



Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi

Dergiye Geliş Tarihi: 07.11.2016

Yayına Kabul Tarihi: 09.12.2016

Baş Editör: Ebubekir Altuntaş

Alan Editörü: Köksal Pabuççu

Beyaz Peynirden Bakteriyosin Üreten Bakterinin (*Enterococcus faecium*) İzolasyonu ve Bakteriyosinin Karakterizasyonu*

Mustafa BAYRAM^{a,1}

(mustafa.mbayram@gop.edu.tr)

Zeliha YILDIRIM^b

(zeliha.yildirim@ohu.edu.tr)

^aGaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Böl. 60000 Tokat^b Ömer Halisdemir Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 40000, Niğde

Özet – Bu çalışmada, yöresel bir peynirden izole edilen bakteri ve bu bakterinin ürettiği antimikrobiyal bileşik karakterize edilmiştir. İzole edilen bakteri, genel mikrobiyolojik analizler, karbonhidrat fermantasyonu ve yağ asidi profili testleri sonucunda *Enterococcus faecium* BP olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal bileşiğin antimikrobiyal spektrumu belirlenmiş ve inhibitör aktivitesi üzerine bazı enzimlerin, organik çözücülerin, ısıl işlemin, depolama koşullarının ve üretici bakterinin gelişim fazının etkileri araştırılmıştır. İzole edilen bakterinin Gram-pozitif, kok şeklinde, hareketsiz, hemoliz, katalaz, Voges-Praskauer ve endospor negatif olduğu, % 3,0-6,5 NaCl içeren besi ortamında, pH 4,0-9,6 ve 10-45°C aralığında gelişebildiği tespit edilmiştir. Karbonhidrat fermantasyonu ve yağ asidi profili analizleri bakterinin *Enterococcus faecium* olduğunu ortaya koymuştur. Antimikrobiyal bileşiğin papain, tripsin, pankreatin ve proteaz enzimlerine duyarlı, ancak katalaz, lipaz ve amilaz enzimlerine, etil alkol, metanol, etil eter, kloroform, hekzan gibi çözücülere karşı dayanıklı olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, bileşiğin bir bakteriyosin olduğunu ortaya koymuştur. Bakteriyosinin oldukça geniş bir pH aralığında (2-10) aktivitesini koruduğu, yüksek derecede uygulanan ısıl işlem (80°C’de 30 dakika) ve farklı koşullarda gerçekleştirilen depolama (4, -18 ve -85°C) süresince aktivitesini muhafaza ettiği gözlenmiştir. Antimikrobiyal bileşik, test edilen bazı *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Campylobacter* ve *Citrobacter* türlerine karşı da inhibitör etki göstermiştir. Bakteriyosinin 37°C’de MRS besiyerinde ve bakterinin logaritmik fazın sonu ile sabit fazın başında maksimum düzeyde üretildiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler –
Enterococcus faecium,
bakteriyosin,
karakterizasyon

Gaziosmanpaşa Journal of Scientific Research 13 (2016) 103-115

Isolation of Bacteriocin Producing Bacterium (*Enterococcus faecium*) From White Cheese and Characterization of its Bacteriocin

Abstract – In this study, a bacterium isolated from a traditional cheese and the inhibitory compound produced by this bacteria were characterized. The isolated bacterium was identified as *Enterococcus faecium* BP by using general microbiological analysis, carbohydrate fermentation and fatty acid profile identification test systems. The effects of enzymes, organic solvents, heat treatment, storage conditions and its antimicrobialspectrum were determined. The isolated bacterium was Gram positive, coccus, non-motile, hemolyse, catalase, Voges-Praskauer and endospor negative and able to grow in the presence of 3.0-6.5 % NaCl, and at pH 4.0 to 9.6 and 10 to 45°C. Carbohydrate fermentation and fatty acid profile identification systems showed that this bacterium was *Enterococcus faecium*. It was found that the antimicrobial compound was sensitive to papain, tripsin, pancreatine and protease, but resistant to catalase,

Keywords –
Enterococcus faecium,
bacteriocin,
characterization

lipase and amylase enzymes, ethanol, methanol, ethyl ether, chloroform and hexane. These results indicated that this compound is a bacteriocin. It was observed that bacteriocin maintained its activity in a wide pH range (2-10), and after high heat treatment (80°C/30 min) and during various storage conditions (4, -18 and -85°C). The antimicrobial compound has inhibitor activity against *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Campylobacter* and *Citrobacter* species tested too. It was determined that bacteriocin was produced at maximum level during the late logarithmic phase and at the beginning of stationary phase of the bacterium in MRS broth and at 37°C.

Received: 07.11.2016

Accepted: 09.12.2016

1. Giriş

Günümüzde modern işleme ve koruma yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen, özellikle son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talep artışından dolayı, laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler potansiyel gıda koruyucusu olarak önem kazanmıştır (Cleveland ve ark., 2001). Laktik asit bakterileri, fermente et, süt, sebze, meyve ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır. Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği antagonistik aktivite, ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler, H₂O₂, bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri bileşikler, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır (Messens ve Vuyst, 2002; Rilla ve ark., 2003). Özellikle doğal koruyuculardan bakteriyosinlerin insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etmeleri bakteriyosinler üzerinde yapılan çalışmaların sayısının artışına sebep olmuştur (Yıldırım ve Yıldırım, 2001).

Bakteriyosinler protein tabiatında antagonistik maddeler olup özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere ve gıdalarda bozulmaya neden olan bazı bakteriler ile gıda kaynaklı bazı patojen bakterilere (örneğin *Listeriamonocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium botulinum*) karşı bakterisidal veya bakteriyostatik etki gösteren bileşiklerdir (Klaenhammer, 1993).

