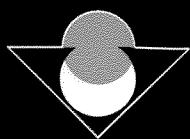


2003_ 222



TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

TARP

TÜRKİYE TARIMSAL ARAŞTIRMA PROJESİ

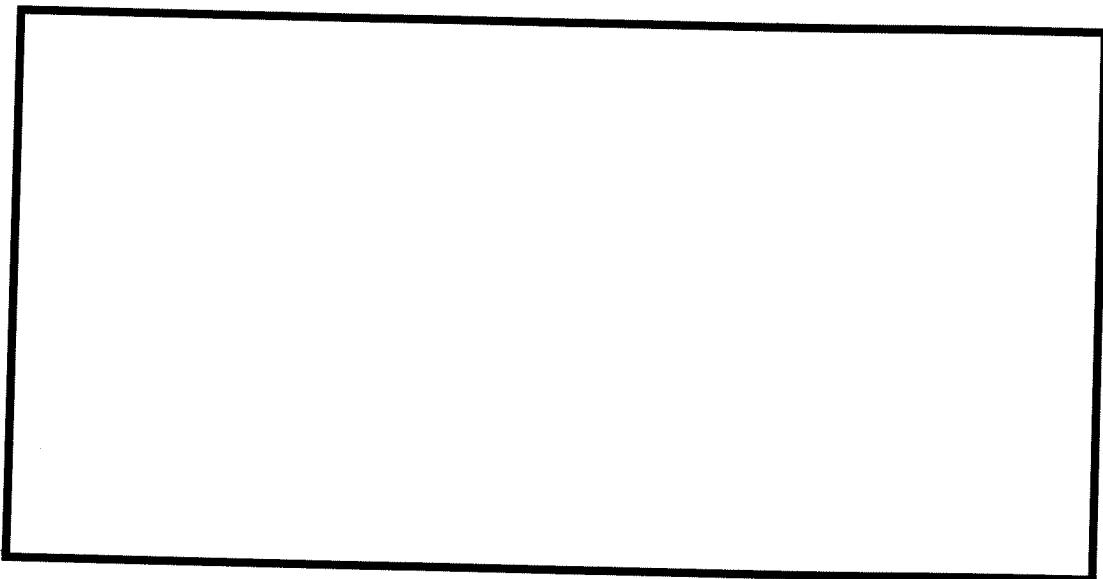
Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu
Agriculture Forestry and Food Technologies Research
Grant Committee

2003 - 222



**TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU**

**THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY**



**Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri
Araştırma Grubu**

**Agriculture, Forestry and Food Technologies Research
Grant Committee**

**ŞARAPLarda MALOLAKTİK FERMENTASYONDA
YER ALAN BAKTERİYOSİN ÜRETEN SUŞLARIN
TARANMASI**

PROJE NO:TOGTAG-2534

**DOÇ.DR. CANDAN GÜRAKAN
ARŞ.GÖR.DR.SEHUN YURDUGÜL
DR. ZİNET AYTANGA ÖKMEN**

**ŞUBAT 2002
ANKARA**

ÖNSÖZ

Çoğu kırmızı ve bazı beyaz şaraplar ‘ikincil fermentasyon’ olarak tanımlanan malolaktik fermentasyona, alkol fermentasyonu sırasında veya sonrasında maruz kalmaktadır, ve bu işlev şarap florasında bulunan laktik asit bakterilerince yürütülmektedir (Izuagbe, 1985; Renault, 1988; Giannakopoulos, 1984; Ribereau-Gayon, 1985) Malolaktik fermentasyon yolu ile şarapların mikrobiyal kararlılığı ve dolayısıyla organoleptik kompleksitesi artmaktadır. Ancak malolaktik bakterilerin fazla miktarda üremesi şarap ortamında istenmeyen bileşiklerin oluşmasını sağlamakta, bu da şarap üreticisi ve tüketicisine zarar vermektedir (Wibowo, 1988; Henick-Kling, 1989; Boulton, 1996). Bu nedenle şaraplarda malolaktik fermentasyonun kontrolü gündeme gelmiş, ancak bu kontrol işlemi sırasında sıkılıkla kullanılan yöntemler de tüketici sağlığına zarar verirken üreticilerin de maddi kayıplara uğramasına neden olmuştur (Daeschel, 1991; Vidal-Carou, 1991; Boulton, 1996; Gerbaux, 1997). Bu projede şarapların kendi florasından laktik asit bakterileri izole edilmiş, bu bakteriler, tüketiciye ve şarabın organoleptik kalitesine hiçbir ölçüde zarar vermeyecek ‘bakteriosin’ olarak adlandırılan mikrobiyal inhibitör veya inhibitörleri üretip üretmedikleri yönünden taranmış, en yüksek kapasitede mikrobiyal inhibisyon gösteren bir izolat (W3- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*) üzerinde bakteriosin üretip üretmediği çalışılmıştır. Bu izolattan 32000 Da molekül ağırlığına sahip bakteriosin benzeri bir inhibitör(BBI) elde edilmiş ve model şarap ortamına bakteriosin benzeri bir inhibitör (BBI) ekleneerek malolaktik fermentasyon kontrol edilmiştir. Bu çalışma 01. 02. 2000 tarihinde başlatılmış ve TÜBİTAK-TOGTAG tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	3
İÇİNDEKİLER	4
TABLO LİSTESİ	5
ŞEKİL LİSTESİ.....	6
ÖZET	7
ABSTRACT.....	7
GİRİŞ.....	8
DENEYSEL.....	8
SONUÇ	20
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	20
BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU.....	22

TABLO LİSTESİ

TABLO-1 İzole edilen Mikroorganizmaların Karakterizasyon Tablosu.....	10
TABLO-2 İzole edilen Mikroorganizmaların Karakterizasyon Tablosu(Glukozdan gaz üretim ve çeşitli sıcaklıklarda büyütme testleri).....	10
TABLO-3 W3 (<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>) Kökenli İnhibitor'e İzole Edilen 16 Laktik Asit Bakterisinin Duyarlılığı.....	12
TABLO-4 Model şarap ortamının bileşimi.....	17
TABLO-5 Model şarap ortamında inhibitörlerin eklenmesi ile oluşan % malik asit ve % laktik asit değişimleri.....	18

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 W3 (<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris</i>) 30° C ve 37° C'de üreme eğrisi	11
Şekil 2 W3 (<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris</i>) için oda sıcaklığında üreme eğrisi	11
Şekil-3 W3 (<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>)'ten elde edilen bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın bir başka indikatör bakteri olan W7'ye (<i>Lactobacillus fructivorans</i>) olan inhibitör etkisi (Farklı sıcaklık değerlerinde değişik zaman aralıklarında elde edilen ekstraktlara göre).....	13
Şekil-4 Elde edilen bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın 100°C sıcaklıkta gösterdiği kararlılığın disk difüzyon yöntemi yardımıyla ifadesi.....	13
Şekil-5 Elde edilen bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın dondurma-kurutma yolu ile konsantre edilip konsantre edilen miktara karşılık eşdeğer sulandırılan örneği (FD) ile dondurma kurutma uygulanmayan örneğin (NFD) karşılaştırılması.....	14
Şekil. 6. Poliakrilamid jelde yürütülmüş inhibitörün, eşit büyülüklükte kesilen jellerin baget ile steril distile su içerisinde ezilerek elde edilen süspansiyondan 5µL 'lik bir miktarının, steril filtre kağıtları üzerine eklenerken MRS agar üzerinde yayma plak tekniği ile 30 C'de büyütülmüş <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> (W6) üstünde aktivitesi.....	14
Şekil 7. SDS-PAGE analizi ile inhibitörün molekül ağırlığının tayini.....	15
Şekil 8. Sephadex G-100 jel kromatografi yöntemi ile inhibitörün eldesi.....	16
Şekil 9. Bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın zamana karşı W6- <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> üzerine inhibisyonu	16
Şekil 10. Malolaktik dönüşümü yapan suş (<i>Lactobacillus delbrueckii subsp.delbrueckii</i>)'nin model şarap ortamında üreme eğrisi ve pH grafiği	17
Şekil 11. Nisin ilave edilmiş model şarap ortamında malolaktik dönüşümü yapan suş (<i>Lactobacillus delbrueckii subsp.delbrueckii</i>)'nin üreme eğrisi ve pH grafiği.....	18
Şekil 12. Bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın ilave edildiği model şarap ortamında malolaktik dönüşümü yapan suş (<i>Lactobacillus delbrueckii subsp.delbrueckii</i>)'nin üreme eğrisi ve pH grafiği.....	19
Şekil 13. Nisin ve bakteriyosin benzeri bir inhibitör(BBI)'nın birlikte ilave edildiği model şarap ortamında malolaktik dönüşümü yapan suş (<i>Lactobacillus delbrueckii subsp.delbrueckii</i>)'nin üreme eğrisi ve pH grafiği	19

