

Yoğurt Yapımında Yararlanılan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*'un Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma

Dr. Sevda KILIÇ

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü — İZMİR

ÖZET

Yoğurt bakterilerinin süte aşılandıktan sonra enzimatik etkinlikleri sonucu proteinleri parçalamaları olayına proteoliz adı verilir. Bu olay sırasında ortamda gerekli gelişme faktörleri meydana geldiğinden *S. thermophilus*'un gelişmesi ve çoğalması hızlandırılmış olur. Simbiyotik faaliyet gösteren bu bakteriler için gerekli ve yararlı olan proteoliz olayının yoğurt yapımında ancak belirli bir düzeyde meydana gelmesi istenir. ASPERGER, tirozin aminoasiti ile aroma oluşumu arasında bir ilişkinin olduğunu, tirozin içeriğinin 0,05-0,1 mg/ml olması durumunda yoğurtların istenen aromaya sahip olabileceğini bildirmiştir. 0,125 mg/ml tirozin içeren yoğurt örneklerinde ise hafif acı tat oluştuğu bildirilmiştir. Bundan hareketle yoğurt bakterileri olan *L. bulgaricus* ile *S. thermophilus*'a ait suşların proteolitik aktiviteleri HULL yöntemine göre tirozin ekvalantı üzerinden belirlenmeye çalışılmıştır.

Araştırmada genellikle yüksek asitlik oluşturabilen *L. bulgaricus* suşlarının daha fazla proteolitik aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Ancak bütün bakteri suşları için bu durumun geçerli olmadığı da belirlenmiştir. 20 *L. bulgaricus* suşuna ait değerlerin 0,105-0,215 mg tirozin/ml sınırları arasında değiştiği gözlenmiştir. *S. thermophilus*'un denemeye alınan 20 suşu için saptanan değerler de 0,080-0,070 mg tirozin/ml arasında belirlenmiş olup değerlerin *L. bulgaricus*'a ait değerlerden çok düşük olduğu anlaşılmıştır.

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen über die Einflüsse der bei der Joghurt-Herstellung verwendeten *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* auf die proteolitische Aktivitäten.

Nach der Impfung von Joghurt-Bakterien werden die Milchproteine durch die enzymatische Aktivitäten der Mikroorganismen zer-

setzt. Diese enzymatische Wirkung wird als Proteolyse genannt. Unter der bestimmten Bedingungen bei der Proteolyse wachsen und vermehren sich *S. thermophilus* im Medium ganz schnell. Nun es wird gewünscht, diese Serzetzungen bis eine bestimmte Grenze zu erweitern. Nach ASPERGER gibt es eine Beziehung zwischen Tyrosin Aminosäure und Aromabildung im Joghurt. Danach ist das gewünscht Aroma bei Joghurt verwirklicht, wenn der Tyrosingehalt zwischen 0,05-0,1 mg/ml ist. Es ist nach der bisherigen Untersuchungen deutlich beschrieben, dass das Aroma ganz leicht bitterlich ist, wenn der Tyrosingehalt 0,125 mg/ml ist. Aus diesem Grund wurde die proteolitische Enzymaktivitäten von *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* nach der HULL-Methode d.h. nach dem Tyrosingehalt oder Equivalentwert bestimmt.

In diesem Versuch wurde allgemein festgestellt, dass die *L. bulgaricus* noch mehr proteolitische Enzymaktivität als andere Mikroorganismenarten hat. Nun ist es klar beobachtet, dass jede *L. bulgaricus*-Arten keine solche Wirkungen gezeigt. Von denen 20 *L. bulgaricus*-Arten hatten einen Tyrosingehalt 0,105-0,215 mg/ml. Dagegen wurde festgestellt, der Tyrosingehalt für 20 *S. thermophilus* Arten zwischen 0,080-0,070 mg/ml und viel weniger als *L. bulgaricus* ist.

