İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MODEL SİSTEMLERDE LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PATOJENLER ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda. Müh. Volkan Kalender KÖSEOĞLU

Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ
Programı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

OCAK 2007

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MODEL SİSTEMLERDE LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PATOJENLER ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Müh. Volkan Kalender KÖSEOĞLU
(506041505)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 4 Ocak 2007
Tezin Savunulduğu Tarih : 29 Ocak 2007

Tez Danışmanı :	**Prof. Dr. Necla ARAN**
Diğer Jüri Üyeleri	**Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN (Yeditepe Ü.)**
	Yrd. Doç. Dr. Gürbüz GÜNEŞ (İ.T.Ü.)

OCAK 2007

ÖNSÖZ

Günümüzde tüketicinin kimyasal katkılardan arındırılmış doğal gıda talebini karşılamaya yönelik yapılan çalışmalarda biyoprezevasyon önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle ürünlerde bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin kullanımıyla önemli birçok gıda patojenin gelişimi durdurularak veya ortadan kaldırılarak gıda güvenliği sağlanabilmektedir. Aynı şekilde bakteriyosinlerin saflaştırılmış formları da yine bu amaçla doğal gıda katkısı olarak kullanılabilmektedir.

Bu çalışmada gıda kaynaklı ciddi enfeksiyonlara ve hatta ölümlere neden olabilen *Listeria monocytogenes, E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis,* ve intoksikasyon etkeni *Bacillus cereus* patojenlerine karşı model sistemlerde laktik asit bakterilerinin antagonistik aktiviteleri araştırılmıştır.

Çalışmam süresince her türlü desteği veren çok sevdiğim hocam Sayın Prof. Dr. Necla ARAN'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Fikirlerinden yararlandığım değerli mesai arkadaşım Ar.Gör. Neşe Şahin Yeşilçubuk'a, yoğun çalışma tempom içerisinde yardımlarını benden esirgemeyen değerli meslektaşım Ar.Gör. Funda Karbancıoğlu Güler'e ve doktora öğrencimiz Ayşe Göçmen'e teşekkür ederim. Çalışmamda kullandığım *Listeria monocytogenes* SLCC 2371 1/2 a ve *Listeria monocytogenes* SLCC 4b kültürlerini temin ettiğimiz Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Recep Çıbık'a, laktik kültürümüzün tanımlanmasında verdikleri değerli destek ve olumlu yaklaşımları nedeniyle Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm'ü Başkanı Sayın Prof. Dr. Fikrettin Şahin ve teknik personel Sayın Zişan Okur'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan aileme, gözbebeğimiz Erturan KÖSEOĞLU'na sonsuz teşekkürler.

Aralık 2006 Volkan Kalender KÖSEOĞLU

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR **v**
TABLO LİSTESİ **vı**
ŞEKİL LİSTESİ **vıı**
ÖZET **vııı**
SUMMARY x

1. GİRİŞ **1**

2. LİTERATÜR ÖZETİ **2**

2.1. Laktik Asit Bakterileri **2**
2.1.1. Laktobasiller 3
2.1.2. Laktokoklar 3
2.1.3. Leukonostoklar 3
2.1.4. Pediokoklar 4
2.1.5. Streptokoklar 4
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Biyoprezervasyon Amaçlı Kullanımı 5
2.2.1. Organik Asitler 5
2.2.2. Hidrojen Peroksit 5
2.2.3. Diasetil 6
2.2.4. Reuterin 6
2.2.5 Bakteriyosinler 6
2.2.5.1 Birinci Sınıf Bakteriyosinler 7
2.2.5.2 İkinci Sınıf Bakteriyosinler 8
2.2.5.3 Üçüncü Sınıf Bakteriyosinler 8
2.2.5.4 Bakteriyosin Üretiminin Optimizasyonu 9

3. MATERYAL VE METOT **11**

3.1. Kullanılan Kültürler ve Muhafazası 11
3.1.1. Laktik Asit Bakterileri 11
3.1.2. İndikatör Bakteriler 11
3.2. Kullanılan Besiyerleri 11
3.3. Kullanılan Diğer Kimyasallar 12
3.4. Deneysel Çalışmalar 12
3.4.1. Agar Difüzyon Yöntemi 12

3.4.1.1. Süpernatantların Hazırlanması 13
3.4.1.2. İndikatör Patojenlerin İnokülasyonu 13
3.4.1.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi 14
3.4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyonu 14
3.4.2.1. Proteaz Uygulaması 14
3.4.2.2. Katalaz Uygulaması 15
3.4.2.3. pH Stabilitesi 15
3.4.2.4. Isıl Stabilite 15
3.4.2.5. Gelişim Eğrisinde Bakteriyosin Üretiminin Belirlenmesi 16
3.4.3. Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin Etki Modu 16
3.4.4. Optimizasyon Çalışmaları 16
3.4.4.1. Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi 17
3.4.4.2. Faktörlerin Taranması 17
3.4.4.3. Optimizasyon 17
3.4.5. Standart ile Karşılaştırma 17

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 18

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri 18
4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyonu 20
4.2.1. Proteaz ve Katalaz Uygulaması 19
4.2.2. Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin pH Stabilitesi 21
4.2.3. Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin Isıl Stabilitesi 22
4.2.4. Gelişim Eğrisinde Bakteriyosin Üretiminin Belirlenmesi 22
4.2.5. Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin Etki Modu 23
4.3. Optimizasyon Çalışmaları 24
4.3.1. Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi 24
4.3.2. Besiyeri Bileşenlerini Etkisi 25
4.3.2.1. Plackett-Burman Deseni Uygulaması 25
4.3.2.2. Fraksiyonel Faktöryel Deseni Uygulaması 27
4.3.2.3. Koşulların Optimizasyonu
4.4. Standart ile Karşılaştırma 35

5. SONUÇ 36

KAYNAKLAR 38

EK 44

ÖZGEÇMİŞ 47

KISALTMALAR

LAB:	Laktik Asit Bakterileri
GRAS:	Generally Recognised as Safe
FDD:	Faktöryel Deney Deseni
FFD:	Fraksiyonel Faktöryel Deseni
PBD:	Plackett-Burman Deseni
MRS:	De-Man Rogoso Sharp
TSB:	Tryptic Soy Broth
TSA:	Tryptic Soy Agar
AU:	Arbitrary Unit
Kob:	Koloni Oluşturan Birim

TABLO LİSTESİ

		Sayfa No
Tablo 2.1	:Tanımlanmış Bakteriyosinler …….	7
Tablo 4.1	:LAB'nin İndikatörler Üzerindeki Antimikrobiyal Aktiviteleri…..	18
Tablo 4.2	:Enzim Uygulamaları Sonucu Gözlenen Zon Değerleri (mm) ve İnhibisyon Aktiviteleri (%)……..	20
Tablo 4.3	:Farklı Sıcaklık-Süre Uygulamalarının Bakteriyosin Benzeri Aktivite Üzerine Etkisi…….	22
Tablo 4.4	:Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteriyosin Benzeri Aktivite Üzerine Etkisi……..…….	24
Tablo 4.5	:MRS Bileşimi…….....	25
Tablo 4.6	:PBD-1 Sonuçları ve Bileşen Kombinasyonları (%w/v)……...	25
Tablo 4.7	:PBD-2 Sonuçları ve Bileşen Kombinasyonları (%w/v)…….....	26
Tablo 4.8	:FFD Sonuçları ve Bileşen Kombinasyonları (%w/v)…….....	28
Tablo 4.9	:Optimizasyon Deney Deseni Sonuçları……...	30
Tablo 4.10	:Optimizasyon İkinci Deney Deseni Sonuçları……	34
Tablo 4.11	:Nisin ve Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin Karşılaştırılması……..	35
Tablo A.1	:Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteriyosin Benzeri Aktivite Üzerindeki Etkisini Gösteren ANOVA Sonuçları……...	44
Tablo A.2	:Karbon Kaynakları Ortalamalarının Tukey Testi İle Karşılaştırılması……	44
Tablo A.3	:PBD Birinci Uygulama ANOVA Sonunçları…….....	44
Tablo A.4	:PBD Birinci Uygulamasında Belirlenen Etkiler ve Katsayılar…..	44
Tablo A.5	:PBD İkinci Uygulama ANOVA Sonuçları…….	44
Tablo A.6	:PBD İkinci Uygulamasında Belirlenen Etkiler ve Katsayılar…….	45
Tablo A.7	:FFD Uygulaması ANOVA Sonuçları…….....	45
Tablo A.8	:FFD Uygulamasında Belirlenen Etkiler ve Katsayılar……	45
Tablo A.9	:Optimizasyon Deseni (3_{3-1}^{2}) ANOVA Sonuçları……	46

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 2.1	**:** Laktik Asit Bakterilerinin Karbonhidrat Metabolizması……..	2
Şekil 4.1	**:** *Ped. pentosaceus* Kültüründe Görülen Antimikrobiyal Aktivite…	19
Şekil 4.2	Antimikrobiyal Aktivitenin Enzim Toleransı	20
Şekil 4.3	**:** Farklı pH Değerlerinde Gözlenen Bakteriyosin Benzeri Aktivite...	21
Şekil 4.4	*Ped. pentosaceus* Gelişimi Süresince Bakteriyosin Benzeri Aktivite Üretimi……	22
Şekil 4.5	**:** Bakteriyosin Benzeri Aktivite Karakterizasyonu…….	23
Şekil 4.6	: PBD-1'e Göre Bileşen Etkilerini Gösteren Pareto Çizelgesi……....	26
Şekil 4.7	**:** PBD-2'ye Göre Bileşen Etkilerini Gösteren Pareto Çizelgesi…….	27
Şekil 4.8	**:** FFD'ye Göre Bileşen Etkilerini Gösteren Pareto Çizelgesi…….	29
Şekil 4.9	**:** Tween 80-Maya Ekstraktı Tepki Yüzey Grafiği…….....	30
Şekil 4.10	**:** Tween 80-Maya Ekstraktı İz Düşüm Grafiği……	31
Şekil 4.11	**:** Et Ekstraktı-Tween 80 Tepki Yüzey Grafiği…….....	31
Şekil 4.12	: Et Ekstraktı -Tween 80 İz Düşüm Grafiği…….....	32
Şekil 4.13	**:** Maya Ekstraktı-Et Ekstraktı Tepki Yüzey Grafiği……...	33
Şekil 4.14	**:** Maya Ekstraktı-Et Ekstraktı İz Düşüm Grafiği……	33
Şekil 4.15	**:** İkinci Optimizasyon Çalışması İzdüşüm Grafikleri	34

MODEL SİSTEMLERDE LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PATOJENLER ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Günümüzde gıda güvenliğinin sağlanmasına yönelik yapılan çalışmalar özellikle üründe sentetik katkılar kullanmadan doğal muhafaza yöntemlerinin ve alternatif yeni teknolojilerin uygulanması üzerine odaklanmıştır. Bu kapsamda yürütülen biyoprezervasyon çalışmalarında, gıdanın doğal mikroflorasında bulunan veya gıdada gelişebilen mikroorganizmalar ve bunların metabolitleri doğal gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium botulinum* gibi önemli gıda patojenlerinin gıdada mevcudiyeti veya toksin oluşturma kabiliyeti ortadan kaldırılmıştır. Laktik asit bakterileri bu amaçla kullanılan en yaygın mikroorganizma grubudur. Laktik asit bakterileri yüksek rekabet gücü ve bakteriyosin gibi ürettikleri doğal antimikrobiyal bileşiklerle gıda güvenliğinin sağlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyokimyasal düzeyde en iyi tanılanmış bakteriyosin Nisin'dir. Nisin, endüstriyel anlamda üretilen tek bakteriyosindir. Birçok ülkede peynir, yoğurt, bira, şarap ve et ürünleri gibi çeşitli gıdalarda doğal katkı olarak kullanılmaktadır. Günümüzde tüm gıda gruplarında yeni doğal koruyucuların kullanımı kapsamında bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri bileşikler üretebilen bakteri kültürleri üzerindeki çalışmalar sürdürülmektedir.

Bu çalışmada stoklarmızda mevcut laktik asit bakterilerinin *Listeria monocytogenes* 1/2a ve 4b suşları ile *Bacillus cereus, Salmonella enteritidis* KUKEN 369, ve *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 patojenleri üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda *Pediococcus pentosaceus* kültürünün *L. monocytogenes* 1/2a suşu üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *Ped. pentosaceus* kültürünün gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin hangi faktörlerden kaynaklandığı araştırılmış, yapılan çalışmalar sonucunda antimikrobiyal etkinin protein yapıda bakteriyosin benzeri bileşik(ler) den kaynaklandığı gözlenmiştir. Karakterizasyon amacıyla, bakteriyosin benzeri aktivitenin pH ve ısıl stabilitesi incelenmiş, aktivitenin pH 3 - 6 arasında arttığı, pH 8 - 10 arasında ise azaldığı belirlenmiştir. Isıl işlem uygulamasında (30 dakika) ise aktivitenin 100°C'de %30,86'sının, 80°C'de % 60,49'unun ve 45°C' de % 100'ünün korunduğu saptanmıştır. Karakterizasyon çalışmalarını takiben bakteriyosin benzeri aktivitenin kültürün 24 saatlik gelişimi süresince hangi aşamalarda ve ne düzeyde üretildiği araştırılmış, aktivitenin logaritmik fazla birlikte arttığı erken durağan fazda (9. saatte) en yüksek seviyeye ulaştığı ve takip eden saatlerde sabit kaldığı bulunmuştur. Koloni sayım yöntemiyle yapılan çalışmada bakteriyosin aktivitesinin etki modunun bakteriyostatik olduğu tespit edilmiştir.

İleri ki aşamalarda *Ped. pentosaceus* kültürünün bakteriyosin benzeri aktivitesinin optimizasyonu için De-Man Rogosa Sharp besiyeri bileşenlerinin etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda glikoz, fruktoz, laktoz, mannoz ve sakaroz gibi farklı karbon kaynaklarının etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda, en yüksek bakteriyosin benzeri aktivitenin sırasıyla sakaroz, glikoz, fruktozdan ve düşük aktivitenin mannoz ve laktozdan elde edildiği görülmüştür. Sonuçta karbon kaynağı olarak sakaroz seçilmiştir. Diğer besiyeri bileşenlerinin de etkilerinin belirlenmesi için Plackett-Burman ve Fraksiyonel Faktöryel tarama desenleri uygulanmıştır. Çalışmalar sonucunda et ekstraktı, maya ekstraktı ve Tween 80 bileşenlerinin bakteriyosin benzeri aktiviteyi pozitif yönde etkilediği gözlenmiştir. Etkili faktörler kullanılarak 3_{3-1}^{2} fraksiyonel deseniyle optimizasyon çalışması yapılmış, normal üretime göre 3 kat daha fazla bakteriyosin benzeri aktivite elde edilmiştir.

Nisin ile yapılan karşılaştırma çalışmasında, kültürün ürettiği bakteriyosin benzeri aktivitenin 800, 500, 400, 250 IU/80µl nisin konsantrasyonlarından daha güçlü antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LACTIC ACID BACTERIA AGAINST SOME PATHOGENS

SUMMARY

Recently, food safety studies focus on application of natural preservation methods and alternative novel technologies excluding usage of synthetic food additives. For biopreservation, microorganisms that exist in natural microflora or grow within certain food products and their metabolites as a natural food additive substances are used. By this method, occurance of serious food pathogens such as *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium botulinum* and their toxins in products can be eliminated. Lactic acid bacteria is the most common microorganism group used for this purpose**.** Due to its of high nutrient competition and ability to produce natural antimicrobials such as bacteriocins, LAB have a wide application area to assure food safety. Nisin, which is the only bacteriocin commercially available, is the best defined bacteriocin at biochemical levels. It is used as a natural food preservative in many fermented foods such as cheese, yoghurt, beer, and wine. In order to develop new biopreservatives, researches on bacteriocigenic cultures in many food types are being proceeded.

In this study, antagonistic effects of stock test cultures of lactic acid bacteria were investigated against 2 strains of *Listeria monocytogenes,* and single strains of *Bacillus cereus, Salmonella enteritidis* KUKEN 369, and *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894. Lactic culture of *Pediococcus pentosaceus* showed high antimicrobial activity on *L. monocytogenes* 1/2a strain. After observation of antibacterial activity of *Ped. pentosaceus*, the source of the antimicrobial activity was determined. Results indicated that bacteriocin-like compound(s) with the protein structure is the cause of antimicrobial effect. Thermal stability and pH stability of bacteriocin-like activity were tested in order to determine characterization. Bacteriocin-like activity increased for the range pH 3-6 and decreased at pH 8-10. After heat applications at 45, 85, 100°C for 30 min., preserved bacteriocin-like activity was %100, %60,49, %30,86, respectively. Production rate of bacteriocin-like activity during growth of *Ped. pentosaceus* for 24 hours was determined. Data stated that bacteriocin-like activity increased in the logaritmic phase, reached the maximum level during early stationary phase (at the 9th hour) and remained constant for the following hours. Mode of action of bacteriocin-like activity was determined as bacteriostatic by using colony counting.