ÖZET

Malolaktik fermentasyon, laktik asit bakterilerince alkolik fermentasyondan sonra yürütülen ikinci bir şarap fermentasyonu işlevidir ve çoğu kırmızı ve bazı beyaz şaraplarda istenmektedir. Bu işlev, malat karboksilaz (EC 1.1.1.39) olarak anılan bir enzim yardımıyla L-malik asidin, L-laktik aside çevrimi ile yürütülür. Malolaktik fermentasyon işlevi, kontrolü sağlandığında arzulanmaktadır, ancak bozunmaya yol açan bakterilerin çoğalması oluştuğunda, şarap üreticileri ve tüketicileri açısından istenmeyen bir sonuç olarak görülmektedir. 120 adet suş, aynı şaraplardan izole edilen laktik asit bakterileri üzerinde, inhibe edici etki için taranmıştır. Bunların 16 adedi inhibitör üreten olarak tanımlanmıştır. Bu suşlar karakterize edilmiş ve *Lactobacillus delbrueckii subsp.delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris* ve *Lactobacillus fructivorans* olarak tanımlanmıştır. İzolatlardan biri üzerinde (*Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*) bakteriyosin üretim potansiyeli çalışılmıştır. Bazı büyümeye çalışmaları yolu ile inhibitör aktivite gözlemlenmeye devam edilmiş ve inhibitörün sentezi optimize edilmiştir. Elde edilen bakteriyosin benzeri inhibitörün molekül ağırlığı yaklaşık 32,000 Da olarak belirlenmiş olup sentezinin plazmid bağlantılı olmadığı saptanmıştır. Malolaktik fermentasyonu kontrol için, malolaktik fermentasyon yapabilen bir *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* suşu üzerinde deneyler yapılmış ve elde edilen bakteriyosin benzeri inhibitörün, malolaktik fermentasyonu kontrol ettiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyosin, Laktik Asit Bakterileri, Şarap, Malolaktik Fermentasyon.

ABSTRACT

Malolactic fermentation is the secondary wine fermentation process, accomplished by the lactic acid bacteria after the alcoholic fermentation, and it is desired in most red wines and some of the white ones. This process is carried out by the conversion of L-malic acid into L-lactic acid via the help of an enzyme called malate carboxylase (EC 1.1.1.39). Malolactic fermentation is desirable if the control of due process is achieved, but when spoilage of the predominating bacteria arises, malolactic fermentation is considered as an undesirable phenomena from the producers' and consumers' point of view. In this study a bacteriocin like inhibitor(s) producers were isolated from the native wine flora. 120 isolates were screened for the inhibitory action on isolated lactic acid strains of the same wines. 16 of them were found to produce inhibitors. These strains were characterized and identified as *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* and *Lactobacillus fructivorans*. On one of isolates (*Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris*) the bacteriocin production potential was studied. The inhibitory activity was further monitored throughout some growth studies and the synthesis of the inhibitor was optimized. It was found that the molecular weight of the bacteriocin-like inhibitor was approximately 32,000 Da and the synthesis was not plasmid-linked. Experiments were performed to control malolactic fermentation on an isolate of *Lactobacillus delbrueckii subsp.delbrueckii* which is able to carry out malolactic fermentation process and it was observed that the obtained bacteriocin-like inhibitor was able to control malolactic fermentation.

Keywords: Bacteriocin, Lactic Acid Bacteria,Wine, Malolactic Fermentation.

GİRİŞ

Malolaktik bakterilerin kontrolü, günümüz şarap üretim teknolojisinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Malolaktik bakterilerin şaraplarda fazla miktarda üremesi mikrobiyal bozunmayı kolaylaştırmaktadır (Daeschel, 1991; Vidal-Carou, 1991; Boulton, 1996). Kontrol yöntemi olarak doğal şarap ortamındaki laktik asit bakterilerini ortamdan elimine etmek için pH'ın 3.0'ın altına düşürülmesi, yüksek bir etanol konsantrasyonu ($>\%15$) veya yüksek bir sülfürdioksit düzeyi kullanımı ($>50 \text{ mg/ml}$) gibi çeşitli alternatiflerin denenmesi genelde piyasada mevcut şaraplar için hiçbir zaman arzulanan metodlar olarak görülmemiştir (Radler, 1990; Daeschel, 1991; Boulton, 1996). Şarap malolaktik bakterileri laboratuvar koşulları ve şirada 'nisin' olarak adlandırılan, protein yapıda bakterisidal etkiye sahip, gr(+) bakterilere etkin olup gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan, yine bir laktik asit bakterisi olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen bakteriyosinler tarafından inhibe edilmektedir (Radler, 1990; Daeschel, 1991; Boulton, 1996). Ancak nisin, ticari preparat olarak kolayca temin edilebilir olmasına rağmen maliyet olarak üreticiye ve dolaylı olarak tüketiciye yük getirmektedir. Ayrıca malolaktik fermentasyonu başlamadan, tamamen inhibe etmesi yüzünden şarabın kendi doğal tadına etki edebilecek diasetil ve asetoin gibi maddelerin sentezlerinin engellenmesi nisin kullanımını kontrol açısından uzaklaştırmıştır (Radler, 1990; Boulton, 1996). Bu çalışmada şarap mikroflorasından doğal olarak izole edilen bir sustan, farklı bir inhibitör maddenin, sözü edilen bozunmaya yol açan bakterilere karşı etkisi incelemiş ve bu bakteriyosin benzeri inhibitör madde (BBI) sözü geçen bakterilere karşı etkili bulunmuştur. Bunun yanısıra şaraplarda malolaktik fermentasyon yoluyla kontrollsüz bir şekilde ortaya çıkan diasetil bileşiginin sentezi de tamamen inhibe edilmeden şaraplarda kontrol sağlanmıştır.

DENEYSEL

Bu proje kapsamında, şaraplarda malolaktik fermentasyonu kontrol edebilmek amacıyla şarap ortamından izole edilen laktik asit bakterilerinden bakteriyosin(lerin) eldesi planlanmış olup elde edilecek bakteriyosinlerin şaraplara doğrudan ilavesi ile malolaktik fermentasyonun arzulanan düzeye olması kontrol altında tutulmuş ve bu yolla şarap ortamda laktik asit bakterilerinin aşırı çoğalarak istenmeyen tad oluşumuna sebep olması önlenecektir.

İlk aşamada Kavaklıdere Şarapları A.Ş.'den temin edilen 1998 ve 1999 ürünü beyaz ve kırmızı şaraplardan mikroorganizmaların izolasyonu yapılmış, bunun ardından seri dilüsyonlardan alınan numune MRS agar (OXOID) üzerinde çoğaltılmış ve 30°C 'de 24 saatlik inkübasyon sonrası farklı olduğu varsayılan 120 adet koloni seçilmiş ve bunların morfolojik tanıları yapılmıştır. 120 adet koloni daha sonra yine MRS agar(OXOID) üzerinde steril kürdan uçları yoluyla birbirleri ile çapraz inhibisyon tabi tutulmuştur. İnhibe ettiğleri bakteri sayısına göre 120 adet bakterinin inhibisyon potansiyeli %5 ile %41 arasında değişmekte olduğundan bu bakterilerden %15'ten aşağı inhibisyon gösteren 32 adedi elimine edilmiş, deneylerin daha ilerdeki aşamalarında kullanılmak üzere 88 adedi seçilmiştir. Bu bakteriler köken aldığı kırmızı veya beyaz şarap temel alınarak kodlandırılmıştır. (R1,R2....=kırmızı, W1,W2....=beyaz v.s.)

TABLO-1

Kolonilerin laktik asit bakterisi olup olmadığını belirlemesi amacıyla hareket testleri, Gram boyama, spor boyama, katalaz testi, heterofermentatif-homofermentatif ayırmı testi, çeşitli sıcaklıklarda büyümeye testleri, arjinin ve nitrat indirgeme testleri uygulanmış ve daha sonrasında da API CHL 50 tanı kitleri ile mikroorganizmaların tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta 88 adet olan koloniler, laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında temel nitelik sağlayan Gram(+), spor boyama testine negatif cevap ve katalaz(-) özelliğin belirlenmesiyle 16 bakteriye inmiştir. Bu 16 adet bakteri daha sonra sözü edilen diğer testlerle tanımlanmıştır. Tanımlanan mikroorganizmaların kod numaraları, isimleri ve testlere verdiği cevaplar Tablo-1 ve Tablo-2'de verilmiştir (Schillinger, 1987; Davis, 1988).

