

***Lactobacillus pentosus* 'un Otolitik Aktivitesinin ve Peptidoglikan Hidrolaz Enzimlerinin Karakterize Edilmesi**

Recep Çıbık

Uludağ Üniv., Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi AbD, Bursa
recep_cibik@yahoo.com

Özet

Lactobacillus pentosus suşlarının otolitik özellikleri tamponlanmış ortamlarda değerlendirildi ve test edilen suşların % 34 ile 94 arasında değişen otoliz gösterdikleri saptandı. Yüksek otolitik özelliğe sahip *Lb. pentosus* 1091 suşunun peptidoglikan hidrolaz enzim aktivitesinin renatüre SDS-PAGE ile değerlendirilmesinde 58 ve 112 kDa ağırlıklarında başlıca iki adet band bulunduğu gözlemlendi. Aynı suşa ait farklı fraksiyonların aynı teknikle test edilmesi neticesinde daha başka hidroliz bandlarının da bulunduğu gözlemlendi. Spesifikite analizlerinde en azından iki farklı enzimin otolizde rol aldığı saptandı. Bu çalışma ile *Lb. pentosus*'un otolitik sistemi ilk olarak tanımlandı ve elde edilen bulgular teknolojik açıdan önem arz eden suşların karakterize edilmesinde etkin olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: *Lactobacillus pentosus*, otoliz, peptidoglikan hidrolaz

Giriş

Bakteriyel otoliz, bakterinin çevresel iskeletini oluşturan ve ona şeklini veren hücre duvarının ana bileşeni olan peptidoglikan tabakasının yine bakteri tarafından üretilen endojen hidrolitik enzimler vasıtasıyla parçalanmasıdır. Bu enzimler peptidoglikan üzerinde bölgesel olarak gerçekleştirdikleri ve hidroliz neticesinde açığa çıkardıkları serbest parçacıklara göre; β -N-asetilmuramidaz, β -N-asetilglukozaminidaz, N-asetilmuramil-L-alanin amidaz ve peptidazlar şeklinde sınıflandırılırlar (1). Laktik asit bakterileri süt endüstrisinde starter kültür olarak üründe istenen niteliklerin oluşturulmasını sağlamak üzere kullanılmaktadır. Bu bakterilerin özellikle peynirlerin olgunlaşma sürecinde otolizleri neticesinde açığa çıkan hücre içi enzimler olgunlaşma süresinin kısalmasını sağlamak ve istenen aromatik niteliklerin gelişimini arttırmaktadır (2). Özellikle hücre içi yer alan peptidazların salınımı ile daha fazla amino asit şekillenmekte ve acı lezzete sahip hidrofobik karakterli peptitler yıkılmaktadır. Amino asit katabolizmasıyla da arzulanan aromatik bileşiklerin oluşumu sağlanmaktadır (3).

Lb. pentosus heterofermentatif bir laktik asit bakterisidir ve diğer bazı laktobasiller ve pediokoklarla birlikte süt endüstrisinde "starter olmayan laktik

asit bakterileri" grubunda yer almaktadır. Birçok peynirde olgunlaşmanın ilk zamanlarında sayıları çok az iken zaman içerisinde sayıları artmakta ve ürünlerde aroma oluşumuna katkı sağlamaktadırlar (4). Bu çalışmada *Lb. pentosus* suşlarının otolitik aktiviteleri ve peptidoglikan hidrolaz aktiviteleri belirlenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada kullanılan *Lb. pentosus* suşları CNRZ kültür koleksiyonundan (INRA, Jouy-en-Josas, Fransa) elde edildi ve MRS sıvı besi yerinde 30°C de canlandırılıp çoğaltıldı. Mikroorganizmaların otolitik aktiviteleri Çıbık ve Chapot-Chartier (5) tarafından belirtildiği şekilde ölçüldü. Otoliziz, tamponda 24 saatlik inkübasyon sonrası oluşan türbidimetrik azalma yüzdeliği olarak verildi. Renatüre SDS-PAGE tekniği için otoklavlanmış *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma) bakterisi substrat olarak kullanıldı. Renatüre SDS-PAGE, hücresel fraksiyonlar ve spesifisite analizleri Çıbık ve Chapot-Chartier (5) tarafından belirtildiği üzere yapıldı.

