



Laktokoksin BZ ve Enterosin KP'nin Yoğurt Kültürlerinin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Nilgün Öncül^{1*}, Zeliha Yıldırım², Metin Yıldırım²

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 51240 Tokat, Türkiye

²Niğde Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 60250 Niğde, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Geliş 18 Kasım 2014
Kabul 26 Ocak 2015
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

Anahtar Kelimeler:

Laktokoksin BZ
Enterosin KP
Yoğurt kültürü
Bakteriyosin
Inhibitor etki

ÖZET

Bu çalışmada, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ ve *Enterococcus faecalis* KP'den elde edilen laktokoksin BZ ve enterosin KP (1600 AU/mL) bakteriyosinlerinin üç farklı yoğurt kültürlerine (Y1, Y2: CHR Hansen, Danimarka, Y3: Sacco, İtalya) karşı inhibitör etkileri belirlenmiştir. İnkübasyon süresince (42°C'de 24 saat) belirli aralıklarla alınan örneklerde laktik asit bakteri sayısı ve pH değerleri incelenmiştir. Laktokoksin BZ'nin test edilen 3 yoğurt kültüründen sadece birine, enterosin KP'nin ise iki yoğurt kültürüne karşı bakterisidal etkiye sahip olduğu görülmüştür. Laktokoksin BZ ve enterosin KP 1:1 oranında karışım halinde kullanıldığında da iki yoğurt kültürüne karşı bakterisidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

* Sorumlu Yazar:

E-mail: nilgunoncul@gop.edu.tr

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 3(5): 342-345, 2015

Effect of Lactococcin BZ and Enterocin KP on the Activity of Yoghurt Cultures

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2014

Accepted 26 January 2015

Available online, ISSN: 2148-127X

Keywords:

Lactococcin BZ
Enterocin KP
Yoghurt cultures
Bacteriocin
Inhibitory effect

ABSTRACT

In this study, the effects of lactococcin BZ from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BZ and enterocin KP from *Enterococcus faecalis* KP (1600 AU/mL) on the activities of three different yoghurt cultures (Y1 and Y2: CHR Hansen, Denmark; Y3: Sacco, Italy) were investigated. Lactic acid bacteria counts and pH values of the samples were determined during the incubation period (at 42°C for 24 h). It was found that lactococcin BZ had bactericidal effect against only one yoghurt culture whereas enterocin KP was effective against two yoghurt cultures. When lactococcin BZ and enterocin KP were used in combination (1:1), they showed bactericidal effect against two yoghurt cultures.

* Corresponding Author:

E-mail: nilgunoncul@gop.edu.tr

Giriş

Günümüzde hem gıda endüstrisinin hem de tüketicilerin biyokoruma yöntemlerine karşı ilgisi her geçen gün artmaktadır. Bu anlamda antagonistik aktiviteye sahip laktik asit bakterileri veya bunların ürettiği bakteriyosinler güvenli katkı olarak değerlendirilmektedir. Bakteriyosinler bakteriler tarafından ribosomal olarak üretilen antimikrobiyal aktiviteye sahip peptitler olarak tanımlanmaktadır. Bakteriyosinler korunacak gıdanın fizikokimyasal özelliklerinde değişime neden olmaksızın patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişmelerini kontrol altında tutabildikleri gibi protein yapısında oldukları için insan ve hayvanların bağırsak sisteminde parçalandıklarından insan sağlığı açısından güvenli bileşiklerdir.

Günümüzde fermente süt ürünlerinde kullanılan birçok bakteriyosinjenik laktik asit bakterileri hem koruyucu hem starter hem de probiyotik özellik gösterdiğinden süt endüstrisinde starter, yardımcı, probiyotik veya koruyucu kültür olarak veya ürettikleri antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolitleri saflaştırıldıktan sonra antimikrobiyal bir katkı maddesi olarak kullanılabilir (O'Sullivan ve ark., 2002; Papagianni, 2003; Cintas ve ark., 2001).