İzole edilen ve tanımlanan mikroorganizmalar arasında en yüksek yüzdede ve en iyi çapta (7 mm) zon yapabilen bir koloni (*W3- Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*) bakteriyosin eldesi için seçilmiştir. Mikroorganizmanın bakteriyosin veya hidrojen peroksit sentezleyip sentezlemediğini test etmek amacıyla öncelikle mikroorganizmanın zon oluşturma deneyi MRS agar (OXOID) kullanılarak anaerobik ortam şartlarında(Gas Pak,BBL) tekrarlanmıştır. Bileşigin bakteriyosin olup olmadığı tam bir saflaştırma ve tam bir karakterizasyon ile kesinlik kazanmadından bakteriyosin benzeri inhibitör (BBI) olarak adlandırılmıştır. BBI üreten mikroorganizma daha sonra MRS broth (OXOID) içinde 24 saat 30°C'de inkübe edilmiş ve %5'lük kültür ortamı MRS broth içeren tüplere aktarılıp yoluyla 24 saat büyütülmüştür (Lewus,1991).

W3'ün (Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 24'üncü saatlerde numune almak yolu ile üreme eğrisi çıkarılmıştır (30 °C ve 37° C). Numuneler daha sonra 5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası numuneler steril filtreler (MFS) kullanılarak yolu ile mikrofiltrasyon işlemine tabi tutulmuş, bu yolla bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI) kısmi düzeyde konsantre edilerek steril disk difüzyon yöntemi ile aktivitesine bakılmıştır. Sözlü edilen steril disk difüzyon yöntemi ile, elde edilen 16 mikroorganizma üzerinde duyarlılık (sensitivite) testi yapılarak aktivitenin 5. saat sonrasında ortaya çıktıgı belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın +4°C deki saklama şartlarında 30 gün aktiviteyi muhafaza ettiği de görülmüştür. 30°C ve 37° C için çıkarılan üreme eğrisinin yanısıra oda sıcaklığında da üreme eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 2) (Lewus, 1991).

Üç farklı sıcaklıkta yapılan mikroorganizma üretimi sonucunda bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın aktivitesi, şaraplardan izole edilen 16 izolatta denenmiş, aktivitenin en fazla 30° C'de büyüyen izolatta (*W3*) saptanmıştır. Denenen tüm sıcaklıklarda büyümeye ortamının pH'sı 2 N NaOH (Merck) kullanılarak sabit hale getirilmiştir. Elde edilen BBI aktivitesi steril disk difüzyon yöntemi ile yapılan sensitivite testinde milimetre cinsinden en yüksek inhibisyon değerini 5. saatin sonu ile 8. saatin başlangıcında elde edilen numunelerde vermektedir (Şekil 3). 30°C'de etkin olan BBI'ye duyarlı ve duysuz olan suşlar Tablo-3'de verilmiştir.

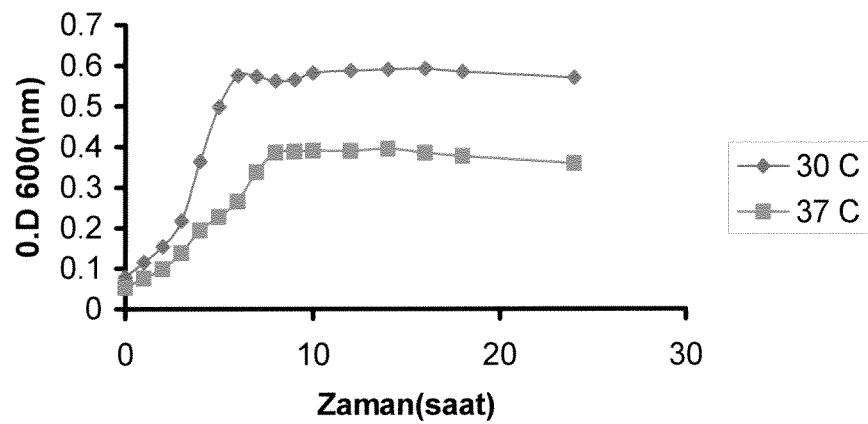
Bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın karakterizasyon işlemleri için öncelikle elde edilen inhibitörün hangi pH'da daha etkin bir aktivite gösterdiği araştırılmış, bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'yı üreten suş 30 ° C'de yine MRS broth sıvı

TABLO-1
İzole edilen Mikroorganizmaların Karakterizasyon Tablosu

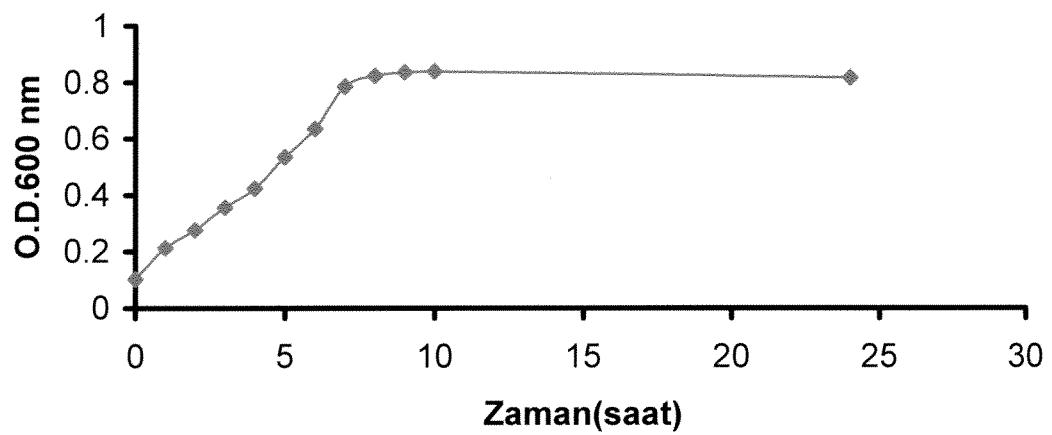
Mikroorganizma Kod adı ve Kit Sonuç adı	Gram +/-	Spor oluşumu	Katalaz testi	Hareket	Arjinin kullanımı	Nitrat İndirgeme
R10,R23,R29, R22,R35,R37, W22,W6, R13 <i>Lactobacillus delbrueckii delb.</i>	+	-	-	-	+	-
R41, R50, R43, R55, R44, W3 <i>Leuconostoc mesenterioides subsp. cremoris</i>	+	-	-	-	-	-
W7 <i>Lactobacillus fructivorans</i>	+	-	-	-	+	-

TABLO-2
**İzole edilen Mikroorganizmaların Karakterizasyon Tablosu (Glukozdan gaz üretim ve çeşitli
sıcaklıklarda büyümeye testleri)**

Mikroorganizma Kod adı ve Kit Sonuç adı	Glukozdan Gaz üretim testi	4°C	15°C	30°C	37°C	45°C
R10,R23,R29,R22,R35,R37,W22, W6, R13 (<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>)	Heteroferm.	+	+	+	+	+
R41, R50, R43, R55, R44, W3 <i>Leuconostoc mesenterioides subsp. cremoris</i>	Heteroferm.	+	+	+	-	-
W7 <i>Lactobacillus fructivorans</i>	Heteroferm.	+	+	+	+	-



Şekil 1- W3 (*Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris*) 30° C ve 37° C'de üreme eğrisi.



Şekil 2-W3 (*Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris*) için oda sıcaklığında üreme eğrisi.