Bu çalışmanın amacı Tokat ilinde geleneksel olarak üretilen peynirlerden antimikrobiyal aktiviteye sahip bakteriyi izole edip tanımlamak ve antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşiğin fiziko-kimyasal özellikleri ile antimikrobiyal spektrumunu belirlemektir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1 Materyal

Bu çalışmada, Tokat ilinde geleneksel olarak üretilen 5 farklı peynir örneği temin edilmiştir. Peynir örnekleri temin edildikten hemen sonra antimikrobiyal aktiviteye sahip bakteri içerip içermediğini belirlemek için izolasyon işlemine geçilmiştir.

2.2 Bakteri Kültürleri ve Besiyerleri

Peynir örneklerinden antimikrobiyal aktiviteye sahip bakterilerin izolasyonunda ve antimikrobiyal bileşiğin antimikrobiyal spektrumunda kullanılan bakteriler Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü ve Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir. Araştırmada gıda örneklerinden bakterilerin izole edilmesinde ve laktik asit bakterilerin geliştirilmesinde de Mann Rogosa Sharpe (MRS) (Merck, Germany) besiyeri, diğer bozulma etmeni ve patojen bakterilerin geliştirilmesinde Brain Hearth Infusion (BHI) (Merck, Almanya) besiyeri kullanılmıştır. Laktik asit bakterileri % 20 gliserol içeren MRS besiyerinde, diğer bakteriler ise % 20 gliserol içeren BHI besiyerinde -80°C'de muhafaza edilmişlerdir.

2.3 Yöntem

2.3.1 Gıda Örneklerinin İzolasyon için Hazırlanması

Gıda örnekleri steril kabinde steril bıçak, pens ve spatülalar vasıtası ile açılarak 10 gram örnek uygun şekilde alınıp 90 ml %0.1'lik peptonlu suya (Merck, Almanya) aktarılmış ve stomacher (StomacherLab-Blender 400, SewardMedical, London, UK) kullanılarak homojenize edilmiştir. Örnekler ekimden önce canlandırma işlemi için 1-3 saat 25°C'de bekletilmiş sonra 10^{-6} - 10^{-7} 'ye kadar desimal dilüsyonlar hazırlanmıştır.

2.3.2 Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip İzolatların Tespit Edilmesi

Antimikrobiyal aktiviteye sahip bakterilerin izolasyonunda "Sandviç Yöntemi" (Mary-Harting ve ark., 1972) kullanılmıştır. Bu yöntemde göre hazırlanan dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak MR Sagar'a ikişer paralelli olacak şekilde yayma yöntemi kullanılarak aktarılmıştır. Örnekler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra 30-300 arasında koloni içeren petripler seçilmiş ve bunların üzerine 35-40°C'ye soğutulduktan sonra yaklaşık 10^6 kob/mL miktarında indikatör bakteri ilave edilen yumuşak besiyerleri (% 0,8 agar içeren MRS veya BHI) dökülmüş ve indikatör bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarına bağlı olarak 32°C veya 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İndikatör bakteri olarak *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ve *Enterococcus faecalis* kullanılmıştır. İnkübasyon sonucunda 2 mm ve daha büyük inhibisyon zonu gösteren kolonilerin inhibitör aktivite açısından pozitif olduğu kabul edilerek değerlendirilmeye alınmıştır.

2.3.3 Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Bakterinin Tanımlanması

Sandviç yöntemi ile indikatör mikroorganizmalara karşı inhibitör aktivite gösteren koloni izole edilip MRS besiyerine öze yardımı ile aktarılmış ve saf kültürü hazırlanmıştır. İzolatın tanımlanmasında genel mikrobiyolojik testlerden Gram boyama, spor boyama, hemoliz, katalaz, indol, VogesProskauer, jelatin hidroliz ve hareketlilik testleri yapılmıştır (Temiz 2000). Ayrıca izolatın farklı inkübasyon sıcaklıklarında (4, 15, 30, 37, 45, 55 ve 60°C), farklı pH değerlerinde (4,5, 6,0, 8,0, 9,2 ve 9,6 pH) ve farklı tuz konsantrasyonlarında (%3,0, 4,0, 6,5 ve 10) gelişme yetenekleri belirlenmiştir. İzolatın tanımlanmasında karbonhidrat fermantasyon testlerinden API strep 20 ve API 50CHL ile yağ asidi profil testi kullanılmıştır. API strep 20 ve API 50 CHL fermantasyon testleri TÜBİTAK ATAL'da, yağ asidi profil testi olan Sherlock Tanımlama Sistemi (MIS) Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi'nde yaptırılmıştır.

2.3.4 Antimikrobiyal Bileşiğin Karakterize Edilmesi

Antimikrobiyal Bileşiğin Hazırlanması

Antimikrobiyal aktiviteye sahip izolat % 0,5 oranında MRS besiyerine inoküle edilip bakterinin geliştiği optimum sıcaklıkta 12-15 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra bakteri kültürü tek aşamada $4000 \times g$ 'de 20 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı toplanmıştır. Toplanan supernatant, 0,45 µm gözenek çaplı membran filtre ile (Milipore) sterilize edildikten sonra liyofilize edilmiştir. Hazırlanan bu filtrat (supernatant) antimikrobiyal bileşiğin özelliklerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivitenin bakteri tarafından üretilen organik asitlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek amacıyla hazırlanan süpernantın pH'sı steril 5M NaOH kullanılarak 6,5-7,0 arasında ayarlanmış ve antimikrobiyal aktivitesi *Lactobacillus plantarum*'a karşı agar-spot metodu ile belirlenmiştir.

Bileşğin Antimikrobiyal Spektrumunun Belirlenmesi

Hazırlanan steril süpernatantın antimikrobiyal aktivitesi ve inhibitör spektrumu Spot-on-lawn yöntemi (Mayr-Harting ve ark., 1972) kullanılarak belirlenmiştir ve aktivite arbitrary ünite (AU) olarak ifade edilmiştir. Arbitrary ünite, inhibisyon aktivitesi gösteren en son dilüsyonun tersidir.

