ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pediococcus acidilactici PBF SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU ve SAFLAŞTIRILMASI

Burcu BİLER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2009

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU danışmanlığında, Burcu BİLER tarafından hazırlanan **"*Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu ve saflaştırılması"** adlı tez çalışması 25 Mayıs 2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Candan GÜRAKAN

Üye: Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK

Üye: Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Orhan ATAKOL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Pediococcus acidilactici PBF SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU ve SAFLAŞTIRILMASI

Burcu BİLER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaları, pilazmid tarafından kodlanan bakteriyosin üretim özelliklerinden dolayı gıdalarda raf ömrünü uzatmak için potansiyel biyolojik koruyucu rolüne sahip olmaları, probiyotik ürünlerin içeriğinde bulunmaları ile birlikte bazı LAB'lerinin gıdalarda bozulmaya sebep olmaları bu bakteri grubunu hem endüstriyel açıdan hem de bilimsel arenada üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı oldukça önemli bir grup haline getirmiştir.

A.Ü.F.F Biyoloji bölümü Mikrobiyal Genetik laboratuvarının kültür koleksiyonundan sağlanan ve bir fermente sosis izolatı olan *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun birçoğu gıda bozulması ve gıda kaynaklı hastalıklar ile yakından ilişkili olan *Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Lactococcus, Staphylococcus, Enterococcus, Clostridium* ve başta *Listeria monocytogenes* olmak üzere *Listeria*'nın birçok türüne karşı antimikrobiyal bir madde ürettiği gösterilmiştir. pH değerine bağlı olarak bakteriyosin molekülünün hücre tutunumu (adsorpsiyon) ve hücrelerden ayrılmasını temel alan yöntem kullanılarak bakteriyosin ekstrakte edilip kısmen saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları kısmi-saflaştırılan bu ekstraktın kullanımı ile yapılmıştır. Proteolitik enzimlere duyarlı, ısıya ve organik çözücülere karşı dirençli ve geniş bir pH aralığında aktif olan bu antimikrobiyal madde çalışmanın ilerleyen aşamalarında "anti-listerial bakteriyosin" olarak adlandırılmıştır. SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforez) çalışmaları bu bakteriyosinin protein yapısında bir madde olduğunu vurgulamış ve çalışmada *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminin 4.61 ve 6.68kDa moleküler ağırlıklarına sahip iki peptit tarafından kodlandığını gösterilmiştir.

İyi üretim işlemleri ve sıkı bir sanitasyon ile birlikte *Ped. acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin, gıdalarda bozulmalara sebep olan mikroorganizmaları ve sağlığı tehdit eden patojenleri kontrol altında tutabilmek amacıyla etkili bir katkı maddesi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Mayıs 2009, 130 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterisi**,** *Pediococcus acidilactici*, bakteriyosin, SDS-PAGE

ABSTRACT

Master Thesis

CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF BACTERIOCIN PRODUCED BY *Pediococcus acidilactici* PBF

Burcu BİLER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Lactic acid bacteria are widely used as starter cultures in the food industry. Because of their plasmid-coded bacteriocin production speciality, they make expire date of the food longer and thought to be potential biopreservativies. This group of bacteria become very important both industrially and scientificaly in terms of their usage in probiotic products and some of them causes food spoilage.

A food-grade *Pediococcus acidilactici* PBF which had been isolated from fermented sausage and obtained from Culture Collection of Microbial Genetics Laboratory of Biology Department of Ankara University was shown to produce an antimicrobial agent active against several species of *Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Lactococcus, Staphylococcus, Enterococcus, Clostridium* and *Listeria*; many of which are associated with food spoilage and health hazards of food origin. By use of method based on the influence of pH on the adsorption and release of each bacteriocin from the cell surfaces, bacteriocin of *Pediococcus acidilactici* PBF was extracted, partially purified and used for the rest of the characterization studies. This antimicrobial agent is named as anti-listerial bacteriocin as it was found to be sensitive to proteolytic enzymes, effective against food-borne pathogen *Listeria monocytogenes,* resistant to heat and organic solvents and active over a wide range of pH. SDS-PAGE (Sosium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) studies suggested that bacteriocin production in *Pediococcus acidilactici* PBF was encoded on two peptites with a molecular weights of 4.61 and 6.68 kDa.

The bacteriocin produced by *Ped. acidilactici* PBF strain under appropriate processes and strict sanitation can be used as an additive to control the growth of microorganisms which cause food decomposition and pathogens that threatens the health of living things.

May 2009, 130 pages

Key Words: Lactic Acid Bacteria, *Pediococcus acidilactici*, bacteriocin, SDS-PAGE.

TEŞEKKÜR

İlk etapta bana kendisiyle birlikte çalışma şansını tanıyan, çalışmalarımda ilgi ve desteğini eksik etmeyen, teknik tecrübe ve bilgisinin yanında kültürel yönünden de faydalandığım, güçlü eğiticiliği ve pratik zekasıyla her zaman saygı duyduğum, deney çalışmalarımın ana materyali olan suşları temin edebilmek amacıyla Mikrobiyal Genetik laboratuvarının kültür koleksiyonunu hiç çekinmeden kullanımıma açan çok değerli danışman hocam; Sayın ÖZLEM OSMANAĞAOĞLU' na,

Tüm yardımları için laboratuvar arkadaşlarım Fadime Kıran, Pelin Doğan ve Duygu Akkaya'ya, teknik çalışmalarımdaki katkılarından dolayı Başak Oral'a son zamanlarımda manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım Nihat Bilir'e,

Her zaman yanımda olan, her türlü sıkıntımı sıkıntısı, sevincimi sevinci kabul eden, varlıklarını hep en yakınımda hissettiğim, beni bugünlere kadar yetiştiren, maddi manevi hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, daha yolun çok başında olmama rağmen her şeye yetecek gücümün olduğunu her defasında yineleyerek anlatan, hayatımın her aşamasında varlıklarıyla güven ve gurur duyduğum iyi ki onların evladıyım diyebildiğim iki nadide insan sevgili babam MEHMET BİLER ve annem SEMRA BİLER'e,

Doğduğu günden itibaren hayatımın renklerini bir gökkuşağına çeviren, yanımda olmasından bile ayrı bir zevk duyduğum, her türlü sıkıntımı ve mutluluğumu paylaştığım, hayatımın en'leri sıralamasında hep ilk sıralarda yer alacak olan canım kardeşim GÖKÇE BİLER'e

Ve; zorlu olan bu süreçte gösterdiğim azim, kararlılık ve sabırdan dolayı kendime,

TEŞEKKÜRLER…
Burcu BİLER
Ankara,Mayıs 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ x
ÇİZELGELER DİZİN xi
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 4
2.1 Laktik Asit Bakterileri 6
2.1.1 *Lactococcus* cinsi bakterilerin temel özellikleri 6
2.1.2 *Lactobacillus* cinsi bakterilerin temel özellikleri 7
2.1.3 *Leuconostoc* cinsi bakterilerin temel özellikleri 7
2.1.4 *Enterococcus* cinsi bakterilerin temel özellikleri 8
2.1.5 *Pediococcus* cinsi bakterilerin temel özellikleri 8
2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi 9
2.2.1 Starter kültür olarak kullanılmaları 9
2.2.2 Probiyotik olarak kullanılmaları 10
2.2.3 Bakteriyosin üretimi 11
2.2.3.1 Bakteriyosinlerin kronolojik gelişimleri ve tanımlanması 12
2.2.3.2 Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanımı 14
2.2.3.3 Bakteriyosinlerin diğer koruyucu maddeler ve proseslerle birlikte kullanılması 15
2.3 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinler 17
2.3.1 Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler 18
2.3.2 Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinler 21
2.3.3 Lökonostoklar tarafından üretilen bakteriyosinler 22
2.3.4 Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler 22
2.3.5 Pediokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler 23
2.3.5.1 Pediosin A 23

2.3.5.2 Pediosin PA-1/AcH 24
2.4 Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması ve Önemli Özellikleri 27
2.4.1 Grup I bakteriyosinler 28
2.4.2 Grup II bakteriyosinler 28
2.4.3 Grup III bakteriyosinler 32
2.4.4 Grup IV bakteriyosinler 32
2.4.5 Bakteriyosinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri 32
2.4.6 Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları 33
2.5 Bakteriyosin Üreten Türlerin Belirlenmesi ve Bakteriyosin Üretim Koşulları 36
2.6 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Saflaştırılması 38
2.7 Pediosin Peptitlerinin Karakteristikleri ve Biyosentezi 40
2.8 Pediosine Karşı İmmunite ve Bakteriyosinlerin Moleküler Genetiği 44
3. MATERYAL ve YÖNTEM 47
3.1 Materyal 47
3.1.1 Bakteri kültürleri 47
3.1.2 Kültür ortamları 47
3.1.3 Tampon ve çözeltiler 47
3.1.4 Moleküler markörler 47
3.1.5 Kimyasallar 49
3.1.6 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu 49
3.1.7 Bakteri kültürlerinin saklanması 49
3.2 Yöntem 49
3.2.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin optimum üreme koşullarının belirlenmesi ve antimikrobiyal aktivitesi 49
3.2.1.1 Bakteri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi 49
3.2.1.2 Ham (crude) bakteriyosinin elde edilmesi ve bakteriyosin üretiminin teşhisinde kullanılan temel metotlar 50
3.2.1.3 Optimum inkübasyon zamanı 51
3.2.1.4 Optimum sıcaklığın belirlenmesi 51