In the further experiments, components of De-Man Rogosa Sharp culture medium were studied to optimize the bacteriocin-like activity from *Ped. pentosaceus*. First of all, tests for effects of different carbohydrates such as glucose, fructose, lactose, mannose and sucrose showed that higher bacteriocin-like activity was observed with sucrose, glucose and fructose; lower activity was obtained from mannose and lactose. As a result of these studies, sucrose was selected as carbohydrate source. Following these experiments, to determine which elements of culture medium have an effect on

bacteriocin-like activity, Plackett-Burman and Fractinal Factorial screening designs were implemented. Meat extract, yeast extract and Tween 80 were found as critic factors enhancing bacteriocin-like activity as a result of the screening experiments. Bacteriocin-like activity increased three fold using significant factors with 3_{3-1}^{2} fractional optimization design with respect to normal conditions.

Comparision test showed that antibacterial activity of culture is more efficent than the concentrations of nisin solutions such as 800, 500, 400, 250 IU/80µl.

1. GİRİŞ

Günümüzde gıda teknolojisinde büyük ilerlemeler kaydedilmesine karşın gıda güvenliği ve güvencesi sorunu halen çözümlenememiştir. Son 12-13 yılda gıda enfeksiyonları ("Listeriosis", "Salmonellosis", "haemoragic colitis") ve intoksikasyonlarında büyük çapta artışlar kaydedildiği belirtilmiştir (Jays, 1996).

Son yıllarda tüketici talebinin daha doğal, taze, besin içeriği yüksek ve tüketime hazır ürünlere doğru yönelmiş olması gıda muhafaza yöntemlerinin gelişmesi zorunluluğunu doğurmuştur. Bu kapsamda üzerinde en fazla çalışılan yeni teknolojiler yüksek hidrostatik basınç, darbeli elektrik alan uygulamaları, ışınlama, modifiye atmosfer ile aktif paketleme yöntemleri, doğal gıda katkıları kullanımı ve biyoprezervasyondur (Devlieghere ve diğ., 2004).

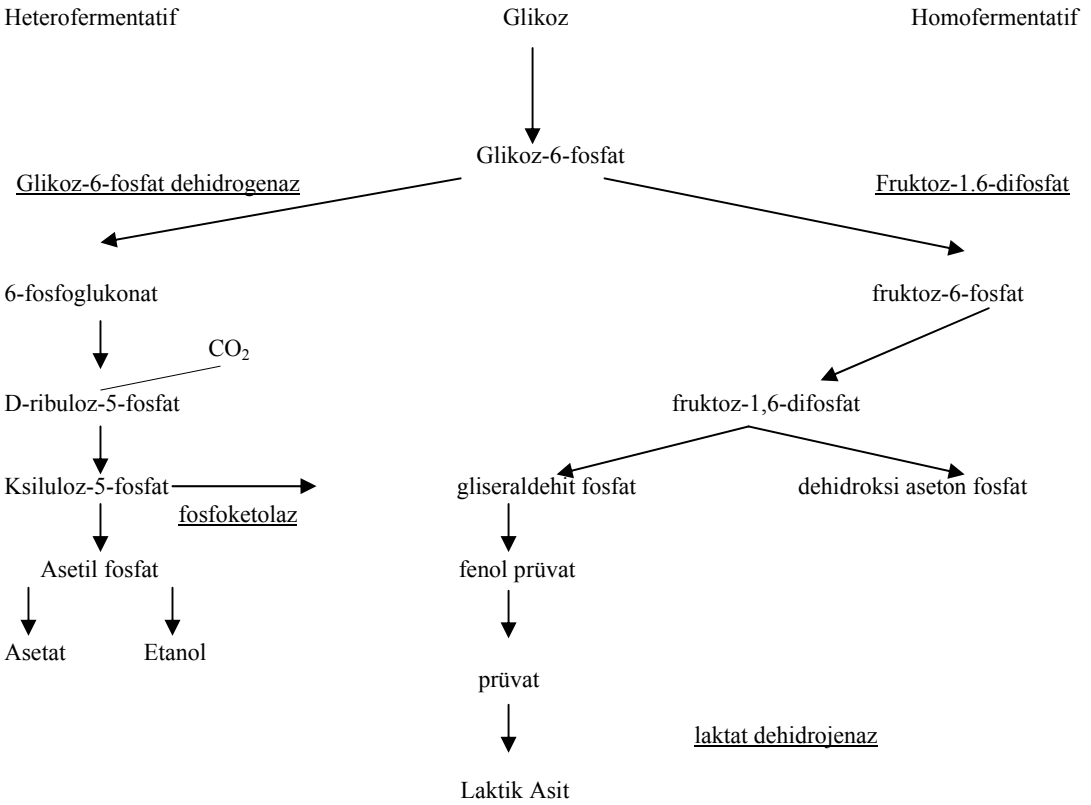
Biyoprezervasyon terimi, gerek mikroorganizmaların gerekse metabolitlerinin gıda güvenliğinin sağlanması veya raf ömrünün uzatılması amacıyla kullanılmasını ifade etmektedir (Hugas, 1998). Biyoprezervasyon amacıyla en yaygın kullanılan mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir (LAB). LAB gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmayan, kok/basil/kokobasil şeklinde, mezofilik ve termofilik özellikte olabilen bakterilerdir (Axelsson, 1998). LAB, fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra gıda güvenliği açısından da büyük önem taşımaktadır. LAB gıda ortamındaki yüksek besin rekabeti ve ürettikleri antimikrobiyal bileşiklerle bozulma ve hastalık etkeni mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Gilliland, 1990).

Bu çalışmanın amacı; farklı gıdalardan izole edilmiş LAB'nin *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157 H7, *Listeria monocytogenes*, ve *Salmonella enteritidis* gibi bazı patojenler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması, karakterize edilmesi ve model sistemlerde aktivite oluşumda etkili faktörlerin belirlenmesidir. Çalışma kapsamında optimizasyon amacıyla en yüksek antimikrobiyal aktivitenin elde edildiği ortam koşullarının belirlenmesi de hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Laktik Asit Bakterileri

LAB, morfolojik özelliklerine, glikoz fermantasyonuna (homofermentatif, heterofermentatif) gelişim sıcaklığına (10°C / 45°C), son ürün laktik asidin konfigürasyonuna, yüksek tuz konsantrasyonunda gelişimine, kullanılan şeker kaynağına, asidik ve bazik koşullara toleransına, yağ asidi kompozisyonuna, hücre duvarı bileşenleri ve rRNA dizilimine göre sınıflandırılabilmektedir. LAB, glikoz fermentasyonunda iki farklı yol izlemektedir. Bu metabolizmalar Şekil 2.1'de belirtilen "Embden-Meyerhof" glikolitik yolu ve heksoz monofosfat fosfotoketolaz reaksiyonlarının kombinasyonudur. Glikoz fermantasyonunda birinci yolu kullanan türler homofermentatif, ikinci yolu kullanan türler ise heterofementatif olarak adlandırılmaktadır (Steel, 1998).



Şekil 2.1: Laktik Asit Bakterinin Karbonhidrat Metabolizması

Günümüzde LAB, *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus Aerococcus, Alloiococcus, Bifidobacterium, Cornabacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactococcus, Lactosphaera, Oenoccoccus, Tetragenococcus, Vagococcus* ve *Weissella* cinsleri olarak sınıflandırılmıştır. Gıda endüstrisi açısından özellikle *Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus, Streptococcus* türleri önem arz etmektedir (Holzapfel ve Stiles, 1997).

2.1.1. Laktobasiller

Yaklaşık 50 türü bulunan *Lactobacillus* cinsi, obligat homofermentatif, fakültatif heterofermentatif ve obligat heterofermentatif grupları içermektedir. Termofilik olan *Lb. delbruckii* spp. *bulgaricus*, *Lb. delbruckii* spp. *lactis*, *Lb. acidophilus* ve *Lb helveticus* türleri obligat homofermentatiflerdir. Bu grup 6 karbonlu şekerleri (heksozlar) tümüyle laktik aside dönüştürmekte; ancak 5 karbonlu şekeri (pentoz) fermente edememektedir (Rousis, 1994; Holzapfel ve Stiles, 1997).

Lb. casei, *Lb. plantarum*, *Lb. sake* fakültatif heterofermentatif grubu oluşturmaktadır. Bu türler heksozlardan laktik asit, pentozlardan ise laktik asit ve asetik asit, *Lb. brevis* ve *Lb fermentum* ise heksozlardan laktik asit, asetik asit ve karbondioksit (CO_2) oluşturmaktadır (Hammes ve Vogel, 1992; Rousis, 1994).

2.1.2. Laktokoklar

Laktokoklar hareketsiz, hemolitik aktivite göstermeyen % 4 (w/v) tuz konsantrasyonunda gelişebilen cinstir. Laktokokların 10°C gelişme göstermesi ve 45°C'de gelişememesi bu cinsi Streptokoklar ve Enterokoklardan ayıran başlıca özelliklerindendir. Endüstride kullanılan en yaygın türler *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* ve *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis*'dir. *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* sitratı metabolize ederek *Lc. lactis* ssp. *lactis* türünden ayrılmaktadır. Ayrıca "lactis" türü arjininden amonyum üreterek "cremoris" kültüründen farklılık göstermektedir (Rousis, 1994; Teuber, 1992).

2.1.3. Leukonostoklar

Sebzelerde, süt ve süt ürünlerinde, işlenmiş/işlenmemiş et ürünlerinde bulunabilen *Leuconostoc* cinsi bakteriler iki gruba ayrılmaktadır (Ray, 2001). Bunlar, asidofilik olanlar ve asidofilik olmayan türlerdir. Asidofilik türlere süt ve ürünlerinde rastlanmamaktadır. *Leuc. mesenteroides* en iyi bilinen asidofilik olmayan türdür.

Leukonostoklar sitratı metabolize ederek diasetil oluşturmakta ve lezzet oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Aroma oluşumunda rol oynayan türler *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris* ve *Leuc. mesenteroides* ssp. *lactis*' tir (Dellaglio ve diğ., 1992; Rousis, 1994).

2.1.4. Pediokoklar

Homofermentatif özellikte, 25-45°C arasında gelişebilen Pediokoklar, glikoz fermentasyonunda yüksek miktarda laktik asit üretmektedir. Bununla birlikte 50°C'de gelişebilen türleri de bulunmaktadır. Bilinen iki türü *Pediococcus pentasaccus* ve *Pediococcus acidilactici,* fermente sebze, et ve tahıl ürünlerinde kullanılmaktadır (Ray, 2001). Pediokok türleri olgunlaşan peynirde gelişebilmeleri nedeniyle süt fermentasyanında starter kültür olarak kullanılmamaktadır (Rousis, 1994).

2.1.5. Streptokoklar

Streptococcus salivarus ssp. *thermophilus* yoğurt üretiminde starter kültür olarak kullanılan streptokok türüdür. *S. thermophilus* 45°C'de gelişebilmekte ancak 15°C'de gelişememektedir (Hardie ve Whiley, 1992). *S. thermophilus* laktozu kullanabilmesine rağmen kazeini hidrolize edememektedir. Bu nedenle *Lb. delbruckii* ssp. *bulgaricus* proteolitik aktivitesi yüksek bir kültür olduğundan yoğurt üretiminde sütün fermentasyonunda *S. thermophilus* ile birlikte kullanılmaktadır (Rousis, 1994). Ayrıca *S. thermophilus* laktoz bileşeni olan galaktozu metabolize edemediğinden ortamda galaktoz birikimi ortaya çıkmakta ve *Lb. delbruckii* ssp. *bulgaricus*'un mevcut galaktozu kullanmasını sağlamaktadır (Axellson, 1998).

LAB fermente süt, et, sebze ve tahıl ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. GRAS statüsündeki LAB ürüne özgü duyusal özelliklerin oluşturmasının yanı sıra ürün güvenliğini sağlamakta ve raf ömrünü de uzatmaktadır. Bu nedenle LAB biyoprezervasyon amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Naidu ve dig., 2006).

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Biyoprezervasyon Amaçlı Kullanımı

LAB gıda ortamında gösterdikleri yüksek besin rekabeti, redoks potansiyeli, su aktivitesi, pH ve sıcaklık gibi faktörlere karşı geliştirdikleri adaptasyonla gıda muhafazasında önemli bir yer tutmaktadır. Ayrıca LAB, ürettikleri organik asitler (laktik asit ve asetik asit), diasetil, hidrojen peroksit, reuterin ve bakteriyosinler gibi bileşiklerle de gıda güvenliğini etkileyen patojenler ve raf ömrünü kısaltan bozulma etkeni mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterebilmektedirler (Holzapfel ve diğ., 1995).

2.2.1. Organik Asitler

LAB'ın karakteristik fermentasyon ürünü olan laktik asit ve asetik asit pH düşüşünü sağlayarak bozulma etkeni (clostridia, pseudomonas) ve patojen (Salmonellae ve *Listeria* spp.) bakterilerin gelişimini sınırlamakta veya inaktive etmektedir. Ayrıca her iki asit direkt antimikrobiyal aktivite de göstermektedir. Zayıf asitler olan laktik ve asetik asidin çözünmemiş formları hidrofobik özellikleri nedeniyle bakteri içerisine nüfus ederek hücre içinde çözünmektedir. Sonuçta sitoplazmada gerçekleşen pH düşüşü nedeniyle, hücre ölümü meydana gelmektedir (Ray, 2001).

Asetik asit çözünürlük sabitinin daha yüksek olması nedeniyle (pKa 4,75) belirli bir pH ve konsantrasyonda laktik asitten (pKa 3,1) daha güçlü antimikrobiyal etki göstermektedir (Holzapfel ve diğ., 1995).

2.2.2. Hidrojen Peroksit

Güçlü oksitleyici etkiye sahip olması nedeniyle antimikrobiyal aktivite gösteren hidrojen peroksit, LAB tarafından oksijen, laktat, pürivat, NADH varlığında sentezlenmektedir (Holzapfel ve diğ., 1995). Hidrojen peroksit yüksüz olup kolayca hücre içerisine nüfus etmektedir. Hücre içerisinde gerçekleşen indirgenme reaksiyonları sonucu oluşan hidroksi radikaller kalıtım materyalini etkileyerek hücre ölümüne neden olmaktadır (Lindgren ve Dobrogosz 1990). Geniş bir etki spektrumuna sahip hidrojen peroksit, bakteriler, mayalar, küfler, virüsler ve bakteri sporlarına karşı antagonistik aktivite göstermektedir (Russel ve diğ., 1992).

2.2.3. Diasetil

Tereyağına özgü aromasını kazandıran diasetil ("2,3-butanedione") LAB tarafından ara metabolit olan prüvattan sentezlenmektedir. Başlıca dört laktik asit bakterisi cinsi Streptokoklar, Leukonostoklar, Laktobasiller ve Pediokoklar tarafından sentezlenebilmektedir (Jay, 1982). Diasetil, mayalar, gram negatif bakteriler ve laktik asit bakterileri dışındaki gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyal etki göstermektedir. GRAS statüsünde olmasına rağmen diasetilin gıda katkısı olarak kullanımı sınırlıdır. Antimikrobiyal etkinin sağlanabilmesi için diasetilin yüksek miktarlarda kullanımı gerekmektedir. Ancak yüksek düzeylerde diasetil kullanımı ürünün duyusal özelliklerini olumsuz etkileyebilmektedir. Yüksek uçucu özelliği nedeniyle diasetilin çeşitli malzemelerin ve yüzeylerin temizliğinde kullanımı önerilmektedir (Daeschel, 1989).

2.2.4. Reuterin

Reuterin anaerobik koşullarda *Lactobacillus reuteri* tarafından gliserolden üretilen düşük molekül ağırlığında protein yapıda olmayan yüksek çözünürlüğe sahip bir bileşiktir (Dobrogosz ve diğ, 1989). Reuterin, *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. gibi gram pozitif ve *Salmonella* spp., *Shigella* spp. gibi gram negatif bakterilere, *Candida* türü mayalara ve *Trypanosoma* protozoerine karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (Daeschel, 1989).

2.2.5. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler bakteri ribozomlarında sentezlenen yakın türler üzerinde bakterisidal etki gösteren ve insan sindirim sisteminde enzimlerle parçalanabilen polipeptid yapısındaki antimikrobiyal bileşiklerdir (Klaenhammer, 1993). Günümüzde bakterisidal peptidler veya proteinler bakteriyosin olarak adlandırılmaktadır. Bakteriyosinlerin ilk prototipi *Escherichia coli* tarafından üretilen "colicin" dir. LAB tarafından üretilen bakteriyosinler katyonik, hidrofobik veya amfilik özellikte 20-60 amino asit grubundan oluşabilen moleküllerdir (Nes ve Holo 2000).

Bakteriyosinler protein yapıları gereği proteazlara karşı hassastır. Tripsin, α-kimotripsin ve pepsin gibi proteazlarla hidroliz işlemi bakteriyosinlerin protein yapısının tayini veya yeni bir bakteriyosinin karakterizasyonu amacıyla yararlanılan en yaygın uygulamadır. Bununla birlikte bakterioyisinlerin özellikle ısıl işlem

uygulanan üretimlerde yüksek sıcaklıklara karşı gösterdikleri stabilite ve farklı pH değerlerindeki aktiviteleri de karakterizasyonlarında temel basamakları oluşturmaktadır. (Cleveland ve diğ., 2001; Desmazeaud, 1996). Tablo 2.1'de tanımlanmış bakteriyosinler ve üreten mikroorganizmalar belirtilmiştir. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler başlıca üç sınıfa ayrılmaktadırlar.

