

Streptococcus thermophilus ve Lactobacillus bulgaricus'un Tek ve Karışık Kültürlerinin Proteolitik ve Laktik Asit Üretimleri. 1. β -Disodyum Gliserofosfat'ın S. thermophilus Üzerindeki Etkisi

Yrd. Doç. Dr. Yavuz İBEYATLI

Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü — ANKARA

ÖZET

S.thermophilus ve *L.bulgaricus*'un laktik asit üretimleri ve proteolitik aktiviteleri skim-milk besiyerinde tek ve karışık kültürler halinde saptanmıştır. *S.thermophilus*, *L.bulgaricus*'a kıyasla daha az miktarda metabolik ürünler oluşturmuştur. β -disodyum gliserofosfat tek ve karışık kültür halindeki *S.thermophilus*'un proteolitik aktivitesini yükseltmiş, ancak laktoz enzimi aktivitesini etkilememiştir.

SUMMARY

Proteolytic Activity and Lactic Acid Production of single and Mixed Cultures of *L.bulgaricus* and *S.thermophilus*. 1. Effect of β -disodium glycerophosphate on *S.thermophilus*.

Proteolytic and lactic acid producing activities of single and mixed cultures of *L.bulgaricus* and *S.thermophilus* determined. *S.thermophilus* showed less metabolic activity than *L. bulgaricus*. Proteolytic activity of *S. thermophilus* was became higher by disodium glycerophosphat but lactose enzym activity wasn't effected.

GİRİŞ

Fermente süt mamüllerinde starter kültürleri tarafından oluşturulan asit ile proteolitik aktivite önemli sayılmaktadır. *S.thermophilus* ve *L.bulgaricus* yoğurt ve İsviçre peynirlerinin yapımında kullanılmaktadırlar (8, 12).

Lactobacillus'lar *Streptococcus*'larla kıyaslandığında genellikle daha fazla protease ve lactase aktivitesi göstermektedirler. *Lactobacillus* süt proteinini protease enzimi ile parçalamakta, oluşan serbest amino asitler *streptococcus*'ları stümüle ederek hızlı üremelerini sağlamaktadır. *Streptococcus*'ların üreme sonucu oluşturdukları laktik asit, ortamın pH'sını düşürerek *Lactobacillus*'ların üremesini teşvik etmektedir (2, 5).

Homofermantatif laktik *streptococcus*'lar tarafından oluşturulan laktik asit miktarı, besiyerindeki değişik serbest amino asitlerin varlığına ve besiyerinin tampon özellik göstermesine (buffer) bağlıdır (13).

Starter kültürlerinde görülen proteinase negatif veya az asit oluşturan bakterilerin metabolik aktivitelerini artırmak amacıyla bir çok mutagen maddeler ve mutasyon teknolojisi uygulanmaktadır (3, 7, 9, 10, 14). Mutajenik maddeler bakterilerin genlerinde değişimlere yol açarlar (1, 6).

Akman (1977) bakterilerin üzerinde mutajenik etkisi olan çok sayıda kimyasal maddelerin bulunduğu ve kimyasal mutajenlerin etki biçimleri farklı olduğunu göstermektedir. Bunların bir kısmı (Taban Analogları), normal tabanların yerine DNA yapısına girebilmektedirler, bazıları DNA daki tabanları değiştirirler. Bazı kimyasal mutajenler DNA dan tabanları giderirler.

MATERYAL ve YÖNTEM

Kültürler : *S.thermophilus* ve *L.bulgaricus*'un saf kültürleri A.B.D. Cornell Üniversitesinden sağlanmıştır.

Kültürler % 11 NFM (nonfat. skimmilk) besiyerinde 37°C da 3 ardışık transfer ile aktifleştirildikten sonra stok kültürler hazırlanmıştır. Stok kültürlerin hazırlanması % 15 gliserin ve % 11 NFM besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Bakteriler bu besiyerine % 10 oranında inoküle edilip -20°C de muhafaza edilmişlerdir. Denemeden önce kültürler dondurucudan çıkartılıp 30°C de 16 saat tutulmuş ve % 1 oranında % 11 NFM besiyerinde 37°C de üç ardışık transfer ile tekrar aktifleştirilmiştir.

β disodyum gliserofosfat'ın *S.thermophilus* üzerinde etkisini incelemek amacıyla, β -disodyum gliserofosfat Gp (grade 1, Sigma Chemical Co.) 1.5 gr alınarak 10 ml destile su-

da çözüldükten sonra 121°C de 15 dk sterilize yapılmıştır. Çözeltiden 0,2 ml alınarak 9,8 ml steril % 11 NFM skimmik besiyerine ilave edilmiştir (Gp nin sütteki son konsantrasyonu % 1,9) *S.thermophilus* % 1 (v/v) oranında besiyerine inoküle edilerek, üç ardışık transferi sağlanmıştır. Glycerofosfat besiyerinde aktifleştirilen *S.thermophilus* bakterisi tek % 1 ve karışık kültür olarak *L.bulgaricus* ile birlikte % 2 (1:1) oranında % 11 NFM skimmik besiyerine inoküle edilerek 43°C de değişik aralıklarla inkübe edilmiştir. Bu sürelerin bitiminde, kültürlerin oluşturdukları toplam asitlik, saf laktik asit ve proteolitik aktivite bulunmuştur.