1. GİRİŞ

Yoğurt yapımı sırasında, süten yoğurt kültürüyle aşılması sonrası öncelikle *S. thermophilus* gelişir ve ortam pH'sını 5,5'e kadar düşürür. Daha sonra koşullar uygun olduğunda *L. bulgaricus* hızla çoğalarak süt proteinlerinden kazeini, salgıladığı proteolitik enzimlerin etkisi ile parçalayarak dipeptit, peptit ve amino asitlerin açığa çıkmasını sağlar. Bu olay sırasında *S. thermophilus* için gerekli gelişme faktörleri ortamı da temin edildiğinden gelişme ve çoğalması hızlandırılmış olur. KURMANN

(1967), SHANKAR ve DAVIS (1977, 1978), SHARPE (1979) Böylelikle yoğurta arzulan seviyede asitlik, tat ve aroma oluşumu sağlanmış olur. Yapılan çalışmalar her iki tür bakteri arasındaki karşılıklı etkileşim ve yardımlaşmanın bunlar arasındaki simbiyotik yaşamdan kaynaklandığını ortaya koymuştur. ACCOLAS ve ark. (1977), DESMAZEAUD ve ark. (1978), GILLILAND (1986), MOON ve REINBOLD (1976). Nitekim SHANKAR ve DAVIES (1977), MOON ve REINBOLD (1976), MOCOLOT ve HUREL (1970), ACCOLAS ve ark. (1977) proteolitik aktivitesi yüksek olan *L. bulgaricus*'un kazeinden valinin yanısıra glisin, lösin, izolösin, histidin, sistin, trosin, metionin, glutamik asit, aspartik asit gibi önemli amino asitlerin ortaya çıkmasının *S. thermophilus*'un iyi gelişmesini sağladığını belirtmişlerdir.

Bu bilgilerden de anlaşılacağı gibi proteolitik aktivite Lak. ve Str. türü bakterilerin etkinlikleri sonucu bir taraftan proteonun amino asitlere kadar parçalanmasını diğer taraftan da ortamda birlikte oldukları mikroorganizmaların gelişme ve çoğalmalarını teşvik etmektedirler. GILLILAND (1986), MOON ve REINBOLD (1976), SHANKAR ve DAVIES (1977). Bu da ancak proteoliz olayıyla gerçekleşmektedir. İşte bakterilerin enzimatik etkinlikleri sonucu proteinlerin bir dizi ara kademelerden sonra amino asitlere kadar parçalanması durumuna Proteoliz adı verilir DEETH ve TAMİME (1981).

Bakterilerin yaşamlarını sürdürmeleri için gerekli olan proteoliz olayının yoğurt yapımında ancak belirli düzeyde meydana gelmesi istenir. Çünkü kaliteli yoğurt elde etmede bu durumun önemi fazladır. Nitekim KURMANN (1967) yoğurttaki kuvvetli bir proteoliz istenmediğini fakat *S. thermophilus* üzerinde uyarıcı bir etki yaratan amino asitleri özellikle valini açığa çıkaracak düzeyde bir proteolizin gerekli olduğuna dikkatini çekmiştir.

Araştırmada bu yüzden her iki tür bakterinin proteolitik aktivitesini belirlemek ve yoğurt yapımına en uygun olanları seçmek amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Proteoliz olayı yoğurt oluşumu sırasında belirli seviyede meydana geldiğinde ve yoğurdun yapı ve kıvamının düzeldiği, asit üretiminin, *S. thermophilus*'un gelişimi teşvik edildiği için arttığı, sindirilebilme özelliğinin önemli derecede çoğaldığı bildirilmiştir. (DEETH ve TAMİME (1981) Aşırı proteoliz durumunda ise yapının yumuşadığı, kıvamın çabuk bozulduğu, acı tadın oluştuğu belirlenmiştir. RENZ ve PUHAN (1975) yoğurttaki bu acılığın *L. bulgaricus*'un proteolitik aktivitesi sonucu meydana geldiğini ortaya koymuşlardır. Bundan dolayı ASPERGER (1973), GROUX (1973) yoğurt kültürünün elde edilmesi sırasında düşük proteolitik aktivite gösteren *L. bulgaricus* suşlarının seçilmesi gerektiğini vurgulamışlar. *S. thermophilus*'un aktivitesinin daha düşük olduğunu saptamışlardır. KHANA ve SING (1978) *L. bulgaricus*'un tek başına faaliyeti sonucu, ortamda daha fazla amino asit meydana geldiği halde her iki bakterinin birlikte aşılması sonucu bu miktarın daha düşük düzeyde kaldığını saptamışlardır. Bu duruma *S. thermophilus*'un ortamdaki, bu amino asitlerin bir kısmı kullanmış olabileceği neden olarak gösterilmiştir.

MILLER ve KANDLER (1967), RASIC ve KURMANN (1978) proteoliz olayının bakteri türü ve suşuna göre değiştiğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar bu yüzden orta derecede proteolitik aktif suş veya bakterilerin seçiminin, laktik asit ve aminoasit üretimi ile aroma oluşumunu etkileme yönünden önemli olduğunu açıklamışlardır.