Tablo 2.1: Tanımlanmış Bakteriyosinler (Chen ve Hoover, 2003)

Bakteriyosin	**Sentezleyen**
1. Sınıf Tip A-Lanbioyotikler	
Nisin	*Lactococcus lactis*
Lactocin S	*Lactobacillus sake*
Epidermin	*Staphylococcus epidermidis*
Gallidermin	*Staphylococcus gallinarum*
Lactocin 481	*Lc. Lactis*
1. Sınıf Tip B-Lanbiyotikler	
Mersacidin	*Bacillus subtilis*
Cinnamycin	*Streptomyces cinnamoneus*
Ancovenin	*Streptomyces* ssp.
Duramycin	*Streptomyces cinnamoneus*
Actagardin	*Actinoplanes* ssp.
2. Sınıf-a	
Pediocin PA-1/AcH	*Pediococcus acidilactici*
Sakacin A	*Lb. sake*
Sakacin P	*Lb. sake*
Leucocin A-UAL 187	*Leuconostoc gelidum*
Mesentericin Y105	*Leuconostoc mesenteroides*
Enterocin A	*Enterococcus faecium*
Divercin V41	*Cornabacterium divergen*
Lactococcin MMFII	*Lc. Lactis*
2. Sınıf-b	
Lactococcin G	*Lc. Lactis*
Lactococcin M	*Lc. Lactis*
Lactacin F	*Lactobacillus johnsonii*
Plantaricin A	*Lactobacillus plantarum*
Plantaricin S	*Lb. plantarum*
Plantaricin EF	*Lb. plantarum*
Plantaricin JK	*Lb. plantarum*
2. Sınıf-c	
Acidocin B	*Lactobacillus acidophilus*
Cornabacteriocin A	*Cornabacterium piscicola*
Divergicin A	*C. divergens*
Enterocin P	*E. faecium*
Enterocin B	*E. faecium*
3. Sınıf	
Helvetici J	*Lactobacillus helveticus*
Helveticin V-1829	*Lb. helveticus*

2.2.5.1. Birinci Sınıf Bakteriyosinler

Birinci sınıf bakteriyosinler lanbiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Bu grupta yer alan bakteriyosinler yaygın olmayan "lanthionine", "α-methyllanthionine", "dehydroalanine" ve "dehydrobutyrine" amino asitlerini içeren küçük molekül ağırlığında (<5 kDa) ısıl stabilitesi yüksek peptidlerdir. Kimyasal yapılarına ve

antimikrobiyal aktivitelerine göre Tip A ve Tip B olarak ikiye ayrılmaktadır (Guder ve diğ., 2000).

Pozitif yüklü Tip A lanbiyotikler, bakteri membranında porlar oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Biyokimyasal ve genetik düzeyde en iyi tanımlanmış olan "nisin" bir tip A bakteriyosindir. Nisin, 34 amino asit grubundan oluşan pentasiklik yapıda bir peptidir. Ortamda 3,75 ve 12,5 $mg.kg^{-1}$ düzeylerinde nisin mevcudiyeti antibotülinal, antilisterial ve antistafilokokal aktivite sağlamaktadır (Hugas, 1998). Tip B lanbiyotikler ise küçük globüler yapıda negatif yüklü veya yüksüz peptidlerdir. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Naidu ve diğ., 2006; Chen ve Hoover 2003).

Bu sınıftaki bakteriyosinlerin çoğu gram pozitif olan *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* ve *Clostridium botulinum* patojenleri üzerinde antagonistik etki göstermektedir. Örneğin nisin ve termofilin 13 bakteriyosinleri *B. cereus* ve *C. botulium* sporlarının çimlenmesini önlemektedir (Marciset ve diğ., 1997).

2.2.5.2. İkinci Sınıf Bakteriyosinler

İkinci sınıf bakteriyosinler karakterize edilmiş en geniş bakteriyosin grubudur. Bu sınıfta yer alan bakteriyosinler küçük molekül ağırlığında (<10 kDa), ısıl stabilitesi yüksek, lantiyonin içermeyen modifiye edilmemiş peptidlerdir. Bu sınıfa dahil IIa grubu peptidler, pediyosin benzeri peptidlerdir ve N-terminalinde Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizilimini içerirler. Antilisterial aktiviteleri nedeniyle üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır. Grup IIb bakteriyosinler aktivite için iki farklı peptid içermektedirler. Pediyosinler, plantarisinler ve laktokoksinler bu sınıfa örnek bakteriyosinlerdir (Chen ve Hoover 2003).

2.2.5.3. Üçüncü Sınıf Bakteriyosinler

Üçüncü sınıf bakterioyosinler, büyük molekül ağırlıklı (>30 kDa), ısıl stabilitesi düşük peptidlerdir. Helvetisin bu sınıfa örnek bakteriyosindir. Bakteriyosinlerin sınıflanmasında aktiviteleri için karbonhidrat veya lipit grupları içeren bakteriyosinler bir dördüncü sınıf olarak bulunmaktadır. Ancak bu gruba dahil bakteriyosinler biyokimyasal düzeyde yeterince karakterize edilmemiştir (Klaenhammer, 1993).

Gıdalarda biyoprezervasyon amacıyla LAB kullanımı üç farklı yolla gerçekleştirilmektedir. Birinci uygulama bakteriyosin üreten bir laktik asit bakterisinin gıdaya ilave edilmesidir. Bu uygulamadaki önemli nokta, laktik asit bakterisinin çevresel ve teknolojik koşullar altında (sıcaklık, pH, tuz, vb.) gıdada gelişebilmesi ve bakteriyosin üretebilmesidir (Chen ve Hoover, 2003; Hugas, 1998). Örneğin *Lc. lactis* bakterisinin 10°C'de yeterli düzeyde nisin üretememesi nedeniyle proteolitik olmayan *C. botilinum*'un toksin üretiminin engellenemediği belirtilmektedir (Rodger, 2001).

İkinci uygulama şekli, saflaştırılmış veya yarı saflaştırılmış bakteriyosinin doğal gıda katkısı olarak kullanımıdır. Bu kapsamda nisin 1950'li yıllardan itibaren birçok ülkede gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. (Chen ve Hoover, 2003).

Üçüncü uygulama ise ürünün organoleptik özelliklerinde olumsuz değişimlere neden olmadan gıdada hızlı çoğalabilen kültürlerin kullanımıdır. Bu yöntemde kültür soğuk depolama koşullarında canlılığını sürdürmekte, ancak sıcaklık artışı durumunda kültür hızla çoğalarak olası patojen ve bozulma etkeni bakterinin gelişimini ve toksin oluşumu önlemektedir (Stiles, 1996).

Bakteriyosinlerin doğal gıda katkısı olarak kullanımları maliyet ve verim problemleri nedeniyle sınırlıdır. Bununla birlikte günümüzde yeni ve daha etkin bakteriyosinler üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar yeni bakteriyosinlerin belirlenmesinin yanı sıra bakteriyosin üretiminin optimizasyonunu da kapsamaktadır (Naidu ve diğ., 2006).

2.2.5.4. Bakteriyosin Üretiminin Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmaları ardışık işlemlerin gerçekleştirilmesine dayanmaktadır. Bu tip çalışmalarda ilk aşama çıktıyı etkileyen ortam koşullarının araştırılmasıdır. Çevresel ve teknolojik birçok faktör taranarak ürün üzerinde önemli etki gösteren faktörler belirlenmektedir. Faktör taramasının gerçekleştirilmesinin ardından, her bir faktörün hangi seviyelerde istenen etkiyi arttırdığı tespit edilmektedir. Son aşamada da bu koşulların/faktörlerin hangi kritik değerlerde üretimi optimize ettiği belirlenmektedir. Optimizasyon çalışmalarında çeşitli istatistiksel desenlerden yararlanılmaktadır. İlk aşama olan faktör tarama çalışmalarında, faktöryel deney desenleri (FDD), Plackett-Burman (PBD) deseni ve fraksiyonel faktöryel deney desenleri (FFD) kullanılabilmektedir (Sullivan ve Strobel, 1999).

FDD "X^n" şeklinde ifade edilmektedir. "X" çalışılacak faktörün kaç düzeye sahip olduğunu, "n" ise faktör sayısını ifade etmektedir. Bu deney deseninde her bir faktörün ana etkileri, ikili, üçlü ve ileri etkileşimleri tespit edilebilmektedir (Sullivan ve Strobel, 1999). Hyun ve diğ. (2006) FDD'yi kullanarak mikrokoksin GO5 bakteriyosininin üretimini etkileyen karbonhidrat, azot ve iyon kaynaklarını belirlemiştir. Fakat faktör sayısı arttığında yapılması gerekli deney sayısı artarak fiziksel koşulları zorlamakta ve bazen imkansız kılmaktadır. Bununla birlikte deneyler yürütülebilse dahi sonuçların yorumlaması zor olmaktadır. Bu nedenle deney sayısını azaltarak istenen bilgileri sağlayan desenlerden faydalanılabilmektedir (Caulcutt, 1991).

PBD'ninde "n-1" faktör "n" deney yapılarak araştırılabilmektedir. PBD'nin bakteriyosin üretimi ile ilgili kullanımı yenidir. Fernandez ve diğ, (2005) 19 değişkenin bulunduğu bir çalışmada, 20 deneme yaparak sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarının *Lactobacillus pentosus* B36 kültürünün bakteriyosin aktivitesi üzerinde etkili olduğunu bulmuşlardır. Bu desen kullanılarak sadece faktörlerin ana etkileri görülebilmekte, faktörler arasındaki etkileşimler belirlenememektedir (Cochran ve Cox, 1992).

Faktörler arasındaki etkileşimlerin de değerlendirilmesinin gerektiği durumlarda PBD yerine FFD kullanılabilmektedir. FFD, "2^{k-p}" şeklinde ifade edilmektedir. Burada "2" düzey, "k" faktör sayısı ve "p" uygulanacak fraksiyonu belirtmektedir (Kuehl, 2000). FFD birçok çalışmada bakteriyosinlerin optimizasyonunda faktörlerin taranması amacıyla kullanılmıştır. Li ve diğ. (2002) *Lactococcus lactis* bakterisiden model sistemde nisin üretmini optimize etmek amacıyla 2^{6-2} FFD kullanarak 6 besiyeri bileşeninden önemli olanları tespit etmiştir. Diğer bir çalışmada glikoz, inokülum düzeyi, O_2, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarının *Lb. plantarum* kültürünün bakteriyosin aktivitesine etkisi 2^{5-2} FFD kullanılarak araştırılmıştır (Barba ve diğ., 2002).

3. MATERYAL METOT

3.1. Kullanılan Kültürler ve Muhafazası

3.1.1 Laktik Asit Bakterileri

Çalışmalarda çeşitli fermente et ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterileri kullanılmıştır. Literatürde belirtilen idenfikasyon şemelarına göre fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanımlanmış kültürler (gram (+), katalaz (-)) % 25 gliserol içeren De-Man Rogoso Sharp (MRS) besiyerinde -18°C'de muhafaza edilmiştir (Sharpe, 1979; Harrigan, 1998). Kültürler gliserolle muhafazanın yanı sıra aktivasyon işleminin ardından MRS agar kültür ortamına dikey ekim yapılarak +4°C'de de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. İndikatör Patojen Bakteriler

Çalışmada *Bacillus cereus* DSM 4312 (DSMZ, Almanya), *Esherichia coli* O157 H7 ATCC 43894, *Listeria monocytogenes* SLCC 2371 1/2 a ve *Listeria monocytogenes* SLCC 4b ile *Salmonella enteritidis* KUKEN 369 (SZH; Nationalen Salmonella Zentrale, Higienisches Institut, Deutschland) patojen kültürleri kullanılmıştır. İndikatör bakteriler de yukarıda açıklandığı şekilde % 25 gliserol içeren "Tryptic Soy Broth" (TSB) ortamında -18°C'de ve "Tryptic Soy Agar" (TSA) yatık besiyerlerinde +4°C'de saklanmıştır.

3.2. Kullanılan Besiyerleri

Laktik asit bakterilerinin stoklanması, aktivasyonu ve antimikrobiyal aktivitelerin taranması aşamalarında MRS (Merck, Almanya) kullanılmıştır. İndikatör patojen bakterilerin stoklanmasında Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) ve aktivasyonunda % 0,6 (w/v) maya ekstraktı (M.E.) (Merck, Almanya) içeren yatık Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck, Almanya) besiyerinden faydalanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde indikatör inokülasyonu için % 1 (w/v) Agar-Agar (Merck, Almanya) içeren TSB (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan Diğer Kimyasallar

Antimikrobiyal aktivitenin karaterizasyonunda "α-chymotrypsin" (Sigma-Aldrich, A.B.D.), "pepsin" (Sigma-Aldrich, A.B.D.), "pronase" (Sigma-Aldrich, A.B.D.), "papain" (Sigma-Aldrich, A.B.D.), "trypsin" (Sigma-Aldrich, A.B.D.) ve "catalase" (Sigma-Aldrich, A.B.D.) enzimleri kullanılmıştır.

Farklı karbon kaynaklarının bakteriyosin aktivitesine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda D+glikoz-monohidrat (Merck, Almanya), D-fruktoz (Merck, Almanya), D-sakaroz (Merck, Almanya), mannoz (Merck, Almanya) ve laktoz-monohidrat (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivitenin optimizasyonunda istatistiksel deney desenlerine göre oluşturulmuş MRS bileşiminlerinde kazein (Merck, Almanya), et ekstraktı (Merck, Almanya), maya ekstraktı (Merck, Almanya), Tween 80 (Merck, Almanya), di-amonyum hidrojen sitrat (Merck, Almanya), sodyum asetat-trihidrat (Merck, Almanya), magnezyum sülfat-heptahidrat (Merck, Almanya), mangan sülfat-monohidrat (Merck, Almanya) kimyasalları kullanılmıştır.

3.4. Deneysel Çalışmalar

3.4.1. Agar Difüzyon Yöntemi

Laktik asit bakterilerinin indikatör patojenler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için agar difüzyon yöntemi uygulanmıştır (Mary-Harting ve diğ., 1972). Yöntemde öncelikle uygun sıcaklık sürelerde geliştirilmiş test kültürlerinin fermentasyon sonrası sıvısı (süpernatant) elde edilmiş, ardından TSA (% 1 agar) besiyerine inoküle edilmiş patojenler üzerindeki etki zon oluşumlarıyla tespit edilmiştir.

3.4.1.1. Süpernatantların Hazırlanması

Stok LAB'dan inokülum düzeyi % 1 (v/v) olacak şekilde MRS (5 ml) besiyerine ekimler yapılarak 37°C'de 18 saat aktivasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. LAB ikinci kez aktive edildikten sonra son aktivasyonun yapıldığı tüpten MRS (20 ml) içeren vida kapaklı şişelere % 1 (v/v) düzeyinde ekimler yapılmıştır. Ardından kültürler aynı koşulda fermantasyona bırakılmıştır.

Fermentasyon işlemini takiben kültürleri içeren MRS besiyerleri santrifüj tüplerine alınarak, 4°C'de 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemine (Universal 32R, Hettich, Almanya) tabi tutulmuş ve süpernatantlar elde edilmiştir (Yamato ve diğ. 2003). Santrifüj işleminin ardından, her bir süpernatant ikiye bölünmüştür. Her bir test kültürü için süpernatantların 10 ml' lik ilk kısmı pH ayarlaması (Hanna Instruments, Amerika) ile nötralize (6.90-7.00) edilerek 0,22 µm memmbran filtre ile (Sartorious, Almanya) steril edilmiştir. Kalan 10 ml'lik kısım ise orijinal pH korunarak aynı şekilde memmbran filtrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Her bir kültür için hazırlanan bu iki 10'ar ml'lik steril süpernatant ileri ki aşamalarda antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.4.1.2. İndikatör Patojenlerin İnokülasyonu

LAB'ın fermentasyon basamağına paralel olarak stok patojen bakteriler *B. cereus* DSM 4312 (DSMZ, Almanya) 30°C'de, *E. coli* O157 H7 ATCC 43894, *L. monocytogenes* SLCC 2371 1/2a, *L. monocytogenes* SLCC 4b ve *S. enteritidis* KUKEN 369, 37°C'de yatık TSA'da (% 0,6 M.E.) 18 saat aktivasyona bırakılmıştır.

LAB'ın santrifüj işlemine paralel olarak, su banyosunda 48°C'ye soğutulmuş deney tüplerindeki 16 ml TSA (%1 agar) besiyerine toplam bakteri yükü 10^5 kob/ml olacak şekilde indikatör bakteriler aşılanmıştır.

Patojenlerin inokülasyon düzeyleri McFarland çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Bakteri yükünü doğrulamak amacıyla aynı zamanda her bir patojen için dökme plak yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Vorteks (Janke&Kuntel, IKA, Laborteknik, Almanya) ile homojenizasyon işleminin ardından patojenleri içeren agarlar steril plastik petrilere (9cm) dökülmüştür. Bu işlemlerin ardından agarların katılaşmasını sağlamak amacıyla petriler +4°C'de 30 dakika bekletilmiştir (Zarate ve diğ., 2005).