Toplam asitlik fenolftalein indikatörü kullanılarak 0,1 N NaOH ile titre yapılarak bulunmuştur. Saf laktik asit, Steinholt ve Galbert (1960) metoduna göre ve proteolitik aktivite ise Miathy ve Koskikowski (1983)'e göre hesaplanmıştır.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma :

L.bulgaricus ve *S.thermophilus* kültürleri ile oluşturulan toplam asitlik ve laktik asit miktarları Çizelge 1'de gösterilmiştir.

L.bulgaricus bakterisi *S.thermophilus*'a kıyasla daha yüksek düzeyde asit üretmiştir. 24 saatlik inkübasyonun bitiminden sonra oluşturulan yüzde asitlik *L.bulgaricus* kültüründe 2,67, *S.thermophilus* kültüründe ise 0,97 bulunmuştur.

İki kültür karışık olarak kullanıldığında ve 4 saat inkübasyon sonunda ölçülen laktik asit miktarı tek kültürlerden daha fazla bulunmuştur ve bu durumun bu iki bakteri arasındaki stümulasyonu göstermektedir.

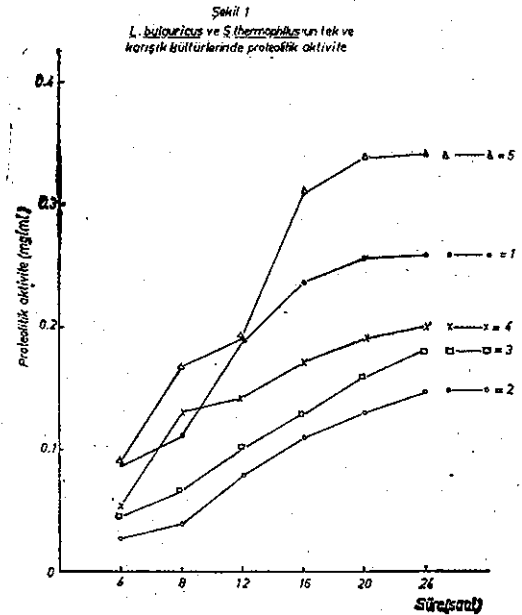
β -disodyum gliserofosfat'ın *S.thermophilus* bakterisi üzerindeki asit artırıcı etkisi görülmemiştir (Çizelge 1). Ancak bu maddenin *S.lactis* ve *S.cremoris* bakterilerinin asit oluşturma yeteneklerini artırıcı olduğu Terzaghi ve Sandine (1975) tarafından belirtilmiştir.

L.bulgaricus tarafından oluşturulan proteolitik aktivite miktarı, *S.thermophilus*'a kıyasla daha fazla bulunmuştur. *L.bulgaricus* ekso ve endo proteolitik enzimleri ile süt proteini daha fazla parçalama yeteneğine sahiptir (3, 4). Laktik starter, kültürlerinde protease enzimi-

nin plazmid DNA ya bağlı olduğu pekçok araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

β -disodyum gliserofosfat'ın *S.thermophilus*'un proteolitik aktivitesini belirgin bir şekilde artırdığı bulunmuştur (Çizelge 2, Şekil 1). Gp skimmik besiyerinde aktifleştirilen *S.thermophilus* kültürü 24 saat inkübasyon bitiminden sonra 0,18 mg tirozin/ml proteolitik aktivite göstermiştir. Buna karşın aynı kültür normal Gp sız sütlü besiyerinde 0,15 mg tirozin/ml proteolitik aktivite göstermiştir. Karışık kültürde de proteolitik aktivite farklı ölçülmüştür. Gp'li sütte aktifleştirilen *S.thermophilus* ve *L.bulgaricus* karışık olarak kullanıldığında ölçülen proteolitik aktivite miktarı 24 saat inkübasyon bitiminde 0,34 mg tirozin/ml bulunmuştur. Oysa Gp'de aktifleştirilmeyen *S.thermophilus* ile *L.bulgaricus*'un karışık kültürü aynı süre sonunda 0,20 mg tirozin/ml proteolitik aktivite göstermiştir.

Sonuç olarak Gp'in *S.thermophilus*'un proteolitik aktivitesini yükselttiği ve bu etkinin plazmid DNA üzerinde olduğu söylenebilir. Çünkü laktik asit bakterilerinde laktoz ve sitrat metabolizmaları ile proteaz enzimi üretiminin plazmid DNA üzerinde olduğu kanıtlanmıştır (17).



- 1- *L. bulgaricus*
2- *S. thermophilus* x
3- *S. thermophilus* xx
4- *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* x
5- *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* xx
x- *S. thermophilus* sızın milü de aktifleştirilmiştir.
xx- *S. thermophilus* Gp'lik de aktifleştirilmiştir.

Çizelge 1. Tek ve Karışık Kültürler Tarafından Oluşturulan Toplam Asitlik ile Saf Laktik Asit Miktarları.