Antimikrobiyal bileşğin antimikrobiyal spektrumunun belirlenmesinde bazı laktik asit bakterileri, gıdalarda bozulmaya neden olan bazı bakteriler ile gıda kaynaklı patojen bakteriler kullanılmıştır. Bu amaçla test edilen bakteriler 45°C'ye soğutulmuş steril yumuşak agarlı besiyerine ilave edilerek daha önce dökülmüş ve katılaşmış agarlı besiyerinin üzerine konulmuştur. Yumuşak agarlı besiyeri katılaştıktan sonra hazırlanan antimikrobiyal bileşikten (steril süpernatant) 20 µl alınmış ve nokta halinde indikatör mikroorganizma (*Lactobacillus plantarum*) içeren yumuşak agarlı besiyeri üzerine eklenmiştir. Kullanılan indikatör mikroorganizmaya bağlı olarak 32 veya 37°C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi sonunda 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları pozitif olarak değerlendirilmiştir. Laktik asit bakterileri için yumuşak agarlı MRS besiyeri ve diğer bakteriler için yumuşak agarlı BHI besiyeri kullanılmıştır.

Enzimlerin Antimikrobiyal Bileşğin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Proteolitik ve proteolitik olmayan enzimlerin, antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşğin aktivitesi üzerine etkisi Bhunia ve ark. (1988)'e göre saptanmıştır. Lipaz (Sigma), papain (Merck), pepsin (Merck), pankreatin (Sigma), katalaz (Sigma-Aldrich), tripsin (Sigma), proteaz (Sigma) ve α -amilaz (Sigma) enzimleri 4 mM fosfat tamponu (pH:7) ile konsantrasyonu 400 µg/ml olacak şekilde membran filtre ile sterilize edilmiş supernatanta ilave edilmiş ve 37°C'de 1 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonunda antimikrobiyal aktivite *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes* bakterilerine karşı agar-spot yöntemine göre belirlenmiştir. Bakteriyosin+fosfat tamponu, enzim+fosfat tamponu ve fosfat tamponu negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Antimikrobiyal Bileşğin Aktivitesi Üzerine Isıl İşlemin, pH'nın ve Organik Çözücülerin Etkisi

Antimikrobiyal bileşğin ısıtma işlemine karşı stabilitesini belirlemek amacıyla 2'şer ml'lik steril süpernatant örnekleri 80°C'de 15, 30 ve 60 dakika, 121°C'de 15 dakika ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra antimikrobiyal aktiviteleri *Lactobacillus plantarum*'a karşı agar-spot yöntemiyle belirlenmiştir. Isıtma işlemi uygulanmamış bakteriyosin preparatı kontrol örneği olarak kullanılmıştır (Bhunia ve ark., 1988).

Antimikrobiyal aktivite üzerine pH'nın etkisini tespit etmek amacıyla hazırlanan antimikrobiyal bileşik 0,04 M fosfat tamponuna 50 mg/mL konsantrasyonda çözündürülmüş ve son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde pH'ları 2'den 12'ye kadar birer birim artacak şekilde 5 M NaOH veya 5 M fosforik asit ile ayarlanmıştır. Daha sonra bu örnekler sırası ile (i) 25°C'de 2 saat (ii) 25°C'de 24 saat (iii) 90°C'de 20 dakika ısıtma işlemlerine tabi tutulmuştur. Bunu takiben pH'ları 7'ye ayarlanıp antibakteriyal aktiviteleri *Lactobacillus plantarum*'a karşı agar-spot yöntemiyle belirlenmiştir (Yıldırım ve ark., 1999).

Değişik organik çözücülerin antimikrobiyal bileşğin aktivitesi üzerine etkisi Yıldırım ve Johnson (1998)'e göre saptanmıştır. Antimikrobiyal bileşik formaldehit, kloroform, aseton, metanol, etil alkol, hekzan ve etil eter gibi organik çözücülerde 50 mg/ml konsantrasyonda çözündürülmüş ve 25°C'de 1 saat süreyle inkübe edildikten sonra etüve konarak 4 saat süre ile bekletilmiştir. Bunu takiben örneklerin antimikrobiyal aktivitesi *Lactobacillus plantarum*'a karşı agar-spot yöntemiyle belirlenmiştir. Bakteriyosin içermeyen organik çözücüler ve organik çözücü içermeyen bakteriyosin örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır.

Bakterinin Gelişme Sıcaklığının Antimikrobiyal Bileşiğın Üretimi Üzerine Etkisi

MRS besiyerine % 0,5 oranında antimikrobiyal aktiviteye sahip izolat inoküle edildikten sonra 25, 30 ve 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sırasında belirli aralıklarla kültür ortamından örnek alınıp antimikrobiyal aktivitesi spot-on-lawn yöntemi ile belirlenmiş ve 600 nm’deki absorbans değeri spektrofotometre (Perkin Elmer UV/VIS Spektrofotometre Lambda EZ) kullanılarak belirlenmiştir (Yıldırım ve ark., 1999).

