

Bozanın Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin ve Laktik Asit Bakterisi İzolatlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

Yasin TUNCER^{1,*}, Banu ÖZDEN², Mürşide Dilek AVŞAROĞLU³

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü / ISPARTA

²Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü – Tandoğan / ANKARA

³Ortadoğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü / ANKARA

Alınış tarihi:21.11.2007, Kabul:05.05.2008

Özet: Bu çalışmanın amacı geleneksel fermente Türk içeceği olan bozanın bazı mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve izole edilen laktik asit bakterilerinin antibakteriyel aktivite özelliklerinin tespitidir. Bu amaçla Türkiye'nin dört farklı ilinden (Isparta, Antalya, İstanbul ve Ankara) toplanan 15 boza örneğinin mikrobiyolojik özellikleri analiz edildi. Boza örneklerinin toplam aerofilik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı 2.4×10^7 ile 3.2×10^8 kob/mL arasında ve ortalama 1.2×10^8 kob/mL; laktik asit bakterisi (LAB) sayısı 2.1×10^7 ile 2.9×10^8 kob/mL arasında ve ortalama 9.3×10^7 kob/mL; maya-küf sayısı 4.7×10^5 ile 5.4×10^6 kob/mL arasında ve ortalama 1.9×10^6 kob/mL olarak tespit edildi. Boza örneklerinin yalnız bir tanesinde 1.1×10^2 kob/mL seviyesinde koliform grup bakterisi bulunduğu belirlendi. Boza örneklerinden izole edilen toplam 30 adet laktik asit bakterisi içerisinde, 6 adedi antibakteriyel madde üretme yeteneğinde bulundu. Proteolitik enzim uygulaması sonucunda bu 6 izolattan bir adedinin bakteriyosin üreticisi olduğu tespit edildi. Biyokimyasal, kültürel testler ve API sistemi ile bakteriyosin üreticisi YBD 11 izolatu *L. lactis* subsp. *lactis* YBD11 olarak tanımlandı.

Anahtar Kelimeler: Boza, Laktik Asit Bakterisi, Antibakteriyel Aktivite, Bakteriyosin, *L. lactis* subsp. *lactis*

Determination of Some Microbiological Characteristics and Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolates of Boza

Abstract: The purpose of this study was determination of some microbiological characteristics of boza, a traditional fermented Turkish beverage and determination of antibacterial activity properties of lactic acid bacteria isolates. For this purpose, 15 boza samples were obtained from four different cities in Turkey (Isparta, Antalya, İstanbul and Ankara). The microbiological properties of these samples were analyzed. Minimum, maximum and average values for the different microbiological counts of boza samples were as follows respectively, 2.4×10^7 , 3.2×10^8 and 1.2×10^8 cfu/mL for TAMB; 2.1×10^7 , 2.9×10^8 and 9.3×10^7 cfu/mL for LAB; and 4.7×10^5 , 5.4×10^6 and 1.9×10^6 cfu/mL for yeast-mold. The coliform group bacteria count was detected 1.1×10^2 cfu/mL at only one among boza samples. A total of 30 lactic acid bacteria were isolated from boza samples. 6 isolates were found as antibacterial substances producer among 30 lactic acid bacteria. Proteolytic enzyme treatment shown that 1 isolate was found as bacteriocin producer among these 6 bacteria. Bacteriocin producer YBD11 strain was identified as *L. lactis* subsp. *lactis* YBD11 by physiological, biochemical tests and API system.

Key Words: Boza, Lactic Acid Bacteria, Antibacterial Activity, Bacteriocin, *L. lactis* subsp. *Lactis*

Giriş

Fermentasyon gıda üretimi ve korunmasında kullanılan en eski ve en ekonomik metotlardan biridir (Blandino vd., 2003). Pek çok Orta Asya, Orta Doğu ve Afrika ülkesinde laktik asit fermentasyonu yolu ile üretilmiş geleneksel fermente gıdalar tüketilmektedir (Hesseltine, 1979, Gotcheva vd., 2000). Geleneksel fermente Türk içeceği olan boza; mısır, pirinç ve darı gibi tahılların öğütülüp su ile pişirilmesi ve şeker ilave edilerek alkol ve laktik asit fermentasyonlarına tabi tutulması ile üretilen az veya çok kıvamlı bir içecektir (Güven ve Benlikaya, 2005). Balkanlar, Kırım, Kafkasya, Orta Asya ve Mısır'a kadar yayılmış olan boza değişik yerlerde farklı kıvam ve lezzetle tanınır. Yunanistan, Yugoslavya, Bulgaristan, Arnavutluk, Romanya, Bosna-Hersek ve Türkiye'de çok bilinen fermente bir içecek olan bozadan izole edilen bakterilerin büyük bir çoğunluğunun laktik asit bakterisi (LAB) üyesi olan *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinslerine ait türler oldukları belirlenmiştir