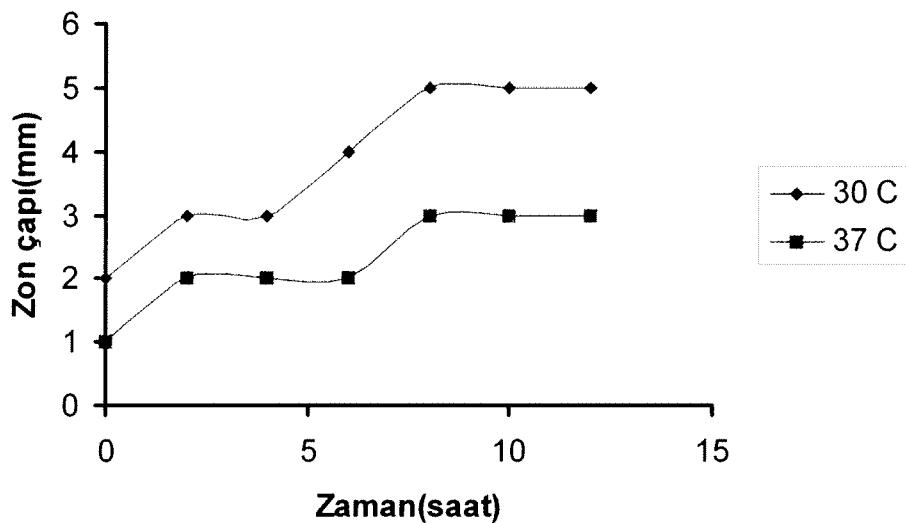
besiyeri (OXOID) içerisinde büyütüllererek santrifüj edilmiş, santrifüjlenen kısmın pH'sı her bir pH değeri için 100'er mL olmak koşuluyla sırasıyla pH=2, pH=3, pH=4, pH=5 değerlerine 1 N HCl (Merck) ile ayarlanmış, yine her bir pH değeri için 100'er mL olmak koşuluyla santrifüjlenen kısmın pH'sı pH=6, pH=7, pH=8, pH=9 ve pH=10 değerlerine ayarlanmıştır. Daha sonra numuneler 0.45 µ'luk steril filtreler yardımıyla mikrofiltrasyona tabi tutulmuş ve bakteriosin benzeri bir inhibitör (BBI) aktivitesi steril disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. İnceleme sonucunda bakteriosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın asidik pH derecelerinde, özellikle pH=2 ve pH=3'te en etkin inhibisyonu indikatör bakterilerde gösterdiği saptanmıştır. Bakteriosin benzeri bir inhibitör(BBI) üreten mikroorganizma'ının büyümeye ortamı pH'sının da aynı değerlere ayarlandığında pH=2 ve 30 °C'de büyütünen W3 en iyi inhibisyonu ulaşmaktadır (Schved, 1993).

Yüksek sıcaklık değerlerinde bakteriosin benzeri bir inhibitör (BBI) stabilitesi incelenmiş, 80° C ve 100° C'de çeşitli sürelerde (5 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 20 dakika) tutulan bakteriosin benzeri bir inhibitör (BBI) daha sonra aktivitesinin olup olmadığını anlaşılabilmek için steril disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. İnceleme sonucunda, bakteriosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın 100° C gibi yüksek bir sıcaklıkta 20 dakika tutulması sonucu bakteriosin benzeri bir inhibitör (BBI) aktivitesinin yüksek sıcaklıkta kararlılığını muhafaza ettiği anlaşılmıştır (Şekil 4) (Schved, 1993)

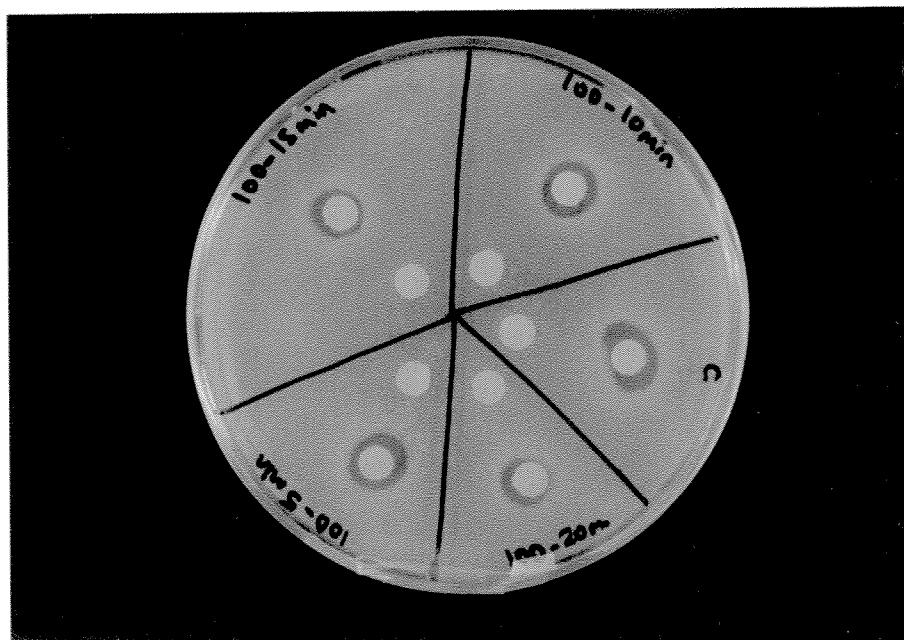
Elde edilen bakteriosin benzeri bir inhibitör (BBI)'dan bol miktarda (3 litre) MRS broth sıvı besiyeri (pH=2) içerisinde % 5 kültür (*W3-Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris*) eklenerek santrifüj ve mikrofiltrasyon uygulamak suretiyle elde edilmiş, elde edilen ekstrakt %10 yağı alınmış steril süt tozu ve % 1 laktoz ilave edilerek dondurma-kurutma (freeze-drying) muamelesi görmüştür. Dondurulup kurutulan örneklerden alınan belirli miktarlar, karşılık gelen eşdeğer miktarlara göre sulandırılmış ve steril disk difüzyon yönteminde aktivite tayin edilmiştir (Şekil 5).

TABLO-3
W3(*Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris*) Kökenli İnhibitor'e İzole Edilen 16 Laktik Asit Bakterisinin Duyarlılığı

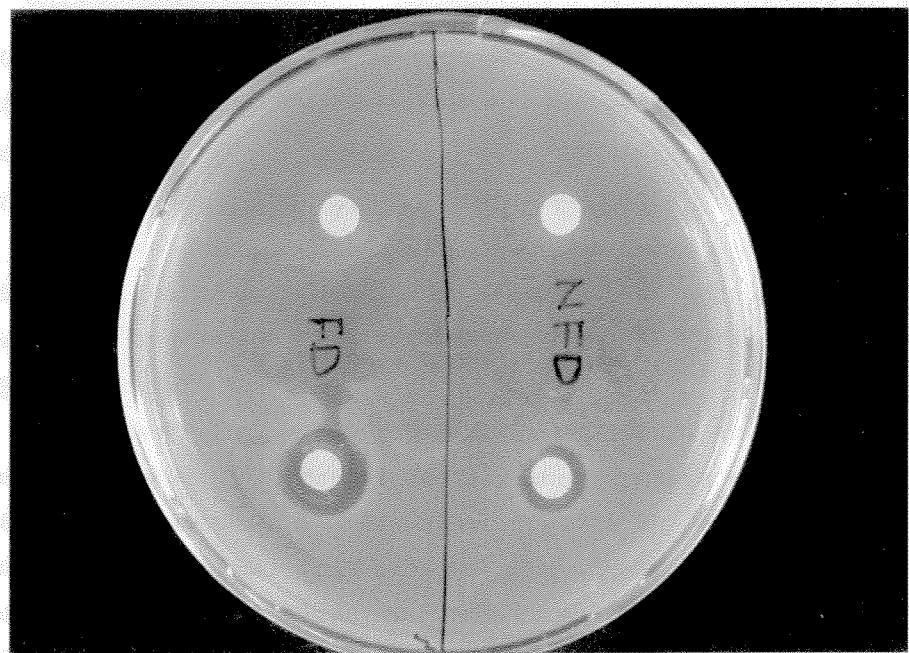
Duyarlı Mikroorganizmalar	Duyarlık Düzeyi	İnhibe Edilmeyenler
R22- <i>Lb.fructivorans</i>	++	R41 <i>Lc.mesenteroides s.cr.</i>
R29 <i>Lb.delbruecki delbruecki</i>	+++	W3 <i>Lc.mesenteroides s.cr.</i>
R35 <i>Lb.delbruecki delbruecki</i>	+++	R43 <i>Lc.mesenteroides s.cr.</i>
R37 <i>Lb.delbruecki delbruecki</i>	++	R55 <i>Lc.mesenteroides s.cr.</i>
W6 <i>Lb.delbruecki delbruecki</i>	++++	R10 <i>Lb.delbruecki delbruecki</i>
W7 <i>Lb.delbruecki delbruecki</i>	++++	
W22 <i>Lb.delbruecki delbruecki</i>	++++	
R44 <i>Lc.mesenteroides s.cr.</i>	+++	
R50 <i>Lc.mesenteroides s.cr.</i>	++	
R13 <i>Lb.delbruecki delbruecki</i>	++	
R23 <i>Lb.delbruecki delbruecki</i>	+++	



Şekil-3 W3 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*)'ten elde edilen BBI'nın bir başka indikatör bakteri olan W7'ye (*Lactobacillus fructivorans*) olan inhibitör etkisi (Farklı sıcaklık değerlerinde değişik zaman aralıklarında elde edilen ekstraktlara göre).



