



TARHANADAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BİYOGÜVENLİK VE BAZI TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ



İlkin ŞENGÜN, Kıvanç ATLAMA

Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir

Sorumlu yazar: ilkin.sengun@ege.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, ülkemizin geleneksel fermente ürünlerinden biri olan tarhanadan izole edilip tanımlanan laktik asit bakterilerinin probiyotik potansiyelinin belirlenmesi amacıyla izolatların biyogüvenlik ve teknolojik özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla toplam 226 izolat arasından genotipik olarak benzer gruplardan temsili 30 adet izolat belirlenmiş, bu izolatların biyogüvenlik değerlendirmesinde hemolitik enzim aktivitesi ve antibiyotiklere duyarlılık, teknolojik açıdan starter kültür olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesinde ise β -galaktosidaz ve proteolitik enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmada, tüm izolatların (%100) eritromisine karşı duyarlı olduğu, izolatların %93'ünün tetramisine, %90'mın kloramfenikole, %87'sinin ampisiline, %63'ünün ise kanamisine duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *L. plantarum* (2) ve *L. paraplantarum* (1)'a ait suşlar β düzeyinde hemoliz gerçekleştirirken diğer izolatların hemolitik aktivite göstermediği tespit edilmiştir. İzolatların proteolitik enzim aktivitesinin 0.011-0.076 mg tirozin/mL aralığında değiştiği, tüm izolatlar içerisinde *E. faecium* (1), *L. fermentum* (1), *L. paraplantarum* (1), *L. plantarum* (2), *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* (1) ve *S. thermophilus* (1)'ün β -galaktosidaz enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, *E. faecium* (1), *P. acidilactici* (2), *P. pentosaceus* (1), *Leu. pseudomesenteroides* (1), *S. thermophilus* (1) ve *W. cibaria* (2)'nin biyogüvenlik açısından, *P. acidilactici* (1), *P. pentosaceus* (1), *L. fermentum* (1) ve *S. thermophilus* (1)'ün ise hem biyogüvenlik hem de teknolojik açıdan probiyotik potansiyelinin bulunduğu belirlenmiştir.

GİRİŞ

Probiyotikler, “yeterli miktarda alındığında kişinin sağlığı üzerinde olumlu etki gösteren canlı mikroorganizmalar”dır (WHO/FAO, 2002). Probiyotik özellik gösteren mikroorganizmalar ağırlıklı olarak *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinsine ait türlerden oluşmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* probiyotik özelliği kanıtlanmış tek maya türüdür (Sengun ve Kilic, 2019). Mikroorganizmaların probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için patojen olmamaları, insan gastrointestinal sisteminde canlı kalabilmeleri, bağırsak mukozasına tutunabilmeleri ve burada kolonize olabilmeleri, sağlığa yararlı metabolit sentezleyebilmeleri gerekmektedir (Roberts ve ark., 2018; Lakra ve ark., 2020). Probiyotikler, insan ve hayvan intestinal sisteminde, anne sütünde, doğada ve doğal fermentasyonla üretilen süt, et, meyve, sebze ve hububat bazıli fermente gıdalarda doğal olarak bulunabilmektedir (Angelov ve ark., 2006; Albano ve ark., 2018).

Tarhana, hububat bazıli fermente bir ürün olup fermentasyonunda LAB'leri ve mayalar rol almaktadır. Ülkemizde farklı formülasyonlarla üretilen tarhanalardan izole edilen LAB'lerinin *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* ve *Streptococcus* cinslerine ait olduğu, moleküler tanımlama sonucunda ise bu izolatların *P. acidilactici*, *S. thermophilus*, *L. fermentum*, *E. faecium*, *P. pentosaceus*, *Leu. pseudomesenteroides*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Leu. citreum*, *L. paraplantarum* ve *L. casei* olarak tanımlandığı görülmektedir (Sengun ve ark., 2009; Settanni ve ark., 2011) Literatürde, tarhanadan izole edilip tanımlanmış LAB'lerinin probiyotik potansiyelini belirlemeye yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, tarhanadan izole edilip moleküler olarak tanımlanmış olan LAB izolatlarının probiyotik potansiyeli biyogüvenlik ve teknolojik özellikler bakımından değerlendirilmiş, bu amaçla izolatların biyogüvenlik özelliklerini belirlemek üzere hemolitik enzim aktivitesi ve antibiyotiklere duyarlılık testleri, teknolojik özelliklerini belirlemek üzere proteolitik enzim aktivitesi ve β -galaktosidaz enzim aktivitesi testleri uygulanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Hemoliz kabiliyeti probiyotiklerde istenmeyen bir özellik olup “hemolitik anemi” rahatsızlığına neden olmaktadır (Huang ve ark., 2020; Lakra ve ark., 2020). Bu çalışmada test edilen kültürler arasında sadece *L. plantarum* ve *L. paraplantarum*'un beta düzeyinde hemoliz gerçekleştirdiği, diğerlerinin ise hemolitik aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 1).