3.4.1.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Agarların katılaşmasının ardından petrilerde 8,5 mm çapında oyuklar açılmıştır. Bu oyuklara nötralize edilen ve edilmeyen süpernatantlardan 80 µl ilave edilmiş, sıvıların ön difüzyonu için petriler +4°C'de 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra petriler her bir indikatör patojen için uygun olan sıcaklıkta 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan zonlar ölçülmüştür (Simonetta ve diğ., 2002).

Antimikrobiyal aktivite, tarama çalışmalarında zon çapı ölçülerek, karakterizasyon ve optimizasyon çalışmalarında ise seri dilüsyon yöntemiyle tayin edilmiştir. Dilüsyon yönteminde aktivite, "AU/ml" ("Arbitrary Unit") olarak ifade edilmiştir. Bu yöntemde 100µl süpernatant Ependorf tüplerinde fizyolojik tuz çözeltisi (% 0,85 NaCl (w/v)) kullanılarak 2 kat seyreltimelere tabi tutulmuştur. Her seyreltimden indikatör içeren petrilerdeki oyuklara 80 µl ilave edilmiştir (Yousef ve Carlstrom, 2003).

$$AU/ml = (Df_i)^{-1}.1000.V^{-1} \qquad (3.4.1.3a)$$

Df_i = Zon oluşumunun gözlediği en büyük dilüsyon
V= Petride açılmış oyuklara konulan hacim (ml)

Bunlara ek olarak pH stabilitesi ve ısıl stabilite çalışmalarında inhibisyon aktiviteleri de belirlenmiştir. İnhibisyon aktivitesi (korunan aktivite) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Jiang ve diğ. 2004).

$$\%\text{İnhibisyon Aktivitesi} = (R_z-R_k)^2.(Rm_z-R_k)^{-2}.\%100 \qquad (3.4.1.3b)$$

R_z = Zon Çapı, R_k= Kuyu Çapı, Rm_z= Maksimum Zon Çapı

3.4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyonu

Nötralize edilen süpernatantlarda tespit edilen zon olşumunun ardından, buna neden olan antimikrobiyal aktivitenin kaynağı araştırılmıştır. Antimikrobiyal etkinin protein yapıda molekül(ler)den ileri gelip gelmediği Bölüm 3.3'de belirtilen proteazlar kullanılarak test edilmiştir. Ayrıca katalaz enzimi kullanılarak aktivitenin hidrojen peroksit faktöründen kaynaklanıp kaynaklanmadığı da araştırılmıştır. Bu veriler ışığında tespit edilen protein yapıdaki bakteriyosin benzeri aktivitenin pH ve ısıl stabilitesine bakılarak ileri karakterizasyonları yapılmıştır. Kültürün gelişim eğrisi çıkartılarak gelişme fazının hangi safhalarında bakteriyosin benzeri aktivitenin üretildiği belirlenmiştir. Son aşamada antibakteriyel aktivitenin etki şekli (bakterisidal / bakteriyostatik) belirlenmiştir.

3.4.2.1. Proteaz Uygulaması

Bölüm 3.3.'de belirtilen "α-chymotrypsin" (Sigma-Aldrich A.B.D.), "pepsin" (Sigma-Aldrich A.B.D.), "pronase" (Sigma-Aldrich A.B.D.), "papain" (Sigma-

Aldrich A.B.D.), "trypsin" (Sigma-Aldrich A.B.D.) enzimlerinin fosfat tampon çözeltisinde (0,2 M K_2HPO_4, pH:6) 1 mg/ml'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Ardından 250µl süpernatant ile 25µl enzim çözeltisi ependorf tüplerinde karıştırılarak 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası agar difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. Enzim süpernatant karışımıyla birlikte, süpernatant ve enzim çözeltileri de kontrol amacıyla antimikrobiyal aktivite tayinine dahil edilmiştir (Gourama ve diğ., 2005).

3.4.2.2. Katalaz Uygulaması

Proteaz uygulamasında olduğu gibi belirtilen hacimlerde süpernatant ile fosfat tampon çözeltisinde (0,2 M K_2HPO_4, pH:6) katalaz enzimi çözeltisi (1 mg/ml) karıştırılmıştır. Karışım 37°C 60 dakika inkübe edilmiş, aktivite tayini agar difüzyon yöntemiyle yapılmıştır.

3.4.2.3. pH Stabilitesi

Süpernatantların pH ları 10 N NaOH ve 6 N HCl ile 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 olarak ayarlamıştır. Süpernatantlar pH ayarlamasının ardından 37°C 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası nötralizasyon işlemi yapılmış ve seri dilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal aktiviteler saptanmıştır.

3.4.2.4. Isıl Stabilite

Süpernatantlara (5 ml) 45°C, 85°C için su banyosunda, 100°C için elektirikli ısıtıcıda ve 120°C için otoklavda 30'ar dakikalık ısıl işlem uygulanmıştır. Sıcaklık ölçümleri (45, 85, 100°C) civalı termometre ile etkinliğine bakılmayacak olan ayrı tüpteki aynı süpernatanta daldırılarak yapılmıştır.

3.4.2.5. Gelişim Eğrisinde Bakteriyosin Üretiminin Belirlenmesi

Bakteriyosin benzeri aktivite gösteren kültürün tespiti ve temel karakterizasyon işlemlerinin ardından kültürün gelişimin hangi safhasında bakteriyosin benzeri bileşiği/bileşikleri ürettiği araştırılmıştır. Bu çalışmada 1'er saatlik periyotlarda 24 saat süresince mikrobiyal yükteki (kob/ml) değişimi belirlemek için MRS agara yayma plak yöntemiyle ekimler yapılmış ve pH değişimi kaydedilmiştir. Aynı zamanda, her periyotta bakteriyosin benzeri aktivitenin tayini için örnekler ayrılmış ve -18°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.3. Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin Etki Modu

Bakteryosin benzeri aktivitenin bakterisidal veya bakteriyostatik karakterde olup olmadığı koloni sayım yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu çalışmada 800 AU/ml'lik aktivite içeren süpernatant (15ml) çift güçlü TSB (15 ml)'ye ilave edilmiştir. Süpernant bulunmayan tek güçlü TSB (30 ml) kontrol olarak kullanılmıştır (Schöbitz ve diğ., 2003). Kontrol ve bakteriyosin içeren ortamlara 10^5 kob/ml düzeyinde *L. monocytogenes* 1/2a inoküle edilmiştir. İlk 9 saat süresince ve 24. saatte her iki gruptan dökme plak yöntemiyle TSA'ya ekimler yapılmıştır (Leisner ve dig. 2002). Deneyler iki tekrarlı ve paralel olarak yürütülmüştür. Sonuçlar zamana karşı bakteri yükü olarak kaydedilmiştir.

3.4.4. Optimizasyon Çalışmaları

Bakteriyosin benzeri aktivitenin arttırılması amacıyla öncelikle farklı şeker kaynaklarının etkileri belirlenmiştir. Sonuçların yorumlanmasında Minitab Release 12® programından faydalanılmıştır. Yüksek aktivite sağlayan şeker kaynağı belirlendikten sonra besiyeri bileşimlerinin aktivite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla Plackett-Burman ve Fraksiyonel Faktöryel tarama desenleri kullanılmıştır. Desenlerin oluşturulmasında ve sonuçların yorumlanmasında yine Minitab Release 12® programı kullanılmıştır. Aktivite üzerinde önemli etkisi olan ($P<0,05$) besiyeri bileşenlerinin belirlenmesinin ardından 3^{n-1} fraksiynonel deseni kullanılarak aktivitenin maksimum olduğu koşullar tespit edilmiştir. Optimizasyon deseninin oluşturulmasında ve verilerin değerlendirilmesinde Statictica 6.0 programından yararlanılmıştır.

3.4.4.1 Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

Glikoz, fruktoz, laktoz, mannoz, sakaroz şekerleri kullanılarak farklı MRS besiyeri bileşimleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bileşimler 118°C'de 15 dakika otoklavlama işlemine tabi tutulmuştur. Sterilizasyon işleminin ardından farklı şeker kaynakları içeren besiyerlerinin pH değerleri 5,7 olarak ayarlanmış ve 0,22 µm membran filtre (Sartorious, Almanya) ile tekrar sterilizasyonu yapılmıştır. Ardından besiyerleri 2 kez aktive edilmiş kültürle % 1 (v/v) düzeyinde inoküle edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar difüzyon yöntemi uygulanarak her bir şeker kaynağı için bakteriyosin benzeri aktiviteler belirlenmiştir.

3.4.4.2. Faktörlerin Taranması

MRS bileşenlerinin bakteriyosin benzeri aktivite üzerindeki etkisinin tespit edilebilmesi için Bölüm 3.3'de belirtilen kimyasallar kullanılmıştır. Plackett-Burman ve Fraksiyonel deney desenleriyle oluşturulan bileşimlere 118°C'de 15 dakika sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Bileşen kombinasyonları 2 kez aktive edilmiş kültürle % 1 (v/v) düzeyinde inoküle edilmiştir. Uygun sıcaklıkta (37°C) 18 saat inkübasyon sonrasında seri dilüsyon yöntemiyle aktivite tayinleri yapılmıştır.

3.4.4.3. Optimizasyon

Tarama desenlerinin uygulanmasının ardından aktiviteyi etkileyen besiyeri bileşenleri kullanılarak optimizasyon çalışmasına geçilmiştir. Koşulların optimizasyonunda 3_{3-1}^{2}, 3 düzeyli fraksiyonel desen kullanılmıştır. Deney desenin oluşturduğu kombinasyonlardaki antimiktobiyal aktiviteler seri dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir.

3.4.5. Standart ile Karşılarştırma

Standart olarak nisinin (Valisin, USA) kullanıldığı çalışmada farklı konsantrasyonlarda çözeltiler optimizasyon çalışmalarından elde edilen maksimum bakteriyosin benzeri aktivite ile karşılaştırılmıştır. Öncelikle 10^4 IU/ml düzeyinde nisin içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Ardından stoktan yapılan ileri seyreltimlerle 80 µl'lik hacimde 800, 500, 400, 250 IU nisin olacak şekilde yeni çözeltiler hazırlanmıştır. Nisin çözeltilerinin antimikribiyal aktiviteleri seri dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri

Agar difüzyon yöntemi uygulanarak 37°C 18 saat geliştirilen stok laktik asit bakterilerinin antagonistik aktiviteleri belirlenmiştir. İki tekrarlı deney sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1:LAB'nin İndikatörler Üzerindeki Antimikrobiyal Aktiviteleri

LAB	B.c		S.e.		E.c.		L.m.1/2a		L.m.4b	
	S	N.S	S	N.S	S	N.S	S	N.S	S	N.S
Lb.1	2-2	-	2-2	-	2-3	-	2-2	-	2-3	-
Lb.2	2-2,5	-	2-2	-	2-2,5	-	-	-	2-2	-
Lb.3	1,5-2	-	-	-	2-2	-	-	-	1,5-2	-
Lb. 4	2-2	-	1-1,5	-	1,8-2	-	-	-	1-2	-
Lb.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb.6	<1-1	-	-	-	1-2	-	-	-	1-2	-
Lb.7	1-1,5	-	-	-	2-2	-	-	-	2-2	-
Lb.8	1-2	-	-	-	1-1,5	-	-	-	1,5-2	-
Lb.9	1-2	-	-	-	1-2	-	-	-	1-2	-
Lb.10	2-2	-	1-1,5	-	1-2	-	-	-	1-1,5	-
***L. lactis subsp lactis* DSM 20729**	2-2,5	-	2-2	-	2-2	-	2-2	-	2-3	-
Ped.11	-	-	-	-	-	-	9-9	9-9	-	-
Lb.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb.15	1-1	-	1-1	-	1-1	-	-	-	1-1	-
Lb.16	1-1	-	1-0	-	1-1	-	-	-	1-1	-

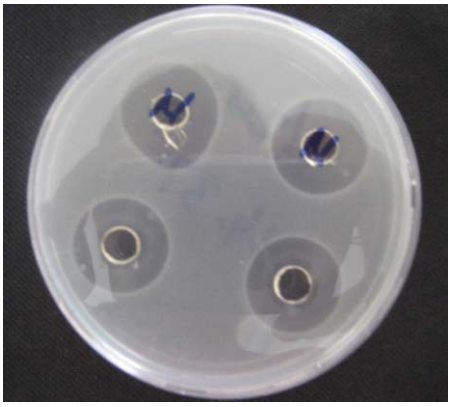
Değerler Zon Kalınlığını (mm) ifade etmektedir. S: Süpernatant, N.S.: Nötralize edilmiş Süpernatant (pH 6,90-7,00)
B.c.: *B. cereus*; S.e.: *S. enteritidis*; E.c.: *E. coli* O157:H7; L.m. 1/2a: *L. monocytogenes* 1/2a; L.m. 4b: *L. monocytogenes* 4b

Yapılan tarama çalışması sonucunda Ped. 11 kodlu kültürün *L. monocytogenes* 1/2a indikatörü üzerinde güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca izolattan elde edilen bu süpernatantın nötralizasyonu sonucunda zon kalınlığında bir değişim olmadığı görülmüştür. Bu durum antimikrobiyal aktivitenin düşük pH dışında diğer faktörlerden kaynaklandığını göstermektedir.

Antilisteriyal aktivitesi tespit edilen Ped. 11 kodlu kültürün "microbial identification system" (MIDI, Inc., Newark, DE) ile tür düzeyinde identifikasyonu yapılmıştır

(Anon, 2004). Bu yöntemle bakterinin yağ asidi profili referans kütüphanesi ile karşılaştırılmış ve analiz sonucunda kültürün *Pediococcus pentosaceus* olduğu belirlenmiştir.

Birçok çalışmada *Pediococcus* spp. türünün *L. monocyotogenes* üzerine antimikrobiyal etkisi tespit edilmiştir (Hugas, 1998; Hereijgers ve diğ., 1991). Tablo 4.1'de görüldüğü gibi *Ped. pentosaceus* kültürü diğer *L. monocytogenes* türü üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Benzer bulgulara diğer çalışmalarda da rastlanmaktadır. Örneğin Jiang ve diğ. (2004) *Pediococcus pentosaceus* ACCEL kültürüyle yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes* CCRC 14024 kültüründe 6 mm'den fazla zon elde ederken, *L. monocytogenes* RamII kültüründe zon gözlememişlerdir.



Şekil 4.1: *Ped. pentosaceus* Kültüründe Görülen Antimikrobiyal Aktivite

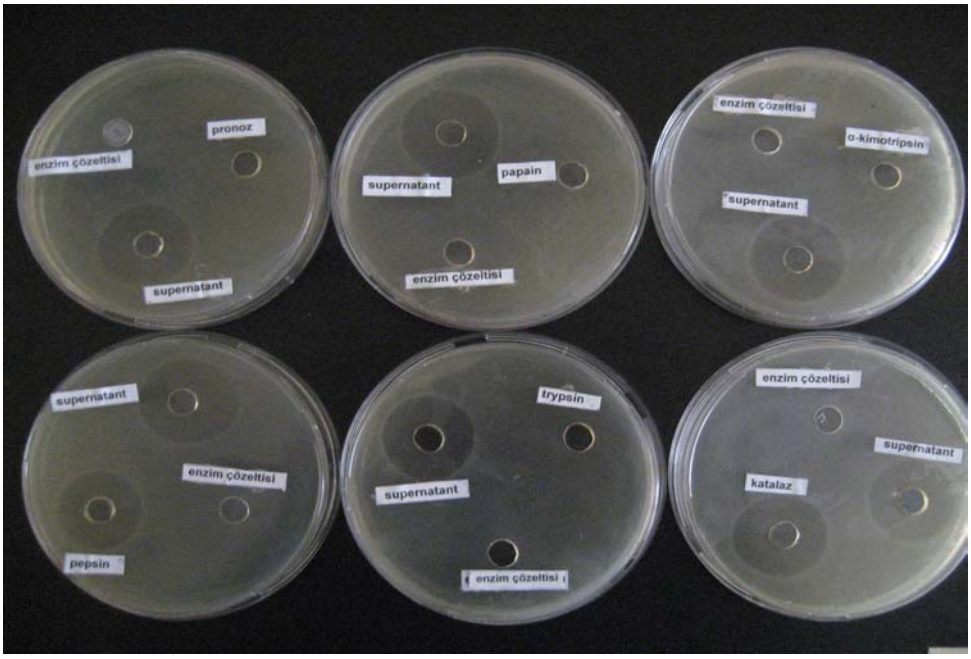
Test edien diğer LAB, patojenler üzerinde önemli bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Gözlenen zayıf antimikrobiyal aktivitelerin ise pH faktöründen ileri geldiği tespit edilmiştir.

Ped. pentosaceus bakterisinin 20, 30, 37, 45°C'lerde geliştiği koşullarda da aktiviteler incelenmiş, nötralize edilmiş süpernatantlarda sırasıyla 1,5-1, 8-7, 8-8 ve 6-6 mm lik zonlar elde edilmiştir. Zon değerleri dikkate alınarak bundan sonraki aşamalarda *Ped. pentosaceus* kültürüyle 37°C'de çalışılmıştır. Ahn ve dig. (2000) de çalıştıkları Pediococcus izolatının en yüksek bakteriyosin aktivitesini 37°C'de elde etmişlerdir. Diğer test kültürleri ile optimum sıcaklıkları yanında 20°C'de de çalışılmış, ancak hiçbir zon oluşumu gözlenmemiştir.

4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyonu

4.2.1. Proteaz ve Katalaz Uygulaması

Ped. pentosaceus kültürünün gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin hangi faktörden kaynaklandığı proteaz ve katalaz uygulamasıyla tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Tablo 4.2'de enzim uygulamaları sonucu gözlenen zon değerleri ve inhibisyon aktiviteleri verilmiştir.



Şekil 4.2: Antimikrobiyal Aktivitenin Enzim Toleransı

Tablo 4.2: Enzim Uygulamaları Sonucu Gözlenen Zon Değerleri (mm) ve İnhibisyon Aktiviteleri (%)

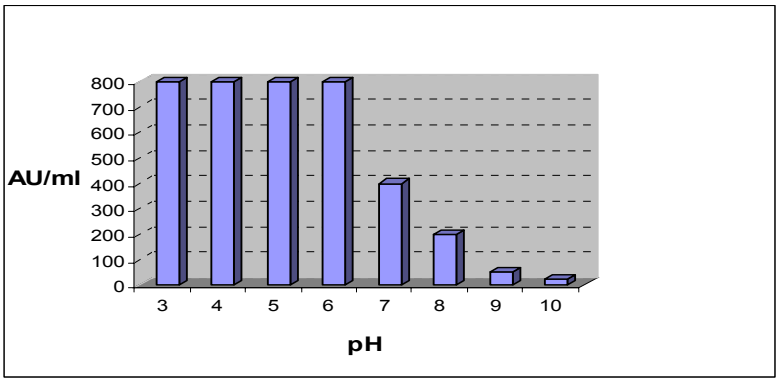
Enzim Çözeltisi	Supernatant	Enzim + Süpernatant		İnhibisyon Aktivitesi (%)
0-0	9,5-8	Papain	0-0	0
0-0	9-9	Pepsin	7,5 - 8	74,15
0-0	8,5-9	Tripsin	0-0	0
0-0	8-9	Alfa-kimotripsin	0-0	0
0-0	9-8	Pronaz	0-0	0
0-0	9-8	Katalaz	8-9	100

Süpernatanta katalaz enziminin uygulanması sonucunda antimikrobiyal aktivite de bir değişim olmamıştır. Bu veri aktivitenin hidrojen peroksitten kaynaklanmadığını göstermektedir. Öte yandan papain, tripsin, alfa-kimotripsin ve pronaz proteazlarının uygulanması sonucunda ise antimikrobiyal aktivite tamamen kaybolmuştur. Deney sonuçları antimikrobiyal aktiviteyi oluşturan faktörün/faktörlerin protein yapısında bakteriyosin-benzeri bileşik(ler) olduğunu göstermektedir. *Ped. pentosaceus*'un

antilisteriyal bakteriyosin benzeri aktivitesi bir çok çalışmada tespit edilmiştir (Brede ve diğ., 2006; Dicks ve Todorov, 2005c; Jiang ve diğ., 2004; Hereijgers ve diğ., 1991). Pepsin uygulaması incelendiğinde aktivitenin % 74,15'inin korunduğu gözlenmiştir. Bu durum bakteriyosin benzeri yapının veya yapıların pepsin enzimine dirençli olduğunu göstermektedir. Bakteriyosinler insan sindirim sistemindeki protezlarla indirgenmesine karşın bazı enzimlere karşı direnç gösterebilmektedirler. Örneğin 1. sınıf bakteriyosinlerden nisin tripsin, pepsin, erepsin enzimlerine (Hoover ve Hurst 1993); lacticin 3147B pepsine (Guder ve diğ., 2000); pantaricin C ise pepsin ve proteinaz K enzimlerine direnç göstermektedir (Gonzales ve diğ, 1994). Aynı şekilde Chobert ve dig. (2006) *Enterococcus durans*'dan izole edilen bakteriyosinin tripsin ve pepsine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Jiang ve diğ. (2004) tarafından *Ped. pentosaceus* ile yapılan çalışmada ise bakteriyosin aktivitesi pronaz, α-kimotripsin ve pepsin uygulamasıyla tamamen ortadan kalkmıştır.

4.2.2. Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin pH Stabilitesi

Farklı pH değerlerinde 4 saatlik inkübasyon sonucunda *Ped. pentosaceus* süpernatantında gözlenen bakteriyosin benzeri aktiviteler Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3: Farklı pH Değerlerinde Gözlenen Bakteriyosin Benzeri Aktivite

Şekilde de görüldüğü gibi pH 3, 4, 5, 6 değerlerinde bakteriyosin aktivitesi 800 AU/ml, pH 7'de 400 AU/ml'dir. Alkali koşullarda aktivite azalmış, pH 8, 9, 10'da sırasıyla 200, 50 ve 25 AU/ml olarak tespit edilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda bakteriyosinlerin düşük pH değerlerinde daha stabil ve yüksek aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Örneğin Mattiason ve arkadaşlarının (2005) *Lb. aciophilus* ile yaptıkları çalışmada bakteriyosin aktivitesinin pH 4-9 arasında değişmediği ancak pH 10'da aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada *S.*

*thermophilus'*da görülen bakteriyosin aktivitesinin pH 10'da kaybolduğu saptanmıştır (Aktypis ve Kalantzopuoulos, 2003).

4.2.3. Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin Isıl Stabilitesi

Farklı ısıl işlem uygulamalarının bakteriyosin benzeri aktivite üzerindeki etkisi Tablo 4.3'de görülmektedir.

Tablo 4.3: Farklı Sıcaklık-Süre Uygulamalarının Bakteriyosin Benzeri Aktivite Üzerine Etkisi

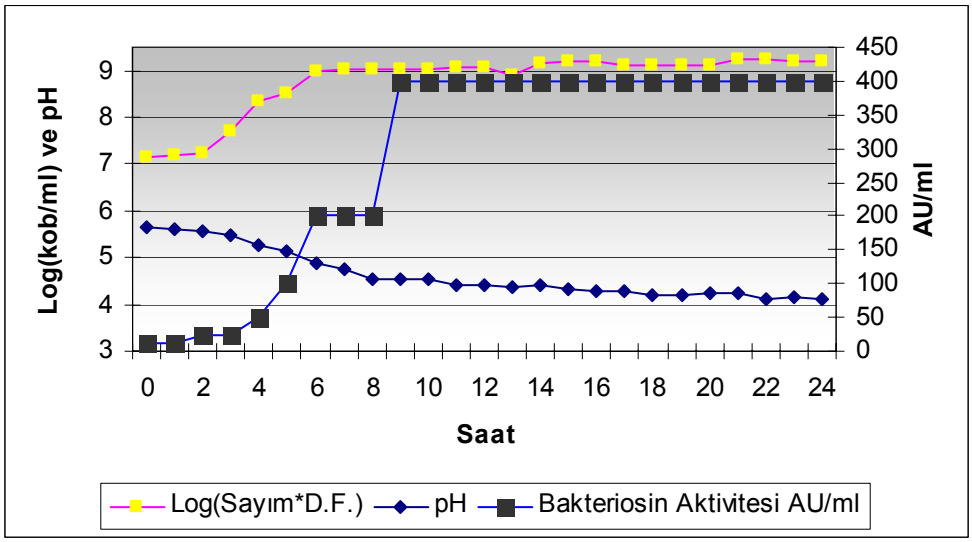
Sıcaklık-Süre	İnhibisyon Aktivitesi (%)	Bakteriosin Aktivitesi (AU/ml)
45°C-30dk	100	400
85°C-30dk	60,49	200
100°C-30dk	30,86	25
120°C-30dk	0	0

Bakteriyosin aktivitesi 45°C-30dak. uygulamasında stabilitesini korumuştur. Aktivitenin 100°C'ye kadar azalarak devam ettiği saptanmıştır. Ancak 120°C'de 30 dakikalık ısıl işlem neticesinde aktivite tamamen kaybolmuştur. Farklı kültürlerle yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Manghi ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada kısmi saflaştırılmış enterosinin 100°C 30 dakikalık ısıl işlem sonucunda aktivitesinin % 50 sini koruduğu; ancak 121°C 15 dakikalık uygulamada kaybolduğunu belirlemişlerdir. Somkuti ve Gilbreth (2005) tarafından yapılan çalışmada da *S. thermophilus* bakterisinden elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosin preparatının 100°C-60 dakika ısıl işlem sonrasında aktivite gösterdiği ancak 90. dakikadan itibaren aktivitenin ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Çeşitli çalışmalarda termostabilitenin pH ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Örneğin yüksek ısıl işlem düşük pH kombinasyonlarında pediyosin benzeri aktivitenin korunduğu belirtilmiştir (Dicks ve Todorov, 2005c; Jiang ve diğ., 2004).

4.2.4. Gelişim Eğrisinde Bakteriyosin Üretiminin Belirlenmesi

Ped. pentosaceus kültürünün 24 saat süresince gösterdiği gelişim, pH değişimi ve bakteriyosin üretimi Şekil 4.4'de verilmiştir. Bakteriyosin aktivitesi geç logaritmik faz ve erken durağan fazda hızla yükselmiş ve 9. saatten itibaren aktivite de bir değişim olmamıştır. Bulgular üretilen antimikrobiyal faktörün sekonder bir metabolit olduğunu göstermektedir. Gelişim sonucunda mikroorganizma sayısı $1{,}4.10^7$ kob/ml'den $1{,}5.10^9$ kob/ml'ye yükselmiş ve pH değeri de 5,63'den 4,10'na

düşmüştür. Pediococcus kültürü ile yapılan bir çalışmada bakteriyosin üretiminin geç eksponansiyel fazda meydana geldiği saptanmıştır (Ahn ve diğ., 2000).



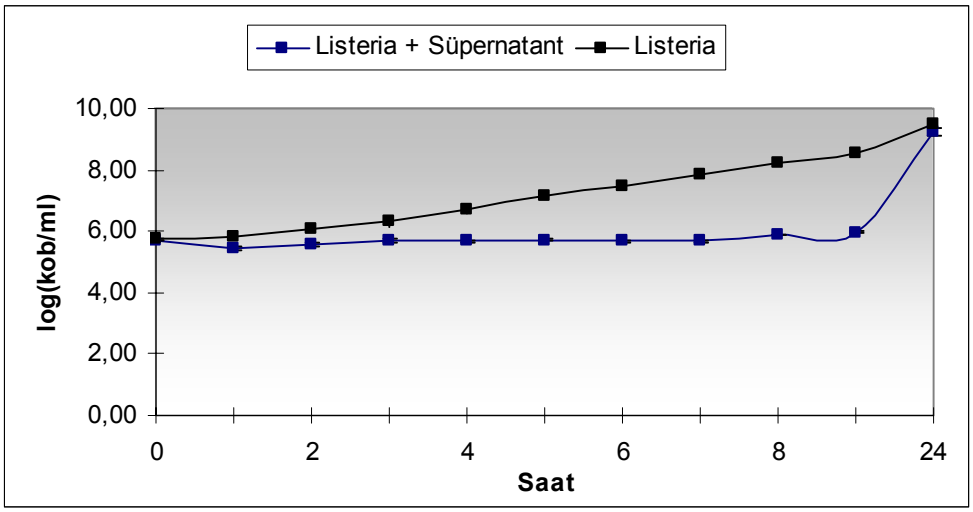
Şekil 4.4: *Ped. pentosaceus* Gelişimi Süresince Bakteriyosin Benzeri Aktivite Üretimi

Benzer şekilde konu ile ilgili yapılan birçok çalışmada bakteriyosin aktivitesinin gelişim süresince 9. ve 12. saatleri arasında maksimum seviyeye ulaştığı ve durağan faz süresince 24. saate kadar sabit kaldığı tespit edilmiştir (Somkuti ve Gilbreth, 2005; Yamato ve diğ, 2003; Leisner ve diğ., 2002).

4.2.5 Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin Etki Modu

Tekrarlı ve paralel çalışmaların sonucunda antimikrobiyal aktivitenin bakteriyostatik özellikte olduğu saptanmıştır. Şekil 4.5'de gördüğü gibi *L. monocytogenes* kültürünün süpernatant bulanan ortamda adaptasyon (lag) fazı uzamış, 9. saatte kontrol yükü 8,53 logkob/ml düzeyine yükselirken, test grubunun yükü sabit kalmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda *Ped. pentosaceus* kültürünün bakteriyosin aktivitesinin bakteriyostatik bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Dicks ve Todorov, 2005c; Jiang ve diğ., 2004).

İndikatör patojen 24 saat sonrasında bu bariyeri aşmış ve mikrobiyal yük kontrolle aynı düzeye ulaşmıştır. Leisner ve dig (2002) tarafından enterosinler üzerinde yapınlan çalışmada *L. innocua* üzerinde bakteriyostatik bir etki görülmüş ve 24 saatlik inkübasyonun ardından indikatör bu bariyeri aşabilmiştir.



Şekil 4.5: Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin Karakterizasyonu

4.3. Optimizasyon Çalışmaları

4.3.1. Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

Glikoz, fruktoz, laktoz, mannoz ve sakaroz şekerleri kullanılarak hazırlanan 5 farklı MRS bileşiminde gözlenen 3 tekrarlı ve paralel yapılan çalışmanın pH değişimleri ve aktivite değerleri Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4: Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteriyosin Benzeri Aktivite Üzerine Etkisi

Deneme	Ölçümler	Glikoz		Fruktoz		Laktoz		Mannoz		Sakkaroz		1/2a Yükü (kob/ml)
1	*log(AU/ml)*	2,60	2,60	2,60	2,90	2,00	2,00	2,30	2,30	2,90	2,90	$7{,}1x10^5$
	ΔpH	1,33	1,40	1,36	1,32	0,23	0,23	0,74	0,76	1,44	1,47	
2	*log(AU/ml)*	2,60	2,60	2,60	2,60	1,70	2,00	2,30	2,30	2,90	2,30	$5{,}4x10^5$
	ΔpH	1,42	1,40	1,13	1,20	0,24	0,23	0,65	0,66	1,50	1,47	
3	*log(AU/ml)*	2,60	2,90	2,90	2,90	2,00	-(*)	2,30	2,30	2,90	2,90	$5{,}2x10^5$
	ΔpH	1,41	1,41	1,38	1,38	0,15	0,14	0,76	0,77	1,51	1,47	

(*):Kayıp Değer

Üçüncü denemedeki kayıp değer nedeniyle 1. ve 2. deneme kullanılarak yapılan istatistiksel analizde en yüksek aktivitenin sakaroz, fruktoz ve glikoz kullanıldığında elde edildiği görülmüştür (Ek Tablo A.1 ve Tablo A.2) ($p<0,05$). En düşük etkinin ise laktoz kullanıldığında ortaya çıktığı gözlenmiştir ($p<0,05$). İleri çalışmalarda yapılan faktör tarama ve optimizasyon çalışmalarında karbon kaynağı olarak sakaroz kullanılmıştır

4.3.2. Besiyeri Bileşenlerinin Etkisi

Yürütülen bu çalışmada MRS bileşenlerinin etkisi Plackett-Burman deney (PBD) deseni ve Fraksiyonel Faktöryel deney (FFD) deseni kullanılarak araştırılmıştır. Tablo 4.5'de MRS bileşimi verilmiştir.

Tablo 4.5: MRS Bileşimi (Merck, Almanya)

Bileşen	% (w/v)
Kazein	1
Et Ekstraktı	0,8
Maya Ekstraktı	0,4
Sakkaroz	2
Di-potasyum hidrojen fosfat	0,2
Tween 80	0,1
Di-amonyum hidrojen sitrat	0,2
Sodyum asetat	0,5
Magnezyum Sülfat	0,02
Manganaz Sülfat	0,004

4.3.2.1. Plackett-Burman Deseni Uygulamaları

PBD ile yapılan 1. ve 2. deneylerin kombinasyonları aşağıdaki Tablo 4.6 ve Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6: PBD-1 Sonuçları ve Bileşen Kombinasyonları(%w/v)

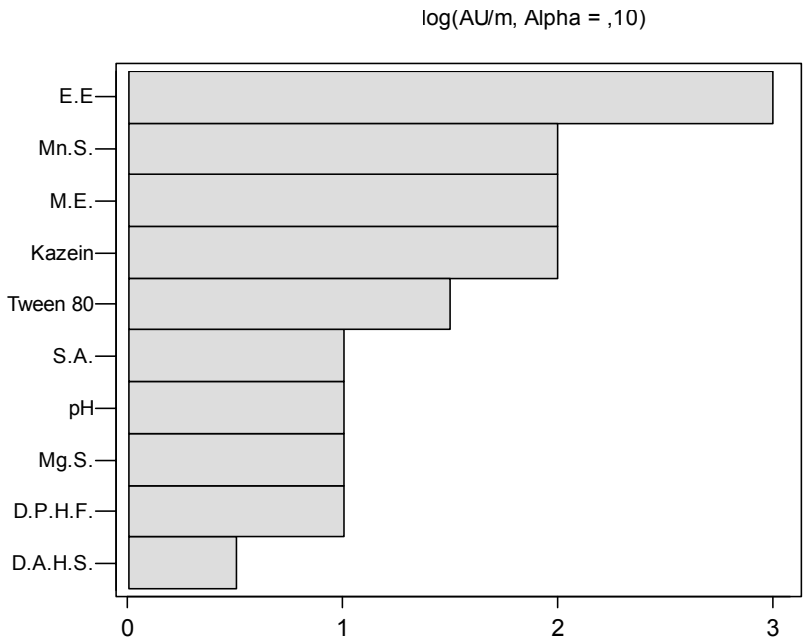
Deney	Kazein	E.E.	M.E	D.P.H.F	Tween 80	D.A.H.S	S.A.	Mg.S.	Mn.S.	pH	D1	Log (AU/ml)
1	1		0,4				0,5	0,02	0,004	5,7		1,70
2	1	0,8		0,2				0,02	0,004	6,5		2,30
3		0,8	0,4		0,1				0,004	6,5		2,00
4	1		0,4	0,2		0,2				6,5		2,00
5	1	0,8		0,2	0,1		0,5			5,7		2,60
6	1	0,8	0,4		0,1	0,2		0,02		5,7		2,90
7		0,8	0,4	0,2		0,2	0,5		0,004	5,7		2,00
8			0,4	0,2	0,1		0,5	0,02		6,5		2,60
9				0,2	0,1	0,2		0,02	0,004	5,7		1,10
10	1				0,1	0,2	0,5		0,004	6,5		1,70
11		0,8				0,2	0,5	0,02		6,5		2,00
12										5,7		1,10

E.E.: Et ekstraktı; M.E: Maya Ekstraktı; D.P.H.F.:di-potasyum hidrojen fosfat; D.A.H.S.: di-amonyum hidrojen sitrat; S.A.: Sodyum asetat; Mg.S.: Magnezyum sülfat; Mn.S.: Manganaz sülfat; D1: sanal faktör.

Tablo 4.7: PBD-2 Sonuçları ve Bileşen Kombinasyonları (%w/v)

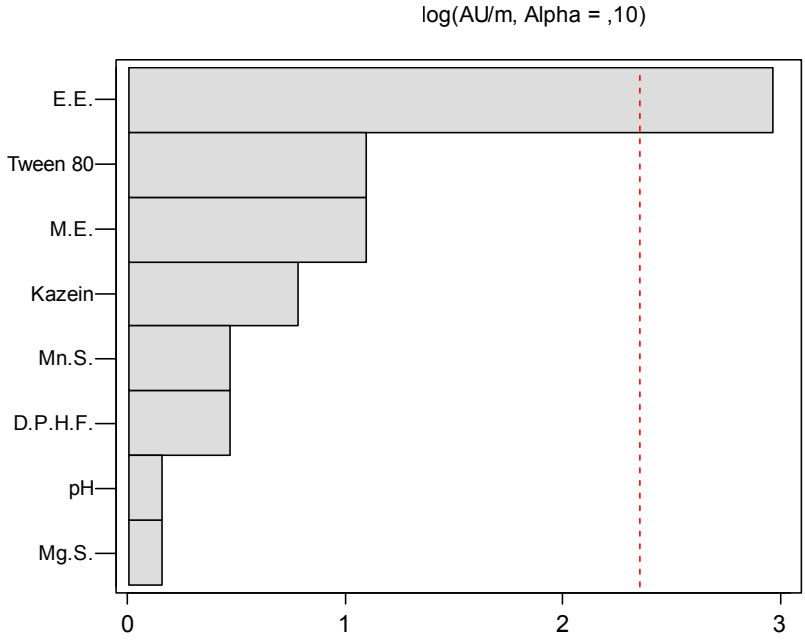
Deney	Kazein	E.E.	M.E.	D.P.H.F.	Tween 80	Mg.S.	Mn.S.	pH	D1	D2	D3	Log(AU/ml)
1				0,2	0,1	0,02		7	1	-1	1	1,10
2	1		0,4	0,2		0,02		5,7	-1	1	1	2,00
3		0,8	0,4	0,2		0,02	0,004	5,7	1	-1	-1	2,30
4								5,7	-1	-1	-1	1,10
5	1	0,8		0,2				7	1	1	-1	2,60
6	1				0,1	0,02	0,004	5,7	1	1	-1	2,30
7	1	0,8		0,2	0,1		0,004	5,7	-1	-1	1	2,60
8			0,4	0,2	0,1		0,004	7	-1	1	-1	2,30
9	1	0,8	0,4		0,1	0,02		7	-1	-1	-1	2,90
10		0,8	0,4		0,1			5,7	1	1	1	3,20
11		0,8				0,02	0,004	7	-1	1	1	2,60
12	1		0,4				0,004	7	1	-1	1	1,70

İstatistiksel analiz sonucunda PBD-1 deneyinde faktörler arasında önemli bir fark elde edilememiştir (P>0.05) (Ek, Tablo A.3 ve Tablo A.4). Aşağıdaki Şekil 4.5'de PBD-1 için faktör etkilerini gösteren pareto çizelgesi verilmiştir. Deney sonucunda D faktörünü 3'e çıkarmak amacıyla sodyum asetat ve di-amonyum hidrojen sitrat bileşenleri sabitlenerek yeni bir PBD deseni (PBD-2) oluşturulmuştur.



Şekil 4.6: PBD-1'e Göre Bileşen Etkilerini Gösteren Pareto Çizelgesi

PBD-2 deney deseninde çalışılan pH aralığı genişletilerek 5,60-7,00 olarak ayarlanmıştır. İstatistiksel analiz sonucunda faktörlerin ana etkileri arasında yine bir fark gözlenmemiş (Ek Tablo A.5 ve Tablo A.6), ancak et ekstraktının katkısının önemli olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.7'da faktör etkileri görülmektedir. Benzer veriler Barba ve diğ. (2002) tarafından yapılan araştırmada da elde edilmiştir. Bu çalışmada 2_{5-2}^{3} fraksiyonel deseni kullanılmış ancak hiçbir faktörün *Lb. plantarum* kültürünün bakteriyosin üretimini etkilemediği görülmüştür. Yaptığımız çalışmada da gerek literatür bilgileri gerekse uygulanan PBD sonuçları dikkate alınarak farklı bir tarama deseninin oluşturulmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.7: PBD-2'ye Göre Bileşen Etkilerini Gösteren Pareto Çizelgesi

4.3.2.2. Fraksiyonel Faktöryel Deney Deseni Uygulaması

Yeni desende kazein ve etkinliği PBD'de düşük olarak saptanan pH faktörü sabitlenmiştir. Uygulanan FFD deseninde (2^{4}_{6-2}), PBD'lerde yüksek etki göstermiş et ekstraktı, maya ekstraktı, Tween 80 ve literatürde bakteriyosin üretimi üzerindeki etkileri vurgulanan dipotasyum hidrojen fosfat, magnezyum sülfat ve manganaz sülfat değişken olarak seçilmiştir (Li ve diğ., 2002). FFD'ye merkez noktada dört tekrar ilave edilerek bakteriyosin benzeri aktivite davranışının her bir faktör için belirtilen veri aralıklarında değişkenliği araştırılmıştır. Tablo 4.8'de FFD ve sonuçları verilmiştir.

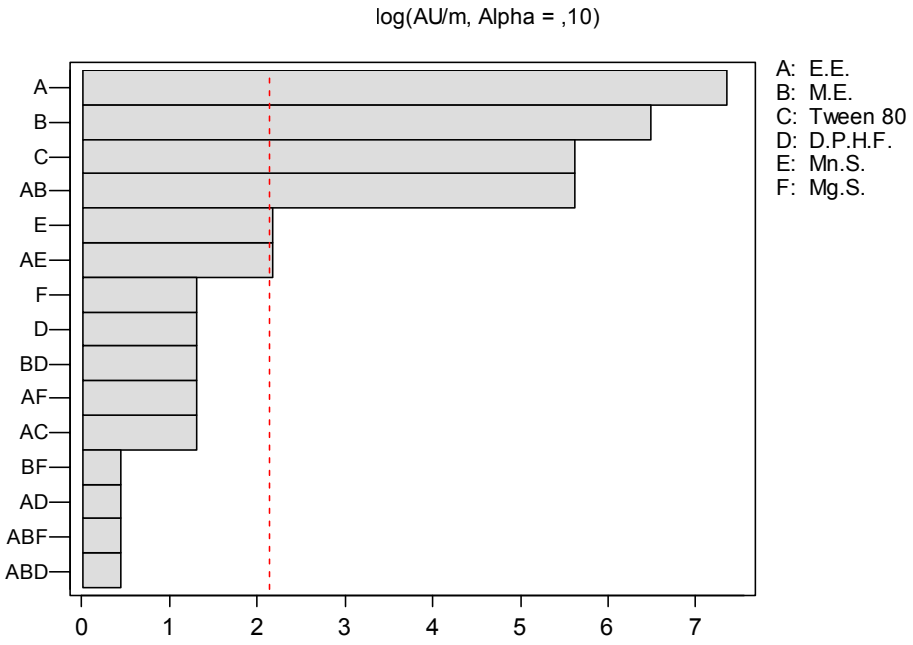
Tablo 4.8: FFD Sonuçları ve Bileşen Kombinasyonları (%w/v)

Deney	E.E.	M.E.	Tween 80	D.P.H.F.	Mn.S.	Mg.S.	Log(AU/ml)
1							1,40
2	0,8				0,004		2,30
3		0,4			0,004	0,04	2,30
4	0,8	0,4				0,04	2,90
5			0,1		0,004	0,04	2,00
6	0,8		0,1			0,04	3,20
7		0,4	0,1				2,90
8	0,8	0,4	0,1		0,004		2,60
9				0,2		0,04	1,10
10	0,8			0,2	0,004	0,04	2,30
11		0,4		0,2	0,004		2,30
12	0,8	0,4		0,2			2,60
13			0,1	0,2	0,004		1,70
14	0,8		0,1	0,2			2,90
15		0,4	0,1	0,2		0,04	2,90
16	0,8	0,4	0,1	0,2	0,004	0,04	2,90
17	0,4	0,2	0,05	0,1	0,002	0,02	2,90
18	0,4	0,2	0,05	0,1	0,002	0,02	2,60
19	0,4	0,2	0,05	0,1	0,002	0,02	2,60
20	0,4	0,2	0,05	0,1	0,002	0,02	2,90

Şekil 4.8'de pareto çizelgesinde önemli etki gösteren faktörler belirtilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda (Ek Tablo A.6 ve Tablo A.7) bakteriyosin benzeri aktiviteyi etkileyen ($p<0,05$) faktörler et ekstraktı, maya ekstraktı ve Tween 80 olarak tespit edilmiştir. Söz konusu faktörler bakteriyosin benzeri aktivite üzerinde pozitif etki, et ekstraktı ve maya ekstraktı etkileşimi ise negatif etki oluşturmuştur. Benzer sonuca farklı kültürün kullanıldığı çalışmalarda da rastlanmıştır. *Lb. brevis* ile yapılan çalışmada maya ekstraktı (% 3) ve Tween 80'in (% 0,5) bakteriyosin aktivitesini artırırken magnezyum sülfat, manganaz sülfat, potasyum fosfat ve sodyum asetatın aktiviteyi etkilemediği belirtilmektedir (Ogunbanwo ve dig., 2003). Dicks ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışmada da azot kaynağı olarak et ve maya ekstraktının ayrı ayrı ve birlikte kullanımında *Lb. plantarum* bakterisinin bakteriyosin üretimini artırdığı gözlenmiştir. Chandrashekar ve Halami (2005) pediyosin üretiminin çalışılan model sistemde % 2 maya ekstraktı ile en yüksek seviyeye ulaştığını saptamıştır.

Tween 80'in bakteriyosin üretimi üzerindeki etkisi konusunda farklı yorumlar mevcuttur. *Enterococcus feaceum* yapılan çalışmada Tween 80 in (% 1) sakaroz ve glikoz ile pH 5.5'de bakteriyosin üretimi üzerinde sinerjistik etki gösterdiği

belirlenmiştir (Hugas ve dig., 2000). *Pediococcus damnosus* kültürünün test edildiği çalışmada da Tween 80'in bakteriyosin üretimi arttırdığı belirlenmiştir (Bauer ve diğ., 2001). Ayrıca Tween 80'in plantaricin (Verellen ve diğ, 1998), pediyosin AcH (Biswas, 1991) üretimini arttırdığı buna karşın *Leuc. mesenteroides'*den bakteriyosin üretimini % 50 oranında azalttığı saptanmıştır (Dicks ve Todorov, 2005a). Yüzey aktif ajan olması nedeniyle Tween 80'in bakteriyosin üreten hücreden bakteriyosinin ayrılmasını kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir (Dicks ve Todorov, 2005b).



Şekil 4.8: FFD'ye Göre Bileşen Etkilerini Gösteren Pareto Çizelgesi

Bir sonraki aşamada yapılacak olan optimizasyon çalışmasında üç faktörün veri aralıkları değiştirilmemiştir. Ayrıca istatistiksel anlamda önemli olmamakla birlikte bakteriyosin benzeri aktivite üzerinde negatif etki gösteren faktörlerin düzeyleri de orta noktalarda sabitlenmiştir.

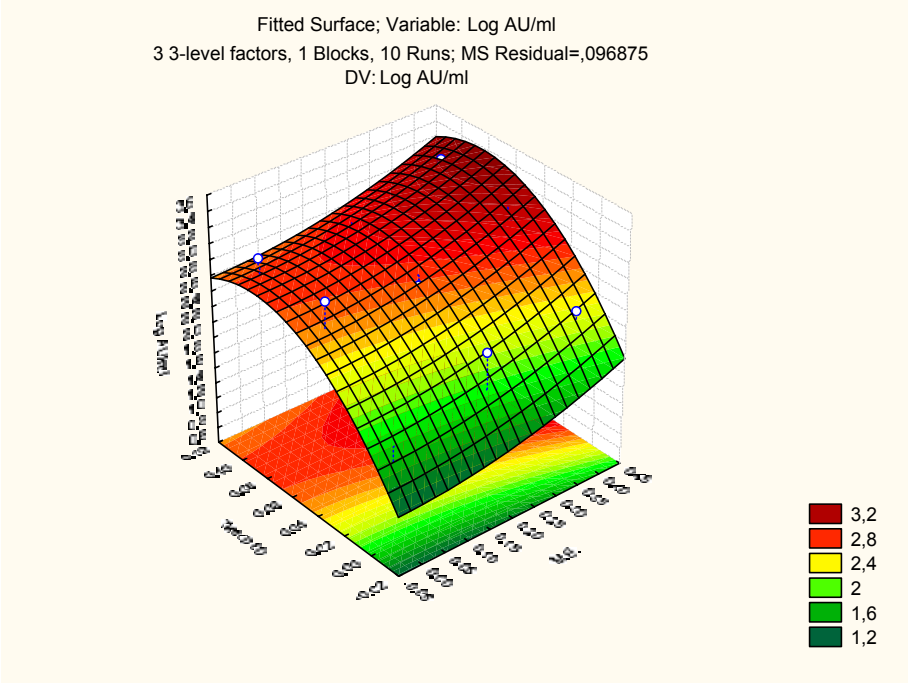
4.3.2.3. Koşulların Optimizasyonu

Bakteriyosin benzeri aktivitenin optimizasyonunda 3^{2}_{3-1} üç düzeyli fraksiyonel desen kullanılmıştır. Faktör kombinasyonları ve bakteriyosin benzeri aktivite değerleri (logAU/ml) Tablo 4.9'da verilmiştir.

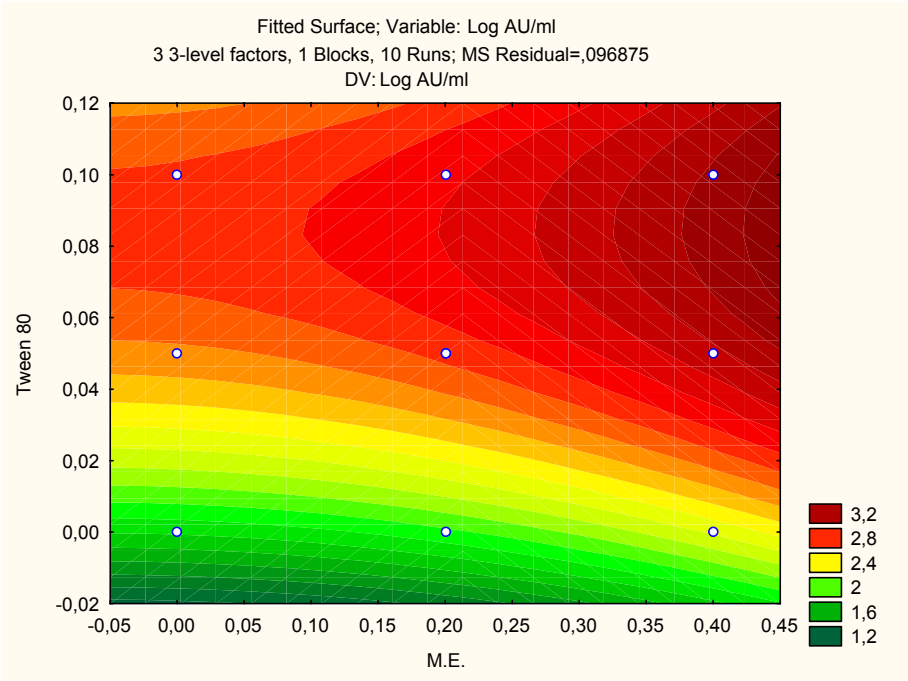
Tablo 4.9: Optimizasyon Deney Deseni Kombinasyonları (%w/v) ve Sonuçları

Bileşim	Et Ekstraktı	Maya Ekstraktı	Tween 80	Log(AU/ml)
1	0	0	0	1,10
2	0	0,2	0,1	2,60
3	0	0,4	0,05	2,90
4	0,4	0	0,1	2,90
5	0,4	0,2	0,05	2,60
6	0,4	0,4	0	2,30
7	0,8	0	0,05	2,90
8	0,8	0,2	0	2,30
9	0,8	0,4	0,1	3,20
10	0,4	0,2	0,05	2,60

Yapılan istatistiksek analiz sonucunda (Ek Tablo A.9) Tween 80 bileşenin etkisi istatistisel olarak önemli bulunmuştur (P=0,05). Ancak diğer faktörlerin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (P>0,05).

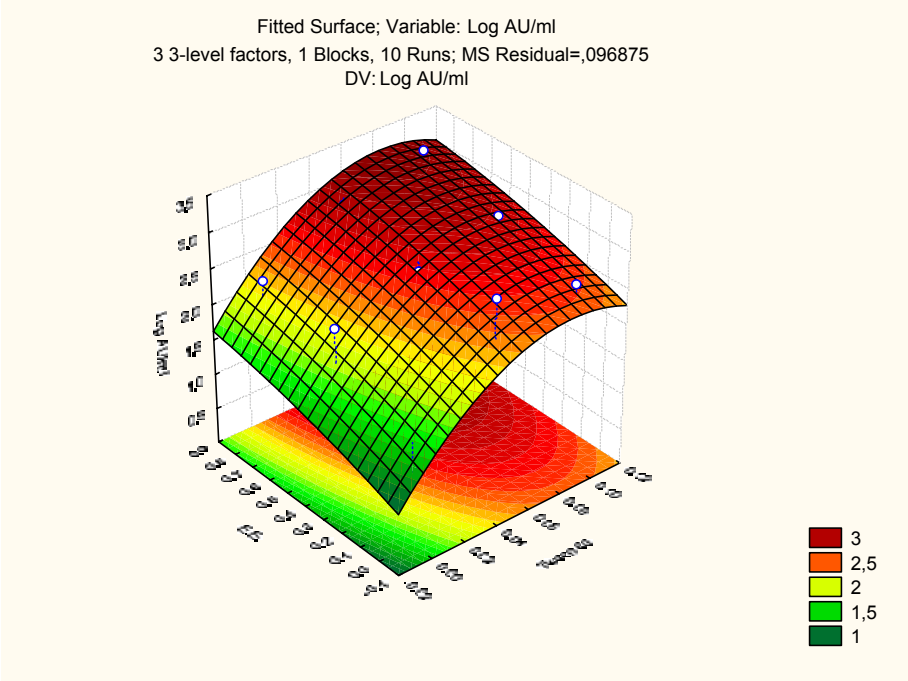


Şekil 4.9: Tween 80-Maya Ekstraktı Tepki Yüzey Grafiği

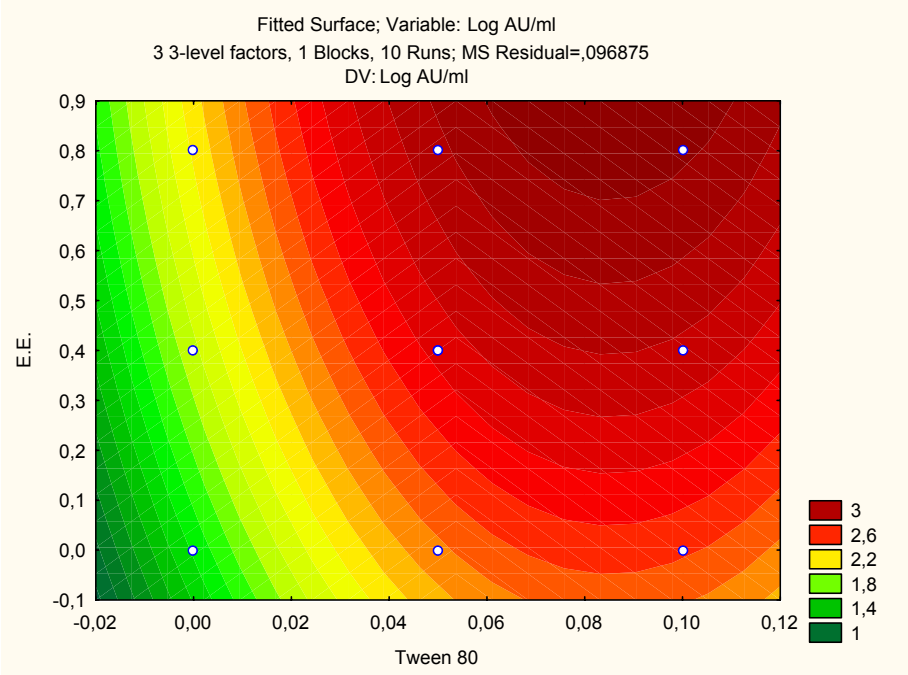


Şekil 4.10: Tween 80-Maya Ekstraktı İz Düşüm Grafiği

Yukarıdaki Şekil 4.9 ve 4.10 incelendiğinde maksimum bakteriyosin benzeri aktivitenin maya ekstraktı için çalışılan aralığın dışında olduğu görülmektedir. Ancak Tween 80 en yüksek düzeyinde maksimum bakteriyosin benzeri aktivite sağlamıştır.



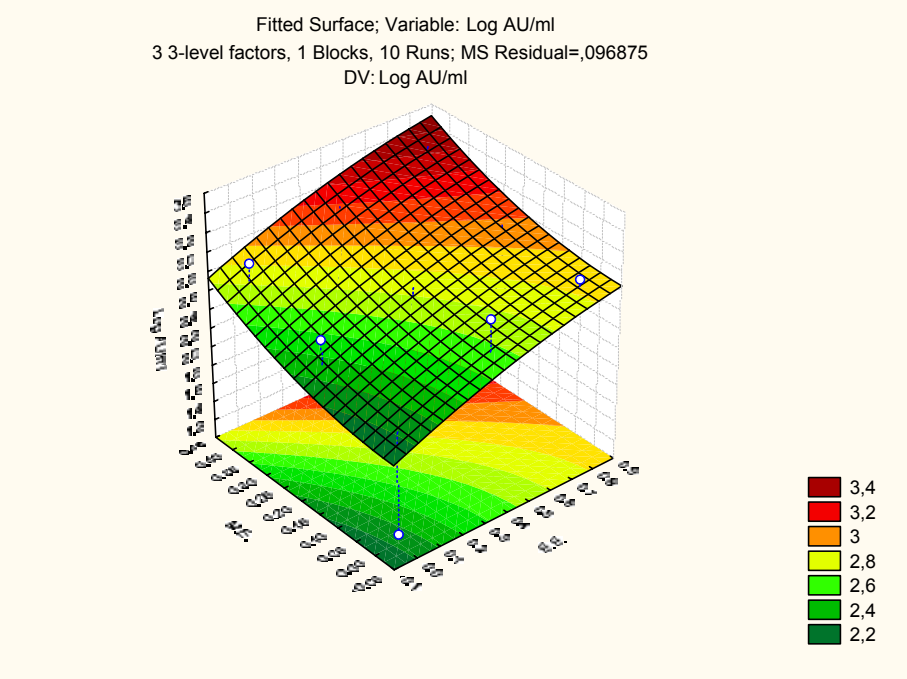
Şekil 4.11: Et ekstraktı-Tween 80 Tepki Yüzey Grafiği



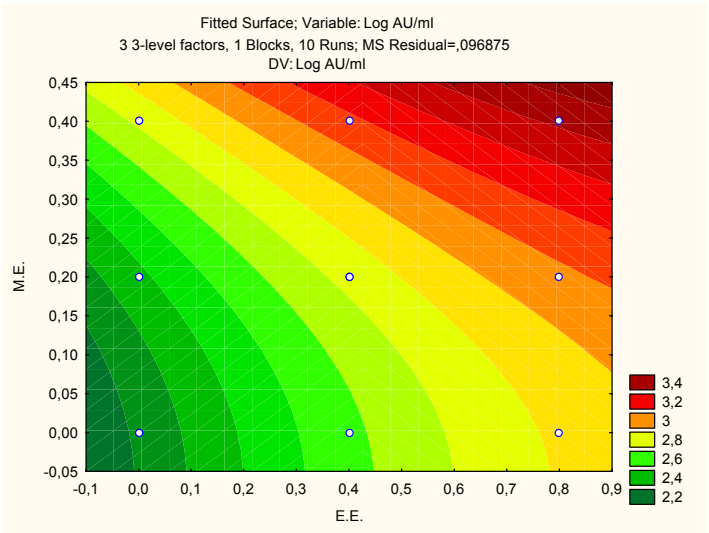
Şekil 4.12: Et ekstraktı-Tween 80 İz Düşüm Grafiği

Yukarıdaki Şekil 4.11 ve 4.12 incelendiğinde maksimum bakteriyosin benzeri aktivite üretiminin Tween 80'in çalışıldığı aralık içerisinde elde edildiği görülmektedir. Tween 80 miktarındaki artışın bakteriyosin benzeri aktiviteyi düşüreceği öngörülebilmektedir. Bununla birlikte çalışılan et ekstraktı aralığının aktivite üzerinde olumlu etkisi görülmektedir. Ancak bu etki istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Şekil 4.13 ve 4.14 incelendiğinde et ekstraktı ve maya ekstraktının çalışılan aralıkta bakterioyisin benzeri aktiviteyi arttırdığını göstermektedir. Ancak bu etkiler istatistiksel anlamda önemli değildir ($P>0,05$). Bu nedenle et ekstraktı ve maya ekstraktı için çalışılan aralığın pozitif yönde kaydırılması gerekmektedir.



Şekil 4.13: Maya ekstraktı-Et ekstraktı Tepki-Yüzey Grafiği



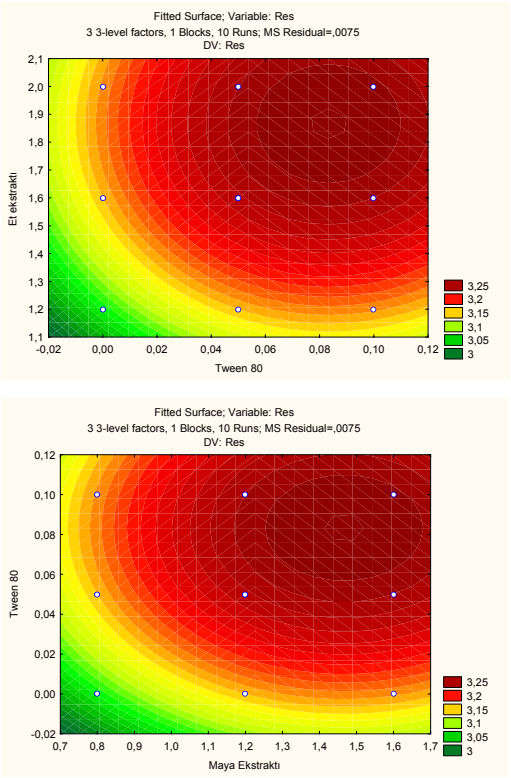
Şekil 4.14: Maya ekstraktı-Et ekstraktı İz Düşüm Grafiği

İlk optimizasyon sonuçları dikkate alınarak yapılan ikinci optimizasyon deseni ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Tablo 4.10). Yeni desende çalışılan düzeyler et ekstraktı için 1,2-2,0 (% w/v), maya ekstraktı için 0,8-1,6 (% w/v) olarak artırılmış ve Tween 80 düzeyi sabit tutulmuştur.

Tablo 4.10: Optimizasyon İkinci Deney Deseni Sonuçları

Bileşim	Et Ekstraktı	Maya Ekstraktı	Tween 80	Log(AU/ml)
1	1,2	0,8	0	2,90
2	1,2	1,2	0,1	3,20
3	1,2	1,6	0,05	3,20
4	1,6	0,8	0,1	3,20
5	1,6	1,2	0,05	3,20
6	1,6	1,6	0	3,20
7	2,0	0,8	0,05	3,20
8	2,0	1,2	0	3,20
9	2,0	1,6	0,1	3,20
10	1,6	1,2	0,05	3,20

İkinci optimzasyon çalışması sonucunda yapılan istatistiksel analizde faktörler arasında önemli bir fark tesbit edilmemiştir (P>0,05). Faktörlerin ikili iz düşüm grafikleri aynı şekli vermektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: İkinci Optimizasyon Çalışması İzdüşüm Grafikleri

Barba ve dig. (2002) tarafından yapılan optimizasyon çalışmasında ölçülen parametre olarak log AU/ml kullanılmıştır. Bu çalışmada da faktörler arasında istatiksel fark görülmemiş ve optimum noktaları içeren ikili iz düşüm grafikleri elde edilmiştir. Bulgular çalışılan düzeylerin her bir faktör için optimum noktaları

içerdiği ve gözlenen bu maksimum ana etkiler arasında fark olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Yaptığımız optimizasyon çalışmalarında dikkat çeken diğer bir husus bakteriyosin-benzeri aktivitenin üretiminde üç katlık (AU/ml) bir artış olmasıdır.

4.4. Standart ile Karşılaştırma

Farklı konsantrasyonlardaki nisin çözeltileri ile yapılmış tekrarlı deney sonuçları (ortalama değerler) Tablo 4.11'de verilmiştir. Tablodaki değerler ışığında kültürden elde edilen bakteriyosin benzeri aktivitenin çalışılan nisin düzeylerinden daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.11: Nisin ve Bakteriyosin Benzeri Aktivitenin Karşılaştırılması

Uygulama	Aktivite (AU/ml)	Zon Çapı (mm)
Süpernatant / 80µl	1600	9,75
800 IU / 80µl	200	3,50
500 IU / 80µl	100	3,00
400 IU / 80µl	100	2,75
250 IU / 80µl	50	2,00

5. SONUÇ

Çalışmada çeşitli laktik asit bakterilerinin önemli gıda patojenleri olan *Bacillus cereus* DSM 4312 (DSMZ, Almanya), *E. coli* O157 H7 ATCC 43894, *L. monocytogenes* SLCC 2371 1/2 a ve *L. monocytogenes* SLCC 4b *S. enteritidis* KUKEN 369 üzerindeki antagonistik etkileri araştırılmıştır. Tarama çalışmaları neticesinde *Ped. pentosaceus* izolatının *L. monocytogenes* SLCC 2371 1/2 a üzerinde yüksek antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda belirlenen antimikrobiyal aktivitenin protein yapıda bakteriyosin benzeri bileşik(ler)den ileri geldiği görülmüştür. Karakterizasyon amacıyla yapılan pH stabilite testlerinde bakteriyosin benzeri aktivitenin pH 2, 3, 4, 5 ve 6'da 800 AU/ml; pH 7'de 400 AU/ml; pH 8'de 200 AU/ml; pH 9'da 50 AU/ml; pH 10'da 25 AU/ml olduğu tespit edilmiştir. Yine karakterizasyon amacıyla yapılan ısıl stabilite testlerinde 45, 85, 100, 120°C'de 30 dakikalık ısıl işlem uygulamalarında aktivitenin sırasıyla 400, 200, 25 ve 0 AU/ml olduğu belirlenmiştir.

Gelişim eğrisi çalışmasında bakteriyosin benzeri bileşik(ler)in *Ped. pentosaceus* gelişiminin logaritmik fazıyla birlikte arttığı ve erken durağan fazda (9. saat) maksimuma ulaşarak sabit kaldığı görülmüştür.

Bakteriyosin benzeri aktivitenin optimizasyonu kapsamında yapılan çalışmalarda karbon kaynağı olarak en yüksek aktivitenin sırasıyla sakaroz, fruktoz, glikoz, mannoz ve laktoz varlığında ortaya çıktığı gözlenmiştir. Belirlenen aktiviteler sırasıyla 2,75, 2,68, 2,60, 2,30, 1,93 logAU/ml olarak bulunmuştur.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında MRS kültür ortamı bileşenlerinin etkisi PBD desenleri ve FFD deseni ile araştırılmıştır. PBD desenlerinde 11 ve 9 faktörle yapılan deneylerde besiyeri bileşenlerinin bakteriyosin benzeri aktivite üzerindeki etkisinin önemsiz olduğu görülmüştür ($p>0,05$). FFD 2^{6-2} deseninde ise bileşenlerden et ekstraktı (0-0,8 %), maya ekstraktı (0-0,4%) ve Tween 80'in (0-0,1%) bakteriyosin benzeri aktivite üzerindeki etkilerinin pozitif olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir.