3.2.1.5 Maksimum aktiviteli besiyerinin belirlenmesi 52
3.2.1.6 Bakteriyosin aktivite ünitesinin ölçülmesi 52
3.2.1.7 Antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesi 52
3.2.2 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin stabilitesi 53
3.2.2.1 pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi 53
3.2.2.2 Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi 54
3.2.2.3 Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi 54
3.2.2.4 Organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi 54
3.2.3 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosin özelliği gösteren proteinlerin ayrılması 55
3.2.3.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin üretici hücrelerden adsorbsiyonu ile kısmi saflaştırılması ve eldesi 55
3.2.3.2 Pediosin PBF'nin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforeziyle (SDS-PAGE) tesbiti ve moleküler ağırlığının hesaplanması 56
3.2.3.3 Protein büyüklüklerinin saptanması 58
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 59
4.1 Antimikrobiyal Madde Üretim Özelliğinin Gösterilmesi 59
4.2 *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddenin Optimum Üretim Koşullarının Belirlenmesi 59
4.2.1 Optimum inkubasyon zamanının tespiti 59
4.2.2 Optimum sıcaklığın tespiti 61
4.2.3 Maksimum aktiviteli besiyerinin tespiti 61
4.3 *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddenin Aktivite Ünitesinin Tespiti ve Antimikrobiyal Aktivite Spektrumu 62
4.4 *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddenin Tabiatı 66
4.4.1 pH 66
4.4.2 Sıcaklık 68
4.4.3 Enzim 68

4.4.4 Organik çözücüler 69
4.5 Kısmi Saflaştırılması Yapılan Bakteriyosin Bant(lar)ının SDS-PAGE Yöntemiyle Moleküler Büyüklüklerinin Tespiti 72
4.6 İnhibitör Proteinlerin SDS-PAGE'le Ayrılması ve Bakteriyosin Etkisinin Gösterilmesi 72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 75
5.1 *Pediococcus acidilactici* PBF Tarafından Üretilen Pediosin PBF 76
KAYNAKLAR 90
EKLER 118
EK 1 Bakterilerinin gelişmelerinde kullanılan kültür ortamları 119
EK 2 Tampon ve çözeltiler 123
EK 3 Protein analizi için kullanılan moleküler markör 128
EK 4 Kimyasallar 129
ÖZGEÇMİŞ 130

SİMGELER DİZİNİ

APS	Amonyum persülfat
APT	All Purpose Tween
ATP	Adenozin Trifosfat
BHI	Brain Heart Infusion Broth
Bp	Baz çifti
CH	Karbonhidrat
CO_2	Karbondioksit
Da	Dalton
Dk	Dakika
DNA	Deoksinükleikasit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Gr	Gram
GRAS	İnsan ve Hayvan Tüketiminde Güvenilir (Generally Regarded as Safe)
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
Kb	Kilobaz
Kbp	Kilobaz çifti
kDa	Kilo Dalton
LAB	Laktik Asit Bakterisi
Lc.	Lactococcus
Leu.	Leuconostoc
Lb.	Lactobacillus
M	Molar
mA	Miliamper
MDa	Megadalton
Mg	MiliGram
mM	Milimolar
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe Broth

N	Normal
NaCl	Sodyum klorür
NB	Nutient Broth
ºC	Santigrat Derece
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Ped.	*Pediococcus*
PMF	Proton İtici Gücü
RSKK	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	Tetra metil Etilen Diamin
TGE	Tripton Glukoz Yeast Ekstrakt
M	Mikro
Ml	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Fermentasyon reaksiyonu sonucu laktik asit oluşumu..... 4

Şekil 2.2 Katı besiyeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu 18

Şekil 4.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin indikatör *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı oluşturmuş olduğu inhibisyon zonları..... 60

Şekil 4.2 TGE besi ortamında 35ºC de gelişen *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun büyüme hızı (OD_{600} nm), asit üretimi (pH) ve pediosin üretimi (AU/ml). 60

Şekil 4.3 BHI, MRS, M17, Ellikier, TGE ve TGE buffer besi ortamlarında pediosin üretimi..... 62

Şekil 4.4 **(a)** *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin çeşitli indikatörlere karşı sergilemiş olduğu antimikrobiyal etki spektrumu **(b)** Kısmi olarak saflaştırılmış ekstraktın kullanımıyla belirlenen aktivite ünitesi (AU)..... 64

Şekil 4.5 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin farklı sıcaklıklarla muamelesi sonucunda *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı göstermiş olduğu aktivite 68

Şekil 4.6 **(a)** Farklı enzimlerin**(b)** ve organik çözücülerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri 69

Şekil 4.7 **(a)** Coomassie Blue ile boyanmış SDS-PAGE jel I: Kuyucuk 1, Moleküler ağırlık standartı (NOVEX Mark 12, INVITROGEN). Kuyucuk 2; *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen proteinler (20µl) **(b)** PAGE jel II (biyoanaliz için): Antimikrobiyal aktiviteden hangi bant(lar)ın sorumlu olduğunun belirlenmesi için indikatör bakteriyle kaplanmış jel. Kuyucukta *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosin (20µl) yer almaktadır..... 74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri 16

Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel özellikleri 19

Çizelge 2.3 İki peptitli Sınıf IIb nonlantibiyotik bakteriyosinler 30

Çizelge 2.4 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen iki peptitli bakteriyosinler 31

Çizelge 2.5 *Lactococcus lactis* türünden elde edilen Nisin A lanthionin (Ala-S-Ala) bakteriyosinin, *Pediococcus acidilactici* türünden elde edilen pediocin PA-1/AcH, *Leuconostoc gelidum* türünden elde edilen lökosin A ve *Lactobacillus sake* türünden elde edilen sakasin A nonlanthionin bakteriyosinlerin amino asit sekansları 43

Çizelge 2.6 Pediosin üretim özelliğinin pilazmid bağlantısı 46

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri türleri, gelişme ortamları ve optimum gelişim sıcaklıkları 48

Çizelge 4.1 Sıcaklığın *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen pediosinin optik densitesi (OD_{600}), son pH ve aktivite ünitesi üzerindeki etkisi 61

Çizelge 4.2 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivite spektrumu 65

Çizelge 4.3 Geniş aralıktaki değişik pH değerlerinin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri 67

Çizelge 4.4 Farklı enzimlerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri 70

Çizelge 4.5 Farklı organik çözücülerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri 71

1. GİRİŞ

İnsanların sağlıklı büyüme ve gelişmelerinde tükettikleri gıdaların güvenilir olması oldukça önemlidir. Her geçen gün tüketici talebine bağlı olarak yeni gıdalar geliştirilmektedir. Bu gıdaların birçoğu bildiğimiz temel gıda kaynaklarından üretilmekte ve fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin (raf ömrü) uzatılması için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Mikrobiyolojik problemlerin artmasıyla birlikte gıdalara ilave edilen katkı maddeleri ve antimikrobiyal maddelerinde sayısında artış gözlenmiştir. Ham madde ile birlikte tarımsal üretimde kullanılan hormonlar ve kimyasallara ek olarak ham maddenin işlenmesi sırasında ilave edilen bazı katkı maddeleri kalp hastalıklarına, astıma, alerjik sorunlara ve hatta kansere yol açmaktadır (Eaton and Klaassen 1996). Bununla beraber, yapılan son çalışmalarda gıda katkı maddelerinin (antioksidanlar, tatlandırıcılar, renklendiriciler vs.) bazılarının sağlıksız oluşu ve kullanım oranına bağlı olarak kanserojenik ve toksik etki yapabilmeleri, doğal ve güvenilir katkıların elde edilmesi ve kullanımı oldukça önemli hale getirmiştir. Teknolojik ve ekonomik olarak gelişmiş olan ülkelerde bunun gibi sorunlara sıkça rastlanılması başta beslenme alışkanlıkları olmak üzere doğallıktan uzaklaşıldığını göstermektedir. Bu durum daha doğal yapıya sahip antimikrobiyal maddelere ve üretim teknolojisi gereği kullanılan gıda katkılarına olan talebi arttırmaktadır. Bazı gıda katkı maddelerinin kanserojen özelliklerinin ortaya çıkmasından dolayı bir çok ülke ekolojik tarıma yönelmiş ve katkısız doğal ürünler elde etmeye başlamıştır. Bu ürünlerin maliyetinin çok yüksek olması tüketici talebini azaltmaktadır. Gıdaların korunması ve muhafaza sürelerinin uzatılmasında, düşük sıcaklık veya ısıl işlem uygulanması, paketleme yöntemleri gibi prosesler ve tuz, şeker ve antimikrobiyal katkı maddeleri gibi katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak yine de gıda kaynaklı sağlık sorunlarıyla karşılaşılabilmektedir. Sağlıklarını düşünen tüketicilerin son günlerde gıdalarda kullanılan kimyasallara olan ilgilerinin artması, tüketime hazır dondurulmuş gıdaların piyasadaki pazar payını arttırmıştır. Bu gıdaların raf ömrünü uzatmak için dondurarak depolama ve vakum paketleme uygulanmaktadır (Motlagh *et al.* 1991). Gıdaların güvenliğinin sağlanmasında mümkün olduğunca proses uygulamasından kaçınılması ve doğal katkı maddelerinin kullanımı gerekmektedir. Bu amaçla biyokontrol yöntemi önerilmektedir. Yani; kimyasal formulasyona sahip gıda

katkı maddelerine alternatif olarak doğal koruyucular ya da antimikrobiyal koruyucuların kullanımı tavsiye edilmektedir. Bu yöntemle; antagonistik mikroorganizmaların ve metabolitlerinin kullanımıyla patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların inaktive edilmesi sağlanmaktadır (de Martinis *et al.* 2002).