	4 Saat		8 Saat		12 Saat		16 Saat		20 Saat		24 Saat	
	%	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml
L.bulgaricus	0,45	4,20	1,44	13,50	1,70	16,3	2,34	22,60	2,67	25,80	2,67	26,00
S.thermophilus	0,56	4,30	1,70	6,30	0,80	7,40	0,83	7,70	0,97	8,85	0,97	8,90
S.thermophilus*	0,52	4,20	0,68	6,30	0,77	6,62	0,81	7,53	0,99	8,90	0,97	8,90
L.bulgaricus + S.ther.	0,77	6,80	1,10	10,48	1,46	13,00	2,05	18,41	2,08	19,00	2,10	19,20
L.bulgaricus + S.ther.*	0,66	5,90	1,01	9,31	1,29	11,89	2,00	18,00	2,06	18,91	2,14	19,41

* Kültür Glikserofosfat içeren sıvımlık'te aktifleştirildikten sonra tekrar Cp içermeyen skimmlik'e inoküle edilmiştir.

Çizelge 2. Tek ve Karışık Kültürlerin Proteolitik Aktiviteleri.

Kültürler	4 Saat	8 Saat	12 Saat	16 Saat	20 Saat	24 Saat
L.bulgaricus	0,09	0,12	0,19	0,24	0,26	0,26
S.thermophilus	0,03	0,04	0,08	0,11	0,13	0,15
S.thermophilus*	0,05	0,07	0,10	0,13	0,16	0,18
L.bulgaricus + S.thermophilus	0,06	0,13	0,14	0,17	0,19	0,20
L.bulgaricus + S.thermophilus*	0,08	0,17	0,12	0,31	0,34	0,34

* Kültürler Gp skimmilk'de aktifleştirilip ve Gp içermeyen skimmilk besiyerine inoküle edilmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Akman, M., 1977. Bakteri Genetiği Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, No: 1, Sivas.
- Akuzawa, R., O. Ito, K. Yokoyama, 1984. Two types of interaccellar proteinase from dairy Lactic acid bacteria Dairy Sci Abs, 46 (8).
- Chuang, L.F., F.B. Collins, 1971. Isolation of nitroguanidine induced mutants of Streptococcus diacetilactis with enhanced ability to produce acetoin and diacetyl. J Dairy Sci 54: 282.
- Ezzat, N., M. Elsofa, C. Bouillanno, C. Zevaco, P. Blanchard, 1985. Cell wall associated proteinases in Lactobacillus helveticus, Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus Lactis Dairy Sci Abs, 77 (11).
- Hegazi, F.Z., 1987. Proteolytic activity of Lactic acid bacteria in skimmilk with special references the biodegradation of Casein fraction. Dairy Sci Abs, 49 (10).
- Hollaender, A., 1982. Genetic Engineering of Microorganisms for chemical. Plenum Press-New York, London.
- Khanna, S., A. Kaul, R.K. Kulla, J. Singh, 1982. Studies on the utilization of mutants of Streptococcus Lactis subspecies diacetilactis for preparation of fermented milk products «Chakka». Cultured Dairy Products J 17 (4), 24 - 25.
- Kosikowski, F.V. 1974. Cheese and Fermented Milk Foods - Edwards Brothers Inc., Ann Arbor, Michigan, U.S.A.
- Kulla, R.K., B. Ranganathan, S.M. Dutta, H. Laxminarayana, 1971. Induction of mutation in Streptococcus diacetilactis by nitrosoquinidine and ultraviolet irradiation. J Dairy Sci 54: 331.
- Kulla, R.K., B. Ranganathan, 1978. Ultraviolet light - Induced mutants of Streptococcus Lactis subspecies diacetilactis with enhanced acid or flavor producing ability. J. Dairy Sci 61: 379 - 383.
- Mistry, V.V., F.V. Kosikowski, 1983. Application of dialysis to measure proteases activity in milk. J Dairy Sci 66: 687 - 693.
- Sandine, E.W. 1979. Lactic Starter Culture Technology. Pfizer Inc. New York, U.S.A.
- Shankar, P.A., F.L. Davies, 1977. A note on the suppression of Lactobacillus bulgaricus in media containing β -glycerophosphate and application of such media to selective isolation of streptococcus thermophilus from yoghurt. J Soc Dairy Tech 30: 28.
- Sicard, N. 1982. Lack of UV - induced mutation in several streptococci. Microbiology 1982. American Society for Microbiology. Washington D.C., U.S.A.
- Steinholt, K., H.E. Calbert. 1960. A rapid colorimetric method for the determination of Lactic acid in milk and milk products. Milchwissenschaft, 15: 7 - 11.
- Terzaghi, B.E., W.E. Sandine. 1975. Improved medium for Lactic Streptococci and their bacteriophages. Applied Microbiology, 29 (6), 807 - 813.
- Thompson, J.K., M.A. Collins, 1989. A comparison of the plasmid profiles of strains of Lactic Streptococci isolated from a commercial mixed strain starter culture with those from fermented milk. Milchwissenschaft, 44 (2), 65 - 69.