



Enzyme activities *Lactobacillus sp.* and *Lb. Rhamnosus* Isolated from Silage

Tuğçe Turgut^{1*}, Kemal Gürler², Halit Yücel³, Emin Özköse⁴, M. Sait Ekinci⁵

^{1*} Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE, (ORCID:0000-0003-2147-5526), tugceturgut@ksu.edu.tr

² Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE, (ORCID:0000-0003-1666-0997), kgurler10@gmail.com

³ Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE, (ORCID:0000-0002-6196-5303), halityucel@ksu.edu.tr

⁴ Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE (ORCID: 0000-0001-5710-4175), cozkose@ksu.edu.tr

⁵ Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE (ORCID: 0000-0001-7994-0203), sekinci@ksu.edu.tr

(3rd International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences ICAENS 2022, July 20-23, 2022)

(DOI: 10.31590/ejosat.1144916)

ATIF/REFERENCE: Turgut T., Gürler K., Yücel H., Özköse E. & Ekinci M.S. (2022). Silajdan Elde Edilen *Lactobacillus sp.* ve *Lb. rhamnosus,*' un bazı Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi. *European Journal of Science and Technology*, (39), 109-112

Abstract

Probiotic lactic acid bacteria are vital microbial group for fermentation of silage, which is crucial importance particularly for dairy animal nutrition. These microorganisms are able to degrade amino acids, carbohydrates and fatty acids, our knowledge, however, about their other enzymatic activities is still limited. To investigate the inulinase and invertase activities of silage originated *Lactobacillus sp* and *Lactobacillus rhamnosus*, the isolates were incubated for 24h, 36h and 48h in LB broth and MRS broth. Supernatant and cell associated enzyme activities were determined at pH: 6.0 using inulin and sucrose as substrates, and their specific and total enzyme activities were analysed comparatively. *Lactobacillus sp* showed the highest invertase activity as 22.1 mg/ml (cell associated) for 24h incubation, whilst the utmost invertase activity was observed as 20 mg/ml at the end of 36h incubation period for supernatants. Same enzyme activities were determined as 20,1 mg/ml and 19,9 mg/ml for 24h incubation, for cell associated and supernatant samples of *Lb rhamnosus* respectively. The highest cell associated inulinase activity of *Lactobacillus sp* was recorded as 20,1 mg/ml for 36h incubation time while the maximal activity for supernatant was recorded at 24h incubation. Maximum cell associated and supernatant activities of the isolate was observed as 24,6 mg/ml and 26, mg/ml respectively. Both isolates showed noteworthy amount of invertase and inulinase activities which makes them potential silage inoculants.

Keywords: Lactobacillus sp, Lb rhamnosus, probiotics, invertasez, inulinase

Silajdan Elde Edilen *Lactobacillus sp.* ve *Lb. rhamnosus,*' un bazı Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi

Öz

Laktik asit bakterileri hayvan beslemede önemli bir yeri olan silaj materyalinin fermantasyonunda görev alan probiyotik özellikli mikrobiyal bir gruptur. Amino asitleri, karbonhidratları ve yağ asitlerini parçalayabilme yeteneğine sahip oldukları bilinen bu mikroorganizmaların enzim aktiviteleri hakkındaki bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada *Lactobacillus sp* ve *Lb. rhamnosus* için inülinaz ve invertaz aktiviteleri incelenmek amacı ile spesifik sıvı besi yerleri (LB Broth ve MRS Broth) içerisinde optimum sıcaklık derecelerinde 24 saat, 36 saat ve 48 saat kültüre alınmışlardır. Gerek hücre içi gerekse süpernatant enzim aktiviteleri pH:6.0 sodyum fosfat tamponu kullanılarak inülin ve sükroz substratlarına karşın analiz edilmiştir. Her iki bakteriyel suş için spesifik ve toplam enzim aktiviteleri belirlenmiş ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. *Lactobacillus sp*' sukroza karşı en yüksek spesifik aktiviteyi hücre içi 24. saatte 22.1 mg/ml olarak gösterirken hücre dışında ise 36 saatte 20 mg/ml olarak göstermiştir. Diğer suş, *Lb rhamnosus* ise aynı substart kullanıldığında en yüksek hücre içi ve hücre dışı enzim aktiviteleri 24 saatte sırası ile 20,1 mg/ml ve 19,9 mg/ml olarak belirlenmiştir. İnülin substratında ise *Lactobacillus sp* hücre içi maksimum seviyeye 20,1 mg/ml olarak 36 saatte ulaşırken hücre dışı maksimum seviyeye (22,18 mg/ml) ise 24 saatlik inkübasyon sonunda ulaşmıştır. *Lb rhamnosus* suşunun hücre içi ve süpernatant enzim aktivitelerine 36 saatte sırasıyla 24,6 mg/ml ve 26, mg/ml olarak ulaştığı gözlemlenmiştir. Her iki suşun da yüksek aktiviteli inülinaz ve invertaz enzimlerini üretebilme kabiliyetleri bu suşları potansiyel silaj inokülantı olarak öne çıkarmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Lactobacillus sp, Lb rhamnosus, probiyotikler, invertaz, inulinaz

