardi, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *Int. J. Food Microbiol.*, 64: 193-198.
- Neysens, P., Messens, W. and De Vuyst, L. 2003. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.*, 2730: 1-11.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(8): 219-227.
- Paavola, M.L.N., Laitala, A., Sandholm, T.M. and Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 29-35.
- Rollan, G. and Valdez, G.F. 2001. The peptide hydrolase system of *Lactobacillus reuteri*. *Int. J. Food Microbiol.*, 70: 303-307.
- Rosenquist, H. and Hansen, A. 1998. The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* isolated from wheat bread. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 621-631.
- Schaffer, H.E. and Sederof, R.R. 1981. Improvement estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 115: 122-133.
- Southern, E.M. 1979. Measurement of DNA lengths by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 100: 319-323.
- Suma, K., Misra, M. C. and Varadaraj, M. C. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 40: 17-25.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocin of Gram-positive Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40: 722-756.
- Thompson, J.M., Waites, W.M. and Dodd, C.E.R. 1998. Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 481-86.
- Tomas, M.S.J., Bru, E., Wiese, B., de Ruiz Holgado, A.P. and Nader-Macias, M.E. 2002. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL1328. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 714-724.
- van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.L. 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 1131-1137.
- Vaughan, A., Eijsink, V.G.H., O'Sullivan, T.F. and O'Hanlon, K. 2001. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 131-138.