ASPERGER (1973) trosin aminoasiti ile aroma oluşumu arasında bir ilişkinin olduğunu, trosin içeriğinin 0,05 mg/ml — 0,100 mg/ml olması durumunda yoğurtlara aroma yönünden tam puan verildiğini bildirmiştir. Yoğurt örneklerinde 0,125 mg/ml ve yukarı değerlerde trosin aminoasidi belirlenmesi durumunda acı tadın oluşmaya başladığı belirtilmiştir. Bu noktadan hareket ederek bakteri tür ve suşları ile yoğurtlardaki proteolitik aktivite seviyesinin HULL yöntemine göre, trosin ekivalenti üzerinden saptanması önerilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

L. bulgaricus ve *S. thermophilus*'a ait 20'şer suş, İzmir ve çevresi illerden temin edilen yoğurtlardan izole edilen ve tanımı yapılan suşlar arasından seçilmiştir.

3.2. YÖNTEM

HULL yönteminden yararlanılmıştır HADİ, (1982).

3.2.1. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Bunun için % 10 yağsız süt tozundan hazırlanan sütler tüplere 5'er ml konulmuş, otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonra % 1 oranında her bir bakteri kültürüyle aşılanmış, uygun inkübasyon sıcaklıklarında 36 saat bırakılmışlardır. Sürenin sonunda tüpler hemen buzdolabına alınmıştır.

3.2.2. Proteolitik Aktivite Belirlenmesi

3.2.2.1. Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

a) Triklor Asetik Asit (TCA) = 0,72 (N) normalitede hazırlanmıştır.

b) Na_2CO_3 , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ çözeltisi = 75 gr Na_2CO_3 , 10 gr $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ tartılmış, saf suyla 500 ml'ye tamamlanmıştır.

c) Fenol ayıracı = 1 kısım fenolciocalteau (BDH) 2 kısım saf su ile karıştırılmıştır. Çözelti kullanılmadan hemen önce hazırlanmıştır.

3.2.2.2. Trosin Standart Çözeltisinin Hazırlanması

100 mg trosin, distile suyla 100 ml'ye tamamlanmış, daha sonra 0,02 - 1,0 mg/ml sınırları arasında çözeltiler hazırlanarak ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar, en küçük kareler yöntemiyle göre elde edilen standart eğriden yararlanarak trosin ekivalenti olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.3. Deneyin Uygulanışı

Bakteri kültürlerinin bulunduğu tüplere 1'er ml saf su, 10'ar ml 0,72 NTCA konmuş, ağızları lastik tıpa ile kapatılarak iyice karıştırılmıştır. 10 dakika dinlendirilen karışım SS 595 no'lu filtre kağıdından süzülmüştür. 50 ml'lik erlenmayerlere 5'er ml süzüntülerden konulmuş, üzerine 10'ar ml Na_2CO_3 - $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ çözeltisi

tisi eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra 3'er ml fenol ayıracı eklenen çözeltiler 4500 devir/dakika'da 20 dakika santrifüj edilmişlerdir. Tüplerin üst kısımlarındaki berrak sıvı özel küvetlere alınarak optik yoğunlukları ölçülmüştür. Bu amaçla 650 nm dalga boyunda ve 1 cm ışık yolu ile olan küvetlerde ölçümler yapılmıştır. Bunun için spektro kolorimetre kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

L. bulgaricus ve *S. thermophilus* suşlarının proteolitik aktiviteleri ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar çizelgede toplu olarak verilmiştir. Genelinde yüksek asitlik oluşturabilen *L. bulgaricus* suşlarının yüksek proteolitik aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Ancak bütün bakteri suşları için bu durum geçerli değildir. Ortalama olarak 0,158 mg trosin/ml olan proteolitik aktivite değerlerinin 0,105-0,215 mg trosin/ml sınırları arasında değiştiği gözlenmiştir.

S. thermophilus suşlarına ait proteolitik aktivite değerleri de aynı çizelgeden inceleneceği üzere 0,008 - 0,070 mg trosin/ml arasında değişmiştir. Bütün suşların proteolitik aktivite değerlerinin ortalaması 0,043 mg trosin/ml olarak hesaplanmıştır. Yine aynı çizelge izleneceği üzere *S. thermophilus* suşlarına ait proteolitik aktivite *L. bulgaricus*'a ait değerlerden oldukça düşük düzeyde saptanmıştır (Çizelge 1).