Laktik asit bakterilerinden uzun yıllardan beri çeşitli fermente gıdaların üretilmesinde yararlanılmaktadır. Bu şekilde laktik asit fermentasyonuna tabi tutulan bazı gıdaların üretilen organik asitlerden dolayı raf ömrünün uzadığı bilinmektedir. Ancak laktik asit bakterilerinin organik asitler dışında diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren hidrojen peroksit, serbest yağ asitleri, amonyak, diasetil ve bakteriyosin gibi inhibitör maddeleri de ürettiği saptanmıştır (Daeschel 1989).

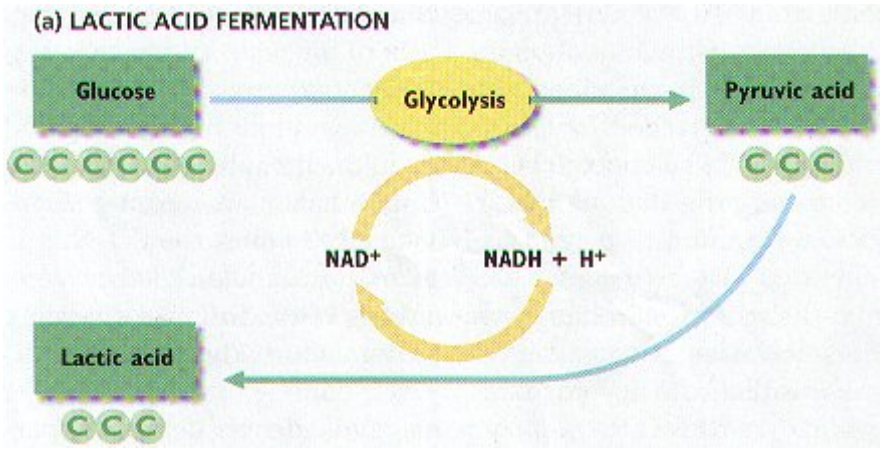
Bakteriyosinler; üretici bakteriye yakın türlere karşı, bakterisidal aktivite gösteren protein yapısında maddelerdir (Klaenhammer 1988). Aynı zamanda insan ve çevre sağlığı üzerinde olumsuz etki içermeyen, ancak gıda bozulması ya da gıda kökenli hastalık etmeni olan mikroorganizmalara karşı güçlü bir koruma sağlayan doğada ve hatta uzun yıllardır tüketilen bazı gıdalarda yaygın olarak bulunan mikroorganizma türleri tarafından sentezlenen bileşikler bakteriyosinler olarak adlandırılmaktadır. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinin protein yapısında olan bir antimikrobiyal bileşen olması (de Martinis *et al.* 2002, Riley 1998) ve bakteriyosin üreten LAB'lerinin fermente edilmiş gıda ürünlerinde doğal olarak bulunması bu bakterilerin biyoprezervatif olarak potansiyel kullanımlarına olan ilgiyi arttırmıştır ve kimyasal koruyucuların yerini alabilecek aday durumuna gelmesini sağlamıştır (de Vuyst and Vandamme 1994). Bakteriyosinlerinlerin gıdada antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları da ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir. Peptit ve protein yapılarında olmaları ise; pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden, mide salgılarından etkilenebildiklerini ve insan vücudunda sindirilebileceklerini göstermektedir. Ayrıca bazı bakteriyosinlerin (Grup 2) ısı stabilitelerinin olması, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır (de Martinis *et al.* 2002, Delves – Broughton *et al.* 1996). Hatta bazı bakteriyosinler otoklavlama sıcaklığında bile stabil kalabilmektedir. Dolayısıyla bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere

birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır. Bakteriyosinler gıda maddesine doğrudan katılabildikleri gibi, bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürlerin gıdaya inokulasyonuyla veya gıdanın koruyucu ambalaj materyaliyle birlikte de kullanılabilirler. Böylelikle; uygun olan bakteriyosinin veya bakteriyosin üreten LAB'sinin gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir. Bu amacın gerçekleşebilmesi için kullanılacak olan bakteriyosin molekülünün iyi bir şekilde tanımlanıp saflaştırılması gerekmektedir.

Gıda güvenliği açısından, patojen mikroorganizmaların gıdalarda gelişiminin önlenmesi sağlanmalıdır. Gıdalarda gelişen patojen mikroorganizmalar üzerinde antagonistik mikroorganizmaların ve bakteriyosin gibi metabolik ürünlerin etkili olması nedeniyle gıda güvenliğinde bakteriyosin kulanımının önemi oldukça artmıştır. Bu çalışmada; fermente gıda ürünlerinden izole edilen ve bir laktik asit bakterisi olan *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun ürettiği bakteriyosinin karakterizasyonu (biyokimyasal ve fenotipik tekniklerin kullanımı ile) ve saflaştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Laktik asit bakterileri; Gram-pozitif, katalaz negatif, karbonhidrat fermentasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit oluşturan doğal bir grup olarak bilinmektedir. (Şekil 2.1) Morfolojileri kok veya çubuktan oluşan farklı uzunlukta zincir şeklindedir. Birkaç ayrıcalık gösteren üye dışında hepsi hareketsizdir. *Sporolactobacillus imilinus* hariç hiçbiri spor oluşturmaz. Laktik asit bakterileri Gram- pozitif bakteriler içerisinde düşük düzeyde guanin ve sitozin oranına sahip bir bakteri grubudur (Ludwig *et al.* 1993). Laktik asit bakterilerinin genomunun G+C içeriği % 50'nin altındadır ve bu bakteriler *Clostridium* filumuna dahil edilirler.



Şekil 2.1 Fermentasyon reaksiyonu sonucu laktik asit oluşumu

Toprak ve suda neredeyse hiç rastlanılmayan laktik asit bakterilerine; bazı bitkilerde, süt ve süt ürünlerinde, insan ve canlıların bağırsak sistemlerinde ve fermente gıdalarda rastlamak mümkündür. Laktik asit bakterileri mandıra ürünlerinin, et ve sebzelerin fermentasyonunda geniş bir kullanım alanına sahiptir (Stiles 1996). Vakum paketlenmiş et ürünleri gibi fermente ürünlerde LAB'leri stoklama süreci boyunca dominant mikroflora olmaya başlamıştır (Shillinger and Lücke 1987, Shaw and Harding 1984). Bu durum etlerin dondurularak depolama ömürlerini ve talep edilebilirliklerini arttırmasına rağmen, (Sharpe and Pettipher 1983, Shillinger and Lücke 1987) etler, laktik asit bakterilerinin ürettikleri metabolik ürünler ve pH'ın düşmesiyle

bozulabilmektedirler (Osmanağaoğlu 2003, Samelis *et al.* 2000, Yang and Ray 1992). Et endüstrisinde laktik asit bakterileri sucuk fermantasyonunda, aroma gelişimini teşvik etmeleri ve fermente sucukların korunması amacıyla, starter kültür olarak geniş bir şekilde kullanılmaktadır (Liepe 1983). LAB'nin kullanımıyla üretilen organik asit, hidrojen peroksit, diasetil, inhibitör enzimler ve bakteriyosinler çoğu gıdayı kontamine eden mikroorganizmalara karşı güçlü bir antagonistik aktivite oluşturmaktadır (Piard and Desmazeaud 1992). Laktik asit bakterilerinin diğer organizmalar üzerindeki inhibisyon etkisi; pH'ı düşürme, besiyeri için rekabet, hidrojen peroksite karşı ilgisi ve antimikrobiyal maddeler üretimi gibi birçok hareket mekanizmalarını içermektedir. Son yıllarda, biyolojik koruyucu (biyopreservatif) uygulamalarında özellikle bakteriyosin ve/veya diğer inhibitör madde üreten laktik asit bakterilerinin kullanımına olan ilgi artmıştır. Uzun yıllardan beri güvenle kullanılmaları, GRAS olarak belirlenmeleri ve ilginç metabolik karakteristikleri, geniş alanda endüstriyel uygulamalara olanak tanımaktadır

Axelsson ve arkadaşlarının yapmış olduğu sınıflandırma dahilinde laktik asit bakterilerinden; *Streptococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Lactococcus, Tetragenecoccus, Vagococcus ve Weissella* cinsleri gıdalarla yakından ilişkilidir (Axelsson *et al.* 1998, Stiles and Holzapfel 1997).

Bunun yanı sıra bazı LAB türleri potansiyel sağlık faydaları sonucunda probiyotik olarak kullanılmaktadır. Gıdalara ilaveleri ve gıda fermentasyonunda sık kullanımları yüzünden LAB' leri metabolik özellikleri, gelişim kabiliyetleri, endüstriyel işlemlere dirençliliği, son ürün oluşturmadaki gücü, raf ömrünü uzatması gibi durumları nedeniyle titizlikle karakterize edilmişlerdir (Temmerman *et al*. 2004).

Laktik asit bakterileri; fermentasyonda oluşan ürünlerin cins ve miktarına göre sınıflandırıldıklarında homofermantatif ve heterofermantatif olarak ikiye ayrılırlar (Drian 1976).

Homofermantatif laktik asit bakterileri glukozu; Fruktoz Di Fosfat yoluyla parçalayıp fermentasyon sonucu % 95-100 oranında laktik asit üretirler (Drinan 1976).

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2(CH_3 - CHOH-COOH)$(Laktik asit)

Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise glukozu; Hegzos Mono Fosfat yoluyla parçalayarak fermentasyon sonucu % 50 oranında laktik asit üretirken, bunun yanı sıra etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (Drinan *et al.* 1976).

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3 - CHOH-COOH + CH_3 - CHOH-CO_2$

2.1 Laktik Asit Bakterileri

Bilinen türlerin taksonomik düzeltmeleri ve yeni genuslarınun tanımlanmasıyla laktik asit bakterilerilerine; *Aerococcus, Alloicoccus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagoccus ve Weissella* cinsleri dahildir (Axelsson *et al.* 1998).