Şekil-4 Elde edilen bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nin 100°C sıcaklığında gösterdiği kararlılığın disk difüzyon yöntemi yardımıyla ifadesi (C:kontrol, 100-5 min:5 dakika muamele, 100-10 min:10 dakika muamele, 100-15 min:15 dakika muamele, 100-20 min:20 dakika muamele) (İndikatör mikroorganizma: W6 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) Merkeze doğru yerleştirilen disklere inhibitör eklenmemiştir vebunlar da kontrol amaçlıdır.



Şekil-5 Elde edilen bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın dondurma-kurutma yolu ile konsantr edilip konsantr edilen miktara karşılık eşdeğer sulandırılan örneği (FD) ile dondurma kurutma uygulanmayan örneğin (NFD) karşılaştırılması (Şekil 4 ve 5 'teki petrilerin merkezine doğru yerleştirilmiş ve çevresinde zon gözlenmeyen filtre kağıtları kontrol amaçlı olarak yerleştirilmiştir).

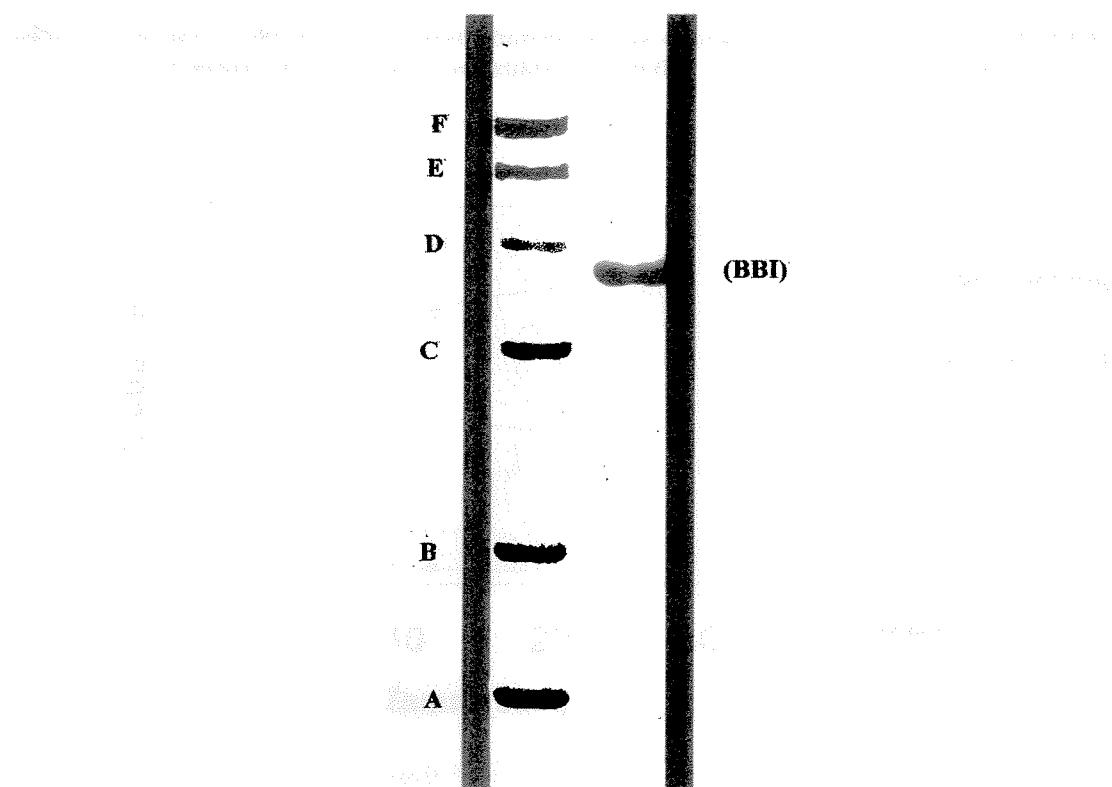


Şekil. 6. Poliakrilamid jelde yürütülmüş inhibitörün, eşit büyüklükte kesilen jellerin baget ile steril distile su içerisinde ezilerek elde edilen süspansiyondan 5 μ L 'lik bir miktarının, steril filtre kağıtları üzerine eklenerek MRS agar üzerinde yayma plak tekniği ile 30 C'de büyütülmüş *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (W6) üstünde aktivitesinin gözlenmesi.

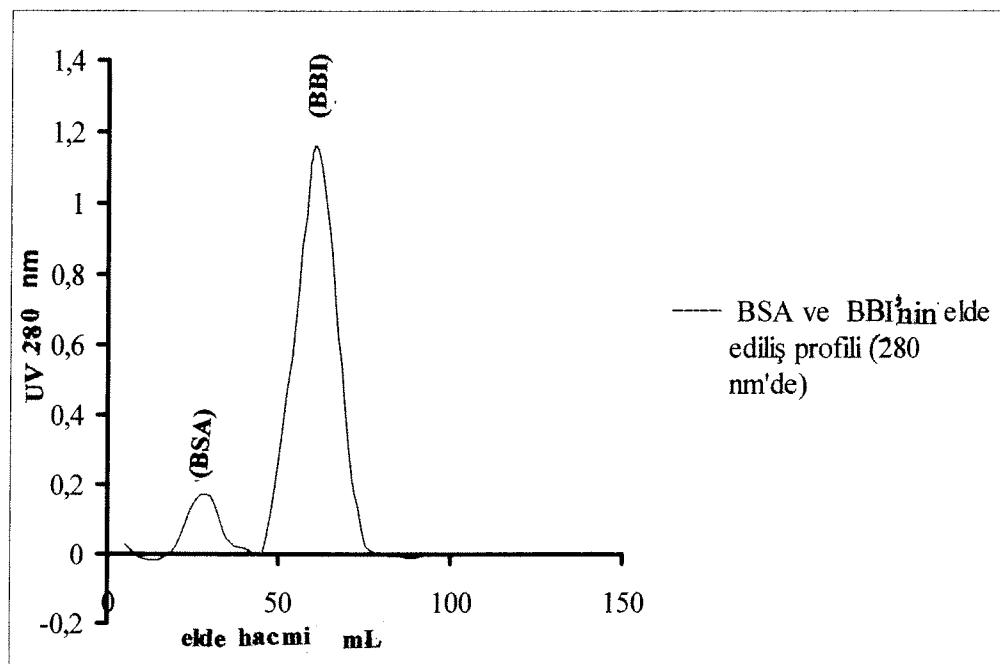
Daha sonraki karakterizasyon çalışmalarında, dondurup kurutulmuş bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın yaklaşık olarak poliakrilamid jelde katettiği mesafe bulunmuş ve jelin hangi bölgesinde indikatör mikroorganizmayı inhibe edici aktiviteye sahip olduğu, eşit uzunlukta kesilen jel parçacıklarının, indikatör mikroorganizma yayılmış MRS agar üzerine yerleştirilerek 30°C'de 24 saatlik inkübasyonu ile tesbit edilmiştir (Şekil 6) (Bozoğlu,1982).

Bu işlemler sonrasında SDS-PAGE yöntemi ile bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın molekül ağırlığı belirlenmiştir. İnhibitörün molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32.000 Da olarak saptanmıştır ve bu Sephadex jel kromatografisi yöntemi ile doğrulanmıştır (Şekil 7 ve Şekil 8) (Bozoğlu,1982; Schved,1993).