5. TARTIŞMA

Araştırmada 20 *L. bulgaricus* suşunun proteolitik aktiviteleri sütte 36 saat inkübasyon sonunda 0,105-0,215 mg trosin/ml sınırları arasında saptanmıştır.

HADİ (1982) izole edilerek tanımını yaptığı 18 adet *L. bulgaricus* suşuna ait proteolitik aktivite değerlerinin 0,13 - 0,79 mg trosin/ml 5 ml ortalama 0,51 mg trosin/ml 5 ml olarak tesbit etmiştir. Araştırmacı Laktobasillerin daha yüksek aktivite gösterdiklerini ve daha yüksek düzeyde laktik asit oluşturduklarını belirlemiştir. GARINI ve ark. (1970), MAKSIMOVA (1969), RASIC ve ark. (1971) laktik asit bakterilerinin hemen hepsinin kazeinolitik enzim sistemine sahip olduklarını, bunların laktobasillerin daha yüksek proteolitik aktivite göster-

diklerini bildirmişlerdir. Araştırma bulguları bunu doğrulamakla birlikte HADI'nin sonuçlarına kıyasla daha yüksek düzeyde elde edilmiştir.

S. thermophilus suşlarına ait değerler de 0,008 - 0,070 mg trosin/ml arasında ortalama 0,043 mg trosin/ml olarak hesaplanmıştır. HADI ise 19 **S. thermophilus** suşunun proteolitik aktivite değerlerinin 0,02 - 0,1 mg/5 ml arasında değiştiğini bildirmiş olup genel olarak değerlerin birbirine yakın ve uyum içinde oldukları görülmüştür. SHCHEDU SHNOV ve ark. (1973) **L. bulgaricus**'un proteolitik aktivitesinin **S. thermophilus**'unkinden yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ancak sayısal bir değer belirtmediklerinden bulgularıyla karşılaştırmak mümkün olmamıştır.

Araştırmada her iki türe ait saptanan proteolitik aktivite değerleri arasında RASIC ve KURMANN (1978) HADI'nin (1982) belirttikleri gibi oldukça önemli farklılıklar vardır. Bu farklılıklar suşlar arasında daha az tesbit edilmiştir. Ancak proteolitik aktivite ile asitlik oluşumu arasında kesin bir ilişki bulunamamıştır. Örneğin 24 saat sonunda 115,1 SH oluşturan 13 nolu **L. bulgaricus** suşu 0,175 mg trosin/ml düzeyde proteolitik aktivite oluştururken 4 nolu suş aynı süre sonunda 51,0 SH asitlik oluşturmuş, proteolitik aktivite de 0,215 mg trosin/ml gibi değerler suşlar arasında en yüksek aktiviteyi oluşturmuştur.

SONUÇ

Yoğurt yapımında, kültürü oluşturan mikroorganizmaların acılık oluşturmayaacak düzeyde proteolitik aktif olmalarının gerekli olduğu ortaya konmuştur. Bununla birlikte proteolitik aktivitesi yüksek **L. bulgaricus**'un, yoğurt yapımı sırasında serbest hale geçen aminoasitler ile **S. thermophilus**'un, gelişimini stimule ettiği bilindiğine göre proteolitik aktivitesi yüksek olan türü birlikte kullanarak **S. thermophilus**'un gelişimi teşvik edilmiş olur. Böylelikle daha yüksek aroma ve tatta, iyi kaliteli yoğurt elde edilebilir. **L. bulgaricus**'un enzimatik etkinliği sonucu ortaya çıkan amino asitlerin bir kısmı **S. thermophilus** tarafından kullanıldığından yoğurtta acılık tat algılanmayabilir.

Çizelge 1. L. bulgaricus ve S. thermophilus suşlarına ait tesbit edilen proteolitik aktivite değerleri (mg trosin/ml).

Kültür No.	L. bulgaricus	S. thermophilus
1	0,115	0,030
2	0,165	0,033
3	0,200	0,008
4	0,215	0,028
5	0,145	0,020
6	0,170	0,045
7	0,130	0,028
8	0,105	0,044
9	0,120	0,045
10	0,135	0,070
11	0,200	0,030
12	0,175	0,070
13	0,125	0,045
14	0,190	0,057
15	0,188	0,040
16	0,172	0,036
17	0,120	0,058
18	0,120	0,063
19	0,180	0,027
20	0,190	0,038
Ort.	0,158 ± 0,034	0,043 ± 0,018
En düşük	0,105	0,008
En yüksek	0,215	0,070