(Pamir, 1961; Hancıoğlu ve Karapınar, 1997; Gotcheva vd., 2000; Ivanova vd., 2000; Kabadjova vd., 2000; Zorba vd., 2003; Todorov ve Dicks, 2006).

Laktik asit fermentasyonu sürecinde; pH'nın düşmesi, oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin azalması, esansiyel besin maddeleri için laktik asit bakterileri ile rekabet ve bakteriyosin gibi inhibitör bileşiklerin üretilmesinin kombine etkisi sonucu gıda bozulması etmeni ya da patojen mikroorganizmaların gelişimleri engellenmektedir (Hancıoğlu ve Karapınar, 1997; Blandino vd., 2003). Yapılan farklı çalışmalarda bozadan izole edilen laktik asit bakterileri içerisinde yüksek oranda bakteriyosin üreticisi suşlara rastlanmıştır (Ivanova vd., 2000; Kabadjova vd., 2000; Todorov ve Dicks, 2005; Todorov ve Dicks, 2006). Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen antibakteriyel etkiye sahip, protein ya da proteinlerle birlikte bazı yan gruplar da içerebilen

metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Tagg vd., 1976, Klaenhammer, 1993). Başta *Lactobacillus* ve *Lactococcus* olmak üzere *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsi bakterilere ait pek çok tür, bakteriyosin üretme yeteneğine sahiptir (Gorris, 1994).

Bu çalışmanın amacı geleneksel fermente Türk içeceği olan bozanın bazı mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve izole edilen laktik asit bakterilerinin antibakteriyel aktivite özelliklerinin tespitidir.

Materyal ve Metot

Materyal

Bu çalışma kapsamında Türkiye'nin dört farklı ilinden (Isparta, Antalya, İstanbul ve Ankara) temin edilen 15 adet boza örneği kullanılmıştır.

Mikroorganizmalar ve Besiyerleri

Çalışma kapsamında; Isparta, Antalya, İstanbul ve Ankara illerinden toplanan 15 adet boza örneğinden izole edilen 30 adet LAB ve 23 adedi (*Lactococcus lactis* SIK-83 (nisin üreticisi), *Lactococcus lactis* IL 1403 (nisin duyarlı), *Lactococcus lactis* 105 (laktisin 3147 üreticisi), *Lactococcus lactis* LMG 2908 (Bac⁻), *Lactococcus lactis* T1 (Bac⁻), *Lactococcus lactis* 731 (laktisin 3147 üreticisi), *Lactococcus lactis* 2 (laktisin 3147 üreticisi), *Lactococcus lactis* LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi), *Lactococcus lactis* LMG 2088 (laktokoksin G üreticisi), *Lactococcus lactis* LMG 2132 (laktisin A+B üreticisi), *Lactococcus lactis* JC 17 (laktisin 481 üreticisi), *Lactobacillus sake* NCDO 2714 (nisin duyarlı), *Lactobacillus plantarum* LMG 2003, *Listeria innocua* LMG 2813 (nisin duyarlı), *Escherichia coli* LMG 3083 (ETEC), *Salmonella enterica* serotype Typhimurium SL1344, *Bacillus cereus* LMG 2732, *Pseudomonas fluorescens* P1, *Enterococcus faecalis* LMG 2708 (nisin duyarlı), *Enterococcus faecalis* LMG 2602, *Staphylococcus aureus* LMG 3022, *Staphylococcus carnosus* LMG 2709 ve *Pediococcus pentosaceus* LMG 2001) Prof. Dr. I. F. Nes'den (Department of Genetics and Biochemistry, Agricultural University of Norway, As/Norway) ve 1 adedi (*Micrococcus luteus*) Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden (Ankara) temin edilen toplam 24 adet Gram-pozitif ve Gram-negatif indikatör bakteri kullanılmıştır.