* Corresponding Author: tugceturgut@kdu.edu.tr

1. Giriş

Laktik asit bakterileri fermentasyon sonucu temel ürün olarak laktik asit oluşturan mikroorganizmalardır. İlk olarak 19. yüzyılın sonlarına doğru süte fermentasyona sebep olmaları ile laktik asit bakterileri olarak sınıflandırılmışlardır. Morfolojik olarak çok farklı yapıya sahip olsalar da fizyolojik olarak ailesi bireyleri birbirine benzerlik göstermektedirler. Bireyler genellikle gram pozitif, katalaz negatif çoğunlukla spor oluşturmeyen ve gıda fermentasyonlarında güvenli bir şekilde kullanılan mikroorganizmaları kapsamakla birlikte, önemli miktarda patojen suş da rapor edilmiştir (Shape ve ark. 1966; Okoye ve ark., 2022). Laktik asit bakterileri (LAB), beslenmedeki faydaları ve fermentasyon yetenekleri sebebi ile endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Şimşek ve ark., 1996). Probiyotik bakteri olarak adlandırılan ve insan sağlığına olumlu etkisi olduğu bilinen grup içerisinde de en çok kullanılan mikroorganizmalar arasında da bulunmaktadır (Ludwig ve ark., 2009; Alp ve ark., 2009).

Hayvancılıkta yem materyali olarak sıklıkla kullanılan silaj katkı maddesi olarak LAB kullanılmaktadır. LAB ile silajda pH, asetik asit, bütirik asit miktarlarını düzenlediği bilinmektedir (Moran ve ark., 1996). Enzim aktiviteleri yönünden de silaj katkı maddesi olarak kullanılabilen LAB'lar, hücre duvarı parçalayıcı enzimler ile selüloz, hemisellüloz içeriklerinin de parçalanmasını sağlamaktadırlar (Meeske ve ark., 1993; Filya, 2002). Bu çalışmada silajdan izole edilmiş olan *Lactobacillus sp.* ve *Lb. rhamnosus* suşlarının olası invertaz ve inulinaz aktiviteleri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Mikroorganizmalar ve kültür koşulları

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar çayır silajından izole edilip saflaştırılmış (Tabasco ve ar., 2007) ve putatif olarak *Lactobacillus sp* ve *Lb. rhamnosus* olarak adlandırılmıştır. Suşlar LB besi yeri (5g NaCl, 10g Triptone, 5g Yeast Extract) ve MRS besi yerlerinde (Sigma Aldrich) kültüre alınmıştır. Optimum koşullarda 24, 36 ve 48 saatlik süreler ile inkübe edilen suşlar takibinde enzim analizleri için +4 °C ' de muhafaza edilmiştir.