Antibiyotiklere karşı duyarlılık probiyotiklerde istenen bir özelliktir. Probiyotiklerin antibiyotiklere karşı direnç genini taşımaları, olası bir patojene o geni transfer edebilme olasılığının yüksek olması nedeniyle istenmeyen bir durumdur (Jansen ve ark., 2006). Bu çalışmada incelenen kültürlerin eritromisine (%100) karşı duyarlı olduğu, diğer antibiyotikler için ise duyarlılık derecesinin daha düşük (tetramisin (%93), kloramfenikol (%90), ampisilin (%87) ve kanamisine (%63)) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

MATERYAL VE YÖNTEM

Bakteri Kültürleri

Bu çalışma, bir önceki çalışma (Sengun ve ark., 2009) kapsamında, farklı tarhana örneklerinden izole edilip *E. faecium*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *Leu. pseudomesenteroides*, *Leu. citreum*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *S. thermophilus* ve *W. cibaria* olarak tanımlanan izolatlar ile gerçekleştirilmiştir.

Antibiyotiklere Duyarlılık

Çalışmada, izolatların kloramfenikol, ampisilin, eritromisin, tetramisin, kanamisin antibiyotiklerine karşı direnci disk difüzyon metodu kullanılarak test edilmiştir (Tambekar ve Bhutada, 2010).

Hemolitik Aktivite

Bakteri izolatlarının hemolitik aktivitesini belirlemek üzere %5 koyun kanı içeren Colombia CNA Agar (Biomerieux)'a çizme plak yöntemine göre ekim yapılmış, inkübasyon sonucunda ve koloni çevresinde oluşan zon rengi değerlendirilerek hemolitik aktivite düzeyleri belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2017).

Proteolitik Enzim Aktivitesi

Proteolitik aktivite spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiş ve tirozin standart eğrisi üzerinden hesaplanarak mg tirozin/mL cinsinden ifade edilmiştir (Şimşek ve ark., 2006).

β -Galaktosidaz Enzim Aktivitesi

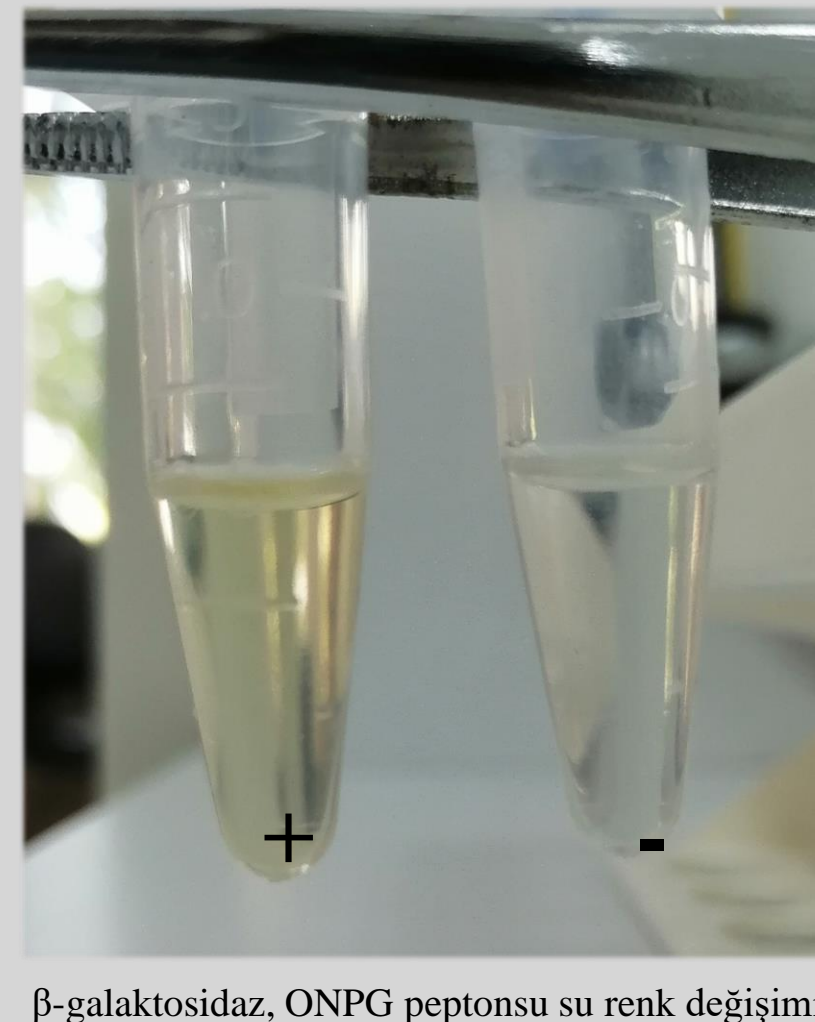
β -Galaktosidaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesinde o-nitrofenil- β -D-galaktopronosid (ONPG) peptonlu besiyeri kullanılmış ve sarı renk oluşumu pozitif olarak ifade edilmiştir (Hébert ve ark., 2000; Anonim, 2005).