Bakterinin Gelişme Fazının Antimikrobiyal Bileşiğın Üretimi Üzerine Etkisi

Antimikrobiyal bileşiğın bakterinin hangi gelişme fazında maksimum düzeyde üretildiğini belirlemek amacıyla izole edilen bakteri, MRS besiyerine inoküle (%0,5) edilip optimum gelişme sıcaklığı olan 37°C’de 72 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi sırasında ikişer saat aralıklarla bakteri kültür ortamından örnek alınıp 600 nm’deki absorbans değeri spektrofotometre kullanılarak belirlenmiş ve bu değerdeki inhibitöraktivite *Lactobacillus plantarum*’a karşı agar-spot yöntemiyle belirlenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Bakteriyosin Üreten Bakteri Kültürünün Belirlenmesi

Geleneksel yöntemlerle üretilen yöresel bir peynirde indikatör mikroorganizmalardan *L. plantarum* ve *L. monocytogenes*’e karşı inhibitör aktiviteye sahip koloniler tespit edilmiştir (Şekil 1). 2 mm’den büyük zon veren bakteri kolonileri öze ile alınarak MRS besiyerine aktarılmış, 30°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve saf kültürleri hazırlanmıştır. Denemenin bu aşamasında tespit edilen inhibitör etkinin herhangi bir organik asitten, bakteriyosin benzeri bir maddeden veya gerçek bir bakteriyosinden kaynaklanıp kaynaklanmadığına bakılmaksızın inhibitör zon veren izolatlar bir sonraki aşamaya alınmıştır. Sandviç (overlay) yöntemi ile oluşan zonların gerçek bir bakteriyosinden kaynaklandığının kesin olarak söylenebilmesi mümkün değildir. İnhibitör etki bakteriyosin dışında bakteriler tarafından üretilen organik asit, alkol ve hidrojen peroksit gibi diğer metabolitlerden de kaynaklanabilmektedir.

3.2 Bakteriyosin Üreten Bakterinin İzole ve Teşhis Edilmesi

Saf kültürleri hazırlanan inhibitör aktiviteye sahip koloniler genel mikrobiyolojik testlere tabi tutulmuştur. Analizler sonucunda seçilen bakterinin Gram pozitif, hareketsiz, katalaz ve hemoliz negatif olduğu, endospor oluşturmadığı, Voges Proskauer negatif olduğu yani aseton üretmediği, tek, ikili ve kısa zincir şeklinde kok olduğu ve glukozu fermente edebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca 10-45°C, pH 4,0–9,6 ve % 3- 6,5 NaCl konsantrasyonunda gelişebildiği ancak sıcaklık ve pH açısından belirtilen değerlerin altında ve üstünde, NaCl konsantrasyonu açısından ise % 6,5’in üzerindeki konsantrasyonlarda gelişemediği tespit edilmiştir.



Şekil 1. Yöresel bir peynirden izole edilen izolatların *L. plantarum*’a karşı inhibitör etkisi

3.3 İzolatın Karbonhidrat Fermantasyon ve Yağ Asidi Profili

Karbonhidrat profilini belirlemek amacıyla uygulanan API strep 20 ve API 50 CHL testinin sonuçları Çizelge 1’de verilmiştir. İzolatın yağ asidi profili analizi sonuçları ise Çizelge 2’de verilmiştir. API strep 20 ve API 50 CHL testleri sonucunda cins ve tür düzeyinde yüksek bir korelasyonla izolatın *Enterococcus faecium* olduğu belirlenmiştir. İzolatın yağ asidi profili analizi de söz konusu bakterinin *E. faecium* olduğunu doğrulamıştır. İzole edilen bakteri *E. faecium* BP olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 1. İnhibitör aktiviteye sahip izolatın karbonhidrat fermantasyon profili

Karbonhidrat		Karbonhidrat		Karbonhidrat	
Gliserol	-	Sorbitol	-	Ksilitol	-
Mellobiyoz	-	α - metil-mannoz	-	β -gentiobiyoz	+
Eritrol	-	α - metil-D- glukozit	-	D-Turanoz	-
D-Arabinoz	-	N-asetil-glukozamin	+	D-Lyxose	-
L-Arabinoz	+	Amigdalın	+	L-Tagotoz	-
Riboz	+	Esculine	+	D-Fukoz	-
D-Ksiloz	-	Salisin	+	L-Fukoz	-
L-Ksiloz	-	Sellobioz	+	D-Arabitol	-
Adonitol	-	Arbutin	+	L-Arabitol	-
α - metil-xyloside	-	Maltoz	+	Glukonat	+
Galaktoz	+	Laktoz	+	2-keto-glukonat	-
D-Glukoz	+	Melibiyoz	-	5-keto-glukonat	-
D-Fruktoz	+	Sakkaroz	-	Hippurat hidrolizi	-
D-Mannoz	+	Trehaloz	+	Pyrolidonylarylamidaz	+
L-Sorboz	-	İnulin	-	β -Galaktosidaz	-
Rhamnoz	-	Melezitoz	-	Lösinaminopeptidaz	+
Dulsitol	-	D-Rafinoz	-	Arjinindihidrolaz	+
İnnositol	-	Amidon	-		
Mannitol	+	Glikojen	-		

+: Fermantasyon kabiliyeti var, -: Fermantasyon kabiliyeti yok

Çizelge 2. İnhibitör aktiviteye sahip izolatın yağ asidi profili

Yağ asidi	%
Laurik Asit (12:0)	0,98
Miristik Asit (14:0)	8,28
Palmitik Asit (16:0)	21,49
Oleik Asit (18:1 w7c)	36,51
Stearik Asit (18:0)	1,69
Vaksenik Asit (11 metil 18:1 w7c)	0,99
10-metilen oktadekonat (19:0cyclo w8c)	10,9
Araşhidonik Asit (20:4 w6, 9, 12, 15c)	0,4