Gıda endüstrisi açısından önemli 11 farklı laktik asit bakterisi grubunun en önemli 5 tanesi *Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Pediococcus ve Lactobacillus*'tur (Cogan 1996).

2.1.1 *Lactococcus* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Karşılaştırmalı serolojik çalışmalar, lipit kompozisyonu, nükleik asit hibridizasyonu ve hücre duvarı kimyasal yapısının belirlenmesi sonucu elde edilen veriler ışığında *Streptococcus* cinsinden ayrılan bazı türler, *Lactococcus* cinsi altında sınıflandırılmıştır (Schleifer *et al.* 1985).

Laktokoklar, homofermantatif özellikte olup karbonhidrat katabolizması sonucu ana ürün olarak L(+) laktik asit üretmektedirler. Bu bakteriler kok şeklinde, küre ya da kısa

zincir halinde birarada bulunmaktadır. Optimum gelişme sıcaklıkları 30°C'dir. 10°C'nin altında ve 45°C'nin üzerinde gelişmeme özellikleriyle (Holt *et al.* 1994) hem streptokoklardan hemde enterokoklardan ayrılmaktadırlar. *Lactococcus. lactis* alttürleri özellikle fermente süt ürünlerinin üretiminde önemli role sahiptir.

2.1.2 *Lactobacillus* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Lactobacillus cinsi bakteriler çeşitli kaynaklarda laktik asit bakterilerine mensup, ince veya kalın çubuk şeklinde, Gram-pozitif, spor oluşturmayan bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Kandler and Weiss 1986).

Fermentasyon sonunda oluşan ürünlere göre homofermentatif veya heterofermentatif türleri bulunmaktadır. Kromozomlarındaki nükleik asit komposizyonunun % 33-55'ini G+C oluşturmaktadır (Stiles and Holzapfel 1997). Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaerob olup % 5 CO_2'li ortamda gelişme gösterebilirler. Genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinirler (Hammes and Vogel 1995). Laktobasiller tarafından sentezlenen bakteriyosinler gıda sanayinde kullanılma potansiyeline en fazla sahip bakteriyosinlerdir.

2.1.3 *Leuconostoc* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Süt, peynir ve et gibi fermente ürünlerin oluşumunda ve organoleptik adı verilen tat, koku gibi özelliklerin kalitesinin belirlenmesinde büyük öneme sahiptirler (Dellaglio *et al*. 1995). Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C'dir (Holt *et al*. 1994). Buzdolabı sıcaklığında da üreyebilme özellikleri vardır.

Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda sadece laktik asit üretmediğinden heterofermentatif özellik göstermektedir. Fermentasyon sonucunda D-laktat ve etanol ile gaz oluşumu gözlenir. Starter kültür içeriğine dahil olup sitrattan diasetil oluşumuna nedendirler. Bu da tat oluşumu için önemli bir kriterdir. Fermente ürünlerde baskın olan türleri: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ve *Leuconostoc lactis'*tir (Dellaglio *et al.* 1995).

2.1.4 *Enterococcus* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Enterokoklar da laktokoklar gibi *Streptococcus* cinsine dahil edilmişler, daha sonra serolojik D-antijeni grubuna sahip olmaları ile sınıflandırmada ayrılmışlardır (Holt *et al.* 1994).

Oksijen kullanma bakımından fakültatif anaerobik bakterilerdir. Fermentasyon sonucu farklı karbonhidrat formlarını L(+) laktik aside çevirir fakat gaz oluşturmazlar .% 6.5 NaCl 'de ve % 40 tuzda, 10-45°C sıcaklık aralığında gelişim gösterebilirler. Katalaz negatif özellik yansıtmalarına rağmen bazı türleri yalancı katalaz aktivitesi verebilir (Doming *et al.* 2003). Optimum gelişme sıcaklıkları 37°C'dir.

2.1.5 *Pediococcus* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Hücreler küre şeklinde olup ikili düzlemde tetrat şeklinde bölünmektedirler. Gram-pozitif ve fakültatif anerobtur. Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda sadece laktik asit ürettiğinden homofermantatiftir. Optimum gelişme sıcaklıkları 35°C'dir. *Pediococcus acidilactici* gibi 50°C'de gelişen türleri bulunmaktadır. Katalaz negatiftirler. *Pediococcus* cinsi bakteriler 8 tür içermektedir. Bu sekiz türden *Pediococcus acidilactici*; *Pediococcus pentosaceus, Pediococcus damnosus* ve *Pediococcus parvulusla* yakından ilişkilidir (Collins *et al.* 1990). *Pediococcus cerevisiae* önceden bu cinsin içerisinde yer almasına rağmen şu an türleri *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus, Pediococcus damnosus* türleri içerisinde yer almaktadır (Kitahara 1974; Garvie 1986, Gherna and Pienta 1989). *Pediococcus acidilactici* ve *Pediococcus pentosaceus*'un DNA/DNA homolojileri birbirlerine çok yakın olup sadece az bir karakteristik farkla birbirlerinden ayrılmaktadır. *Pediococcus acidilactici* türleri 50°C'de gelişme gösterirken, maltozu fermente edememekte bununla birlikte *Pediococcus pentosaceus* 50°C'de gelişme göstermemekte lakin maltozu fermente etmektedir. Ayrıca *Pediococcus acidilactici* hücreleri biraz daha ısıya karşı dirençlilik göstermektedirler (Kitahara 1974, Garvie 1986).

Pediococcus cinsi bakteriler bazen *Micrococcus* cinsi bakterilerle karıştırılabilmektedir. Bunun nedeni morfolojik olarak benzemeleri ve tuza olan toleranslarıdır. *Micrococcus*'ların pigmentli olması ve asite karşı toleranslı olmaması iki cins arasındaki ayrımı güvenle sağlamaktadır. Pediokoklar doğal olarak mandıra ürünlerine, etlerde, taze sebze, bira ve şarap gibi fermente ürünlerde bulunmaktadır. Bunlar doğal olarak sebze ve etlerin fermentasyonlarının kontrolüyle ilişkili olup (Bacus and Brown 1981, Garvie 1986) peynirin oluşmasında ikinci flora gibidir (Bhowmilk and Marth 1989). Pediokoklar sadece aromaya katkıda bulunmayıp, şekil ve renk gelişimini de sağlamaktadır. Fakat bazı pediokok türleri özellikle kendine yakın laktik asit bakterilerine ve diğer bazı bakterilere karşı gelişimi engelleme yeteneği göstermekte ve bu gelişimi engellenen bakteriler arasında gıdayı bozan ve hastalık yapan mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Bhunia *et al.* 1988, Daeschel and Klaenhammer 1985, Gonzalez and Kunka 1987).

2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi

Laktik asit bakterileri gerek fermente ürünlerde starter kültür olarak kullanımı gerekse 'bakteriyosin' gibi gıdada bozulmaya neden olan bakterilerin gelişimini engelleyen antimikrobiyal madde üretim yetenekleri ile gıda endüstrisi için vazgeçilmez unsurlardır. Laktik asit bakterilerinin diğer üyeleri özellikle laktobasiller insanların ve hayvanların gastrointestinel sistemlerinde önemli bir alanı işgal eder ve bunların sağlıklı kalmak ve iyi hissetmek adına bir kaç probiyotik yararı olduğu düşünülmektedir. Bu yararlar arasında normal mikroflorayı olumlu etkilemesi, patojenlerin yok edilmesi ve mukozal bağışıklığın stimülasyonu/modifikasyonu yer almaktadır.

2.2.1 Starter kültür olarak kullanılmaları

Laktik asit bakterilerinin en önemli karakteristik özelliklerinden biri; süt şekeri olan laktozu kullanarak fermentasyon sonucunda laktik asit üretmeleridir. Bu reaksiyonu başlatan kültür ürüne öncelikli olarak verilir ki buna da "starter kültür" denir. Starter bakterilerin kullanımları ile hatalı ürün tehlikesini en az düzeye indirgemek, daha kaliteli ve standart tipte ürünler elde etmek amaçlanmıştır (Gilliland 1986).

Et ürünlerinde son 25 yıldır özellikle de son 10 yıldır starter kültürler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu ürünlerin üretiminde kullanılan starter kültürler; *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sake, Lactobacillus curvatus, Pediococcus acidilactici* ve *Pediococcus pentosaceus*'un uygun kombinasyonları içermektedir.

Starter bakteriler çeşitli şekilde ürüne bulaşan kontaminant mikroorganizmalar, gıda zararlısı veya gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerinde de inhibisyon özelliği göstermektedir (Bacus and Brown 1981). Starter bakterilerin oluşturduğu inhibitör maddeler arasında küçük moleküllü antibiyotikler, laktik asit, hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, litik enzimler, bakteriyosin veya bakteriyosine benzer maddeler bulunmaktadır (Hammes *et al.* 1990, Andersson *et al.* 1988, Geisen *et al*. 1992). Organoleptik özellikler dediğimiz tat, koku gibi özelliklerin yanı sıra fermentasyonu sağlayıp peynir, krema, tereyağ ve yoğurt gibi birçok ürün oluşumunda mühim görev üstlenmektedirler. Mezofilik starter kültürlerden bazıları laktik asit üretirken, bazıları ise sitrik asit fermentasyonu gerçekleştirmektedir. Ve asetoin/diasetil, CO_2 oluşturmaktadır. Diasetil özellikle süt ürünlerinde tat oluşumu için önemlidir (Cogan 1996).

2.2.2 Probiyotik olarak kullanılmaları

Yunanca kökenli bir kelime olup ‘‘yaşam için’’ anlamına gelmektedir. Tarihten günümüze kadar birçok şekilde anlatılan bu terim son olarak 1999'da Kneifel tarafından; vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlandırılmıştır (Kneifel *et al.* 1999).