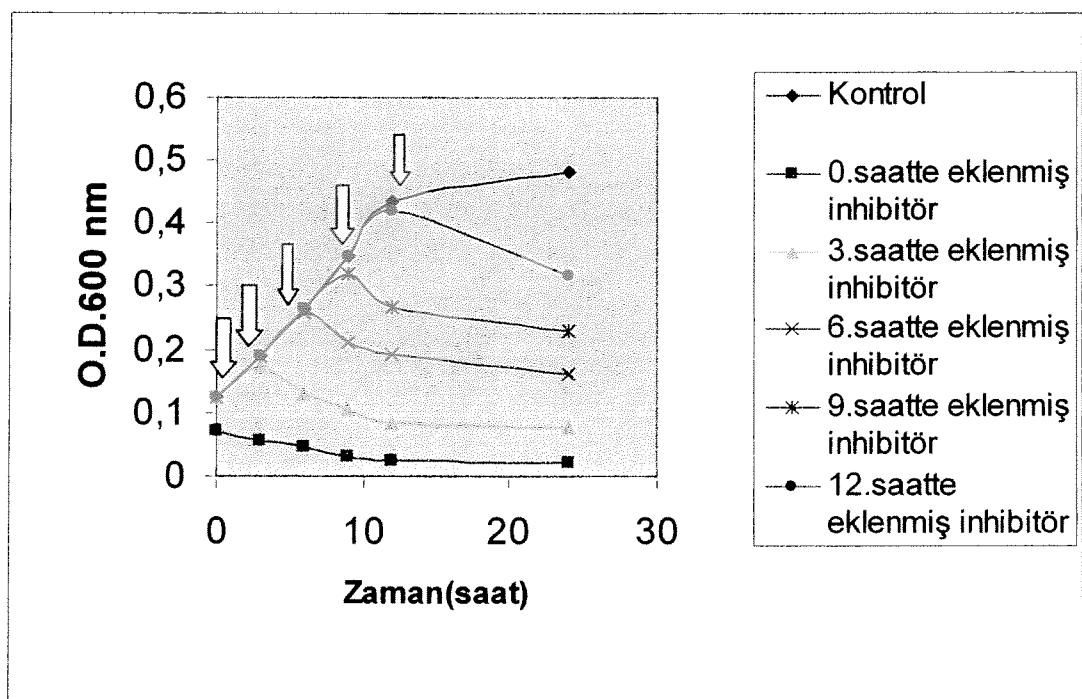
Bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın plazmid bağımlı olup olmadığıının belirlenmesi için lambda faj DNA'sı Pst1 marker'ı ile karşılaştırma yapılmış ve inhibitör sentezinin plazmid bağımlı olmadığı saptanmıştır. Bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın biyokimyasal karakterizasyonunun yanısıra etki gösterdiği mikroorganizmaların tıremesi üzerine etkisi, bu mikroorganizmalara çeşitli saatlerde bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI) ilavesi yolu ile çalışılmış ve inhibisyon gözlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 7. SDS-PAGE analizi ile inhibitörün molekül ağırlığının tayini. İnhibitör molekül ağırlığı 32.000 Da olup standartların molekül ağırlığı, sırasıyla: A) Lysozyme(14,300 Da) B)Lactoglobulin (18,400 Da) C)Trypsinogen (24,000 Da) D) Pepsin (34,700 Da) E) Albumin,Egg (45,000 Da) F) Albumin,Bovine (66,000 Da)



Şekil 8. Sephadex G-100 jel kromatografi yöntemi ile bakteriyosin benzeri bir inhibitör'ün (BBI) Bovine serum albumin(BSA) ile birlikte elde edilen profili.

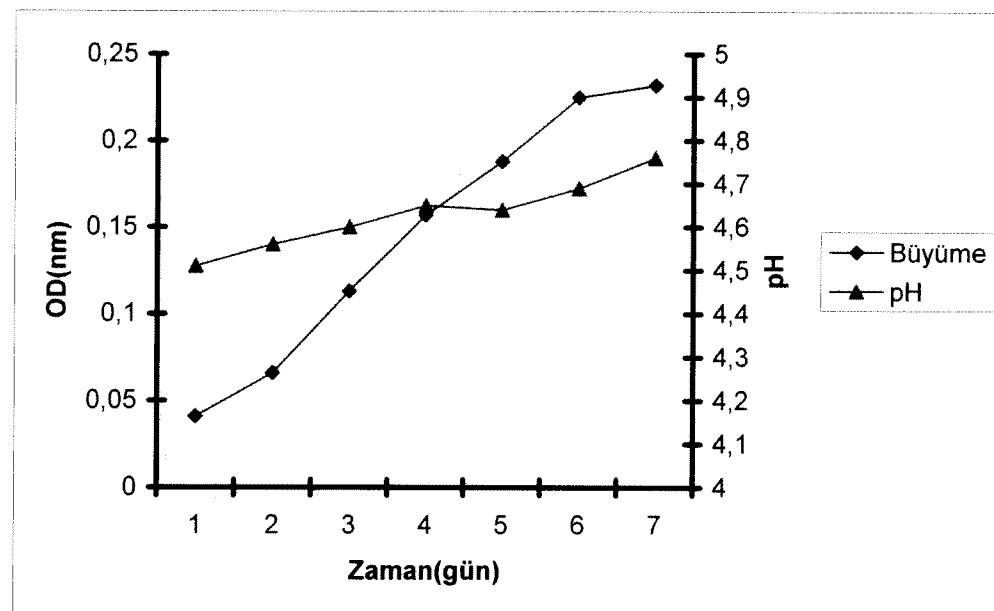


Şekil 9. Bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI) zamana karşı *W6-Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* üzerine inhibisyonu(Oklar inhibitorün ilave zamanını gösterir).

Bakteriyosin benzeri bir inhibitör (BBI)'nın malolaktik fermentasyonu kontrol edip etmediğinin araştırılması için, öncelikli olarak eldeki üç farklı suşun malolaktik dönüşümü yapıp yapmadığı araştırılmış, bu amaçla model şarap ortamı hazırlanmış(Tablo 4) ve üç farklı suş 6 günlük bir süre içerisinde bu ortamda büyütülmüştür. Bu suşlardan sadece *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 'nin malolaktik dönüşümü yaptığı, ortamdaki toplam malik asit ve toplam laktik asitin HPLC kullanılarak ölçümü ile belirlenmiştir. Ayrıca gaz kromatografisi yöntemi ile suşun model şarap ortamında diasetil ürettiği de belirlenmiştir. Bunların dışında malolaktik dönüşümü yapan suşun, model şarap ortamında pH ve büyümeye eğrisi çıkarılmıştır(Şekil 10) (Cox,1990; Nielsen, 1999).

Tablo-4 Model şarap ortamının bileşimi

Erlen No.	Erlendeki Bileşim
1	0.2 g / 100mL malik asit (MERCK) , 10 μ M NAD ⁺ (MERCK), 100 μ M MnSO ₄ (PANREAC), 80 mL MRS broth (MERCK), 10 mL steril üzüm suyu 9.9 mL kültür(W6), 100 IU nisin (SIGMA)
2	0.2 g / 100mL malik asit (MERCK) , 10 μ M NAD ⁺ (MERCK), 100 μ M MnSO ₄ (PANREAC), 80 mL MRS broth (MERCK), 10 mL steril üzüm suyu 9.9 mL kültür(W6), 0.1 mL BBI (50 mg / mL)
3	0.2 g / 100mL malik asit (MERCK) , 10 μ M NAD ⁺ (MERCK), 100 μ M MnSO ₄ (PANREAC), 80 mL MRS broth (MERCK), 10 mL steril üzüm suyu 9.9 mL kültür(W6), 0.05 mL BBI (50 mg / mL) + 0.05 mL 100 IU nisin
KONTROL	0.2 g / 100mL malik asit (MERCK) , 10 μ M NAD ⁺ (MERCK), 100 μ M MnSO ₄ (PANREAC), 80 mL MRS broth (MERCK), 10 mL steril üzüm suyu 9.9 mL kültür(W6), 0.1 mL steril distile su

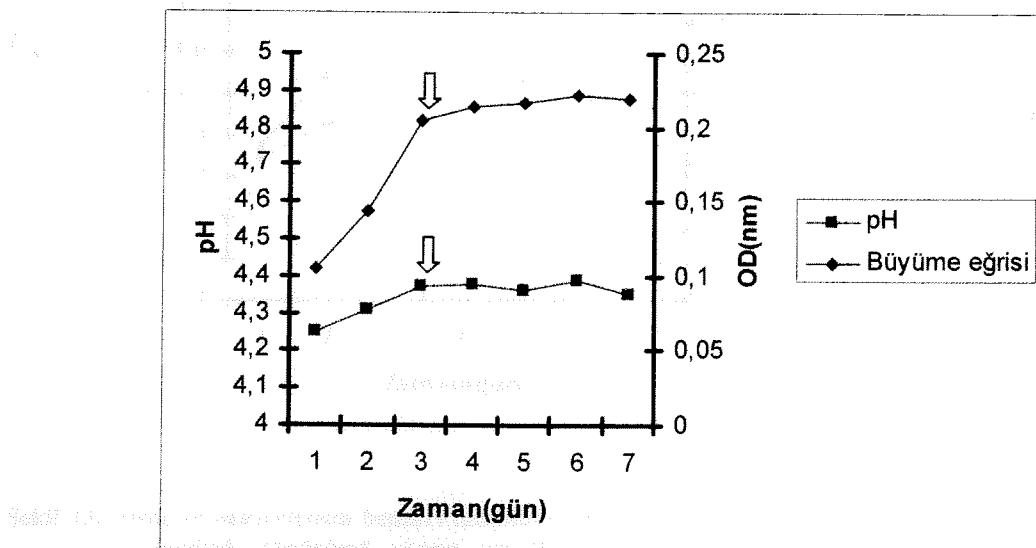


Şekil 10. Malolaktik dönüşümü yapan suş (*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*delbrueckii*)'nın model şarap ortamında üreme eğrisi ve pH grafiği.