İndikatör bakterilerden *Lb. sake* NCDO 2714 ve *Lb. plantarum* LMG 2003 de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS, Merck, Damstadt, Germany) ortamında (37 °C'de statik inkübasyon), *M. luteus*, *P. fluorescens* P1, *S. enterica* serotype Typhimurium SL1344 ve *E. coli* LMG 3083 (ETEC) Luria Bertani (LB) broth ortamında (37 °C'de çalkalamalı inkübasyon) ve *B. cereus* LMG 2732, *S. aureus* LMG 3022 ve *S. carnosus* LMG 2709 Triptik Soy Broth (TSB, Acumedia, Michigan, USA) ortamında (37 °C'de statik inkübasyon) geliştirilmiştir. Bunların dışında kalan indikatör bakteriler için ise; % 0.5 oranında glukoz ilave edilmiş M17 broth (Merck, Damstadt, Germany) (GM17) ortamları (30 °C'de statik inkübasyon) kullanılmıştır. Bakteriler MRS, GM17, LB ve TSB dik

agar ortamlarında +4 °C'de ve MRS, GM17, LB ve TSB broth ortamlarına % 20 oranında steril gliserol ilave edilerek, -20 °C'de saklanmıştır. Çalışma materyalleri ise gliserol ilave edilmemiş MRS, GM17, LB ve TSB broth ortamlarında, +4 °C'de ve haftalık transferler yapılarak korunmuştur (Holt vd., 1994).

Metot

Boza Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizi

Isparta, Antalya, İstanbul ve Ankara illerinden temin edilen boza örneklerinin (15 adet) mikrobiyolojik analizi için, boza örneklerinden 10 mL alınmış ve 90 mL % 0.1'lik steril peptonlu su ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası her bir boza örneğinin 10⁻⁸ seviyesine kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Direk boza örneklerinden ve hazırlanan dilüsyonlardan (10⁰ - 10⁻⁸) toplam aerobik mezofilik bakterilerin sayısının belirlenmesi için Plate Count Agar (PCA, Merck, Damstadt, Germany), laktik asit bakterilerinin sayısının belirlenmesi için % 0.14 sorbik asit ilave edilmiş de Man Rogosa Sharpe Agar (MRS-S) (Anonim, 1987), maya-küf sayısının belirlenmesi için Dikloramfenikol Rose Bengal Agar (DCRBA, Merck, Damstadt, Germany) ve koliform grup bakterilerin sayısının belirlenmesi için ise Violet Red Bile Agar (VRB, Acumedia, Michigan, USA) besiyeri içeren Petri kutularına 100 µL aktararak yüzeye Drigalski spatülü ile yayılmıştır. PCA ve MRS-S agar besiyerleri 30 °C'de 24-48 saat, DCRBA besiyerleri 25 °C'de 3-5 gün ve VRB agar besiyerleri ise 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Petri kutularında gelişen koloniler sayılmıştır.

Boza Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu için, boza örneklerindeki laktik asit bakterisi sayısının belirlenmesinde kullanılan Petri kutularına (MRS-S agar) ek olarak GM17 agar besiyerleri içeren Petri kutuları da kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerlerinde oluşan farklı koloni morfolojisine sahip koloniler seçilmiştir. Seçilen koloniler geliştikleri katı besiyerlerinin sıvı formlarında ardışık iki gün pasajlandıktan sonra Gram boyama ve katalaz testine tabi tutulmuştur.

Morfolojik Tanı ve Katalaz Testi

Bakteri morfolojileri, Gram boyama yöntemi ile hazırlanan preparatların 1500 X büyütme ile ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda belirlenmiştir. Katalaz testi için, MRS agar ve GM17 agar ortamlarında geliştirilen bakteri kolonileri lam üzerine aktarılmış ve % 3'lük hidrojen peroksit çözeltisinden bir damla ilave edilerek, mikroskop altında 100 X büyütmede gaz çıkışı olup olmadığı gözlenmiştir.