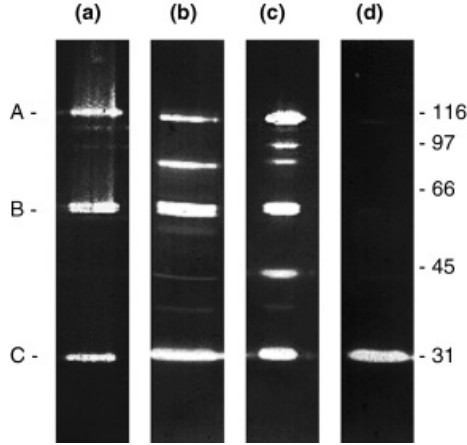
Bulgular ve Tartışma

Tamponlanmış ortama (potasyum fosfat, 50 mM, pH 6.5) transfer edilmiş *Lb. pentosus* suşlarının otolizleri ve yine aynı suşlara ait peptidoglikan hidrolaz profilleri Çizelge 1 de verilmiştir. Suşların % 34 ile % 94 arasında değişen otoliz gösterdikleri belirlenmiştir. Bu durum otolizin suşa özgü bir nitelik olduğunu göstermiştir. Renature SDS-PAGE tekniğinde 112 ve 58 kDa ağırlığındaki bandlar test edilen tüm suşlarda saptanırken 31 kDa ağırlığındaki band sadece iki suşta saptanmıştır. Yüksek otoliz gösteren ve 1091 nolu suşa ait değişik fraksiyonların yine aynı şekilde otoklave edilmiş *M. lysodeikticus* bakterisi üzerinde test edildiğinde farklı moleküler ağırlığa sahip yeni bandların varlığı gözlenmiştir (Şekil 1). Bununla birlikte 31 kDa moleküler ağırlıktaki bandın sadece sitoplazmik fraksiyonda bulunması ve test edilen sadece 1091 ve 1245 suşlarında mevcut olması, bu enzimin mevcut bir profaja ait endolizin olabileceğini göstermektedir.

Spesifisite analizlerinde 1091 suşunun tamponlanmış ortamda otolizine paralel olarak hem indirgenmiş şeker miktarında hem de serbest amino asit miktarında dereceli olarak artma şekillendiği saptanmıştır. Bu durum hücre duvarının hidrolize olmasında en azından iki farklı enzimin rol aldığını göstermektedir.

Çizelge 1. *Lb. pentosus* suşlarının otoliz ve peptidoglikan hidrolaz profilleri

Suşlar	Otoliz (%)	Peptidoglikan hidrolaz bantları		
		112 kDa (A)	58 kDa (B)	31 kDa (C)
1563	63	+	+	-
1245	54	+	+	+
1543	62	+	+	-
1861	48	+	+	-
1559	34	+	+	-
1865	56	+	+	-
1549	82	+	+	-
1553	74	+	+	-
1091	94	+	+	+



Şekil 1. Renatüre SDS-PAGE ile *Lb. pentosus* 1091 suşuna ait farklı hücresel fraksiyonların otoklavlanmış *M. lysodeikticus* hücreleri üzerine test edilmesi. (a) SDS ekstrakt, (b) LiCl ekstrakt, (c) hücre duvarı fraksiyonları ve (d) sitoplazmik fraksiyon.

Sonuç

Bu çalışma ile starter olmayan laktik asit bakterilerinden *Lb. pentosus*'un otolizi, peptidoglikan hidrolaz aktivitesi ve otolizde rol oynayan enzimlerin karakterizasyonu ilk olarak gerçekleştirilmiştir. Tamponlanmış ortamda otoliz % 34 ile % 94 arasında değişkenlik göstermiştir. Bu değişkenlik otolitik fenotipin suşa özgü bir karakteristik olduğunu göstermektedir. Renature SDS-PAGE analizlerinde iki adet suşun diğerlerine kıyasla farklı bir bant taşınması ve

Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu

bu bandın sadece sitoplazmik fraksiyonda yer alması bunun profaja ait bir aktivite olabileceğini göstermektedir. Yüksek ve düşük otolitik özelliğe sahip suşların kıyaslanarak test edilmesi teknolojik açıdan önem arz eden yardımcı kültürlerin seçilmesinde etkin bir kriter olabilir.

Kaynaklar

1. Shockman G.D. and Höltje J.-V. 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. New comprehensive biochemistry. In *Bacterial Cell Wall* ed. Ghuysen, J.-M. and Hakenbeck, R. Elsevier Science. pp. 131–166. Londra.
2. Chapot-Chartier M.-P., Deniel C., Rousseau, M., Vassal, L. and Gripon, J.C. 1994. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *International Dairy Journal* 4: 251–269.
3. Bourdat M., Le Bars D., Yvon M. and Chapot-Chartier M.-P. 2002. Autolysis of lactococci stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids. *Seven Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, September, 1–5, 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands.
4. Duthoit F., Godon J.J. and Montel M-C. 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3840–3848.
5. Cibik R. and Chapot-Chartier M.-P. 2000. Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. *Journal of Applied Microbiology* 89:862–869.