3.4 Enzimlerin Antimikrobiyal Bileşiğin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Proteolitik ve proteolitik olmayan enzimlerin antimikrobiyal bileşiğin aktivitesi üzerine etkisi Çizelge 3’de verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda antimikrobiyal bileşiğin papain, tripsin, pepsin, pankreatin ve proteaza karşı duyarlı olduğu ve aktivitesini kaybettiği, ancak lipaz ve katalaz enzimlerine karşı duyarlı olmadığı, biyolojik aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal maddenin katalaza karşı duyarlı olmaması inhibitör aktivitenin H₂O₂’den kaynaklanmadığını ortaya koymuştur. Bakteriyosinin lipaz enziminden etkilenmemesi de

inhibitör aktivite göstermesi için bir lipit bölgesine ihtiyaç duymadığını göstermektedir. Antimikrobiyal maddenin proteolitik enzimlere karşı duyarlı olması, protein yapısında olduğunu ve dolayısıyla bir bakteriyosin olduğunu göstermiştir. Bundan dolayı antimikrobiyal bileşik Enterosin BP olarak isimlendirilmiştir. Benzer sonuçlar De Toit ve ark. (2000) ve Losteinkit ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmalarda da görülmüştür. Ogunbanwo ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada ise *L. plantarum* F1 tarafından üretilen bakteriyosinin α -kimotripsin, pepsin ve tripsine karşı aktivite gösteremediği; katalaz, lizozim, α -amilaz ve lipaza karşı ise aktivitesini devam ettirdiği belirtilmiştir.

Çizelge 3. Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesine etkisi

Enzimler	Bakteriyosin Aktivitesi
Lipaz (EC 3.1.1.3)	+
Katalaz (EC 1.11.1.6)	+
Papain (EC 3.4.22.2)	-
Tripsin (EC 132.650.8)	-
Pepsin (EC 3.4.23.1)	-
Pankreatin (EC 232.468.9)	-
Proteaz (EC 3.4.24.4)	-
Alfa amilaz (EC 3.2.1.1)	-

+ : inhibisyon var - : inhibisyon yok

3.5 Bakteriyosin Aktivitesine Isıl İşlemin Etkisi

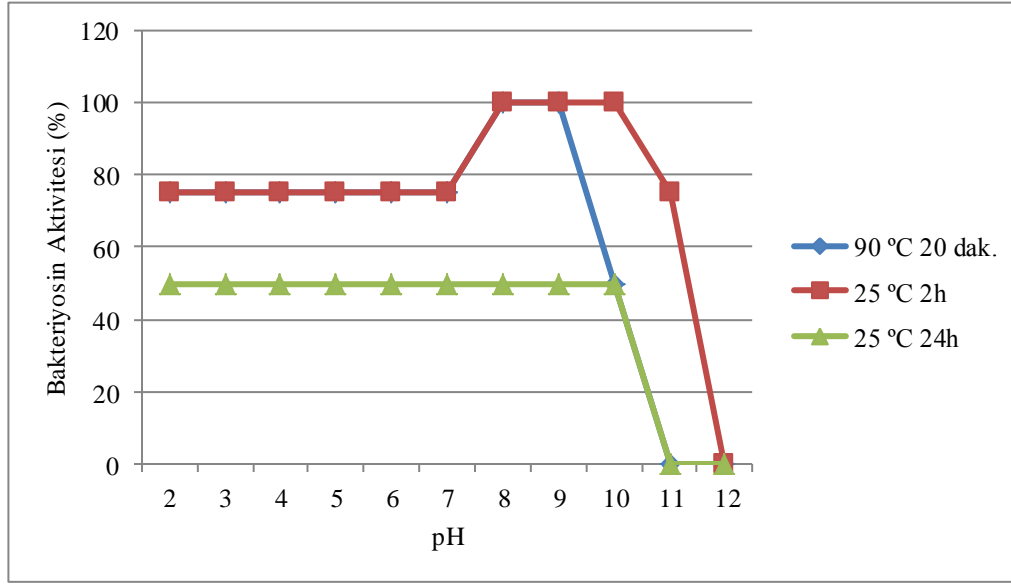
Bakteriyosinin 80°C'de 15 dakika ısıl işleme maruz kaldığında aktivitesini kontrol örneğine göre tamamen koruduğu, 80°C'de 30 dakika uygulanan ısıl işlemde aktivitesinde %50 oranında bir azalma, 80°C'de 60 dakika ve 121°C'de 15 dakika ısıl işleme tabi tutulduğunda ise aktivitesini tamamen kaybettiği saptanmıştır. *Enterococcus gallinarum* 012 tarafından üretilen Enterosin 012'nin 80°C'de 30 dakika ısıl işleme maruz kaldığında aktivitesinin yarısını kaybettiği belirtilmiştir (Jennesve ark., 2000). *E. faecium* N15 tarafından üretilen bakteriyosin N15'in 121°C'de 15 dakika ısıl işleme tabii tutulduğunda aktivitesini tamamen kaybettiği bulunmuştur (Losteinkitve ark., 2001). *E. faecium* NKR-5-3 tarafından üretilen bir bakteriyosinin 121°C'de 15 dakika ısıl işlem uygulamasından sonra aktivitesini koruduğu saptanmıştır (Wilaipuna ve ark., 2004).

3.6 Bakteriyosin Aktivitesine pH'nın Etkisi

Bakteriyosin aktivitesine pH'nın etkisi Şekil 2'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere bakteriyosin biyolojik aktivitesini pH 2-11 arasında koruduğu tespit edilmiştir. 25°C'de 2 saat tutulduğunda bakteriyosin aktivitesinin pH 7-10 arasındaki değerlerde stabil olduğu, pH 6'nın altındaki değerlerde ve pH 11'de aktivitesinde % 25, pH 12'de ise aktivitesinde % 100'lük bir kaybın olduğu tespit edilmiştir. 25°C'de 24 saat bekletilen örneklerin aktivitesinde pH 2 ile 10 arasında % 25, pH 11-12 arasında ise %100'lük bir kaybın olduğu saptanmıştır. 90°C'de 20 dakika tutulan örneklerin aktivitesinde pH 2-5 arasında % 25'lik, pH 10'da % 50'lik ve pH 11'de ise % 100'lük bir azalma olduğu belirlenmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere bakteriyosin asidik koşullarda ve özellikle pH 6-10 arasında oldukça stabildir.