Belirtilen faktör aralıklarında yapılan optimizasyon çalışmasında, Tween 80 (0-0,1%) etkisinin önemli olduğu görülmüş, çalışılan diğer faktörlerin etkisi (et ekstraktı ve maya ekstraktı) ise önemli bulunmamıştır. Bu veriler dikkate alınarak oluşturulan yeni optimizasyon deseninde Tween 80 (0-0,1%) aralığı değiştirilmeden et ekstraktı ve maya ekstraktı düzeyleri artırılmış ve üç kat daha fazla bakteriyosin benzeri aktivite üretimi sağlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarındaki (800, 500, 400, 250 IU/80µl) nisin çözeltileriyle yapılan karşılaştırmada, bakteriyosin benzeri aktivitenin daha güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Yürütülen çalışmalar sonucunda ilerde biyoprezervasyon amacıyla kullanılabilecek yeni bir bakteriyosin veya bakteriyosinlerin varlığı tespit edilmiş ve temel karakterizasyonları yapılmıştır. Bununla birlikte endüstriyel ölçekte üretimine temel oluşturacak optimizasyon çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

Bu aşamadan sonra öncelikle metabolit/metabolitlerin biyokimyasal karakterizasyonlarının yapılması gerekmektedir. Örneğin metabolit(ler)in molekül ağırlığı, amino asit kompozisyonu ve dizilimi belirlenmesi ileri de yürütülmesi gereken temel çalışmalar arasında yer almaktadır.

Teknolojik uygulamalara temel teşkil edebilecek ürünün kültür ortamından saflaştırılmasına yönelik çalışmalar yürütülmeli, farklı ekstraksiyon yöntemlerinin verimleri araştırılmalıdır.

Stabilite çalışmaları kapsamında farklı pH-ısıl işlem kombinasyonlarının ve depolama sürelerinin stabilite üzerindeki etkisi araştırılmalıdır.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında farklı karbon ve azot kaynaklarının kombinasyonlarıın, sabit pH, redoks potansiyeli ve stres faktörlerinin (tuz) bakteriyosin üretimi üzerindeki etkileri araştırılmalıdır. Bununla birlikte r-DNA teknolojisinden faydalanılarak ileri düzeyde optimizasyon çalışmaları da yürütülebilecek çalışmalar arasında yer almaktadır. Bakteriyosin aktivitesinden sorumlu gen(ler)in tespit edilerek uygun mikroorganizmalara yapılacak ekspresyonlarla bakteriyosin üretiminin arttırlmasına yönelik çalışmalar yapılabilecektir.

İn vivo çalışmalar yürütülerek tanımlanmış bakteriyosinlerin farklı gıda sistemlerinde ürün güvenliğine ve raf ömrüne katkısı araştırılabilecektir.

KAYNAKLAR

Ahn, C., Kim, C.H. ve Ji, G.E., 2000. Purification and molecular characterization of a bacteriocin from *Pediococcus* sp. KCA1303-10 isolated from fermented flatfish. *Food Science and Bitchnology,* **9,** 4, 270-276.

Aktypis, A. ve Kalantzopoulos, G., 2003. Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001. *Lait,* **83**, 365-378.

Anon, 2004. Agilent Technologies LSCA in Homeland Security. http://www.agilent.com/about/newsroom/lsca/background/2004/lsca_homeland_security.pdf. 24 Şubat 2007.

Axelsson, L., 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects, Eds. Salminen, S., Wright, A., Marcel Decker, Inc. New York, Bassel, Hong Kong, pp. 1-72.

Bauer, R., Dicks, L.M.T., Nel, H.A. ve Vandamme, E.J., 2001. Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *Journal of Applied Microbiolog,* **91**, 6, 1131-1138.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. ve Ray, B., 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied Environmental Microbiology*, **57**, 1265–1267.

Brede, D., Diep, D.B., Godager, L. ve Nes, I.F., 2006. Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology.* **152**(6), 1649-1659.

Caulcutt, R., 1991. Statistics in Research and Development. Chapman and Hall, London. pp.258-273

Chandrashekar, A. ve Halami, P.M., 2005. Enhanced production of pediocin C20 by a native strain of *Pediococcus acidilactici* C20 in an optimized food-grade medium. *Process Bichemistry,* **40**, 5, 1835-1840.

Chen, H. ve Hoover, D.G., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* **2**, 82-100.

Chobert, J.M., Haertle, T., Batdorj, B., Choiset, Y., Dalgalarrondo, M., Pedroche J., Metro, F. ve Prevost, H., 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology,* **101**, 837-848.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. ve Chikindas, **M.L.,** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 1–20.

Cochran, W.G. ve Cox, G.M., 1992. Experimental Designs. John Wiley and Sons, Inc. pp.259-270.

Daeschel, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology,* 164-167.

Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. ve Torriani, S., 1992. The genus *Leuconostoc.* In: The Genera of Lactic Acid Baceteria, Eds: Wood, B.J.B. ve Holzapfel, W.H., Blackie Acedemic and Professional, London. pp.235-275.

Desmazeaud, M., 1996. Growth inhibitors of Lactic Acid Bacteria. In: Dairy Starter Cultures. Eds: Cogan, T.M., Accolas, J.P., VCH Publishers, Inc. pp.133-140.

Devlieghere, F., Vermeiren, L. ve Debevere, J., 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal,* **14**, 273-285.

Dicks, L.M.T., ve Todorov, S.D., 2005a. Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**, 1585-1590.

Dicks, L.M.T., ve Todorov, S.D., 2005b. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. *Food Technology and Biotechnology,* **43**, 2, 165-173.

Dicks, L.M.T., ve Todorov, S.D., 2005c. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Bichemistry,* **40**, 1, 365-370.

Dobrogosz, W.J., ve Talarico, T.L., 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuterin*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy,* 674-679.

Fernandez A.G., Delgado, A., Arroyo, F.N., Peres, C. ve Brito, D., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology.* **22**, 521-528.

Gilliland, S.E., 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological.Reviews*, **87**, 175–178.

Gonzalez B, Arca, P., Mayo, B. ve Suarez J.E., 1994. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Applied Environmental Microbiology,* **60**, 2158-2163.

Gourama, H., Lash, B.W. ve Mysliwiec, T.H., 2005. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbioogy,* **22**, 199-204.

Guder, A., Wiedemann, I. ve Sahl H.-G., 2000. Post-translationally modified bacteriocins-the lantibiotics. *Biopolymers,* **55**, 62-73.

Hammes, W.P. ve Vogel, R.F., 1992. The genus *Lactobacillus.* In: The Genera of Lactic Acid Baceteria, Eds: Wood, B.J.B., ve Holzapfel, W.H., Blackie Acedemic and Professional, London. pp.19-54

Hereijgers, W., Mattila, S.T. ve Skytta, E., 1991. Broad spectrum antibacterial activity of Pediococcus damnosus and *Pediococcus pentosaceus* in minced meat. *Food Microbiology,* **8**, 3, 231-237.

Hurst, A. ve Hoover D.G., 1993. Nisin. In: Antimicrobials in Foods. Eds. Davidson PM, Branen AL, New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 369-407.

Hardie, J.M. ve Whiley, R.A., 1992. The genus *Streptococcus.* In: The Genera of Lactic Acid Baceteria, Eds: Wood, B.J.B., ve Holzapfel, W.H., Blackie Acedemic and Professional, London. p.114

Harrigan, W.F., 1998. Laboratory methods in food microbiology. Sen Diego, Academic Pres.

Holzapfel, W., Geisen, R. ve Schillinger, R.G.U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology,* **24**, 343-362.

Holzapfel, W. ve Stiles, M.E., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology,* **36**, 1-29.

Hugas, M., 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science,* **49**, Suppl.1

Hugas, M., Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M. ve Monfort J.M. 2000. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology,* **88**, 686-694.

Hyun, H.H., Baek, H., Kim, M.H. ve Kong, Y.J., 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* spp. GO5. *Journal of Biotechnoogy,* **121**, 54-61.

Jay, J.M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Enviromental Microbiology,* **44**, 3, 525-532

Jay, J.M., 1996. Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Science,* **43**, 59-S65.

Jiang, S.T., Wu C.W. ve Yin L.J., 2004. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **52**, 1146-1151

Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiolgy Review,* **12**, 39-86.

Kuehl, R.O., 2000. Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis. Duxbury Thomson Learning, USA. pp.391-421.

Leisner, J.J., Moreno, M.R.F., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul G., Vancanneyt, M. ve 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.

Li, C., Bai, J., Cai, Z., ve Ouyang, F., 2002. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of Biotechnology,* **93**, 27-34.

Lindgren, S.E. ve Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews,* **87**, 149–163.

Manghi, M.A. Sparo M.D., Castro, M.S., Andino, P.J., Lavigne, M.V., Ceriani, C., Gutieerrez,G.L., Fernandez, M.M., De Marzi, M.C. ve Malchiodi, E.L. 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis. Journal of Applied Microbiology,* **100**, 123-134.

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M.C., Mollet, B. ve Poolman, B., 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor. *Journal of Biological Chemistry,* **272**, 14277-84.

Mayr-Harting, A., Hedges, A.J. ve Berkeley, R.C.W., 1972 Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiology,* **7A**, 313–342.

Mattiasson, B., Deraz, S.F., Karlsson, E.N., Hedström, M. ve Andersson, M.M., 2005. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology,* **117**, 343-354.

Moretro, T., Aasen, I.M., Storro, I. ve Axelsson, L., 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *Journal of Applied Microbiology,* **88**, 536-545.

Naidu, A.S., Unal, R. ve Tulpinski J., 2006. Bacteriocins: Antimicrobial Activity and Applications. In: Food Biotechnology, Eds. Shetty K., Paliyath, G., Levin, R.A.P.E. Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Nes, I.F. ve Holo, H., 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, **55**, 50-61.

Ogunbanwo, S.T., Sannii A.I. ve Onilude, A.A., 2003. Influnce of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology,* **2**, 7, 179-184.

Ray, B., 2001. Fundamental Food Microbiology. CRC Press Boca Raton. pp.201-210

Rodgers, S., 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review. *Trends in Food Science and Technology,* **12**, 276-284.

Rousis, I.G., 1994. Dairy lactic acid bacteria physiology and growth. *Chimica chronica*, **23**, 137-153

Russel, A.D., Hogo, W.B. ve Ayliffe, G.A.J., 1992. Principles and Practise of Disinfection, Preservation and Sterilization. Balckwell Science, Oxford.

Schöbitz, R., Ciampi, L., Costa, M. ve Suazo, V., 2003. Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology*, **84**, 237-244.

Sharpe, M.E., 1979. Identification of the lactic acid bacteria. In F.A. Skinner ve D.W. Lovelock, Eds. Identification methods for microbiologists London Academic Press. pp. 233–259

Simonetta, A.C., Carrasco, M.S. ve Scarinci, H.E., 2002. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology,* **57**, 1, 15-19.

Somkuti, G.A. ve Gilbreth S.E., 2005. Thermophilin 110: A Bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. *Current Microbiology,* **51**, 175-182.

Steel, L.J., 1998. Genetics and Metablism of Starter Cultures. In: Applied Dairy Microbiology. Eds. Marth, E.H., ve Steel, J.L., Marcel Dekker, Inc. pp.173-177.

Stiles, M., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 331–345.

Sullivan, G.R. ve Strobel, R.J., 1999. Experimental Design for Improvement of Fermentation. pp.80-93. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnolgy, Eds. Davies, J.E. ve Demain, A.L., ASM PRESS, Washington D.C.

Teuber, M., 1992. The genus *Lactococcus*. In: The Genera of Lactic Acid Baceteria, Eds. Wood, B.J.B., ve Holzapfel, W.H., Blackie Acedemic and Professional, London. pp.174-234.

Todorov, S.D., Reenen, C.A.V. ve Dicks, L.M.T., 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of General and Applied Microbiology*, **50**, 3, 149-157.

Yamato, M. , Ozaki K. ve Ota, F., 2003. Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. *Microbiological Research*, **158**, 169-172.

Verellen, T.L.J., Bruggeman, G., Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. ve Vandamme, E.J., 1998. Fermenta**tio**n optimisation of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **86**, 174–179.

Yousef, A.E. ve Carlstrom, C., 2003. Food microbiology: a laboratory manuel. John Wiley and Sons, Hoboken, N.J. pp

Zarate, V., Cardell, E. ve Hernandez, D., 2005**.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology,* **99,** 77-84.

EK İSTATİSTİKSEL ANALİZ TABLOLARI

Tablo A.1: Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteriyosin Benzeri Aktivite Üzerindeki Etkisini Gösteren ANOVA Sonuçları

VK	S.D.	K.T.	K.O	F	P
Karbon Kaynağı	4	1,845	0,460	17,080	0,000
Hata	15	0,405	0,027		
Toplam	19	2,250			

Tablo A.2: Karbon Kaynakları Ortalamalarının Tukey Testi İle Karşılaştırılması

Karbonhidrat Kaynağı	Sakaroz	Glikoz	Fruktoz	Laktoz	Mannoz
Ortalama log(AU/ml)	2,75±0,150[a]	2,60±0,000[ab]	2,68±0,075[a]	1,93±0,075[c]	2,30±0,000[b]

Tablo A.3: PBD Birinci Uygulama ANOVA Sonuçları

VK	S.D.	K.T.	K.O	F	P
Ana Etkiler	10	3,300	0,330	2,750	0,440
Hata	1	0,120	0,120		
Toplam	11	3,420			

Tablo A.4: PBD Birinci Uygulamasında Belirlenen Etkiler ve Katsayılar

Terim	Etki	Katsayı	P
Sabit		2,000	0,032
Kazein	0,400	0,200	0,295
E.E	0,600	0,300	0,205
M.E.	0,400	0,200	0,295
D.P.H.F.	0,200	0,100	0,500
Tween 80	0,300	0,150	0,374
D.A.H.S.	-0,100	-0,050	0,705
S.A.	0,200	0,100	0,500
Mg.S.	0,200	0,100	0,500
Mn.S.	-0,400	-0,200	0,295
pH	0,200	0,100	0,500

Tablo A.5: PBD İkinci Uygulama ANOVA Sonuçları

VK	S.D.	K.T.	K.O	F	P
Ana Etkiler	8	3,780	0,473	1,540	0,396
Hata	3	0,920	0,308		
Toplam	11	3,420			

Tablo A.6: PBD İkinci Uygulamasında Belirlenen Etkiler ve Katsayılar

Terim	Etki	Katsayı	P
Sabit		2,225	0,001
Kazein	0,250	0,125	0,492
E.E	0,950	0,475	0,059
M.E.	0,350	0,175	0,354
D.P.H.F.	-0,150	-0,075	0,671
Tween 80	0,350	0,175	0,354
Mg.S.	-0,050	-0,025	0,886
Mn.S.	0,150	0,075	0,671
pH	-0,050	-0,025	0,886

Tablo A.7: FFD Uygulaması ANOVA Sonuçları

VK	S.D.	K.T.	K.O	F	P
Ana Etkiler	6	4,084	0,681	22,690	0,013
İkili Etkileşimler	7	1,254	0,179	5,970	0,085
Üçlü Etkileşimler	2	0,011	0,006	0,190	0,838
"Curvature"	1	0,406	0,406	13,540	0,035
Rezidü	3	0,090	0,090		
Hata	3	0,090	0,090		
Toplam	19	5,846			

Tablo A.8: FFD Uygulamasında Belirlenen Etkiler ve Katsayılar

Terim	Etki	Katsayı	P
Sabit		2,394	0,000
E.E	0,638	0,319	0,005
M.E.	0,563	0,281	0,007
Tween 80	0,488	0,244	0,011
D.P.H.F.	-0,113	-0,056	0,285
Mn.S.	-0,188	-0,094	0,119
Mg.S.	0,113	0,056	0,285
E.E*M.E.	-0,488	-0,244	0,011
E.E.*Tween 80	-0,113	-0,056	0,285
E.E.*D.P.H.F.	0,0375	0,0188	0,694
E.E.*Mn.S.	-0,1875	-0,0938	0,694
E.E.*Mg.S.	0,125	0,0563	0,285
M.E.*D.P.H.F.	0,125	0,0563	0,285
M.E.*Mg.S.	0,0375	0,0188	0,694
E.E.*M.E.*D.P.H.F.	-0,0375	-0,0188	0,694
E.E.*M.E.*Mg.S.	0,0375	0,0188	0,694

Tablo A.9: Optimizasyon Deseni (3_{3-1}^{2}) ANOVA Sonuçları

VK	S.D.	K.T.	K.O	F	P
(1)E.E. L+Q	2	0,547	0,273	2,824	0,204
(2)M.E. L+Q	2	0,395	0,197	2,039	0,275
(3)Tween 80 L+Q	2	1,790	0,895	9,239	0,052
Hata	3	0,290	0,0968		
Toplam	9	3,024			
R^2 :	0,904				

ÖZGEÇMİŞ

Volkan Kalender Köseoğlu 8 Eylül 1982 yılında Osnabrück'de (Almanya) dünyaya geldi. Orta öğrenimini 2000 yılında Bakırköy Hasan Polatkan Süper Lisesi'nde tamamladı. Aynı yıl girdiği İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2004 yılında 5. olarak mezun oldu. Aynı Bölümde 2005 yılında Araştırma Görevlisi olarak göreve başlamıştır. Halen, 2004 yılında girdiği İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği programında yüksek lisans eğitimini sürdürmektedir.