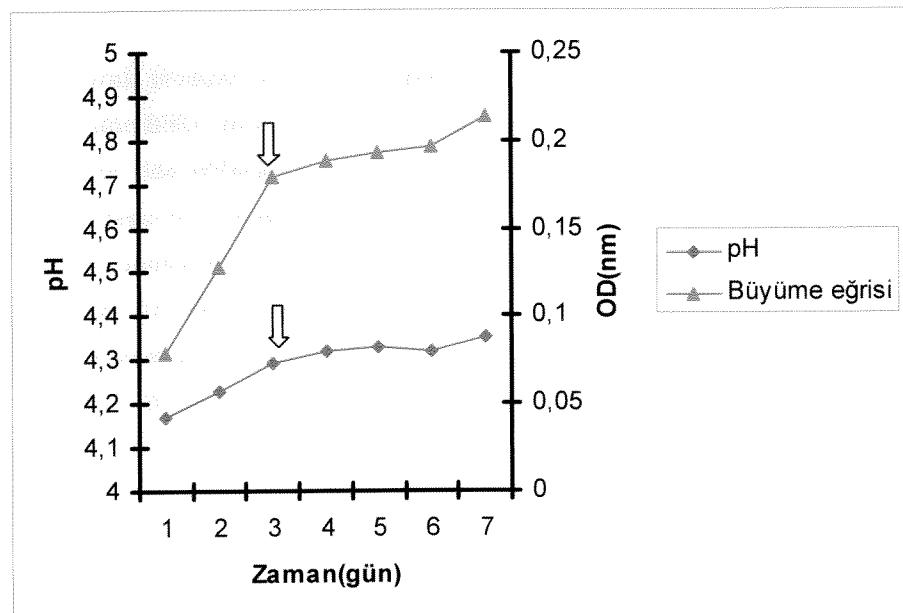
Bir sonraki aşamada malolaktik dönüşümü yapan suşa, belirli dozarda nisin, W3-*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*'ten elde edilen bakteriyosin benzeri inhibitör (BBI) ve her iki antimikroiyal maddenin kombinasyonu uygulanmış ve malolaktik fermentasyonun başlangıç anında bakteriyosin benzeri inhibitör BBI'nin, nisin'in ve kombine olarak nisin ve bakteriyosin benzeri inhibitör (BBI) karışımının şarap ortamına ilavesinden sonra malolaktik dönüşümün gerçekleşmediği, bu yolla inhibitörün malolaktik fermentasyonu kontrol edebildiği yüksek basınçlı sıvı kromatografisi'nde (HPLC) toplam malik ve toplam laktik asit ölçümü yapılarak gözlenmiştir. Uygulamalar sonucunda ortaya çıkan ortamdaki malik ve laktik asit değerleri yüzde olarak ifade edilerek Tablo-5'de verilmiştir. Bununla beraber ilgili inhibitörlerin ilavesi sonucunda model şarap ortamında bulunan bakterinin üreme eğrisi ve ortam pH'ına da bakılarak inhibitörlerin bu kriterler üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 11, 12 ve 13) (Radler, 1990; Daeschel, 1991).

Tablo-5 Model şarap ortamında inhibitörlerin eklenmesi ile oluşan % malik asit ve % laktik asit değişimleri

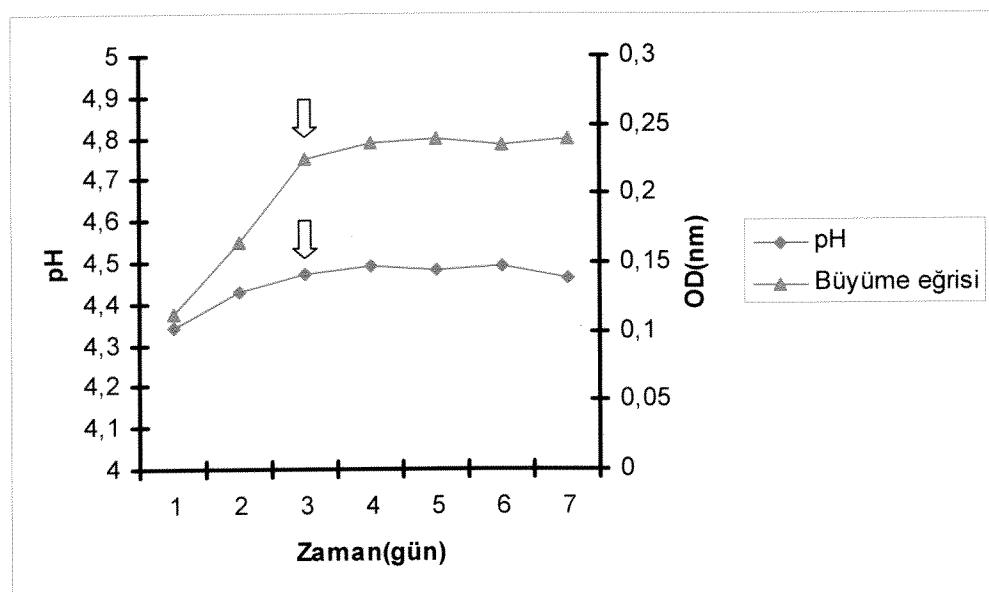
İnhibitör uygulaması	Ortamda Malik asit (%)				Ortamda Laktik asit (%)			
	Gün 0	Gün 2	Gün 4	Gün 6	Gün 0	Gün 2	Gün 4	Gün 6
Nisin	100	73	70	70	0	27	30	30
Bakteriyosin benzeri inhibitör (BBI)	100	77	74	70	0	23	26	30
Bakteriyosin benzeri inhibitör (BBI) + Nisin	100	75	73	74	0	25	27	26
Kontrol	100	74	34	8	0	26	66	92



Şekil 11. Nisin ilave edilmiş model şarap ortamında malolaktik dönüşümü yapan suş (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)'nın üreme eğrisi ve pH grafiği (Oklar inhibitorün ilave zamanını gösterir).



Şekil 12. Bakteriyosin benzeri inhibitör BBI'nın ilave edildiği model şarap ortamında malolaktik dönüşümü yapan suş (*Lactobacillus delbrueckii subsp.delbrueckii*)'nın üreme eğrisi ve pH grafiği(Oklar inhibitorün ilave zamanını gösterir).



Şekil 13. Nisin ve bakteriyosin benzeri inhibitör BBI'nın birlikte ilave edildiği model şarap ortamında malolaktik dönüşümü yapan suş (*Lactobacillus delbrueckii subsp.delbrueckii*)'nın üreme eğrisi ve pH grafiği(Oklar inhibitorün ilave zamanını gösterir).

SONUÇ

Sonuç olarak protein tabiatında yapıya sahip, 32000 Da molekül ağırlığında bakteriyosin benzeri bir inhibitör(BBI), beyaz şaraptan izole edilen bir W3-*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* izolatından elde edilmiş ve malolaktik fermentasyonu, model şarap ortamında durdurarak kontrol işlevinde başarılı olmuştur. Ancak bu inhibitörün şarabın asıl ortamında denenmesi ve şarapların tüm organoleptik kalitesi üzerinde herhangi bir değişikliğe yol açıp açmayacağı test edilmelidir. Şaraplar üzerinde malolaktik fermentasyonu kontrol amaçlı olarak nisin denenmiş ancak nisin, malolaktik fermentasyonu tamamen inhibe edebilmek için kullanılmıştır ve nisin oldukça yüksek bir maliyete sahiptir. Burada değinilmesi gereken bir başka husus ise elde edilen bakteriyosin benzeri inhibitör BBI'nin saflik derecesi ile ilgilidir. Bakteriyosin benzeri inhibitör (BBI) saflaştırması daha ileri düzeye ulaştığında maliyeti nisbeten artturacak ancak bununla birlikte bozunmayı sağlayan mikroorganizmalara etki düzeyi ve etki süresi azalacak, bu da şarap üreticisi açısından olumlu olacaktır.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