Çizelge 1. LAB'lerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve hemolitik enzim aktivite dereceleri

	Antibiyotik duyarlılığı (mm)					Hemolitik aktivite
	Tür	K.	E.	Ka.	A.	
<i>E. faecium</i>	28	24	10	20	18	γ
<i>E. faecium</i>	24	24	6	36	18	γ
<i>E. faecium</i>	24	24	10	6	18	γ
<i>L. bulgaricus</i>	26	20	6	14	14	γ
<i>L. casei</i>	6	20	6	6	6	γ
<i>L. fermentum</i>	26	22	6	28	14	γ
<i>L. fermentum</i>	24	26	8	24	8	γ
<i>L. fermentum</i>	28	10	8	32	28	γ
<i>L. paraplantarum</i>	28	12	8	28	28	β
<i>L. plantarum</i>	30	12	10	30	32	β
<i>L. plantarum</i>	6	14	8	6	6	β
<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	28	12	8	32	30	γ
<i>Leu.citreum</i>	24	22	6	22	14	γ
<i>Leu.citreum</i>	26	24	8	38	24	γ
<i>P. acidilactici</i>	32	24	8	22	16	γ
<i>P. acidilactici</i>	6	22	6	6	20	γ
<i>P. acidilactici</i>	22	22	8	14	14	γ
<i>P. acidilactici</i>	26	24	8	30	20	γ
<i>P. acidilactici</i>	28	26	6	18	18	γ
<i>P. acidilactici</i>	30	24	6	24	18	γ
<i>P. pentosaceus</i>	28	10	8	32	30	γ
<i>P. pentosaceus</i>	28	12	10	30	32	γ
<i>S. thermophilus</i>	28	26	8	22	16	γ
<i>S. thermophilus</i>	30	26	6	20	20	γ
<i>S. thermophilus</i>	22	18	6	30	16	γ
<i>S. thermophilus</i>	26	20	8	22	14	γ
<i>S. thermophilus</i>	26	22	8	24	18	γ
<i>S. thermophilus</i>	28	26	6	18	14	γ
<i>W. cibaria</i>	26	10	8	24	24	γ
<i>W. cibaria</i>	28	12	10	32	30	γ

K.: Kloramfenikol, E.: Eritromisin, Ka.: Kanamisin, A.: Ampisilin, T.: Tetramisin; β : Birinci düzey hemoliz, γ : Hemoliz yok.

Probiyotiklerin β -galaktosidaz aktivitesine sahip olması, fonksiyonel özellikleri bakımından aranan ve istenen bir özelliktir. Probiyotiklerin laktozu metabolize edilmesi veya parçalanması sayesinde, laktoz ile ilgili sağlık problemi yaşayan kişilerin bu ürünleri tüketmesine olanak sağlanabilmektedir (Oliveira ve ark., 2019; Shivangi ve ark., 2020). Bu çalışmada test edilen izolatlar arasında *E. faecium*, *L. paraplantarum*, *L. plantarum*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* ve *S. thermophilus*'ün orta, *L. fermentum*'ün ise yüksek düzeyde β -galaktosidaz aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 2).