Antibakteriyel Madde Üretim Özelliğinin Belirlenmesi

Laktik asit bakterisi izolatlarında antibakteriyel madde üretim özelliğinin belirlenmesinde Van Belkum vd. (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 18 saatlik aktif laktik asit bakterisi izolatları öze yardımıyla MRS ve GM17 agar ortamlarına sürme ekim yapılmış ve bakteriler bu ortamlarda 30 °C'de 18 saat geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan kolonilerden, steril kürdan aracılığıyla MRS ve GM17 agar ortamlarına bir Petri

kutusunda beş farklı izolat olacak şekilde nokta ekim yapılmış ve 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Uygun besiyeri ve inkübasyon sıcaklığında 18 saat geliştirilen indikatör bakterilerden 100 µL alınarak, % 0.7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar (LB, MRS, GM17 ve TSB) üzerine aktarılmış ve bu ortamlar MRS ve GM17 agar besiyerinde geliştirilen laktik asit bakterisi kolonileri üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Petri kutuları indikatör bakterilerin gelişimi için uygun sıcaklıkta 18 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda, laktik asit bakterisi izolatlarının indikatör bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir.

Proteolitik Enzim Uygulaması

Üretilen antibakteriyel maddenin protein doğasında olup olmadığını belirlemek için, öncelikle indikatör bakterilere karşı zon veren laktik asit bakterisi izolatları MRS ve GM17 sıvı besiyeri ortamında 30 °C'de 18 saat süreyle geliştirilmiştir. Bu süre sonunda kültürler 6000 devirde 15 dakika santrifüj (Sigma 3K 30, rotor 12111) işlemine tabi tutulmuştur. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek yeni tüplere aktarılan kültür üst sıvılarının pH'sı, 6 N NaOH kullanılarak 6.5-7.0 arasında ayarlanmış ve bu ortamlar 0.45 µm por çapında steril membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilmek suretiyle sterilize edilmiştir. Nötralize edilmiş steril kültür üst sıvılarına son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde proteinaz K (Amresco, Solon, Ohio, USA) ilave edilmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Enzim aktivitesi 100 °C'de 5 dakika ısı uygulaması ile sonlandırılmıştır. Enzim ilave edilmemiş örnekler kontrol olarak kullanılmıştır (Franz vd., 1997).

Enzim uygulanan ve uygulanmayan nötralize edilmiş kültür üst sıvılarında antibakteriyel aktivite; duyarlı indikatör bakterilere karşı kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Proteinaz K uygulamasında, test edilen her bir izolatın en yüksek inhibisyon zonu oluşturduğu indikatör bakterisi kullanılmıştır. Kültür üst sıvıları kuyucuklara 50 µL olacak şekilde aktarılmıştır.

Bakteriyosin Üreticisi Laktik Asit Bakterisi İzolatının Tanımlanması

İzole edilen 30 adet laktik asit bakterisi izolatı içerisinde bakteriyosin üreticisi olarak belirlenen 1 adet izolatın (YBD11) tür düzeyinde tanısında; biyokimyasal ve kültürel testler (Huggins vd., 1984; Holt vd., 1994) yanında API 50 CHL sistemi (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) kullanılmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Boza Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizi

Isparta, Antalya, İstanbul ve Ankara illerinden toplanan 15 adet boza örneğinin mikrobiyel yükünün belirlenmesi için, toplam aerobik mezofilik bakteri, laktik asit bakterisi, maya-küf ve koliform grup bakteri sayımı yapılmıştır. Boza örneklerinin mikrobiyolojik sayım sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Boza örneklerinin mikrobiyolojik sayım sonuçları

Örnek No.	Mikroorganizma Sayısı (kob/mL)			
	TAMB Sayısı	LAB Sayısı	Maya-Küf Sayısı	Koliform Grup Sayısı*
1	2.7x10 ⁷	2.2x10 ⁷	5.1x10 ⁵	<10
2	3.0x10 ⁸	2.8x10 ⁸	4.4x10 ⁶	<10
3	6.5x10 ⁷	4.4x10 ⁷	7.4x10 ⁵	<10
4	2.6x10 ⁷	2.1x10 ⁷	5.1x10 ⁵	1.1x10 ²
5	6.2x10 ⁷	4.3x10 ⁷	7.2x10 ⁵	<10
6	1.5x10 ⁸	8.6x10 ⁷	2.8x10 ⁶	<10
7	5.8x10 ⁷	4.4x10 ⁷	6.2x10 ⁵	<10
8	2.4x10 ⁷	2.1x10 ⁷	4.7x10 ⁵	<10
9	3.2x10 ⁸	2.9x10 ⁸	5.4x10 ⁶	<10
10	1.7x10 ⁸	8.5x10 ⁷	2.9x10 ⁶	<10
11	5.7x10 ⁷	4.4x10 ⁷	7.1x10 ⁵	<10
12	5.6x10 ⁷	4.2x10 ⁷	6.1x10 ⁵	<10
13	2.9x10 ⁸	2.6x10 ⁸	4.1x10 ⁶	<10
14	5.5x10 ⁷	4.1x10 ⁷	6.9x10 ⁵	<10
15	1.5x10 ⁸	7.3x10 ⁷	2.7x10 ⁶	<10
En Düşük	2.4x10 ⁷	2.1x10 ⁷	4.7x10 ⁵	<10
En Yüksek	3.2x10 ⁸	2.9x10 ⁸	5.4x10 ⁶	1.1x10 ²
Ortalama	1.2x10 ⁸	9.3x10 ⁷	1.9x10 ⁶	-