KAYNAKLAR

- ACCOLAS, J.D., P. BLOQJEL, R. DIDIENNE, J. REGNIER, 1970. Propriétés Addisantes des Bacteries Lactiques Thermophilus en relation avec la fabrication du YOGHURT. *Le Lait* (561 - 562) 1 - 23.
- ASPERGER, H. 1973. Applicability of Analytical Methods for the Assessment of Yoghurt Quality. *Österreichische Milchwirtschaft* 28 (7) 125 - 129.
- CARINI, S., P. RESMINI, M. BOZZOLATI. 1970. Casein Proteolysis by Streptococci and Lactic Bacteria Dairy. *Sci. Abstr.* 32 (10) 4284.
- DEET, H.C., A.Y. TAMIME, 1981. Yoghurt; Nutritive and Therapeutic Aspects, *J. Food Protection* 44 (1) 78 - 86.
- DESMAZEAUD, M.J., M. HERMIER. 1972. Isolement et Détermination de la Composition Qualitative de Peptides Issus de la Caseine, Stimulant la Croissance de *Str. thermophilus* *European J. Biochemistry* (28) 190 - 198.
- DESMAZEAUD, M.J. 1978. Characterisation of Intracellular Proteolytic Activities in Thermophilus and Mesophilic Streptococci, XX. *Int. Dairy Congress Vol: E* 469.
- GILLILAND, S.E. 1986. *Bacterial Cultures for Foods* 204 CRS Pres, Inc. Boca Raton Florida, Second Printing.
- GROUX, M. 1973. Critical Observation of Yoghurt Manufacture with Reference to Protein Breakdown *Dairy Sci. Abst.* 35 (4) 1474.
- HADI, A.Y. 1982. Yoğurtlardan İzole Edilen Kimi Bakterilerin Starter Olarak Seçilme Olanakları. *Doktora Tezi, Ankara Üni. Z.F. Ankara* 102.
- KHANA, A., J. SING. 1978. Comparison of Yoghurt Starters in Cows and Buffalo Milk. *J. Dairy Res.* 46: 681 - 686.
- KURMANN, J.A. 1967. Etudes Biotechnique sur la Fabrication de Yoghurt Doux et Aromatique *Le laitier Romand*, 523 - 525, 599 - 600, 621 - 623.
- MAKSIMOVA, A.K. 1969. Intensified Production of Cultured Milk Products. *Dairy Sci. Abstr.* (24) 1 429.
- MILLER, I., O. KANDLER. Eiweissabbau and Anreicherung freier Aminosäuren durch Milchsäure Bacterien in Milch. *Milchwissensch.* 22 (3) 150 - 159.
- MOCQUOT, G., C. HUREL, 1970. The Selection and Use of Some Microorganisms for the Manufacture of Fermented and Milk Products. *J. Soc. Dairy. Technol.* 23 (3), 130 - 146.
- MOON, N.J., G.W. REINBOLD, 1976. Commensalism and Competition in Mixed Cultured of *Lb. bulgaricus* and *str. thermophilus* *J. Milk Food Technol.* 39 (5) 337 - 341.
- RASIC, J., T. STOJSAULJEVIC, R. CURCIC, 1971. A Study on the Amino Acid of Yoghurt. *Milchwissensch.* 26 (4) 219 - 224.
- RASIC, J., J.A. KURMANN, 1978. Yoghurt; Scientific Grounds Technology, Manufacture and Preparation Vol. 1 Dairy Publishing House, Copenhagen, 466 sayfa.
- RENZ, U., Z. PUHAN, 1975. Beitrag zur Kenntnis von Faktoren die Bitterkeit in Yoghurt begünstigen *Milchwissenschaft* 30 (5) 265 - 270.
- SCEEDUSHNOW, E. U., P. F. DYACHENKO, 1973. Proteolytic Activity of Thermophilus Lactic Acid Bacteria Used in Hard Cheese Manufacture. *Dairy Sci. Abstr.* 35 (4) 1363.
- SHANKAR, P.A., F.L. DAVIES, 1977. Associative Bacterial Growth in Yoghurt Starters, Initial Observations on Stimulatory Factors. *J. Soc. Dairy Technol.* 30 (1) 31 - 32.
- SHANKAR, P.A., F.L. DAVIES, 1978. Proteinase and Peptidase Activities of Yoghurt Starter Bacteria. *XXI. Int. Dairy Congress Vol E*, 467 - 468.
- SHARPE, M.E. 1979. Lactic Acid Bacteria in the Dairy Industry. *J. Soc. Dairy Technol.* 32 (1) 9 - 18.