Daha önce köy peynirinden izole edilen *Enterococcus faecalis* KP ve bozadan izole edilen *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ'nin bakteriyosin üreticileri oldukları tespit edilmiş ve bakteriyosinleri karakterize edilmiştir. *Enterococcus faecalis* KP tarafından üretilen enterosin KP'nin bazı gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni Gram-pozitif bakterilere (*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*) karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (İsleroğlu ve ark., 2012). *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ tarafından sentezlenen laktokoksin BZ'nin ise bazı gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni hem Gram-pozitif (*L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *L. plantarum*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Leu. mesenteroides*, *L. cremoris*) hem de Gram-negatif bakterilere (*E. coli*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella* Enteritidis, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Citrobacter freundii*) karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Şahingil ve ark., 2011). Enterosin KP ve özellikle de laktokoksin BZ tek başlarına besiyerlerinde oldukça geniş antimikrobiyal spektruma sahiptir. Ancak, söz konusu bakteriyosinlerin gıda sisteminde yoğurt üretiminde kullanılan starter kültürler üzerine inhibitör etkisi bilinmemektedir. Dolayısıyla bu çalışma, enterosin KP ve laktokoksin BZ'nin yoğurt starter kültürlerine karşı inhibitör etkilerini ortaya koymak ve böylece bu iki bakteriyosinin biyokoruyucu olarak yoğurt endüstrisinde kullanım olanaklarını ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Süt örnekleri ve ticari starter kültürler: Bu çalışmada kullanılan tam yağlı (%3) UHT sütler marketten, ticari yoğurt kültürleri olan YC-350, YC-X11 (CHR Hansen, Danimarka) ve Y-080 F (Sacco, İtalya) ise Dimes (Tokat)

ve Bakraç (Amasya) süt işletmelerinden temin edilmiştir. Yoğurt starter kültürleri, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* suşlarını içermektedir.

Mikroorganizmalar ve besiyerleri: Enterosin KP üreticisi *Enterococcus faecalis* KP ve laktokoksin BZ üreticisi *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ'yi geliştirmek ve bakteriyosin üretmek için de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Fluka, Almanya) besiyeri kullanılmıştır. Bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesinde indikatör bakteri olarak enterosin KP ve laktokoksin BZ'ye karşı en duyarlı bakteri olan *Lactobacillus plantarum* kullanılmıştır. Bakteriler -80°C'de %20 gliserol içeren MRS besiyerlerinde muhafaza edilmiştir.

Yöntem

Bakteriyosinlerin Hazırlanması: MRS besiyerinde iki kez aktifleştirilen *E. faecalis* KP ve *L. lactis* spp. *lactis* BZ %1 oranında MRS besiyerine inoküle edilip sırasıyla 30°C ve 25°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra bakteri kültürü 7000 x g'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek sıvı faz kısmı toplanmış ve 0,45 µm gözenek çaplı membran filtresi ile sterilize edilmiştir. Sterilize edilen sıvı faz ilk önce amonyum sülfat prespitasyon (%50) ve bunu takiben organik solvent prespitasyon (metanol/kloroform karışımı, 1:2 v/v) işlemine tabi tutulmuşlardır. Prespitasyon işlemleri sonunda elde edilen pelet, -80°C'de muhafaza edilmiştir (Moreno ve ark., 2002). Bakteriyosin hazırlamasının her bir aşamasının sonunda bakteriyosin aktivite testi yapılmıştır. Bakteriyosinlerin aktivitesinin belirlenmesinde agar-spot analiz yöntemi kullanılmıştır. Bunun için bakteriyosin preparatları ikinin katları şeklinde (1/2, 1/4, 1/8 vb.) seyreltilerek dilüsyonları hazırlanmıştır. Her dilüsyondan 20 µl alınıp nokta halinde indikatör mikroorganizma olarak *L. plantarum* içeren (%1) yumuşak agarlı MRS (%0,8) besiyeri üzerine konulmuş ve petriler 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Dilüsyonların ilave edildiği noktalarda 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonlarının oluşup oluşmadığı belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesi *L. plantarum*'a karşı en az 2 mm çapında berrak inhibisyon zonu veren en yüksek dilüsyonun tersi olarak tanımlanmış ve arbitrary unite (AU/mL) olarak ifade edilmiştir (Şahingil ve ark., 2011).

Bakteriyosinlerin yoğurt starter kültürlerinin aktivitesi üzerine etkisi: Bakteriyosinlerin yoğurt starter kültürlerin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için, UHT sütler (42°C) ayrı ayrı ticari starter kültürlerle inoküle (%2 v/v) edildikten sonra 1600 AU/mL düzeyinde laktokoksin BZ ve enterosin KP bakteriyosinleri tek tek ve kombine olarak ilave edilmiştir. Hazırlanan yoğurt kültürleri 42°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sırasında belirli aralıklarla (0-24 saat) örnek alınıp pH değerleri ve anaerobik koşullarda laktik asit bakteri sayımı yapılmıştır. Sayımda besiyeri olarak MRS agar kullanılmıştır (Moreno ve ark., 2006). CHR Hansen firmasına ait YC-350 ve YC-X11 yoğurt kültürleri Y1 ve Y2; Sacco firmasına ait Y-080 F yoğurt kültürü ise Y3 ile kodlanmıştır. Laktokoksin BZ ilave edilen yoğurt kültürleri LY1, LY2, LY3, enterosin KP içeren örnekler EY1, EY2, EY3, enterosin KP ve laktokoksin BZ içerenler ise ELY1, ELY2, ELY3

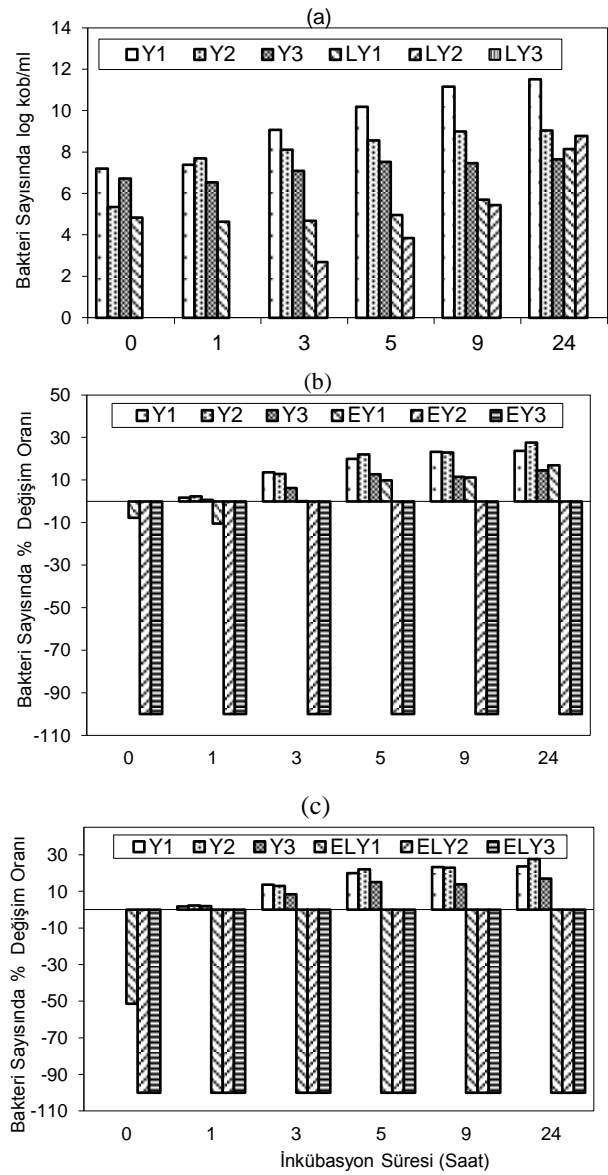
olarak kodlanmışlardır. Negatif kontrol olarak sadece bakteriyosin (laktokoksin BZ, enterosin KP ve her iki bakteriyosin karışımı) ilave edilmiş süt, pozitif kontrol olarak sadece yoğurt kültürü ilave edilmiş süt kullanılmıştır.

İstatiksel Analiz: Her bir analiz üç kez yapıp, ortalamaları hesaplanmıştır. Bakteri sayıları log kob/mL olarak ifade edilmiştir. Ortalamaların karşılaştırılması için Tukey testi kullanılmıştır. Veri analizleri SAS istatistiksel paket programı ile gerçekleştirilmiştir (SAS, 1995).

Bulgular ve Tartışma

Laktokoksin BZ ve enterosin KP (1600 AU/ml)'nin, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus*'un farklı suşlarından oluşan üç farklı ticari yoğurt kültürünün gelişimleri üzerine etkileri tam yağlı sütte 42°C'de 24 saat inkübasyon koşullarında incelenmiştir. Laktokoksin BZ tek başına veya enterosin KP ile birlikte kullanıldığında test edilen üç yoğurt kültürü üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (P<0,01). Laktokoksin BZ'nin Y3 kodlu yoğurt kültürünün gelişimini tamamen önlediği ve 24 saatlik inkübasyon işlemi süresince yoğurt bakterilerinin gelişmediği tespit edilmiştir (Şekil 1). Y1 yoğurt kültüründe bakteri sayısında inkübasyon işleminin 5. saatine kadar 3 log'luk bir azalmaya neden olduğu, ancak inkübasyonun bundan sonraki aşamasında yoğurt bakterilerinin sayısının artmaya başladığı gözlenmiştir. Laktokoksin BZ'nin Y2 yoğurt kültüründe inkübasyon işleminin 2. saatine kadar bakteri sayısını sayılamayacak düzeye düşürdüğü ve bu saatten sonra bakteri sayısının arttığı belirlenmiştir. Inkübasyon işleminin sonunda laktokoksin BZ ile muamele edilen Y2 yoğurt kültürü ile kontrol arasında 1 log'luk farkın olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar laktokoksin BZ'nin, Y1 ve Y2 yoğurt kültürlerine karşı bakteriyostatik, Y3 yoğurt bakterilerine karşı ise bakterisidal etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur.

Enterosin KP'nin, yoğurt kültürlerinden Y1'e karşı inhibitör etkisinin istatistiksel olarak önemsiz (P>0,05), Y2 ve Y3 kültürlerine karşı ise önemli olduğu görülmüştür (P<0,01). Enterosin KP'nin Y2 ve Y3 yoğurt bakterilerin gelişimini tamamen önlediği, Y1 yoğurt kültürü üzerinde çok az etkili olduğu bulunmuştur. Inkübasyon işleminin 1. saatine kadar 1 log'luk düşüşe neden olduğu ve inkübasyonun ilerlemesiyle birlikte yoğurt bakterilerinin sayısının arttığı belirlenmiştir. Enterosin KP'nin Y2 ve Y3 kodlu yoğurt bakterilerine karşı bakterisidal, Y1 kodlu yoğurt kültürüne karşı ise bakteriyostatik etkiye sahip olduğu söylenebilir. Laktokoksin BZ ve enterosin KP birlikte kullanıldıklarında ise bir sinerjist etkinin olduğu ve her 3 yoğurt kültürünün gelişimlerinin önlediği belirlenmiştir. Bakteriyosin içermeyen kontrol örnekleri (Y1, Y2 ve Y3) ile laktokoksin BZ'nin etkili olmadığı ve/veya az etkili olduğu LY1 ve LY2 örneklerinde inkübasyon süresince yoğurt bakterilerinin gelişmesine paralel olarak pH değerinin düştüğü (6,30-6,53'de 3,61-4,55'e) saptanmıştır (P<0,01; Şekil 2). Laktokoksin BZ ve enterosin KP'nin tek başlarına (LY3, EY1, EY2, EY3) ve kombinelelerinin inhibitör etki gösterdiği yoğurt örneklerinde (ELY1, ELY2, ELY3) ise inkübasyon işlemi süresince pH değerlerinin değişmediği tespit edilmiştir (P>0,05).



Şekil 1 Laktokoksin BZ ve enterosin KP'nin yoğurt kültürü üzerine etkisi. (a) Laktokoksin BZ, (b) enterosin KP, (c) laktokoksin BZ ve enterosin KP. Y1, Y2 ve Y3 ticari yoğurt kültürleri (kontroller); LY1, LY2, LY3 laktokoksin katılan yoğurt kültürü; EY1, EY2, EY3 enterosin katılan yoğurt kültürü; ELY1, ELY2, ELY3 laktokoksin ve enterosin katılan yoğurt kültürü.

L. bulgaricus BB18 tarafından üretilen bakteriyosine karşı test edilen 11 farklı yoğurt starter kültürün dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Simova ve ark., 2008).

Sonuç olarak, laktokoksin BZ (1600 AU/mL)'nin test edilen 3 yoğurt kültüründen ikisine (Y1 ve Y2 kodlu kültürler) karşı bakteriyostatik, birine (Y3 kodlu kültür) karşı da bakteriyosidal etki gösterdiği belirlenmiştir. Enterosin KP'nin ise Y2 ve Y3 yoğurt kültürlerinin gelişimini tamamen önlediği (bakterisidal), Y1 yoğurt starter kültürü üzerinde çok az etkili (bakteriyostatik) olduğu bulunmuştur. Bakteriyosin içermeyen kontrol örneklerinde ve bakteriyosinlerin az etkili olduğu yoğurt starter kültür örneklerinde bakterilerin gelişimine bağlı olarak pH değerinin düştüğü, bakteriyosinlerin bakterisidal etki gösterdiği yoğurt kültür örneklerinde ise pH değerinin değişmediği görülmüştür.

Bakteriyosinler süt endüstrisinde antimikrobiyal ajan olarak ürüne direkt olarak katılabilecekleri gibi ambalaj materyalinin içine veya ürün yüzeyine püskürtme şeklinde uygulanma olanağına sahiptirler. Bakteriyosinlerin fermente süt ürünlerinde kullanılma şeklini belirleyen temel faktör starter kültüre karşı antimikrobiyal etkiye sahip olup olmamasına bağlıdır. Starter kültürler bakteriyosine dayanıklı ise bakteriyosin hammaddeye, duyarlı ise ambalaj materyaline ya da son ürüne ilave edilmektedir (Lopez ve Beloso, 2008).