Laktik asit bakterileri, bağırsak florasına olumlu etkileriyle bağışıklık sistemini kuvvetlendirerek, vücudun doğal savunmasını güçlendirir. Ancak bunu yapabilmeleri için bu bakterilerin mideden geçerken canlı kalabilmeleri ve böylece bağırsaklarda gelişme olanağı bulabilmeleri gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinden probiyotik üretiminde kullanılanlar genellikle; *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türlerdir.

Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin sağlığa faydalı diğer etkilerini de sıralayacak olursak;

- Laktoz intoleransının hafifletilmesi.
- Kan lipitlerinin düşürülmesi ve kalp hastalığı riskinin azaltılması.
- Ürogenital infeksiyonlar (Üriner ve vajinal kanal hücrelerine yapışma, H_2O_2 gibi inhibitör maddelerin üretimi).
- Kolon kanseri riskinin azaltılması.
- İmmun sistemin güçlendirilmesi (Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitelerinin arttırılması, IgA üretiminin arttırılması).
- İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması (Sitokin sentezinin düzenlenmesi).
- *Helicobacter pylori* infeksiyonu (Laktik asit üretimi).
- İntestinal sistem infeksiyonlarının engellenmesi (İntestinal mukozaya yapışmak suretiyle patojenlerin yapışmasının engellenmesi).
- Barsak florası üzerine olumlu etki (Toksik metabolit üretiminin azaltılması yoluyla, aşırı gelişmiş olan floranın aktivitesinin etkilenmesi).

2.2.3 Bakteriyosin üretimi

Birçok gıda kaynaklı laktik asit bakterisi türü; *Lactococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus, Carnobacterium* ve *Propionibacterium* bakteriyosin adı verilen küçük antimikrobiyal proteinler üretmektedirler. Bu antimikrobiyal proteinler birçok Gram-pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki göstermekte, gıdanın bozulmasını sağlayan ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bazı mikroorganizmaları da inhibe etmektedir (Tagg *et al.* 1976, Ray and Daeschel 1992a, Klaenhammer 1993, Hoover and Steenson 1993, Vuyst and Vandamme 1994, Jack *et al.* 1995).

2.2.3.1 Bakteriyosinlerin kronolojik gelişimleri ve tanımlanması

Bakterilerin hayatta kalma yeteneği iç ve dış faktörlere ve aynı ekolojik çevre için yarışan diğer antagonist mikroorganizmaların ürettiği antimikrobiyal madde miktarının azlığına bağlıdır (Klaenhammer 1993). Farklı organizmalar arasında birbirinin gelişimini engelleyen ve destekleyen etkileşimler olmaktadır. Pasteur ve Joubert 1877 yılında yaptığı bazı çalışmalarda bakteriler arasında antagonistik etkileşimi göstermiştir (Pasteur and Joubert 1877). Bu etkileşimin bir kimyasal maddeden kaynaklandığı ilk olarak 1925 yılında Andre Gratia tarafından rapor edilmiştir (Gratia 1925). " Principle V" olarak adlandırılan *Escherichia coli*'nin bir türü tarafından üretilen bakteriyosin *Escherichia coli*'nin diğer türlerine karşı etkili bulunmuştur. Kolisin terimi 1946'da Fredericq ve Gratia tarafından kullanılmıştır (Gratia and Frederiq 1946).

1928 yılında Rogers *Lactobacillus bulgaricus* üzerine *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bir maddenin inhibitör etki yaptığını saptamış ve bu madde daha sonra nisin olarak adlandırılmıştır. (Rogers 1928, Montville and Chen 1998). 1969 yılında nisin WHO tarafından yasal bir gıda katkı maddesi olarak kabul edilmiştir (Cogan and Hill 1993).

Bakteriler tarafından üretilen protein yapısındaki antimikrobiyal maddenin tanımlanması ve isimlendirilmesinde 'Bakteriyosin' terimi ilk olarak 1953 yılında Jacob ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Jacob *et al*. 1953). 1969 yılına kadar bakteriyosinlerle ilgili yapılan çalışmalarda pek bir aşama kaydedilmemiş, 1969 yılında nisinin gıda koruyucu katkı maddesi olarak kullanımına izin verildikten sonra bakteriyosin kullanımının belirli bir potansiyel oluşturduğu fark edilmiş ve araştırmalar yoğunlaştırılmıştır.

Bakteriyosinler; bakteriler tarafından sentezlenen, antimikrobiyal etkiye sahip, genelde yakın türlerin inhibisyonunda etkili, kısa veya uzun zincirli protein benzeri yapılardaki maddeler olarak tanımlanmaktadır (Klaenhammer *et al.* 1995, Gorris 1996, Eijsink *et al.* 1998). Bakteriyosinler protein yapısında, doğal olduklarından bunların et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır. Bakteriyosinler gıda

maddesine doğrudan katılabildikleri gibi, bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürlerin gıdaya inokulasyonuyla veya gıdanın koruyucu ambalaj materyaliyle birlikte de kullanılabilirler. Böylelikle; uygun olan bakteriyosinin veya bakteriyosin üreten LAB'sinin gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir.

Birçok kaynakta bakteriyosinler ve antibiyotikler karıştırılmaktadır. Günümüz sınıflandırılmasında bakteriyosinler antibiyotiklerden tamamen farklı moleküller olarak kabul edilmektedir. Temel farklılıklara bakıldığında;

- Bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilirken, antibiyotikler gelişimin durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Vuyst and Vandamme 1991, 1992, Nes *et al.* 2002).

- Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenirken, antibiyotikler enzimatik bir işlenme sonucu aktif hale geçmektedirler. Bakteriyosinler pre-peptitler olarak sentezlenmekte daha sonra posttranslasyonel işlemlerle N-terminal lider peptitin uzaklaştırılmasıyla aktif form olan olgun bakteriyosinlere dönüşmektedirler.

- Üretici hücreler kendi bakteriyosinlerine karşı genetik olarak bağışıklık kazanmışlardır. Bu bağışıklık proteinlerini kodlayan genler bakteriyosinin yapısal genleriyle bağlantılı olup, antibiyotik bağışıklığını yöneten genetik belirleyiciler yapısal antibiyotik genleriyle bağlantılı değildir.

Mevcut antibiyotiklerin gıdalarda kullanımı tıbben mümkün olmamaktadır. Bu nedenle bakteriyosin tanımı içerisinde sadece bakteriler tarafından sentezlenen antimikrobiyal maddelerin yer alması gerektiği kanısına varılmıştır (Rammelsberg and Radler 1990; Riley 1998).

2.2.3.2 Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanımı

Gıda güvenliği açısından, patojen mikroorganizmaların gıdalarda gelişiminin önlenmesi gerekmektedir. Gıdalarda gelişen patojen mikroorganizmalar üzerinde antagonistik mikroorganizmaların ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddelerin etkili olması sebebiyle, gıda güvenliğinde bakteriyosin kullanımının önemi oldukça artmıştır. Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra, peptit veya protein yapılarında olmalarından dolayı mide salgılarından etkilenebildikleri ve insan vücudunda sindirilebilecekleri anlaşılmıştır. Ayrıca bazı Grup II bakteriyosinlerin ısı stabilitelerinin olması, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır. Bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır (Cleveland *et al.* 2001) (Çizelge 2.1). Bakteriyosinler doğrudan gıda maddesine katılabildikleri gibi, bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürlerin gıdaya inokulasyonuyla ya da gıdanın koruyucu ambalaj materyaliyle birliktede kullanılabilmektedir. Bu amaç doğrultusunda koruyucu kültür olarak daha çok laktik asit bakterileri, bakteriyosin olarak ise kullanımına izin verilen nisin kullanılmaktadır. Gıdaların korunmasında bakteriyosinlerin kullanımını esas alan alternatif bir yaklaşım da, bakteriyosin üreticisi canlı kültürlerin kullanımıdır. Bu yaklaşımda bakteriyosin üreticisi suşların; starter kültürler ya da starter kültür karışımlarının bir parçası olarak kullanımı veya gıdalara ilave edilmesi önerilmektedir (O'Sullivan *et al*. 2002a).

Genelde gıdada kullanımları için bakteriyosin üreticisi suş seçiminde kullanılan bazı unsurlar mevcuttur. Bunlardan bazıları aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- Tüketicilerin bu konudaki endişelerinin giderilmesi amacıyla üretici suş tercihen GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir kabul edilen özelliklere sahip) olmalıdır.

- Bakteriyosin *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium botulinum* gibi patojenlerin dahil olduğu geniş bir aktivite spektrumuna sahip olmalıdır.

- Bakteriyosinlerin, tüketici sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olması istenmemektedir.

- Bakteriyosinlerin ilave olunan üründe güvenlik, aroma bileşenlerinin geliştirilmesi gibi yararlı etkileri olmalıdır (Holzapfel *et al*. 1995, Horn *et al*. 2004).

- Bakteriyosin ısı stabil olmalıdır.

Bununla birlikte bakteriyosinlerin gıdalarda koruyucu olarak kullanımı gıda zehirlenmelerinde rol oynayan Gram-negatif patojenlere karşı kullanıma hazır bir bakteriyosinin mevcut olmaması (Gorris 1996), bazı bakteriyosinlerin genetik determinantları açısından stabil olması (Gorris 1996) ve tüketicilerin bu konudaki endişelerinin giderilmesi amacıyla güvenli (GRAS) olduklarının kanıtlanması gibi zorluklar neticesinde kısıtlanmaktadır. Bahsedilen kısıtlayıcı faktörlere rağmen son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda bu unsurları ortadan kaldırabilecek bulgular geliştirilmiştir.