2.1.1 Enzim analizleri

Enzim ekstraktı hücre dışı (supernatant) ve hücreli olarak iki farklı fraksiyondan hazırlanmıştır. Enzim üretimi araştırılacak kültür ortamı 1200 g' de 10dk santrifüjlenmiş ve besi ortamı ile hücrenin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Hücreli enzim aktivitesinin belirlenmesi amacı ile örnekler sıvı azot ile dondurulmuş ve öğütülerek sodyum fosfat tampon çözeltisi ile 10 000 g'de 2dk çöktürülmüş, üst sıvı temiz bir tüpe alınarak hücreli enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere -20°C de saklanmıştır. Enzim aktiviteleri DNS yöntemi ile belirlenmiştir (Miller, 1959), sukroz ile inulinin substrat olarak kullanıldığında açığa çıkan şekerlerin absorpsiyon değerleri spektrofotometrede (Spektramax plus 3084) 540 nm'de ölçülerek enzim aktiviteleri hesaplanmıştır (Ekinci ve ark., 2001).

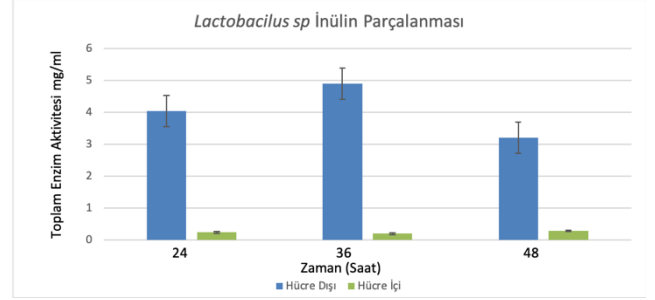
3. Bulgular ve Tartışma

3.1. İnulinaz Aktivitesi

Lactobacillus sp için hücre içi ve supernatant (hücre dışı) toplam enzim aktivitelerinin maksimum seviyeye 48 ve 36

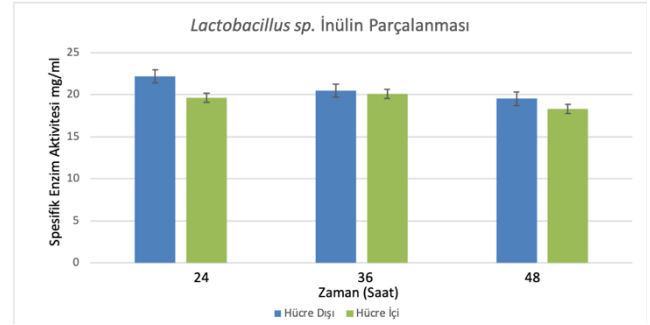
saatlerde ulaştığı belirlenmiştir. Hücre dışı enzim inulinaz aktivitesi ile karşılaştırıldığında Hücre içi enzim aktivitelerinin ihmal edilebilir derecede düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).

Şekil 1. *Lactobacillus sp.* gelişim saatlerine göre gösterdiği hücre içi ve hücre dışı toplam enzim aktiviteleri

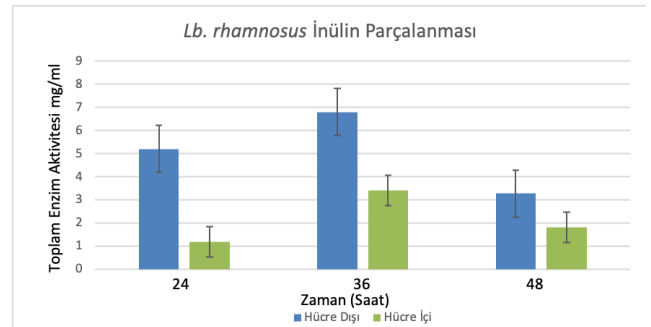


Lactobacillus sp. için hücre içi spesifik enzim aktivitesini maksimum seviyeye 36. Saatte göstermektedir. İnulinaz spesifik aktivitesinin hücre dışı aktivitenin maksimal seviyeye ulaştığı gelişim saati ise 36 saat olarak belirlenmiştir. Hücre içi enzim aktivitesi 24 saatte 19,6 mg/ml, 48. saatte ise 18,3 mg/ml olarak gözlemlenmiştir. Hücre dışı enzim aktivitesi 24 saatte 22,8 mg/ml, 48. saatte ise 19,5 mg/ml olarak gözlemlenmiştir (Şekil 2).