β -galaktosidaz, ONPG peptonu su renk değişimi

Çizelge 2. LAB'lerinin β -galaktosidaz ve proteolitik enzim aktivite dereceleri

	Tür	β -galaktosidaz aktivite	Proteolitik aktivite (mg tirozin/mL)
<i>E. faecium</i>	-	0.046	
<i>E. faecium</i>	+	0.067	
<i>L. bulgaricus</i>	-	0.076	
<i>L. casei</i>	-	0.045	
<i>L. fermentum</i>	-	0.028	
<i>L. fermentum</i>	-	0.036	
<i>L. fermentum</i>	++	0.048	
<i>L. paraplantarum</i>	+	0.031	
<i>L. plantarum</i>	+	0.046	
<i>L. plantarum</i>	+	0.027	
<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	-	0.031	
<i>Leu.citreum</i>	-	0.051	
<i>Leu.citreum</i>	-	0.038	
<i>P. acidilactici</i>	-	0.048	
<i>P. acidilactici</i>	-	0.034	
<i>P. acidilactici</i>	-	0.033	
<i>P. acidilactici</i>	+	0.044	
<i>P. acidilactici</i>	-	0.055	
<i>P. acidilactici</i>	-	0.053	
<i>P. pentosaceus</i>	-	0.059	
<i>P. pentosaceus</i>	+	0.023	
<i>S. thermophilus</i>	-	0.059	
<i>S. thermophilus</i>	-	0.035	
<i>S. thermophilus</i>	-	0.011	
<i>S. thermophilus</i>	+	0.035	
<i>S. thermophilus</i>	-	0.065	
<i>S. thermophilus</i>	-	0.036	
<i>W. cibaria</i>	-	0.043	
<i>W. cibaria</i>	-	0.039	

+: β -galaktosidaz enzim aktivitesi var ve orta derecede, ++: β -galaktosidaz enzim aktivitesi var ve yüksek derecede

Probiyotiklerin büyük bir çoğunluğunu oluşturan LAB'lerinin genellikle proteolitik enzim aktivitesi kabiliyetine sahip olmadığı bilinmektedir (da Silva ve ark., 2019). Bununla birlikte proteolitik enzim aktivitesinin 0.050 mg tirozin/mL üzerinde olması durumunda son üründe acılığa ve kötü koku oluşumu gibi kalite kusurlarına yol açan peptit ve amino asit düzeyinde parçalanmaların olduğu bildirilmektedir (Özkalp ve Akçelik, 2006; Bajić ve ark., 2020a; Bajić ve ark., 2020b). Bu çalışmada incelenen izolatların 9 adedinde proteolitik aktivite değerinin 0.050 mg tirozin/mL'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2).

SONUÇ

Probiyotiklerin gıdalarda kullanımında gerekli ön koşullardan biri olan biyogüvenlik değerlendirmesi, başlıca hemolitik aktivite ve antibiyotik direnci testleri ile yapılmaktadır. Bu çalışmada, hemoliz bakımından 30 izolat içerisinde 3 adedinin beta düzeyinde aktivite gösterdiği, diğer izolatlarda ise gama düzeyi yani hiç hemoliz gerçekleştirmediği tespit edilmiştir. Dolayısıyla incelenen izolatların hemolitik enzim aktivitesi bakımından kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir. Diğer bir biyogüvenlik unsuru olan antibiyotiklere karşı direnç testinde ise izolatların duyarlılık gösterdiği antibiyotik çeşitliliği ve düzeyinin uygun olduğu, dolayısıyla bu izolatların tüketiminin uygun olduğu tespit edilmiştir.

İzolatların teknolojik proseslerde kullanılabilirliğine yönelik yapılan testlerde, 8 izolatın laktozu parçalayabilme kabiliyetinde olduğu, dolayısıyla fermente süt ürünlerinin üretiminde starter olarak kullanılabilirliği, 21 izolatın ise düşük proteaz enzim aktivitesi sayesinde, içeriğinde protein barındıran hammaddelerin yer aldığı ürünlerde starter olarak kullanılabilirliği tespit edilmiştir.