2.2.3.3 Bakteriyosinlerin diğer koruyucu maddeler ve proseslerle birlikte kullanılması

Bakteriyosinler özellikle Gram-pozitif mikroorganizmalar üzerinde etkili olmalarına rağmen Gram-negatif mikroorganizmalar üzerinde fazla etkili olamamaktadır. Dolayısıyla Gram-negatif olan patojen mikroorganizmaların da olduğu düşünüldüğünde sadece bakteriyosin kullanımıyla gıdaların güvenliğinin sağlanamayacağı nettir. Bu sebeple, bakteriyosinle birlikte diğer koruyucu katkıların veya proseslerin kullanılması gerekmektedir. Gram-negatif bakterilerin dış zarlarının stabilitesi bozulduğunda bakteriyosinlere karşı hassasiyet göstermektedirler. Böylelikle bakteriyosinle birlikte hücre zarını bozabilecek trisodyum fosfat veya EDTA gibi şelatlayıcı ajanların kullanılmasının inhibisyon etkisi yapabileceği bildirilmiştir. EDTA, Gram-negatif mikroorganizmaların lipopolisakkarit kısmında Mg^{+2} iyonuna bağlanarak dış zarın yapısını bozup, bakteriyosinin sitoplazmik zara ulaşmasını sağlamaktadır.

Çizelge 2.1 Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri

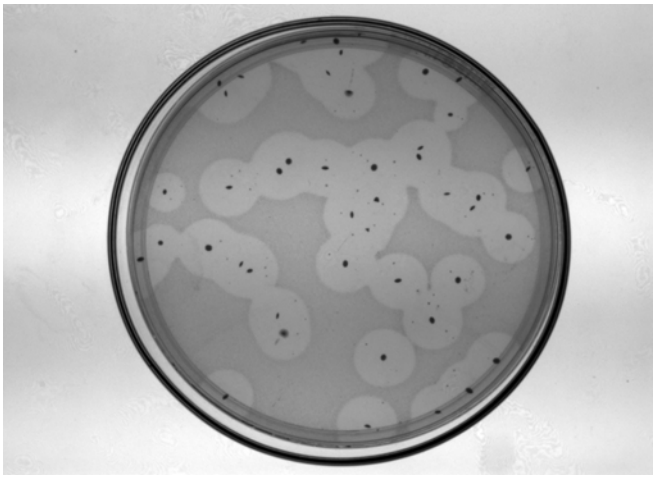
Bakteriyosin	**Uygulanan gıda**	**Etkileri**
Nisin A	Yeniden şekillendirilen et ürünleri	Bakteriyel inaktivasyon
Nisin A	Ricotta peynirinde *Listeria monocytogenes*'in kontrolü için kullanılmıştır.	*Listeria monocytogenes*'i 8 hafta etkili bir şekilde inhibe etmiştir.
Pediocin AcH	Pediocin AcH sentezleyen *Lactobacillus plantarum* WHE 92, olgunlaşmanın başlangıcında Munstar peynirinin yüzeyine spreylenmiştir.	*Listeria monocytogenes*'in gelişimi engellenmiştir.
Enterocin 4	Enterocin sentezleyen *Enterococcus faecalis* INIA4, Manchego peyniri üretiminde kullanılmıştır.	*Listeria monocytogenes* Ohio'yu inhibe ederken, *Listeria monocytogenes* Scott A'yı inhibe etmemiştir.
Piscicolin 126	Jambonda *Listeria monocytogenes* kontrolü için kullanılmıştır.	Ticari bakteriyosinden daha etkili bulunmuştur.
Leucocin A	*Leuconostoc gelidium* UAL 187 vakum paketlemiş sığır etinde bozulma kontrolü için kullanılmıştır.	*Lactobacillus sake*'in etkisiyle bozulma 8 haftaya kadar geciktirilmiştir.
Lactocin 705	Kıyılmış sığır etinde *Listeria monocytogenes'*in gelişimini önlemek için kullanılmıştır.	*Listeria monocytogenes*'in kıyılmış etlerde gelişimini önlemiştir.
Pediocin AcH	Tavuk eti sosisinde *Listeria monocytogenes*'i inhibe etmek için pediocin üreten *Pediococcus acidilactici* kullanılmıştır.	Etkili bir şekilde *Listeria monocytogenes* sayısını azaltmıştır.
Pediocin	Şarap ve fırıncılık ürünlerinde kullanım potansiyeli araştırılmıştır.	Bu tür ürünlerde kullanım potansiyelleri olduğu belirlenmiştir.
Pediocin AcH	Tavuk etine pediocin preparatı ilave edilmiştir.	5°C'de 28 gün *Listeria monocytogenes* gelişimini kontrol etmiştir.
Pediocin PA-1	Fermente sosiste starter olarak *Pediococcus acidilactici* kullanılmıştır.	*Listeria monocytogenes*'i etkili bir şekilde kontrol etmiştir.
Enterocin	Jambon, domuz eti, tavuk göğsü eti ve sosiste kullanılmıştır.	Çeşitli şartlar altında *Listeria monocytogenes* gelişimini kontrol etmiştir.

Yapılan kapsamlı bir çalışmada lactosin 705 ve enterocin CRL35 bakteriyosinleri değişik *Listeria* türleriyle bulaştırılmış kıyma ve et sularında ayrı ayrı ve kombine olarak denenmişlerdir. Denemelerin neticesinde *Listeria* türlerinin 24 saatlik depolama sürecinde büyük oranda inhibe olduğu ve özellikle iki bakteriyosinin birlikte kullanıldığında etkinin daha güçlü olduğu belirlenmiştir (Vignolo *et al.* 2000). Son yıllarda yapılan bir çalışmada bakteriyosinlerin gıda içerisindeki kullanımlarının yanı sıra ambalaj materyaline katıldığında da etkili olabildiği gösterilmiştir (Coma *et al*. 2001). Bu çalışmada kullanılan hidroksipropilmetilselüloz içerisine Nisin bakteriyosini eklenmiş ve bu materyalin *Listeria innocua* ve *Staphylococcus aureus* inhibisyonunda etkili olduğu görülmüştür. Bakteriyosinlerin etki spektrumlarını genişletmek maksadıyla birkaç farklı bakteriyosinin birlikte kullanımının patojenler üzerinde daha etkili olabileceği gösterilmiştir (Halin *et al.* 1993). Ayrıca bakteriyosin uygulamasına ek olarak gıdanın asitliğinin değiştirilmesi veya tuz içeriğinin arttırılmasının etki alanını genişlettiği kanıtlanmıştır (Vignolo *et al*. 2000, Rodgers 2001).Yapılan başka bir çalışmada laktisin 3147 bakteriyosini ve sodyum laktat taze sosislerde sodyum metabisülfit yerine koruyucu olarak kullanılmıştır. Elde edilen bulgular eklenen bakteriyosin ve organik asitin sosislerde *Salmonella kentucky* ve *Listeria innocua*'ya karşı sodyum metabisülfit yerine kullanılabileceğini, *Clostridium perfringens*'e karşı ise kısmen etkili olduğunu göstermiştir (Scannel *et al.* 2000).

2.3 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinler

Laktik asit bakterilerinin sentezlediği bakteriyosinler birbirinden farklı özellikte olup etki spektrumları, genetik determinantları ve biyokimyasal özellikleri farklılık göstermektedir. Genellikle düşük moleküler ağırlığa sahip olup (3-10kDa), hidrofilik ve hidrofobik kısımları bulunmaktadır. pH aralıkları geniş, izoelektrik noktaları yüksektir (de Martinis *et al.* 2002). Nisin ve pediocin AcH asidik koşullarda yüksek sıcaklığa daha dayanıklı olup, nisin otoklavlandıktan sonra aktivitesinin % 40'ını pH 6.8 de ise % 90'ını kaybetmektedir (Yıldırım ve Yıldırım 2000). Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin çoğu katyonik, hidrofobik veya amfilik moleküller olup, 20-60 aminoasit kalıntısı içermektedir (Chen and Hoover 2003). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin antimikrobiyal özelliğinin gözlemlenmesi

aktifleştirildiği besiyeri üzerinde oluşturduğu zonlarla belirlenmektedir (Şekil 2.2). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerde ortak özellikler mevcuttur (Çizelge 2.2).



Şekil 2.2 Katı besiyeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu

2.3.1 Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler

Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler; diplococcin, lactococcin, nisin ve lactostrepsin'lerin üyelerini içermektedir. Laktokoklarda tanımlanan ilk protein benzeri madde diplococcin'dir. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suşları tarafından üretilen bu bakteriyosin; α-kimotripsin, pronaz ve tripsin enzimlerine karşı duyarlı 5.300 kDa büyüklüğünde bir peptittir. Moleküler ağırlığı, ısı stabilitesi ve bakterisidal etkisi nedeniyle, diplococcin'in membrana etkili bir antimikrobiyal olduğu düşünülmektedir (Davey and Richardson 1981, Klaenhammer 1993).

Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel özellikleri

- 34'den 57'ye kadar aminoasitten oluşan katyonik peptit içerirler.
- Gram-pozitif bakterilere karşı duyarlı, bakterisidal etki gösterirler.
- Membran fonksiyonları stabilizasyonunu bozarak hücre ölümüne neden olurlar.
- Bakterisidal hareket genel olarak yüksek sıcaklık, geniş pH aralığına karşı dirençlidir.
- Bakterisidal hareket proteolitik enzimler tarafından kaybedilebilir.
- Bakterisidal spektrum azdan çoğa doğrudur.
- Bakteriyosine duyarlı Gram-pozitif bakteriler, kendi üretmiş olduğu bakteriyosine dirençlidir.
- Gram-pozitif suşa ait hücreler bir bakteriyosine duyarlı iken bir başkasına dirençli olabilirler.
- Üretici hücreler genetik olarak, kendi üretmiş oldukları bakteriyosinlere karşı bağışıklık kazanmıştır.
- Duyarlı bir suş bakteriyosin varlığında gelişirken geçici dirençlilik gösterebilir.
- Bakteriyosin molekülü, üretici hücreleri içeren Gram-pozitif bakterilerin hücre yüzeyinden absorbe edilmektedir.