Şekil 2. *Lactobacillus sp* gelişim saatlerine göre İnulinaz Spesifik enzim aktivitesi



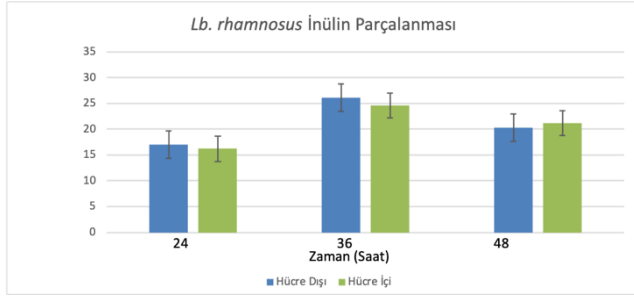
Lactobacillus rhamnosus için inulinaz aktivitesinin gelişim evrelerine göre hücre içi ve hücre dışı enzim aktivitelerinin önemli ölçüde varyasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Hücre içi ve hücre dışı toplam enzim aktivitesinin maksimum olduğu inkübasyon süresinin ise 36h olduğu belirlenmiştir. Hücre içi enzim aktivitesi 24 saatte 1,2 mg/ml, 48. saatte ise 1,8 mg/ml olarak gözlemlenmiştir. Hücre dışı enzim aktivitesi 24 saatte 5,2 mg/ml, 48. saatte ise 3,2 mg/ml olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. *Lactobacillus rhamnosus* gelişim saatlerine göre inulinaz toplam aktivitesi

Lactobacillus rhamnosus suşunun hücre içi spesifik enzim aktivitesinin 36 saatlik inkübasyon süreci sonunda en yüksek

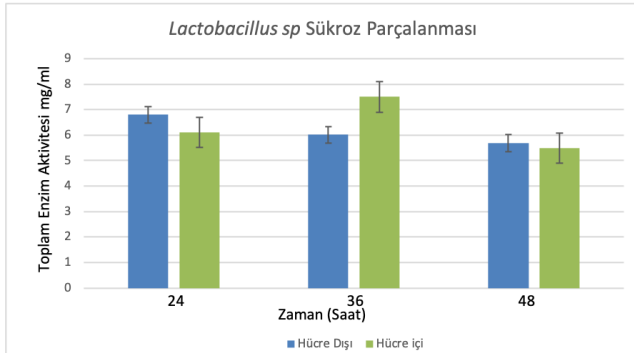
seviyeye ulaştığı bulunmuştur. Hücre içi enzim aktivitesi 24 saatte 16,2 mg/ml, 48.saatte ise 21,2 mg/ml olarak gözlemlenmiştir. Hücre dışı enzim aktivitesi 24 saatte 17 mg/ml, 48.saatte ise 20,3 mg/ml olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. *Lactobacillus rhamnosus*' un gelişim saatlerine göre gösterdiği spesifik enzim aktivitesi

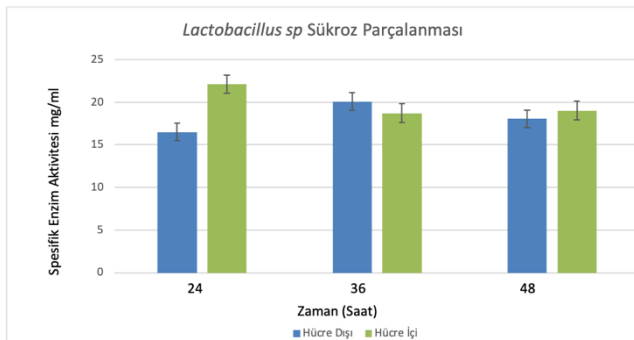
3.2. Sükraz Aktivitesi

Lactobacillus sp için hücre dışı en yüksek toplam sükraz enzim aktivitesi 24 saat sonunda ölçülürken hücre içi en yüksek seviyeye ise 36 saatlik inkübasyon periyodu sonunda ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 5). Hem hücre içi hem hücre dışı toplam sükraz enzim aktivitelerinin 48. saatte azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Hücre içi enzim aktivitesi 24 saatte 6.1 mg/ml, 48.saatte ise 5.5 mg/ml olarak gözlemlenmiştir. Hücre dışı enzim aktivitesi 24 saatte 6.8 mg/ml, 48.saatte ise 5.6 mg/ml olarak gözlemlenmiştir (Şekil 5).