Sıcaklık süre normunun uygulanmadığı *E. faecalis* BFE 1071, *E. faecalis* BFE 1113, *E. faecium* BFE 1072, *E. faecium* BFE 1170, *E. faecium* BFE 1228, *E. faecalis* BFE 1229 ve *E. faecalis* BFE 1263 tarafından üretilen bakteriyosinlerin pH 2 ile 9 arasında aktivite koruduğu ve özellikle pH 5 ile 8 arasında maksimum aktivite gösterdikleri saptanmıştır (De Toit ve ark., 2000). Keizo ve ark. (1993) tarafından yapılan bir çalışmada *E. faecium*'un ürettiği bakteriyosinin pH 3 ile 10 arasında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. *E. faecium*

N15 ve *E. faecium* NKR-5-3 tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitelerini pH 2-10 arasında koruduğu belirtilmiştir (Losteinkit ve ark., 2001; Wilaipuna ve ark., 2004).



Şekil 2. Bakteriyosin aktivitesine pH'nın etkisi

3.7 Bakteriyosin Aktivitesine Organik Çözücülerin Etkisi

Değişik organik çözücülerin bakteriyosinin aktivitesi üzerine etkisi Çizelge 4'de verilmiştir. Bakteriyosin örneği etil alkol, metanol, isopropil alkol, kloroform, etil eter ve hekzan ile muamele edildiğinde aktivitesini kaybetmediği ancak formaldehit ile muamele edildiğinde aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Pirzadave ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada bakteriyosinin, % 1 konsantrasyona sahip organik çözücülerden propanola karşı aktivitesini

Çizelge 4. Organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesine etkisi

Organik Çözücü	Bakteriyosin Aktivitesi
Etil Alkol (%25)	+
Metanol (%25)	+
Isopropil Alkol (%25)	+
Asetonitril (%25)	+
Kloroform (%10)	+
Etil Eter (%25)	+
Hekzan (%25)	+
Formaldehit (%40)	-

+ : inhibisyon var - : inhibisyon yok

koruduğu, metanol, aseton, heptan ve kloroformdan etkilenecek aktivitesini kaybettiği bulunmuştur. Ogunbanwove ark. (2003) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Lb. plantarum* F1 ve *Lb. brevis* OG1'in ürettiği bakteriyosinlerin kloroform, hekzan, etil eter ve petrol etere karşı stabil olduğu ancak amil alkole karşı stabilitesini korumadığı tespit edilmiştir.

3.8 Bakteriyosinin Antimikrobiyal Spektrumunun Belirlenmesi

Filtre ile sterilize edilmiş hücre içermeyen kültür süpernatantının *Lb. plantarum*'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin 400 AU/ml olduğu saptanmıştır. Enterosin BP'nin antimikrobiyal spektrumu Çizelge 5'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere bakteriyosinin antimikrobiyal spektrumunun oldukça geniş olduğu, Gram pozitif bakterilerden *Lb. plantarum*, *S. aureus*,

L. ivonovii, *L. monocytogenes*, *Lc. lactis*, *Leu. mesenteroides* ve *E. faecalis*; Gram negatif bakterilerden de *Campylobacter jejuni* ve *Citrobacter freundii*'ye karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyosinin Gram negatif bakteriye karşı inhibitör etkiye sahip olması ilgi çekicidir.

Çizelge 5. Enterosin BP'nin antimikrobiyal spektrumu

Bakteri	İnhibisyon	Zonunun Çapı (mm)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	AÜ	22
<i>Lactobacillus plantarum</i>	RSKK	16
<i>Staphylococcus aureus</i> CAMP	AÜ	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	AÜ	10
<i>Listeria ivonovii</i>	AÜ	20
<i>Listeria monocytogenes</i>	AÜ	18
<i>Listeria monocytogenes</i>	RSKK	21
<i>Citrobacter freundii</i>	AÜ	8
<i>Lactococcus lactis</i>	AÜ	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	AÜ	22
<i>Campylobacter jejuni</i>	AÜ	4
<i>Bac. treurgesis spp.plasteni</i>	AÜ	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	RSKK	10
<i>Yersinia enteocolitica</i> O:9	AÜ	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	AÜ	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	AÜ	-
<i>Salmonella spp.</i>	AÜ	-
<i>Bacillus subtilis</i>	AÜ	-
<i>Bacillus cereus</i>	AÜ	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	RSKK	-
<i>Escherichia coli</i> Tip1	AÜ	-
<i>Escherichia coli</i>	AÜ	-
<i>Hafnia alvei</i>	AÜ	-
<i>Rhodococcus equi</i>	RSKK	-
<i>Proteus mirabilis</i>	AÜ	-
<i>Lactococcus cremoris</i>	AÜ	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	AÜ	-

-:inhibisyon yok; AÜ: Ankara Üniversitesi; RSKK: Refik Saydam Hıfzısıhha Kültür Koleksiyonu

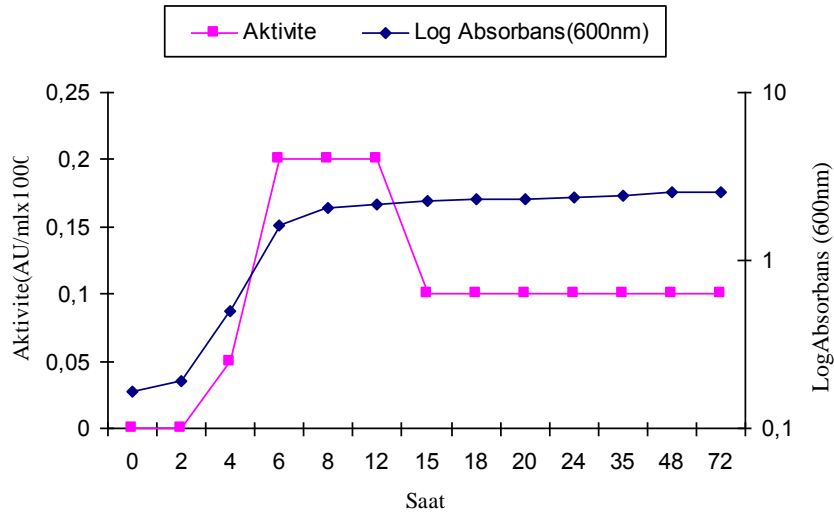
Enterokokların, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Vibrio cholera*, *Clostridium spp.* ve *Bacillus spp.* gibi bakterilerin gelişimini inhibe edebilen bakteriyosinler ürettiği ve bakteriyosinlerinin genelde anti-listerial aktiviteye sahip olduğu daha önce diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalarla belirlenmiştir (Giraffa, 2003; Leroy ve ark., 2003). Çizelge 5'te de görüldüğü gibi izole edilen bakteriyosinin tüm *Listeria*'lara karşı inhibisyon aktivitesine sahip olduğu ve en büyük inhibisyon zonunu *L. monocytogenes* RSKK'ya karşı gösterdiği gözlenmiştir.

3.9 Bakteriyosinin Üretim Fazının Belirlenmesi

MRS besiyerinde 37°C'de geliştirilen *E. faecium* BP'nin erken logaritmik gelişme fazında bakteriyosini üretmeye başladığı; geç logaritmik faz ile erken durgun fazda (6-12sa) maksimum düzeyde oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 3).

İnkübasyonun 12. saatinden yani durgun fazdan sonra bakteriyosin üretiminde bir azalma meydana geldiği daha sonra ise bakteriyosin miktarının sabit kaldığı gözlenmiştir. Durgun fazda bakteriyosin üretiminde meydana gelen azalmanın nedeninin *E. faecium* BP tarafından

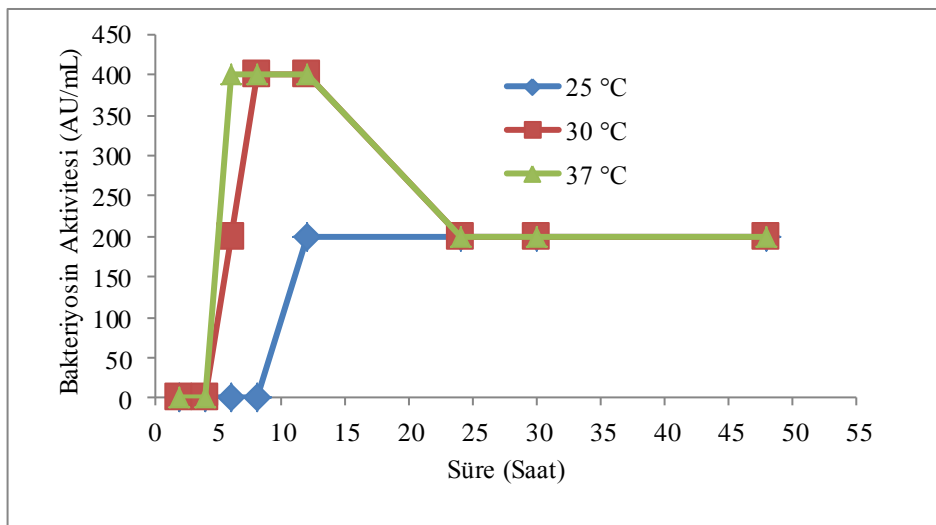
ortama salgılanan ekstrasellüler proteolitik enzimler olduğu düşünülmektedir (Yıldırım ve Johnson, 1998).



Şekil 3. *E. faecium* BP'nin 37°C'de MRS besiyerinde gelişmesi sırasında bakteriyosin üretimi

3.10 Bakterinin Farklı Gelişme Sıcaklıklarının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

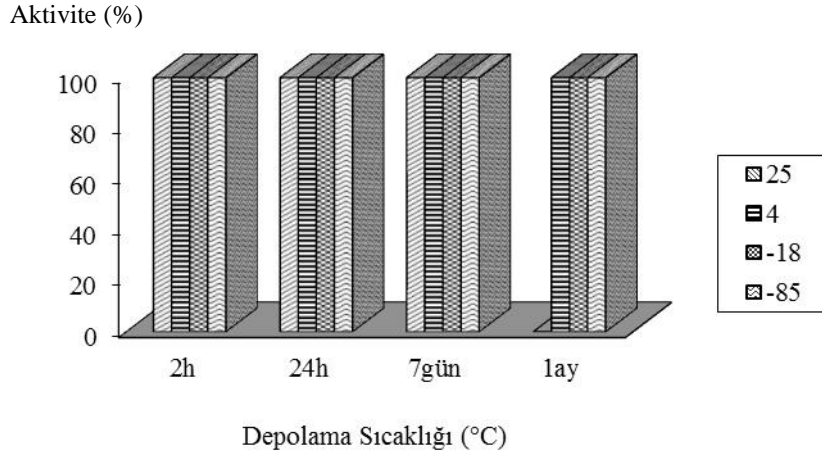
Farklı gelişme sıcaklıklarının *E. faecium* BP'nin bakteriyosin üretme yeteneği üzerine etkisini belirlemek için bakteriyosin üretici bakteri MRS besiyerine inoküle edilmiş ve 25, 30 ve 37°C'de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda Şekil 4'de görüldüğü gibi bakteriyosin üretimi ve bakteri gelişimi açısından en uygun sıcaklığın 30°C ve 37°C olduğu tespit edilmiştir. Belirtilen her iki gelişme sıcaklığında bakteriyosin üretiminin inkübasyon işleminin 6. saatinde başladığı, 8 ile 12. saatler arasında maksimum düzeyde üretildiği tespit edilmiştir. Inkübasyon işleminin uzamasıyla bakteriyosin aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Bakteriyosin aktivitesinde görülen azalmanın bakterinin ortama salgıladığı ekstrasellüler proteolitik enzimlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Bhunja ve ark., 1988).



Şekil 4. Bakteri gelişme sıcaklığının bakteriyosin üretimi üzerine etkisi

3.11 Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Koşullarının Etkisi

Bakteriyosin örneğinin farklı depolama koşullarındaki stabilite özellikleri Şekil 5'te sunulmuştur. Şekilde de görüldüğü gibi 25°C'de muhafaza edilen örneğin depolamanın 1. haftasında aktivitesinde herhangi bir kayıp olmamasına karşın, 1. ayın sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir. 4, -18 ve -85°C'de tutulan bakteriyosin örneklerinin aktivitesini depolama işleminin 1. ayın sonuna kadar tamamen muhafaza ettiği belirlenmiştir. Marekovave ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada *E. faecium* EK13'ün ürettiği bakteriyosinin 4 ve -20°C'lik depolama koşullarında stabilitesini uzun süre koruduğu saptanmıştır.



Şekil 5. Depolama koşullarının bakteriyosinin aktivitesi üzerine etkisi

4. Sonuç

Bu çalışmada Tokat yöresinde geleneksel olarak üretilen bir peynir örneğinde bakteriyosin üreten bakteri izole edilmiş, tanımlanmış ve bakteriyosini karakterize edilmiştir. Yağ asidi profili ve karbonhidrat fermantasyon profili sonucunda bakterinin *Enterococcus faecium* olduğu tespit edilmiş ve ürettiği bakteriyosin Enterosin BP olarak isimlendirilmiştir. Bakteriyosinin antimikrobiyal spektrumunun oldukça geniş olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bakteriyosinin *Campylobacter jejuni* ve *Citrobacter freundii* gibi Gram negatif bakterilere karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu da gözlenmiştir. Yüksek derecelerde uygulanan ısıl işlemin bakteriyosin aktivitesinde önemli bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. 80°C'de 15 dk ısıl işleme maruz kaldığında aktivitesini tamamen koruduğu, 80°C'de 30 dk uygulanan ısıl işlem sonucunda aktivitesinde %50, 80°C'de 60 dk ve 121°C'de 15 dk uygulanan ısıl işlem sonucunda aktivitesini %100 oranında kaybettiği saptanmıştır. Bakteriyosinin oldukça geniş bir pH aralığında (2-10) aktivitesini koruduğu ve özellikle pH 6-10 arasında stabil olduğu gözlenmiştir. Bakteriyosinin 25, 4, -18 ve -85°C gibi farklı depolama koşullarında aktivitesini koruduğu ve ayrıca formaldehit hariç diğer organik çözücülerden etil alkol, metanol, izopropil alkol, kloroform, etil eter ve heksandan etkilenmediği belirlenmiştir. Enterosinin üretici bakterinin geç logaritmik fazı ile durgun fazın başında maksimum düzeyde üretildiği saptanmıştır.

Kaynaklar

Bhunja, A., Johnson, M.C. ve Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 65:261-268.

- Cleveland, J., Montville, J.T., Nes, F.I. ve Chikidas, L.M. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Microbiol.*, 50:1-17.
- De Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T. ve Holzappel W.H. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecalis* isolated from pigfaeces. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 482-494.
- Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *J. Food Microbiol.*, 88: 215-222
- Jennes, W., Dicks, L.M.T. ve Verwoerd D.J. 2000. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Food Microbiology*, 88 (2): 349-357.
- Keizo, A., Cassens, R.G. ve Luchansky, J.B. 1993. Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 19: 123-134.
- Klaenhammer, T.R.1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology.*, 12: 39-86.
- Leroy, F., Foulquie, M.R. ve De Vuyst, L. 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 235-240.
- Losteinkit, C., Uchiyama, K., Ochi, S., Takaoka, T., Nagahisa, K. ve Shioya, S., 2001. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *J. Bioscience and Bioengineering*, 91: 390-395.
- Marekova, M., Laukova, A., Devuyst, L., Skaugen, M. ve Nes, I.F. 2003. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 523-530.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J. ve Berkley, R.W. 1972. Methods for studying bacteriocins. pp. 315-442. In 'Methods in Microbiology, J.R. Norris and N.W. Ribbons (Eds.) vol 7A.
- Messens, W. ve Vuyst, L.D. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.*, 72:31-43.
- Ogunbanwo S.T., Sanni, A.I. and Onilude A.A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African J. Biotech.*, 2 (8): 219-227.
- Pirzada, Z.A., Syed, A. A., Khan, B.M. ve Rasool, S.A. 2004. Production and physico-chemical characterization of bacteriocins-like inhibitory substances from marine bacterium ZM81. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 7 (12): 2026-2030
- Rilla, N., Martinez, B., Delgado, T. ve Rodriguez, A. 2003. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA, a nisin Z producer. *Int. J. Food Microbiol.*, 85: 23-33.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. III. Baskı, Hatiğoğlu Yayınevi, Ankara.
- Wilapuna, P., Zendo, T., Sangjindavong, B.M., Nitisinprasert, S., Leelawatcharamas, A.V., Nakayama, J. ve Sonomotob, K. 2004. The two-synergistic peptide bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 isolated from Thai fermented fish. *Science Asia*, 30: 115-122.
- Yıldırım, Z. ve Johnson, M.G. 1998. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26: 297-304.
- Yıldırım, Z., Winters, D.K. ve Johnson, M.G. 1999. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B, produced by *Bifido bacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 45-54.

- Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. 2001. Characterization of buchnericin LB produced by *Lactobacillus buchneri* LB. Tr. J. Biol., 25: 73-82.
- Yıldırım, Z., Winters, D.K. ve Johnson, M.G. 1999. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B, produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J. Appl. Microbiol., 86: 45-54.