Lactococcin'lerin en iyi bilinen üyeleri; lactococcin A ve lactococcin B'dir (Van Belkum *et al.* 1989, Holo *et al.* 1991, Stoddard *et al*. 1992, Klaenhammer 1993). Lactococcin A dar bir etki spektrumuna sahiptir (Van Belkum *et al.* 1989, Stoddard *et al*. 1992). Lactococcin B, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4 tarafından üretilmekte olup bu bakteriyosinin sentezi p9B4 olarak adlandırılan pilazmid üzerindeki 1.2 kb büyüklüğündeki bir bölge tarafından kodlanmaktadır (Nettles and Barefoot 1993). Bunların dışında; lactococcin MN, lactococcin G (Nissen-Meyer *et al.* 1992), lactococcin 972 ve lactococcin MMFII' de bu grupta yer almaktadır.

Nisin, lacticin 3147, lacticin 481 ve lacticin FS92 laktokoklar tarafından üretilen lantibiyotiklerdir. Nisin birçok Avrupa ülkesinde ve Orta Doğu ülkelerinde başta peynir olmak üzere süt ve konserve gıdalar gibi çeşitli gıdalarda güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. 1988 yılından beri FDA tarafından pastörize işlem görmüş peynirlerde *Clostridium botulinum* sporlarının gelişmesini ve toksin oluşumunu önlemek amacıyla GRAS olarak kullanımına izin verilmiştir (Daeschel 1989). Nisin molekülü 34 aminoasit içermektedir ve ağırlığı yaklaşık 3.500 kDa'dır. Ender rastlanan aminoasitlerin nisin molekülündeki fonksiyonu henüz açıklık kazanmamıştır. Ancak bu aminoasitlerin nisinin bir takım yapısal özellilerinde, örneğin düşük pH'ta otoklanlandıktan sonra stabilitesini kaybetmemesinde önemli olduğu sanılmaktadır (Hansen 1994). Yapılan bir çalışmada tampon çözeltideki nisinin 121ºC'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra pH 3'te aktivitesinin tamamını, pH 5'te % 35'ini, pH 7'de ise % 5'ini koruduğu saptanmıştır (Delves-Broughton 1990a). Nisin molekülü asidik karakterde olup düşük pH'ta stabilitesi ve çözünürlüğü yüksektir. Yapılan bir denemede nisinin düşük pH'ta çözünürlüğünün oldukça yüksek olduğu, yüksek pH'ta ise çözünürlüğün hızlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Liu and Hansen 1990). Nisinin aktivitesi üzerine değişik proteolitik enzimlerin etkisi incelenmiştir. Buna göre nisinin α-kimotripsin enzimi tarafından inaktive edildiği, pepsin, tripsin, proteinaz K enzimlerinin ise nisine etki etmediği saptanmıştır (Klaenhammer 1988, Piard *et al.* 1990, Kojic *et al.* 1991, Uhlman *et al.* 1992, Zezza *et al*. 1993). Gram-negatif bakterilere, maya ve küflere etki etmediği halde Gram-pozitif bakterilere özellikle spor oluşturanlara karşı etkilidir. Yapılan çalışmalarda nisinin Gram-pozitif bakteriler arasında *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Erysipelothrix*, *Clostridium*, *Bacilus*, *Listeria* ve çeşitli laktik asit bakteri türleri üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Scott and Taylor 1981, Magdoub *et al.* 1984, Henning *et al.* 1986, Ogden *et al.* 1988, Splittstoesser and Stoyla 1989, Bayoumi 1991, Kanatani *et al.* 1992, Zezza *et al.* 1993, Ariyapitipun *et al.* 1999). Nisinin; nisin A, nisin Z ve son yıllarda izole edilen nisin Q olmak üzere 3 doğal varyantı bulunmaktadır (Mulders *et al.* 1991, Zendo *et al.* 2003). *Lactococcus lactis subsp. lactis* tarafından üretilen nisin letal etkisi ve geniş aktivite spektrumu nedeniyle en çok çalışılan ve halen doğal gıda koruyucusu olarak kullanılan tek bakteriyosindir (Hurst 1981, Delves-Broughton *et al.* 1996, Zendo *et al.* 2003). Gram-negatif bakterilerin gelişimini önlemek için nisin kullanılmış ve yapılan çalışmalarda nisinin

şelat yapma özelliğine sahip maddelerle birlikte kullanıldığında, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı bakterisidal etki gösterdiği bulunmuştur (Vandenbergh 1993).

Laktoztrepsinler ise; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşları tarafından üretilen ve sadece asidik pH'larda aktivite gösteren antimikrobiyal proteinlerdir (Kozak *et al.* 1977).

2.3.2 Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinler

Bakteri cinsleri içerisinde ürettikleri bakteriyosin bakımından *Lactobacillus* cinsi büyük bir ağırlığa sahiptir. *Lactobacillus* cinsinin bakteriyosin sentezleme yeteneği bakımından bu denli zengin olmasının sebebi, çok farklı türler içermesidir. *Lactobacillus acidophilus* türü tarafından acidolin 8912 ve acidophilucin A (Klaenhammer 1993) bakteriyosinleri sentezlenmektedir. Klerk ve Smith 1967'de *Lactobacillus fermenti* türü tarafından bakteriyosin 466 olarak adlandırılan bakteriyosinin üretildiğini bulmuşlardır (de Klerk and Smith 1967). *Lactobacillus acidophilus* türünden lactocin B izole edilmiştir (Barefoot and Klaenhammer 1983). Bu bakteriyosin proteazlara karşı hassas olup, bakterisidal etki gösteren bu proteinin ağırlığı 10.000 Da'dan fazladır (Barefoot and Klaenhammer 1984). *Lactobacillus helveticus LP27*'den lactocin 27 izole edilmiş bunun da lipopolisakkarit protein kompleksi olduğu düşünülmüştür (Upreti and Hinsdill 1973,1975). *Lactobacillus helveticus*'un başka türleri tarafından helveticin J ve helveticin V-1829 bakteriyosinlerinin üretildiği rapor edilmiştir (Joerger and Klaenhammer 1986). *Lactobacillus plantarum* fermente et ve sebze ürünlerinin üretiminde kullanılan en önemli laktik asit bakterilerinden biridir (Ruiz-Barba *et al.* 1991, Kato *et al.* 1994). *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen çeşitli bakteriyosinler tanımlanmıştır bunlara örnek olarak; plantaricin A (Daeschel *et al.* 1990, Nissen-Meyer *et al.* 1993, Diep *et al.* 1994), plantaricin B (West and Werner 1988), plantaricin C (Gonzalez *et al.* 1994), plantaricin F (Fricourt *et al.* 1994), plantaricin S (Jimenez-Diaz *et al.* 1993,1995) bulunmaktadır. *Lactobacillus sake* türü bakteriler tarafından da sakacin A ve sakacin P gibi önemli bakteriyosinler sentezlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla sakacin

A'nın aminoasit sekans analizleri tamamlanmış ve 41 aminoasit içerdiği moleküler ağırlığının da 4308.7 Da olduğu gösterilmiştir (Holck *et al.* 1992). Çeşitli plantaricin türü bakteriyosinlerin *Listeria spp.*'yi inhibe ettiği rapor edilmiştir (Atrih *et al.*1993, Garriga *et al.* 1993). Fakat bu bakteriyosinlerin araştırmacılar tarafından sınıf IIa bakteriyosinlerle ilişkili olduğu düşünülmesine rağmen bu hala saptanamamıştır.

2.3.3 Lökonostoklar tarafından üretilen bakteriyosinler

Çeşitli et orjinli anti-listerial türde bakteriyosin üreten lökonostok türleri genel olarak ısı stabil, sınıf II bakteriyosinler gibi karakterize edilmektedir (Felix *et al.* 1994, Hastings *et al.* 1994, Osmanagaoglu 2003, Van Laack *et al.* 1992, Yang and Ray 1994). Bozulmuş vakumlu paketlenmiş Türk sucuklarından izole edilmiş *Leuconostoc carnosum* türlerinin ürettiği bakteriyosin *Listeria monocytogenes* ve LAB'leriyle yakın ilişkili türlere karşı inhibisyon etkisi göstermektedir (Osmanagaoglu 2003). Bazı antagonistik laktik asit bakteri türlerinin *Listeria'*nın gelişimini geciktirdiği belirlenmiştir (Harris *et al.* 1989, Stiles and Hastings 1991). Bunların içerisinde bir *Leuconostoc mesenteroides* ve 2 tanede *Leuconostoc gelidum* (Harding and Shaw 1990, Daba *et al.* 1991) bulunmaktadır. Ayrıca; *Leuconostoc gelidum* UAL 187-22'den (Hastings *et al.* 1991b, Van Belkum and Stiles 1995) leucocin A-UAL 187, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105'ten (Hechard *et al.* 1992) mesentericin Y105, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52'den (Mathieu *et al.* 1993, Revol-Junelles *et al.* 1996) mesenterocin 52A üretilmektedir. Leucocin A-UAL 187'nin 37 amino asiti mevcuttur ve moleküler ağırlığı 3930 Da'dur. *Leuconostoc mesenteroides* UL tarafından üretilen diğer bir bakteriyosin ise mesenterocin S'tir (Daba *et al.* 1991). Bozulmuş vakumla paketlenip işlem görmüş etteki *Leuconostoc mesenteroides* TA33a L*isteria* ve yakın ilişkili LAB'lara karşı inhibitor etki göstermektedir (Papathanasopoulos *et al.* 1994).