TAMB: Toplam aerobik mezofilik bakteri

LAB : Laktik asit bakterisi

* : Ortalamaların hesaplanmasında <10 kob/mL değerleri 0 olarak alınmıştır.

Hancıoğlu ve Karapınar (1997) yaptıkları çalışmada 4 saatlik fermantasyon sonucu bozadaki laktik asit bakterisi sayısını 8.6x10⁷ kob/mL iken maya sayısının 3.9x10⁵ kob/mL düzeyinde olduğunu belirtmişlerdir. Aynı

çalışmada 24 saat fermantasyon süresi sonunda ise laktik asit bakterisi sayısı ve maya sayısının sırasıyla 4.6x10⁸ ve 8.1x10⁶ kob/mL seviyesinde olduğunu tespit etmişlerdir. Todorov ve Dicks (2006), 2 farklı boza örneği kullanarak

yaptıkları çalışmada ise laktik asit bakterisi sayısının yaklaşık olarak 5.0×10^7 kob/mL olduğunu belirlemişlerdir.

Boza Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

30 °C'de 24-48 saat inkübasyon süresi sonunda MRS-S ve GM17 agar besiyerinde farklı koloni morfolojisi gösteren 30 adet koloni seçilmiştir. Seçilen 30 adet koloni ardışık 2 pasaj sıvı besiyeri ortamında geliştirildikten sonra Gram boyama ve katalaz testine tabi tutulmuştur. 30 adet izolattan 17 adedinin basil morfolojisine, 13 adedinin ise kok morfolojisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Gram boyama ve katalaz testi sonucunda, 30 adet izolatın tamamı Gram-pozitif ve katalaz negatif özellik göstermiş ve bu izolatlar laktik asit bakterisi olarak tanımlanmıştır. Yapılan farklı çalışmalarda bozadan yüksek oranda laktik asit bakterisi izole edildiği belirlenmiştir. Bu çalışmalarda

izole edilen bakterilerin büyük çoğunluğunun *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinslerine ait türler oldukları tespit edilmiştir (Pamir, 1961; Hancıoğlu ve Karapınar, 1997; Gotcheva vd., 2000; Ivanova vd., 2000; Kabadjova vd., 2000; Zorba vd., 2003; Todorov ve Dicks, 2006).

Laktik Asit Bakterisi İzolatlarının Antibakteriyel Madde Üretme Yeteneklerinin Belirlenmesi

Van Belkum vd. (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılarak, 24 adet Gram-pozitif ve Gram-negatif indikatör bakteriye karşı antibakteriyel madde üretim özellikleri araştırılan bozadan izole edilmiş 30 adet laktik asit bakterisinden 6 adedinin (YBD10, YBD11, YBD16, YBD22, YBD27 ve YBD29) çeşitli bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir (Çizelge 2.).

Çizelge 2. İndikatör suşlara karşı zon veren laktik asit bakterisi izolatları

İndikatör Suşlar	Test Edilen İzolatlar					
	YBD10	YBD11	YBD16	YBD22	YBD27	YBD29
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	2 mm	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	15 mm	-	2 mm	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	16 mm	4 mm	3 mm	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	8 mm	11 mm	-	7 mm	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 105 (laktisin 3147 üreticisi)	-	11 mm	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	10 mm	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	7 mm	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	5 mm	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	4 mm	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	10 mm	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	4 mm	7 mm	-	8 mm	6 mm	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 CFAI (ETEC)	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	10 mm	21 mm	5 mm	6 mm	7 mm	4 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2708 (nisin duyarlı)	-	5 mm	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2602	-	6 mm	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> LMG 3022	-	6 mm	-	-	-	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> LMG 2709	-	8 mm	-	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LMG 2001	-	15 mm	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> LMG 2732	-	4 mm	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> JC17 (laktisin 481 üreticisi)	-	7 mm	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG 2132 (laktisin A+B üreticisi)	-	4 mm	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2088 (laktokoksin G üreticisi)	-	4 mm	-	-	-	-