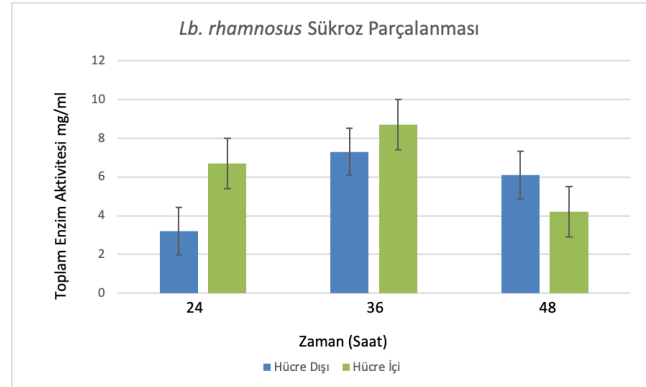
Şekil 5. *Lactobacillus sp*'in gelişim saatlerine göre gösterdiği toplam enzim aktivitesi

Hücre dışı ve hücre içi sükraz enzimi spesifik aktiviteleri belirlenmiş olan *Lactobacillus sp* 'nin hücre içi enzim aktivitesi 24 saatte 22.1 mg/ml, 48.saatte ise 19,01 mg/ml olarak belirlenmiştir. Hücre dışı enzim aktivitesi 36. saatte 20,07 mg/ml, 48.saatte ise 18,05 mg/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 6).



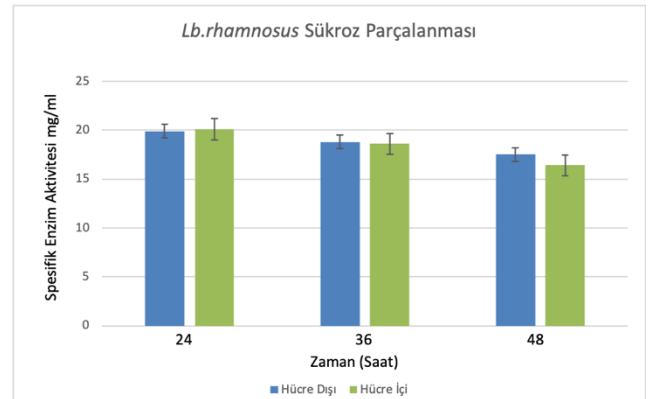
Şekil 6 . *Lactobacillus sp* in gelişim saatlerine göre gösterdiği spesifik enzim aktivitesi

Lactobacillus rhamnosus'un toplam enzim aktivitesinin hücre içi enzim aktivitesi 24 saatte 6,7 mg/ml, 48.saatte ise 4,2 mg/ml olarak gözlemlenmiştir. Hücre dışı enzim aktivitesi 24 saatte 3,2 mg/ml, 48.saatte ise 6,1 mg/ml olarak gözlemlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. *Lactobacillus rhamnosus* gelişim saatlerine göre sükraz toplam aktivitesi toplam aktivitesi

Lactobacillus rhamnosus 'un hücre içi enzim aktivitesi 24 saatte 20.1 mg/ml, 48.saatte ise 16.4 mg/ml olarak gözlemlenmiştir. Hücre dışı enzim aktivitesi 24 saatte 19.9 mg/ml, 48.saatte ise 17.5 mg/ml olarak gözlemlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. *Lactobacillus rhamnosus* gelişim saatlerine göre sükraz spesifik enzim aktivitesi

4. Tartışma

Yonca silajından izole edilen *Lactobacillus sp* ve *Lactobacillus rhamnosus* türlerine ait inülinaz ve sükraz enzimi aktiviteleri incelenmiştir. Hücre içi enzim aktiviteleri ve hücre dışı enzim aktiviteleri incelendiğinde inülinaz aktivitesi için optimum sıcaklık olan 50 °C 'de (Neeraj, ve ark.2017) *Lactobacillus sp* için hücre dışı spesifik inülinaz aktivitesi 36. saatte maksimum seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu durum özellikle bakteriyel gelişimin hızlı olmasını göstermesi açısından önem arz etmektedir. Özellikle silaj inokulantı olarak kullanılma potansiyeli oluşturabilmesi için mikrobiyal gelişimin hızlı olması, uçucu yağ asitlerinin en kısa zamanda ortaya çıkarılıp silaj pH sınırın birkaç gün içerisinde hızlıca düşürülmesi hem yem değerinin korunması açısından hem de yemi tüketecek olan