REFERANSLAR

- Albano, C., Morandi, S., Silvestri, T., Castiglioni, M. C., Marni, F., Brusca, M. (2018). "Lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties for dairy applications: In vitro and in situ activity". *Journal of Dairy Science*, 101(12), 18017-18018.
- Angelov, A., Gocheva, V., Kancheva, R., Hristova, V. (2006). "Development of a new out-based probiotic drink". *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), 75-80.
- Bajić, S. S., Mihaljević, S. B., Radjević, D. D., Djukić, J. M., Stanićević, S. M., ... & Tolmáček, M. S. (2020a). Characterization of pH resistance and the proteolytic activity of GABA-producing *Lactobacillus brevis* BGZS10-17 in preparation of fermented milk beverage and the effects on the symptoms of the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 85(2), 163-176.
- Bajić, S. S., Đikić, J., Đinić, M., Tomić, S., Popović, N., Beldarić, E., ... & Tolmáček, M. (2020b). GABA potentiates the immunoregulatory effects of *Lactobacillus brevis* BGZS10-17 via ATG5-dependent autophagy in vitro. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
- da Silva, L. A., Neto, J. H. P. L., & Cimdrelli, H. R. (2019). Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria. *Annals of Microbiology*, 69(13), 1497-1505.
- Hébert, E. M., Rapp, R. R., Tuller, P., de Groot, G. S. (2000). "Characterization of natural isolates of *Lactococcus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation". *International Journal of Food Microbiology*, 59(1-2), 19-27.
- Huang, J., Zhang, W., Hu, Z., Liu, Z., Du, T., Dai, Y., & Xiong, T. (2020). Isolation, characterization and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from feces of wild boar, native pig and commercial pig. *Food Science and Technology*, 104(106).
- Jansen, W. T. M., Van Der Bruggen, J. T., Verhoef, J., Fluit, A. C. (2006). "Bacterial resistance: complexity of the challenge and containment strategy in Europe". *Drug Resistance Updates*, 9(3), 123-133.
- Kumar, V., Kamari, A., Angmo, K., Bhatti, T. C. (2017). "Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India". *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 1945-1952.
- Lakra, A. K., Dondli, L., Hanjion, G., Tilwani, Y. M., & Arul, V. (2020). Some probiotic potential of *Weissella confusa* MD1 and *Weissella cibaria* MD2 isolated from fermented butter. *LWT*, 109(261).
- Oliveira, D. R., Lopes, A. C. A., Pereira, R. A., Cardoso, P. G., & Duarte, W. F. (2019). Selection of potentially probiotic *Kluyveromyces fragilis* for the fermentation of cheese whey-based beverage. *Annals of Microbiology*, 69(13), 1361-1372.
- Özkalp, B., & Akçelik, M. (2006). Doğal Tip *Lactococcus lactis* Soğuklaması Endüstriyel Starter Kültür Potansiyellerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 101.
- Roberts, D., Reyes, V., Bonilla, F., Dranda, B., Liu, C., Choujlenko, A., Sathivel, S. (2018). "Viability of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in fermented apple juice under simulated gastric and intestinal conditions". *LWT*.
- Sengun, I. Y., Nielsen, D. S., Kasparian, M., Jakobsen, M. (2009). "Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food". *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 105-111.
- Sengun, I. Y., & Kilic, G. (2019). Innovative Functional Fruit and Vegetable-Based Drinks Including Probiotics. Chapter 21 In: *Fermented Food Products* (Eds. A. Sankaranarayanan, N. Amerasinghe and D. Phansavakarn). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 341-365.
- Settanni, L., Tangelder, H., Moschetti, G., Reale, S., Gargano, V., & Etes, H. (2011). Evolution of fermenting microbiota in tarhana produced under controlled technological conditions. *Food Microbiology*, 28(7), 1367-1373.
- Şimşek, O., Coş, A. H., Tolmáček, S. (2006). "Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes". *Food Control*, 17(4), 263-270.
- Tambekar, D. H., Bhutada, S. A. (2010). "An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections". *Recent Research in Science and Technology*, 2(10).
- WHO/FAO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, London, Ontario www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (Erişim tarihi: 2.12.2019).

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı kapsamında desteklenmiştir. PROJE NO: 1190165