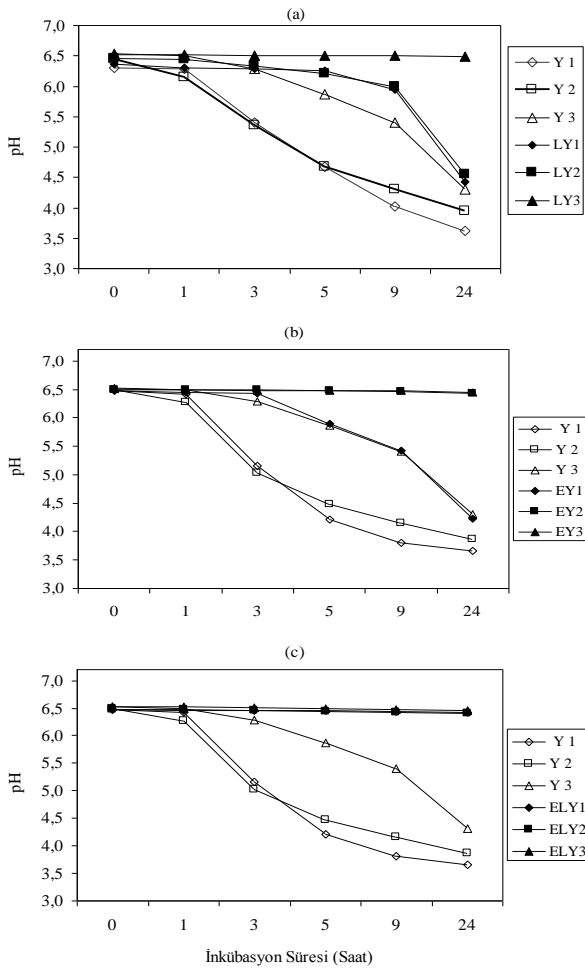
Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler laktokoksin BZ'nin test edilen her üç starter kültürlerin, enterosin KP'nin ise Y2 ve Y3 yoğurt kültürlerinin gelişimlerini inhibe ettiğinden hammaddeye ilave edilmelerinin uygun olmadığını ortaya koymuştur. Enterosin KP Y1 kodlu starter kültür üzerinde etkili olmadığından yoğurt üretiminde starter kültür ile kullanılabilmesi gözlenmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen 2008-50 numaralı projeden üretilmiştir.

Kaynaklar

- Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernandez PE. 2001. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Food Science and Technology International, 7: 281-305.
- Isleroglu H, Yildirim Z, Tokatli M, Oncul N, Yildirim M. 2012. Partial characterisation of enterocin KP produced by *Enterococcus faecalis* KP, a cheese isolate. International Journal of Dairy Technology, 65: 90-97.
- Lopez AS, Beloso OM. 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. International Dairy Journal 4: 329- 343.
- Moreno MR, Leisner JJ, Tee LK, Ley C, Radu S, Rusul G, Vancannet M, De Vuyst L. 2002. Microbial analysis of malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. Journal of Applied Microbiology, 92: 147-157.
- Moreno Y, Collado MC, Ferrus MA, Cobo JM, Hernandez E, Hernandez M. 2006. Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4°C using LIVE/DEAD® BacLight™ staining and conventional plate counts. International Journal of Food Science and Technology 41: 275-280.
- O'Sullivan L, Ross RP, Hill C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, 84: 593-604.
- Papagianni M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. Biotechnology Advances, 21: 465- 499.
- SAS 1995. "User's Guide: Statistics", Version 6.12 Ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Simova E, Beshkova D, Angelov M, Dimitrov ZH. 2008. Bacteriocin production by strain *Lactobacillus delbrueckii* ssp.*bulgaricus* BB18 during continuous prefermentation of yogurt starter culture and subsequent batch coagulation of milk. Journal of Indian Microbiology and Biotechnology, 35: 559-567.
- Şahingil D, İşleroglu H, Yildirim Z, Akçelik M, Yildirim M. 2011. Characterization of lactococin BZ produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BZ isolated from Boza. Turkish Journal of Biology, 35: 21-33.



Şekil 2 Bakteriyosin içeren ve içermeyen yoğurt kültürlerinin pH değerleri. (a) Laktokoksin BZ, (b) enterosin KP, (c) laktokoksin BZ ve enterosin KP. Y1, Y2 ve Y3 ticari yoğurt kültürleri (kontroller); LY1, LY2, LY3 laktokoksin katılan yoğurt kültürü; EY1, EY2, EY3 enterosin katılan yoğurt kültürü; ELY1, ELY2, ELY3 laktokoksin ve enterosin içeren yoğurt kültürü.