hayvan sağlığı açısından hayati niteliktedir (Driehuis ve ark., 2018). Her iki suşun da üretme yeteneğine sahip oldukları her iki enziminde önemli oranlarda hücre dışı aktivite olarak gözlemlenmesi ise diğer önemli bir hususu ortaya koymaktadır. Çünkü yem materyalinin silaja dönüşmesi esnasında sahip oldukları farklı polimerik yapıların hayvanların daha kolay kullanabileceği monomerik yapılara dönüşmesi oluşacak olan silaj materyalinden hayvanların çok daha yüksek oranlarda faydalanmalarına olanak tanıyacaktır (Ozkose ve ark., 2009).

Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. International Dairy Journal. 17: 1107- 1114.

Kaynaklar

- Alp G., Aslım B. (2009), İnsan bağırsak sistminde probiyotik olarak bulunan bifidbakterilerin önemi. Anadolu üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi 10(2):343-354.
- Driehuis, F., Wilkinson J.M., Jiang Y., Ogunade, I., Adesogan A.T. Silage review: Animal and human health risks from silage. Journal of DairyScienceVol:101(5) : 4093-4110
- Ekinci, M.S., Ozcan, N., Ozkose, E. and Flint, H.J. (2001). A study on cellulolytic and hemicellulolytic enzymes of anaerobic rumen bacterium *Ruminococcus flavefaciens* strain 17. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science. 703-709.
- Filya, İ., 2002, Laktik asit bakteri ve laktik asit bakteri+enzim karışımı silaj inokulantlarının mısır silajı üzerine etkileri. Türk J Vet Anim Sci. 26: 679–687.
- Ludwig, W., Schleifer K. H., Whitman, W. B., 2009, Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Classis: Lactobacteriodes, Vol.3, The Firmucutes, second Edition, Springer, USA.
- Meeske, R., Ashbell, G., Weinberg, Z.G., Kipnis, (1993). Ensiling forage sorghum at two stages of maturity with the addition of lactic acid bacterial inoculants. Anim. Feed Sci. Technol.; 43: 165-175.
- Moran, J., Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y., Owen, T.R. (1996) The Effect of a Bacterial Inoculant on the Fermentation and Aerobic Stability of Whole Crop Wheat Silage. In: Proc. 11th International Silage Conference. Aberystwyth, Wales,.. 164-165.
- Neeraj, G., Shobana Ravi, Ravindran Somdutt, ShriAishvarya Kaliyur Ravi & Vaidyanathan Vinoth Kumar (2017). Immobilized inulinase: a new horizon of paramount importance driving the production of sweetener and prebiotics. Critical Reviews in Biotechnology. VOL. 38, NO. 3, 409–422
- [Okoye C.O.](#), [Dong K.](#), [Wang , Y.](#), [Gao L.](#), [Li X.](#), [Wu Y.](#), [Jiang, J.](#) 2022. Comparative genomics reveals the organic acid biosynthesis metabolic pathways among five lactic acid bacterial species isolated from fermented vegetables. New Biotechnology, 70:73-83.
- Ozkose, E., Akyol, I., Kar, B., Comlekcioglu, U., Ekinci, M.S. (2009).Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* strains to construct novel recombinant silage inoculants. Folia Microbiologica, 54 (4)335-342
- Shape ME, Fryer TF, Smith DG (1966),Identification of the Lactic Acid Bacteria. “Gibbs, M.M. and Skinner, F.A Identification Methods for Microbiologist” Part A. p. 245, Academic Press, New York
- Şimşek O., Bilgin B. (1996), Gıda Sanayinde kullanılan laktik asit bakterilerinin oluşturdukları antibiyotiklerin biyokimyasal ve genetik özellikleri. Standart, 409, 89-96.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., 2007, Selective enumeration and identification of mixed cultures of