YBD: Laktik asit bakterisi izolatı

Antibakteriyel etkinlik gösteren izolatlardan YBD29, yalnız *Micrococcus luteus* suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur. Diğer 5 adet izolatın ise, birden fazla Gram-pozitif indikatör bakteriye karşı etkinlik gösteren ve birbiri ile tam benzerlik içermeyen bir aktivite spektrumuna sahip olduğu belirlenmiştir. Boza örneklerinden izole edilen laktik asit bakterisi izolatlarının ürettiği antibakteriyel maddeler, denemede kullanılan hiç

bir Gram-negatif bakteriye karşı inhibisyon etkinliği içermemiştir. Birden fazla indikatör bakteriye karşı inhibisyon etkinliği gösteren laktik asit bakterisi izolatları içerisinde en geniş konakçı spektrumu, YBD11 izolatu için belirlenmiştir. YBD11 izolatu, denemede kullanılan 24 indikatör bakterinin 20 adedine (*L. lactis* IL 1403, *L. lactis* 105, *L. lactis* LMG 2908, *L. lactis* T1, *L. lactis* 731, *L. lactis* 2, *L. lactis* LMG 2912, *L. lactis* LMG 2088, *L.*

lactis LMG 2132, *L. lactis* JC 17, *Lactobacillus sake* NCDO 2714, *Lactobacillus plantarum* LMG 2003, *Listeria innocua* LMG 2813, *Bacillus cereus* LMG 2732, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* LMG 2708, *Enterococcus faecalis* LMG 2602, *Staphylococcus aureus* LMG 3022, *Staphylococcus carnosus* LMG 2709 ve *Pediococcus pentosaceus* LMG 2001) karşı, değişik düzeylerde inhibitör etkiye sahip bulunmuştur. YBD11 izolatından sonra en yüksek düzeyde inhibitör etki gösteren izolatın YBD22 olduğu belirlenmiştir. YBD22 izolatının, 6 adet (*L. lactis* SIK-83, *Lactobacillus sake* NCDO 2714, *Lactobacillus plantarum* LMG 2003, *L. lactis* IL 1403, *Listeria innocua* LMG 2813 ve *Micrococcus luteus*) indikatör bakteriyeye karşı inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. YBD10 izolatı ise denemede kullanılan 24 adet indikatör bakteriden 3 adedine (*L. lactis* IL 1403, *Lactobacillus plantarum* LMG 2003 ve *Micrococcus luteus*) karşı inhibitör etki göstermiştir. Beş adet laktik asit bakterisi izolatı içerisinde, YBD16 ve YBD27 en düşük konakçı dizgesi içeren izolatlar olarak tanımlanmıştır. YBD16 izolatı *Lactobacillus plantarum* LMG 2003 ve *Micrococcus luteus*'a karşı inhibisyon etkinliği gösterirken YBD27 izolatı ise *Listeria innocua* LMG 2813 ve *Micrococcus luteus*'a karşı inhibisyon etkinliği göstermiştir.

Proteolitik Enzim Uygulaması

Laktik asit bakterisi izolatlarının nötrale edilmiş steril kültür üst sıvılarında yapılan proteinaz K uygulaması sonucu, 5 adet izolatın (YBD10, YBD16, YBD22, YBD27 ve YBD29) ürettiği antibakteriyel maddenin proteinaz K uygulamasından etkilenmediği, buna karşı 1 adet izolatın (YBD11) ürettiği antibakteriyel maddenin ise proteinaz K uygulaması sonucu etkinliğinde azalma olduğu belirlenmiştir.

Bazı karbonhidrat ve lipit yan grupları da içerebilmelerine rağmen, bakteriyosinlerin tümünde antibakteriyel etkinlik ana protein yapıdan kaynaklanmaktadır. Laktik asit bakterilerinde tanımlanan tüm bakteriyosinlerin, proteinaz K muamelesi sonucunda aktivitelerini ya tamamen ya da büyük ölçüde kaybettikleri saptanmıştır (Dobrzanski vd., 1982; Van Belkum vd., 1989; Jiménez-Díaz vd., 1990; Piard vd., 1990; Dieye vd., 2001; Tuncer ve Akçelik, 2007). Proteinaz K uygulaması sonucu inhibitör etkinin tamamen veya kısmen ortadan kalkması aktif maddenin protein yapıda olduğunun (bakteriyosin), proteinaz K uygulamasından etkilenmemesi ise antibakteriyel aktivitenin proteiner yapıdan ileri gelmediğinin delili olarak değerlendirilmiştir. Bu veriler ışığında proteinaz K uygulamasından etkilenen laktik asit bakterisi izolatı YBD11 bakteriyosin üreticisi olarak tanımlanmıştır.

5 adet laktik asit bakterisi izolatının (YBD10, YBD16, YBD22, YBD27 ve YBD29) ürettiği antibakteriyel maddenin proteinaz K uygulamasından etkilenmemesi ise, bu izolatların bakteriyosin dışında başka bir antibakteriyel madde ürettiklerine işaret etmektedir. Bugüne kadar farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, laktik asit bakterilerinin bakteriyosinler dışında; organik asitler, diasetil, asetoin ve hidrojen peroksit gibi farklı antibakteriyel maddeler ürettikleri belirlenmiştir (Jay,

1982; McKay, 1983; Condo, 1987; Hugenholtz ve Starrenburg, 1992; Morita vd., 1997; Hsu vd., 2002; Devlieghere vd., 2004).

Bakteriyosin Üreticisi Laktik Asit Bakterisi İzolatının Tanımlanması

Bakteriyosin üreticisi YBD11 izolatı Elliker broth ortamında 30 ve 40 °C'de gelişme göstermiş ancak 45 °C inkübasyon sıcaklığı, % 6.5 NaCl ilavesi (30 °C) ve ortam pH'sının 9.6 düzeyine yükseltilmesi (30 °C) gibi 3 bağımsız koşulda ise gelişmemiştir. YBD11 izolatı; % 4.0 NaCl ilave edilmiş Elliker broth ortamında gelişmiş (30 °C), Reddy agar ortamında laktik asit üretimi sonucu sarıya dönen besiyeri rengini, arjininden amonyak oluşturmak suretiyle nötrale etmiş ancak sitratı fermente edememiştir. Bu sonuçlar bakteriyosin üreticisi YBD11 izolatının, *L. lactis* subsp. *lactis* suşu olduğunu göstermiştir (Huggins vd., 1984; Holt vd., 1994). YBD11 izolatının API 50 CH (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) karbonhidrat fermentasyon sonuçlarının üretici firma data bankı ile kıyaslanması sonucu bakteriyosin üreticisi YBD11 izolatının *L. lactis* subsp. *lactis* ile % 99.8 oranında homoloji gösterdiği belirlenmiştir. API 50 CH karbonhidrat testi, biyokimyasal ve kültürel testler sonucunda elde edilen veriler ışığında YBD 11 izolatı *L. lactis* subsp. *lactis* YBD11 olarak tanımlanmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No. 106O368). Bu çalışmanın gelişimi sürecindeki bilimsel önerilerinden dolayı Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Anonim, 1987. De Man, Rogosa and Sharpe Agar with Sorbic Acid (MRS-S agar). International Journal of Food Microbiology, 5, 230-232.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C. 2003. Cereal-Based Fermented Foods and Beverages. Food Research International, 36, 527-543.
- Condo, S. 1987. Responses of Lactic Acid Bacteria to Oxygen. FEMS Microbiology Reviews, 46, 269-280.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. 2004. New Preservation Technologies: Possibilities and Limitations. International Dairy Journal, 14, 273-285.
- Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A., Piard, J.C. 2001. Design of a Protein-Targeting System for Lactic Acid Bacteria. Journal of Bacteriology, 183, 4157-4166.

- Dobrzanski, W. T., Bardowski, J., Kozak, W., Zajdel, J. K. 1982. Lactostrepcins. Bacteriocin of Lactic Streptococci. Pp. 225-229. In. D. Schlessinger (Editor) Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC, 420 pp.
- Franz, C.M.A.P., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. 1997. Production of Nisin-Like Bacteriocins by *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Vegetables. Journal of Basic Microbiology, 37, 187-196.
- Gorris, L.G.M. 1994. Bacteriocins Potential Applications in Food Preservation. Pp. 79-84. In. L. Leistner and L.G.M. Gorris (Editors). Food Preservation by Combined Processes. Final Report. FAIR Concerted Action No: 7, Subgroup B. Directorate-General XII, European Commision, The Netherlands, 200 pp.
- Gotcheva, V., Pandiella, S. S., Angelov, A., Roshkova, V. G., Webb, C. 2000. Microflora Identification of the Bulgarian Cereal-Based Fermented Beverage Boza. Process Biochemistry, 36, 127-130.
- Güven, K., Benlikaya, N. 2005. Acid Produced by Lactic Acid Bacteria Prevent the Growth of *Bacillus cereus* in Boza, a Traditional Fermented Turkish Beverage. Journal of Food Safety, 25, 98-108.
- Hancıoğlu, Ö., Karapınar, M. 1997. Microflora of Boza, a Traditional Fermented Turkish Beverage. International Journal of Food Microbiology, 35, 271-274.
- Hesseltine, C.W. 1979. Some Important Fermented Foods of Mid-Asia, the Middle East and Africa. Journal of the American Oil Chemists' Society. 56, 367-374.
- Holt, G.H., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Ninth Edition, 787 pp.
- Hsu, S.T., Breukink, E., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M., Nuland, N.A. 2000. Mapping the Targeted Membrane Pore Formation Mechanism by Solution NMR: The Nisin Z and Lipid II Interaction in SDS Micelles. Biochemistry, 41, 7670-7676.
- Hugenholtz, J., Starrenburg, M.J.C. 1992. Diacetyl Production by Different Strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and *Leuconostoc* ssp. Applied Microbiology and Biotechnology, 38, 17-22.
- Huggins, R.A. 1984. Progress in Dairy Starter Culture Technology. Food Technology. 38, 41-50.
- Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S., Dousset, X. 2000. Detection, Purification and Partial Characterization of A Novel Bacteriocin Substance Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 Isolated From Boza-Bulgarian Traditional Cereal Beverage. Biocatal-Vestnik Moskov Univ Kimia, 41, 47-53.
- Jay, J.M. 1982. Antimicrobial Properties of Diacetyl. Applied and Environmental Microbiology, 44, 525-532.
- Jiménez-Díaz, R., Piard, J.C., Ruiz-Barba, J.L., Desmazeaud, M.J. 1990. Isolation of a Bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* Strain from a Green Olive Fermentation. FEMS Microbiology Reviews, 87, 91.
- Kabadjova, P., Gotcheva, I., Ivanova, I., Dousset, X. 2000. Investigation of Bacteriocin Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Boza. Biotechnol Biotechnol Eq, 14, 56-59.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiological Reviews., 12, 39-86.
- McKay, L.L. 1983. Functional Properties of Plasmids in Lactic Streptococci. Antonie van Leeuwenhoek, 49, 259-274.
- Morita, H., Kamizono, K., Nakamura, S., Fujita, Y., Sakata, R., Nagata, Y., McKay, L.L. 1997. Cloning of Citrate Permease Gene of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* NIAI N-7 and Expression in Citrate-negative Lactococci. Milchwissenschaft, 52, 138-141.
- Pamir, M. 1961. H. Boza Üzerinde Mikrobiyolojik ve Kimyasal Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 176, A.Ü. Basımevi, Ankara, 60s.
- Piard, J.C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J., Desmazeaud, M. 1990. Evidence for a Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. Netherlands Milk and Dairy Journal, 44, 143-158.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. Bacteriological Reviews, 40, 722-756.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2005. Pediocin ST18, an Anti-listerial Bacteriocin Produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 Isolated From Boza, a Traditional Cereal Beverage From Bulgaria. Process Biochemistry, 40, 365-370.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2006. Screening for Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from Boza, a Traditional Cereal Beverage from Bulgaria Comparison of the Bacteriocins. Process Biochemistry, 41, 11-19.

- Tuncer, Y., Akçelik, M. 2007. Preliminary Biochemical and Genetic Characterization of the Bacteriocins Produced by Three *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Strains. Australian Journal of Dairy Technology, 62, 19-25.
- Zorba, M., Hancıoğlu, Ö., Genç, M., Karapınar, M., Ova, G. 2003. The Use of Starter Culture in the Fermentation of Boza, a Traditional Turkish Beverage. Process Biochemistry, 38, 1405-1411
- Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J., Venema, G. 1989. Cloning of Two Bacteriocin Genes from a Lactococcal Bacteriocin Plasmid. Applied and Environmental Microbiology, 55, 1187-1191.