- BOULTON, R. B., Singleton,H. Kunkee, R.E. *Fermented Beverage Production*, Chapman-Hall, New York, 1996.
- BOZOĞLU, F. *Isolation and Characterization of A Heat-Stable Lipase from P. fluorescens MC50*, (Doktora Tezi), North Carolina State University, Department of Food Science, (1982).
- COX, D. J. , Henick-Kling, T., A Comparison of Lactic Acid Bacteria for Energy-Yielding(ATP) Malolactic Enzyme Systems, *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 215-218 (1990).
- DAVIES, C.R., Wibowo, D., Fleet, G.H. and Lee, T.H., Properties of Wine Lactic Acid Bacteria:Their Potential Enological Significance, *Am.J. Enol.Vitic.*, 39, 137-142 (1988).
- DAESCHEL, M. A., Jung, D-S., Watson, B. T. ,Controlling Wine Malolactic Fermentation with Nisin and Nisin-Resistant Strains of *Leuconostoc oenos*, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 601-603 (1991).
- GERBAUX, V., Villa, A., Monamy, C., Bertrand, A., Use of Lysozyme to Inhibit Malolactic Fermentation and to Stabilize Wine After Malolactic Fermentation, *Am.J. Enol. Vitic.*, 48, 49-54 (1997)
- GIANNAKOPOULOS, P. I. , Markakis, P. , Howell, G.S., The Influence of Malolactic Strain on the Fermentation on Wine Quality of Three Eastern Red Wine Grape Cultivars, *Am.J. Enol. Vitic.*, 35, 1-4 (1984) .
- HECHARD, Y., Derijard, B., Letellier, F., Cenatiempo, Y., Characterization and Purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria Bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*, *Journal of General Microbiology*, 138, 2725-2731 (1992).
- HENICK-KLING, T., Sandine, W., Heatherbell, D.A. Evaluation of Malolactic Bacteria Isolated from Oregon Wines, *Appl. Environ. Mic.*, 55, 2010-2016 (1989).
- IZUAGBE,Y.S., Dohman, T. P., Sandine, W.E., Heatherbell, D.A., Characterization of *Leuconostoc oenos* Isolated from Oregon Wines, *Appl. Environ. Mic.*, 50, 680-684 (1985).
- LEWUS, C.B. , Montville, T.J., Detection of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria, *Journal of Microbiological Methods*, 13, 145-150 (1991).

NIELSEN, J.C., Richelieu, M., Control of Flavor Development in Wine During and After Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 740-745, (1999).

RADLER, F., Possible use of Nisin in Winemaking. I. Action of Nisin Against Lactic Acid Bacteria and Wine Yeasts in Solid and Liquid Media, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1-6 (1990).

RENAULT, P., Gaillardin, C. and Heslot, H. , Role of Malolactic Fermentation in Lactic Acid Bacteria, *Biochimie*, 70, 375-379 (1988).

RIBEREAU-GAYON, P. ,New Developments in Wine Microbiology, *Am.J.Enol. Vitic.*, 36, 1-10 (1985).

SCHILLINGER, U., Lücke, F. K. , Identification of *Lactobacilli* From Meat and Meat Products, *Food Microbiology*, 4, 199-208 (1987).

SCHVED, F., Lazar, A., Henis, Y., Juven, B.J., Purification, Partial Characterization and Plasmid-Linkage of Pediocin SJ-1, a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici* , *J. of Appl. Bac.*, 74, 67-77, (1993).

VIDAL-CAROU, M.C., Codony-Salcedo, R. and Marine-Font, A.; Changes in the Concentration of Histamine and Tyramine During Wine Spoilage at Various Temperatures, *Am.J. Enol.Vitic.*, 42, 145-149 (1991).

WIBOWO, D., Fleet, G. H. ,Lee, T.H. , Eschenbruch, R.E., Factors Affecting the Induction of Malolactic Fermentation in Red Wines, *J. of Applied Bacteriol.*, 64, 421-428 (1988).

Malolactic fermentation is a bacterial process that converts malic acid to lactic acid. This reaction is catalyzed by malolactic bacteria, which are present in most wine yeasts. The potential of different wine yeasts to produce malolactic bacteria has been studied. The results show that some yeasts can produce malolactic bacteria, while others cannot. The ability of yeast to produce malolactic bacteria is influenced by various factors such as temperature, pH, and nutrient availability. The presence of malolactic bacteria in wine can affect the flavor and texture of the wine, as well as its shelf life.

The main difference between malolactic bacteria and other types of bacteria is that malolactic bacteria are able to produce malic acid, while other bacteria cannot.

Malolactic bacteria are also important in the production of cheese, particularly in the production of cheddar cheese.

YUSLU, S. Gencay, S. Inan, S. Yilmaz, and S. Ozturk, "Isolation and characterization of malolactic bacteria from red wine yeasts and their ability to produce malolactic bacteria," *Journal of Food Protection*, 62, 100-104, (1999).

YURDUGUL, S. Boroglu, S. Inan, S. Ozturk, "Isolation and characterization of malolactic bacteria from red wine yeasts and their ability to produce malolactic bacteria," *Journal of Food Protection*, 62, 100-104, (1999).

YURDUGUL, S. Boroglu, S. Inan, S. Ozturk, "Isolation and characterization of malolactic bacteria from red wine yeasts and their ability to produce malolactic bacteria," *Journal of Food Protection*, 62, 100-104, (1999).

YURDUGUL, S. Boroglu, S. Inan, S. Ozturk, "Isolation and characterization of malolactic bacteria from red wine yeasts and their ability to produce malolactic bacteria," *Journal of Food Protection*, 62, 100-104, (1999).

YURDUGUL, S. Boroglu, S. Inan, S. Ozturk, "Isolation and characterization of malolactic bacteria from red wine yeasts and their ability to produce malolactic bacteria," *Journal of Food Protection*, 62, 100-104, (1999).

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu:TOGTAG-TARP-2534
Proje Başlığı: ŞARAPLarda MALOLAKTİK FERMENTASYONDA Yer Alan BAKTERİYOSİN ÜREten SUŞLARIN TARANMASI
Proje YürüttüCüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: DOÇ.DR. CANDAN GÜRAKAN (Proje YürüttüCüsü) ARŞ.GÖR.DR.SEHYUN YURDUGÜL (Yardımcı Araştırmacı) DR. ZİNET AYTANGA ÖKMEN(Yardımcı Araştırmacı)
Projenin YürüttüDüğü Kuruluş ve Adresi: ORTADOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ, MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ, GIDA MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ, İNÖNÜ BULVARI, 06531, ANKARA
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:-
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:01.02.2000-01.02.2002 (24 ay)
Öz (en çok 70 kelime): Şaraplarda malolaktik fermentasyon bozunmaya yol açan bakterilerin çoğalması durumunda istenilmemektedir. 120 adet suş, aynı şaraplardan izole edilen laktik asit bakterileri üzerinde taranmıştır. İzolatlardan biri üzerinde (<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>) bakteriyosin üretim potansiyeli çalışılmıştır. Bu suştan molekül ağırlığı yaklaşık 32,000 Da olarak belirlenmiş bakteriyosin benzeri bir inhibitör elde edilmiştir. Malolaktik fermentasyonu kontrol için, malolaktik fermentasyon yapabilen bir suş üzerinde deneyler yapılmış ve elde edilen inhibitörün, malolaktik fermentasyonu kontrol ettiği gözlenmiştir.
Anahtar Kelimeler: Bakteriyosin, Laktik Asit Bakterileri, Şarap, Malolaktik Fermentasyon.
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: YURDUGÜL, S.; Gürakan, C.; Bozoğlu, F. Screening Various Isolates of Lactic Acid Bacteria from Turkish Red and White Wines for their Inhibitory Action on Malolactic Fermentation, International Conference, Prospects for Viticulture and Enology, Zagreb, Croatia (2000) pp:137. YURDUGÜL, S. Screening of Bacteriocin Producers in Controlling the Malolactic Fermentation of Wines,(Doktora Tezi),Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,(2002). YURDUGÜL S.; Bozoğlu F. Bacteriocin-Like Inhibitor production from Malolactic Flora of Wines to Control Malolactic Conversion, 2 nd Congress of Macedonian Microbiologists with International Participation, Ohrid, Republic of Macedonia, (2002) pp.142. YURDUGÜL,S., Bozoğlu F., Studies on an inhibitor produced by lactic acid bacteria of wines on the control of malolactic fermentation, European Food Research and Technology, 215: 38-41, (2002).
Bilim Dalı: Doçentlik Bilim Dalı Kodu: