

Et Tavuklarının Körbarsak Florasında Yer Alan Laktobasillerin Proteolitik Aktiviteleri ve Organik Asit Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi*

İbrahim ÇAKIR¹M.Lütfü ÇAKMAKÇI¹

Geliş Tarihi : 16.09.1998

Özet: Bu çalışmada, doğal koşullarda yetişmiş tavukların körbarsak florasından izole edilen *Lactobacillus* türleri tanımlanarak proteolitik aktiviteleri ve organik asit oluşturma özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak, izole edilen bakteriler arasında en çok *Lactobacillus fermentum* türünün olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca en yüksek proteolitik aktivite *Lactobacillus salivarius* 19'da, en yüksek laktik asit üretimi ise *Lactobacillus plantarum* S78'de gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tavukların körbarsak florası, laktobasiller, proteolitik aktivite, laktik asit üretimi.

Determination of Proteolytic Activities and Organic Acid Production of Cecum Lactobacilli in Broiler Chickens

Abstract: In this study proteolytic activities and lactic acid production properties of lactobacilli isolated from cecum flora of naturally grown broiler chickens were investigated. As a result, among investigated strains, *L. fermentum* was determined as the commonly found one. In addition to that, the highest proteolytic activity was shown by *L. salivarius* 19 and the highest lactic acid producer strain was determined as *L. plantarum* S78

Key Words: Cecum flora of chickens, lactobacilli, proteolytic activity, lactic acid production.

Giriş

Konakçının doğal barsak sisteminde dengeyi sağlayan, zararlı mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen ve sindirime katkıda bulunan flora "probiyotik" adı verilmektedir. Tavukların körbarsak florasının önemli bir bölümünü oluşturan laktobasiller probiyotik olarak kullanılabilen özellikleri nedeniyle bir çok araştırmaya konu olmuşlardır (Fuller 1989).

Civcivler yumurtadan çıktıktan hemen sonra oluşmaya başlayan laktobasillus florası, yaşam süresi boyunca konakçının barsak epitellerine bağlı olarak kalmaktadır. Konakçılı ile simbiyotik bir ilişkiye giren bu mikroorganizmalar barsak florasının kompozisyonu-nun düzenlenmesine yardımcı olmaktadır (Fuller 1973, Lessard ve Brisson 1987). Laktobasillerin bu özellikleri onların proteolitik aktiviteleri ve organik asit üretim yetenekleri ile yakından ilişkilidir. Şöyleki: laktobasiller tarafından üretilen proteaz ve peptidaz enzimleri, yemlerin bileşiminde bulunan proteinlerden konakçının ihtiyacı olan temel amino asitlerin alınmasını kolaylaştırmaktadır. Böylece yem rasyonlarının daha etkili olarak kullanımı sağlanmakta ve bunun sonucu olarak da canlı ağırlık kazancı artmaktadır (Fuller 1973, Larsen ve ark. 1993). Bu da tavuk yetiştiricilerine ve dolayısıyla ekonomiye önemli bir kazanç sağlamaktadır.

Diğer yönden laktobasiller, laktik asit başta olmak üzere ürettikleri organik asitler ve bakteriyosin denilen antimikrobiyel metabolitlerle gastrointestinal sistemde meydana gelen enfeksiyonların önlenmesinde çok önemli görevlere sahiptirler (Modler ve ark. 1990).

Et tavuklarının barsak sisteminin doğal florası olan laktobasiller, yukarıda belirtilen özellikleri nedeniyle öncelikle konakçı, dolaylı olarak da insan sağlığını etkilemektedir. Ayrıca ekonomiye sağladıkları kazanç da dikkate alındığında, araştırmaların önemi kolayca anlaşılacaktır.

Bu çalışmada değişik bölgelerden getirilen köy tavuklarının körbarsak florasından izole edilen laktobasillerin proteolitik aktiviteleri ve organik asit oluşturma özellikleri incelenmiş ve bu iki özellik yönünden üstün olan suşlar tespit edilmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Ankara ve Samsun'un üç ayrı köyünden alınan, tamamen doğal şartlarda yetişmiş sağlıklı köy tavukları kesildikten sonra steril şartlarda körbarsakları çıkarılarak

* Yüksek Lisans Tezi Özeti

¹ Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü-Ankara

steril fizyolojik tuzlu su içine alınmıştır. Ayrıca florada bulunan mikroaerofilik mikroorganizmaların ortamda bulunan oksijenden zarar görmesini engellemek için örneklerin üzeri sıvı parafin ile kapatılmıştır.

Yöntem

Körbarsaktan bakterilerin izolasyonu

Körbarsaktan bakterilerin izolasyonu için MRS Agar, aktifleştirmek için ise MRS Broth besiyeri kullanılmıştır. Sıvı besiyerlerinin üzeri hava ile teması kesmek için 0.5 ml steril sıvı parafin ile kapatılmıştır (Aslım 1994, deMan ve ark. 1960, Harrigan ve McCance 1966, Kandler ve Weiss 1986). Körbarsak örneklerinden yapılan seyreltmeler sonucu izole edilen kolonilerden önce saflık kontrolleri yapılmış, daha sonra bu saf kültürler muhafazaya alınmıştır. Muhafaza işleminde, mikroorganizmalar %10'luk litmuslu süt besiyerinde geliştirildikten sonra -18°C' de depolanmıştır (Karahana 1992).

Tanımlama

Elde edilen saf kültürlerin tanımlanmasında koloni morfolojileri, sıvı besiyerinde üreme şekilleri, hücre morfolojileri, Gram reaksiyonları, 15°C ve 45°C'de üreme testleri, arjininden amonyak ve glikozdan gaz oluşumu ve eskulin hidrolizi testleri uygulanmıştır. Ayrıca arabinoz, eskulin, glikoz, laktoz, mannitol, mannoz, rafinoz ve sorbitolün karbon kaynağı olarak kullanılabilme durumları tespit edilerek saf kültürler tanımlanmaya çalışılmıştır (Fuller 1973, Harrigan ve McCance 1966, Kandler ve Weiss 1986, Tunail 1978).

Üreme sonrası asitliğin belirlenmesi

MRS Broth besiyerinde gelişen kültürlerin pH'ları, Knick (pH-mV-Meter) tipi pH metre ile ölçülmüştür. Ölçümlerden önce örnekler vorteks ile karıştırılarak homojenize edilmiştir (Güvenç 1981). Kültürlerin yağsız sütte oluşturdukları asitlik de aynı şekilde ölçülmüştür.

Proteolitik aktivitenin tayini

Proteolitik aktivite, bakterilerin süt proteinlerini hidrolize etmeleri sonucu ortaya çıkan parçalanma ürünlerini tirozin ekvalenti olarak veren spektrofotometrik bir yöntemle ölçülmüştür. Bunun için Zeiss PMQII tipi spektrofotometre kullanılmıştır (Aslım 1994, Beyatlı ve Tunail 1991, Yorgancıoğlu 1986).

Laktik asit üretiminin tespiti

Örnek kültürlerin oluşturdukları laktik asit miktarlarının tayini Karahana (1992), Tunail (1978) ve Yorgancıoğlu (1986) tarafından kullanılan yöntemle yapılmıştır. Yöntemin esası üreme sonrası yağsız sütte oluşan asitliğin laktik asit cinsinden spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Bulgular ve Tartışma

İzolasyon ve tanımlama sonuçları

Üç farklı bölgeden getirilen körbarsak örneklerinden toplam 124 adet tipik laktobasil kolonisi izole edilmiştir. Bu izolatların saflık kontrolleri yapıldıktan sonra tanımlama testlerine geçilmiştir. Çizelge 1'den de görüldüğü gibi tanısı yapılan türler içinde *L. fermentum* 18 adet ile (%21.4) birinci sırada yer alırken, 14 adet ile (%16.7) *L. delbrueckii*, 12 adet (%14.3) ile *L. murinus*, 9 adet ile (%10.7) *L. salivarius* ve 8 adet ile (%9.5) *L. plantarum* körbarsak florasında yer alan laktobasillerin en yaygın türleri olarak tespit edilmiştir. Tanısı yapılan 84 adet suşun 7 tanesi hiçbir türe dahil edilememiştir. Tannock'un (1990) belirttiği türlerden *L. delbrueckii*, *L. animalis*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. murinus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. casei* ve *L. reuteri* türleri bizim çalışmamızda da bulunan türler arasındadır. Bu çalışmada florada en fazla oranda bulunan *L. fermentum* Bergeys Manual of Systematic Bacteriology'de de belirtildiği gibi heterofermantatif intestinal türler arasında baskın olan türdür. Yine bu çalışmada izole edilen ve %10.7 ile önemli bir yeri olan *L. salivarius* türü, daha önce yapılan çalışmalarda ağızdan, insan, sıçan ve tavşanların intestinal bölgelerinden izole edilmiş olup, ağız florasının baskın türüdür (Kandler ve Weiss 1986).

Çizelge 2'den de görüldüğü gibi izole edilen laktobasil türlerinin hepsi glukozu ve *L. vaccinostrercus* T3 hariç hepsi laktozu fermente edebilmektedirler. Glukozdan gaz oluşumu ve arjininden amonyak oluşumu arasında önemli bir ilişki olduğu gözlenmektedir. Arjininden amonyak oluşturan türlerin hepsi glukozdan gaz oluşumu testinde pozitif reaksiyon vermektedirler. Bu iki özellik bakımından incelenen türlerin heterofermantatif grubun üyeleri oldukları belirlenmiştir. Ayrıca tanımlama testlerinden elde edilen bir başka sonuca göre *L. brevis* hariç türlerin hepsinin 45°C 'de üreme gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 1. Tanısı yapılan saf kültürlerin türlere göre dağılımı

Tür Adı	Tanısı yapılan örnek sayısı	Genel populasyon içindeki oranı(%)
<i>L. fermentum</i>	18	21.4
<i>L. delbrueckii</i>	14	16.7
<i>L. murinus</i>	12	14.3
<i>L. salivarius</i>	9	10.7
<i>L. plantarum</i>	8	9.5
<i>L. brevis</i>	5	5.9
<i>L. animalis</i>	3	3.6
<i>L. casei</i>	3	3.6
<i>L. agilis</i>	2	2.4
<i>L. acidophilus</i>	1	1.2
<i>L. reuteri</i>	1	1.2
<i>L. vaccinostrercus</i>	1	1.2
Hiç bir türe dahil edilemeyenler	7	8.3
Genel Toplam	84	100.0

Çizelge 2. Seçilen *Lactobacillus* türlerinin tanımlama testleri

Örnek Kodu	Tür Adı	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1B	<i>L.salivarius</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+Z	+	-
5A	<i>L.reuteri</i>	+	-	+	+	+Z	+	+	?	-	-	+	+	-
8B	<i>L.casei</i>	+	+Z	+	-	-	+	+Z	+	+	+	-	+	+
10A	<i>L.salivarius</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
19	<i>L.salivarius</i>	+	-	+Z	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
T57	<i>L.delbrueckii</i>	+	-	+	+Z	+Z	+	-	-	-	-	-	+Z	-
T62	<i>L.murinus</i>	+	-	+	-	-	+	+Z	+	+Z	+	+	+	-
S9	<i>L.murinus</i>	+	-	+	-	-	+	+Z	+	+	+Z	+	+	-
S11	<i>L.delbrueckii</i>	+	-	+	+	+Z	+	-	-	-	-	-	+	-
S23	<i>L.agilis</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+Z
S51	<i>L.agilis</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+Z
S53	<i>L.delbrueckii</i>	+	-	+	+Z	+Z	+	-	-	-	-	-	+Z	-
S56	<i>L.murinus</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+Z	+	+	+	-
S59	<i>L.murinus</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+Z	+	+	-
S60	<i>L.plantarum</i>	+	+	+	-	-	+	+Z	+	+	+	+	+	+
S67	<i>L.murinus</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+Z	+	+	+	-
S75	<i>L.murinus</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+Z	+Z	+	+	-
S78	<i>L.plantarum</i>	+	+	+	-	-	+	+Z	+	+	+	+	+	+
B1	<i>L.fermentum</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+Z	+	+	-
B21	<i>L.brevis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+Z	-	-	+Z	+Z	-
T1	<i>L.plantarum</i>	+	+	+	-	-	+	+Z	+	+	+	+	+	+
T3	<i>L.vaccinosterc</i>	+	-	+Z	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
T5	<i>L.animalis</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
T14	<i>L.brevis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+Z	-	-	+	+Z	-
T20	<i>L.reuteri</i>	+	-	+	+	+	+	+	?	-	-	+	+	-

A: Gram Reaksiyonu

D: Arjininden amonyak oluşumu

G: Arabinoz

J: Mannoz

M: Sorbitol

+Z: Zayıf reaksiyon

B: 15°C'de gelişme

E: Glukozdan gaz oluşumu

H: Eskulin

K: Rafinoz

+: Pozitif reaksiyon

?: Sonuç belirlenemedi

C: 45°C'de gelişme

F: Glukoz

I: Mannitol

L: Laktoz

-: Negatif reaksiyon

Üreme sonrası asitlik sonuçları

Tür düzeyinde tanısı yapılan 84 adet bakteriden proteolitik aktivite ve organik asit oluşumunun tespit edilmesi için üreme sonrası besiyerinde en düşük pH'ya sahip olan türler belirlenmiştir. Bu türlerin MRS Broth besiyerindeki pH düzeyleri 3.60 ile 5.90 arasında değişim göstermektedir.

Çizelge 3'den izleneceği gibi türlerin inkübasyon süreleri 21 saat ile 264 saat arasında değişmektedir. Yağsız sütte inkübasyon süresi uzadıkça pH'nın yükseldiği yani asitlik gelişiminin azaldığı gözlenmektedir. Asitlik gelişimi yüksek olan suşların kısa sürede pH'yı düşürerek sütü pıhtılaştırdıkları tespit edilmiştir.

Laktobasil türleri MRS Broth ortamında geliştiklerinde pH'yı 3.60'a kadar düşürürken, aynı

mikroorganizmalar için bu rakam yağsız sütte 4.35 olarak tespit edilmiştir.

MRS Broth besiyerinde üretilen asit miktarı tüm türlerde yağsız süttten daha yüksek bulunmuştur. Yine bu çalışmanın bir sonucu olarak homofermentatif suşların inkübasyon süreleri, *L. salivarius* 19 hariç 21 ile 47 saat arasında değişirken, heterofermentatif olanlarda bu sürenin 21 ile 264 saat arasında değiştiği tespit edilmiştir.

İzole ettiğimiz suşlardan *L. murinus* S59 ve S67, *L. agilis* S51, *L. delbrueckii* T57, *L. plantarum* S60 ve S78'in yağsız sütteki asitlik gelişimleri diğer suşlara göre daha yüksek bulunurken, bu suşların inkübasyon sürelerinin de diğerlerine göre oldukça kısa olduğu dikkat çekmektedir.

Çizelge 3. Seçilen türlerin inkübasyon süreleri ve gelişme sonrası pH düzeyleri.

Tür Adı	Yağsız sütte inkübasyon süresi(saat)	Gelişme sonrası pH	
		MRS Broth'ta	Yağsız sütte
<i>L. agilis</i> S23	48	3.75	5.20
<i>L. agilis</i> S51	21	3.65	4.45
<i>L. animalis</i> T5	24	4.00	4.80
<i>L. brevis</i> B21	120	4.00	5.10
<i>L. brevis</i> T14	120	4.00	5.40
<i>L. casei</i> 8B	21	3.90	5.60
<i>L. delbrueckii</i> T57	21	3.70	4.70
<i>L. delbrueckii</i> S11	47	3.70	5.10
<i>L. delbrueckii</i> S53	46	3.60	5.20
<i>L. fermentum</i> B1	48	4.00	5.40
<i>L. murinus</i> T62	42	3.90	4.30
<i>L. murinus</i> S9	43	3.70	4.70
<i>L. murinus</i> S56	24	3.70	5.10
<i>L. murinus</i> S59	42	3.70	4.25
<i>L. murinus</i> S67	21	3.60	4.40
<i>L. murinus</i> S75	43	3.65	4.65
<i>L. plantarum</i> S60	21	3.75	4.60
<i>L. plantarum</i> S78	21	3.70	4.50
<i>L. plantarum</i> T1	96	3.75	5.10
<i>L. reuteri</i> 5A	42	3.90	5.20
<i>L. reuteri</i> T20	264	4.00	5.30
<i>L. salivarius</i> 1B	42	3.90	5.20
<i>L. salivarius</i> 10A	192	3.90	5.30
<i>L. salivarius</i> 19	168	3.90	5.20
<i>L. vaccinostercus</i> T3	42	3.70	4.40

Proteolitik aktivite değerleri

Çizelge 4'ten de izleneceği gibi tanımlanan laktobasil türlerinin proteolitik aktivite düzeyleri 0.000 mg tirozin/5ml ile 0.412 mg tirozin/5ml arasında değişmektedir. En yüksek proteolitik aktivite *L. salivarius* 19'da gözlenirken bunu sırasıyla 0.398 mg tirozin/5ml ile *L. brevis* T14 ve 0.368 mg tirozin/5ml ile *L. plantarum* izlemiştir. *L. reuteri* T20 suşunun ise hiç proteolitik aktivite göstermediği belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre homofermentatif olan *L. animalis*, *L. delbrueckii* ve *L. salivarius* türlerinin ortalama 0.270 mg tirozin/5ml'ye eşdeğer proteoliz ürünü oluşturarak bu özellik bakımından heterofermentatif türlerden daha üstün olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca bu türlerin proteolitik aktiviteleri Aslım'ın (1994) tespit ettiği *L. bulgaricus* suşlarının proteolitik aktivitelerinden daha yüksek ancak,

Beyatlı ve Tunail'in (1991) izole ettikleri *L. bulgaricus* D4 ve *L. bulgaricus* D21 suşlarının oluşturdukları proteolitik aktiviteden daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4. Korbarsaktan izole edilen bazı laktobasil türlerinin proteolitik aktiviteleri ve laktik asit üretim değerleri.

Tür Adı	Proteolitik aktivite (mg tirozin/5 ml)	Laktik asit üretimi (mg/ml)
<i>L. agilis</i> S23	0.226	2.510
<i>L. agilis</i> S51	0.163	4.988
<i>L. animalis</i> T5	0.192	6.227
<i>L. brevis</i> B21	0.324	2.779
<i>L. brevis</i> T14	0.398	2.324
<i>L. casei</i> 8B	0.305	0.930
<i>L. delbrueckii</i> T57	0.233	5.608
<i>L. delbrueckii</i> S11	0.212	3.687
<i>L. delbrueckii</i> S53	0.221	3.150
<i>L. fermentum</i> B1	0.298	1.354
<i>L. murinus</i> T62	0.163	2.903
<i>L. murinus</i> S9	0.153	3.543
<i>L. murinus</i> S56	0.290	3.687
<i>L. murinus</i> S59	0.202	3.047
<i>L. murinus</i> S67	0.153	4.782
<i>L. murinus</i> S75	0.177	5.918
<i>L. plantarum</i> S60	0.224	5.298
<i>L. plantarum</i> S78	0.150	6.950
<i>L. plantarum</i> T1	0.368	3.543
<i>L. reuteri</i> 5A	0.177	3.592
<i>L. reuteri</i> T20	0.000	1.932
<i>L. salivarius</i> 1B	0.272	0.724
<i>L. salivarius</i> 10A	0.349	1.911
<i>L. salivarius</i> 19	0.412	2.531
<i>L. vaccinostercus</i> T3	0.185	2.727

- Harrigan, W.F. and M.E. McCance, 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, London and New York, 362 p.
- Juven, B.J., F. Schved and P. Lindner, 1992. Antagonistic Compounds Produced by Chicken Intestinal Strain of *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Protec., 55(3), 157-161.
- Kandler, O., Weiss, 1986. *Lactobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th Ed. Volume 2, P.H. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Hold, (Eds.), p. 1209-1234. Williams and Wilkins Publishers, Baltimore, MD.
- Karahan, A.G. 1992. *Streptococcus diacetilactis*'den Yüksek Düzeyde Diasetil Oluşturan Mutantların Eldesi ve Bunların Doğal Suşa Oranla Faj Duyarlılıklarının Belirlenmesi. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Ankara.
- Larsen, G.J., A. Rolow and C. Nelson, 1993. Research Note. The Effect of Organic Acids on Salmonella Contamination Originating from Mouse Fecal Pellets. Poultry Sci., 72:1797-1799.
- Lessards, M. and G.J. Brisson, 1987. Effect of a *Lactobacillus* Fermentation Product on Growth, Immune Response and Fecal Enzyme Activity in Weaned Pigs. Can. J. Anim. Sci., 67:509-516.
- Levy, S.B. 1987. Antibiotics Use for Growth Promotion in Animals :Ecologic and Public Health Consequences. J.Food Protec., 50 (7):616-620.
- Modler, H., R. McKellar, M. Yaguchi, 1990. *Bifidobacteria* and Bifidogenic Factors. Can. Inst. Food Sci. Technol. Journal., 23 (1) :29-41.
- Sakellaris, G. and P. Gikas, 1991. The Inductive Role of Casein on Proteinase Production from Lactobacilli. Biotechnology Letters, 13(3):217-222.
- Tannock, G.W. 1990. The Microecology of Lactobacilli Inhabiting the Gastrointestinal Tract. Adv. Microb. Ecol., 11:147-171.
- Tunail, N. 1978. Starter Olarak Kullanılan Laktik Asit Bakterileri ile Beyaz Peynirlerimizden İzole Edilen Bazı Bakterilerin Önemli Fizyolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi, A.Ü.Z.F. Ziraat Mikrobiyolojisi Kürsüsü, Ankara.
- Tunail, N., A. Gürsel, E. Ergül, A. Gürsoy, L.Y. Aydar, 1990. Fekal ve Laktik Streptokoklar ile Laktobasil İçeren Starter Kombinasyonlarının Beyaz Peynir Üretiminde Kullanılması. Ankara Üniv. Araştırma Fonu Proje No: 88-11-08-01. Ankara.
- Yorgancıoğlu, A. 1986. Salamura Beyaz Peynirlerinden N-Grup Streptokoklar ile D-Grup Fekal Streptokokların İzolasyonları, İdentifikasyonları ve Starter Olarak Önemli Özelliklerinin Araştırılması. A.Ü. Fen Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi, Ankara.