2.3.4 Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler

Enterococcus faecium tarafından üretilen bakteriyosinler sıkça rapor edilmiştir. Enterocin L50A ve B (Toit *et al.* 2000), enterocin B (Casaus *et al.* 1997), enterocin

CCM 4231(Laukova and Czikkova 1998), enterocin ON-157 (Ohmomo *et al.* 2000), enterocin Q (Cintas *et al.* 2000) bu bakteriyosinlerin içerisinde yer almaktadır. Enterocin'in antimikrobiyal aktivitesinde ısıya ve alkali uygulamasına karşı yüksek bir direnç vardır. Böylelikle enterocin RJ-11, nisinin aktivitesinin hızla kaybolduğu pH 12'de bile stabil olmaktadır (Rollema *et al.* 1995). Bu bakteriyosinin aminoasit sekansı enterocin L50A (Cintas *et al.* 1995, 1998, 2000) ve enterocin I (Floriano *et al.* 1998) bakteriyosinleriyle yüksek oranda benzerlik sergilemektedir. *Enterococcus faecium* L1 tarafından üretilen maddeler ısı stabil proteinlerdir ve enterocin EL1 olarak adlandırılmıştır. Bu klasik bakteriyosinin bir karakteristiği de dar aktivite spektrumuna sahip olmasıdır (Tagg *et al.* 1976). Enterocin EL1'in moleküler ağırlığı enterocin 101 ve 102'ye yani sırasıyla moleküler ağırlığı 2.000 Da ve 2.500 Da olan bakteriyosinlere benzemektedir (Kato *et al.* 1994). *Enterococcus faecium* DPC 1146 tarafından üretilen bakteriyosinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE'den sonra 3.000 Da olarak hesaplanmıştır (Parente and Hill 1992).

2.3.5 Pediokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler

Pediokoklar Gram-pozitif bakteri grubuna ait olup, homofermantatif laktik asit bakterileridir. Bu bakteriler geniş antibakteriyel spektrumlu bakteriyosinleri ve 2.'cil metabolitleri üretme kabiliyetine sahiptir. Pediokoklardan elde edilen bakteriyosinler pediocin olarak adlandırılmış, protein doğasında olduğu gösterilmiş ve çeşitli istenmeyen mikroorganizmaları inhibe ettiği rapor edilmiştir (Daeschel and Klaenhammer 1985, Gonzalez and Kunka 1987, Bhunia *et al.* 1988, Juven *et al.* 1991).

2.3.5.1 Pediosin A

Yapılan çalışmalarda *Pediococcus pentosaceus* FBB-61'in fermente salatalıklarda bulunan *Lactobacillus plantarum* FBB-67'nin gelişimine engel olduğu bulunmuştur (Etchells *et al.* 1964). Çeşitli kaynaklardan elde edilen 16 pediokokal türün inhibitör özellikleri çeşitli mikroorganizmalara karşı kıyaslanmış ve sonuçta açıkça antagonistik kapasitesi olan iki pediokok türü; *Pediococcus pentosaceus* L-7230 ve *Pediococcus pentosaceus* FBB-61 gösterilmiştir. Bu türler fermente salamura salatalıktan izole

edilmiş ve *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici, Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides, Micrococcus luteus, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* ve *Clostridium spp.*' ye karşı inhibitör etki göstermişlerdir. *Pediococcus pentosaceus* FBB-61'in daha sonra *Listeria monocytogenes*'e karşı da etkili olduğu bulunmuştur (Hoover *et al.* 1989). Bu bakteriyosin üretme kabiliyetine sahip iki pediokok türü, Gram-negatif bakterilere, mayalara ve birbirlerine karşı bir inhibitör etki sergilememişlerdir. *Pediococcus pentosaceus* FBB-61 tarafından üretilen antimikrobiyal ajanın kimyasal doğası karakterize edilmiş (Rueckert 1979); bakterisidal, sıcaklığa-dondurmaya karşı stabil ve pronazlara karşı duyarlı olmasından ötürü bu inhibitör maddenin bakteriyosin olabileceği düşünülmüştür. Bakteriyosin aktivitesinin pilazmid varlığıyla ilişkili olduğu söylenmiştir (Graham and Mckay 1985). *Pediococcus cerevisiae* FBB-63 türü 10.5 MDa'lık pilazmid içermektedir ve bu pilazmid diğer pediokok türlerine karşı gösterilen inhibitör etkiden sorumludur. *Pediococcus pentosaceus* L-7230 ve *Pediococcus pentosaceus* FBB-61 türlerinde bulunan 13.6 MDa'lık pilazmitin (pMD136) bakteriyosin üretiminden sorumlu olduğu ve immuniteyi sağladığı ileri sürülmüştür. Ve sonradan da bu bakteriyosine benzeyen maddeye pediocin A adı verilmiştir (Daeschel and Klaenhammer 1985). Pediocin A'nın üretimi doğal olarak laktik asit bakterilerini inhibe ettiği gibi saf kültür sebze fermentasyonuna da yardımcı olmaktadır.

2.3.5.2 Pediosin PA-1/AcH

Pediocin PA-1, *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 (Gonzalez and Kunka 1987) tarafından üretilen pilazmitlerce kodlanan bir bakteriyosindir. Bu bakteriyosin laktik asit bakterilerinin geniş bir spektrumuna ve *Listeria monocytogenes*'e karşı geniş bir antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Gonzalez and Kunka 1987, Pucci *et al.* 1988). Bu bakteriyosinin ilk olarak moleküler ağırlığı 16.500 Da olarak jel filtrasyon yöntemiyle belirlenmiş (Gonzalez and Kunka 1987) ancak bakteriyosinin saflaştırılması neticelendiğinde moleküler ağırlığının 4.629 Da olduğu ve peptitin 44 aminoasit bulundurduğu görülmüştür (Henderson *et al.* 1992, Nieto-Lozano *et al.* 1992). Bu bakteriyosin çeşitli laktik asit bakterilerine, *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* ve *Clostridium perfringers*'e karşı aktiftir. Pediocin PA-1 en çok pH 4-7

aralığında stabildir, proteaz, papain ve α- kimotripsin enzimlerine karşı duyarlılık göstermektedir. Fakat bununla birlikte yüksek sıcaklıkla ve lipaz enzimiyle muamele edildiğinde aktivitesinde bir değişim gözlenmemektedir. Ve pediocin PA-1 bakteriyosininin 6.2 MDa'lık pSRQ11 adı verilen pilazmid tarafından kodlandığı ifade edilmiştir (Gonzalez and Kunka 1987, Marugg *et al.* 1992). Pediocin PA-1 tamamen karakterize edilip saflaştırıldığı süreçte geni klonlanıp pilazmid haritası da çıkarılmıştır (Marugg *et al.* 1992). Bu bakteriyosinin 2 disülfit bağı içerdiği, net yükün pozitif ve izoelektrik noktasının 10 olduğu açıklanmıştır.

Fermente sosislerden izole edilen *Pediococcus acidilactici* H tarafından küçük, ısı stabil ve ekstraselular bir peptitin üretildiği rapor edilmiştir (Bhunia *et al.* 1987). Bu bakteriyosin daha sonra pediocin AcH olarak tasarlanmıştır. Pediocin AcH çeşitli proteolitik enzimlere karşı duyarlıdır, lipaza karşı aktivitesini kaybetmemekle birlikte aynı zamanda organik çözücüler ve ısıya karşı direçlidir. Geniş pH aralığında (2,5-9,0) aktivite göstermektedir (Bhunia *et al.* 1988). Sonradan farklı fermente sosislerden izole edilen *Pediococcus acidilactici* E,F ve M suşlarınında pediocin AcH üretimi yaptığı saptanmıştır (Ray *et al.* 1989, Kim *et al.* 1992). Pediocin AcH çoğu laktobasil, lökonostok ve çeşitli gıda bozucu, gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibitör etki göstermektedir. Bunların içerisinde *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* ve *Clostridium perfringers* bulunmaktadır (Ray *et al.* 1989). Pediocin AcH'ın moleküler ağırlığı SDS-PAGE kullanılarak 2.700 Da olarak belirlenmiştir (Bhunia *et al.* 1988, Ray *et al.*1989). H ve M suşunda pediocin üretimi ve immunite belirleyiciler 7.4MDa'lık pSMB74 olarak adlandırılan pilazmitle bağlantılıdır. Oysaki E ve F suşlarında bu iki özellik pilazmid bağlantılı değildir (Ray *et al.* 1989). Sonraki çalışmalarda pediocin AcH'ın 44 aminoasit içerdiği ve moleküler ağırlığının 4.600 Da olduğu gösterilmiştir (Motlagh *et al.* 1992a,b). Bununda aminoasit sekansı pediocin PA-1'le aynı olarak bulunmuştur. Böylelikle *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 tarafından üretilen pediocin PA-1'in *Pediococcus acidilactici* H tarafından üretilen pediocin AcH'la özdeş oldukları kanıtlanmıştır. DNA sekans analiziyle pediocin AcH öncülerinde 18 aminoasit N-terminal uçtaki lider sekansta bulunmakla birlikte toplamda 62 aminoasit vardır. Post-translasyonel işlemler sırasında öncü pediosinde bulunan lider peptit dizisi uzaklaştırılmaktadır. Çoğu çalışmalarda pediocin AcH'ın etkin olarak gıdalarda bozucu

ve patojen bakterilerin gelişimini kontrol altında tuttuğu ifade edilmiştir (Bhunia *et al.* 1988,1991, Kalchayanand *et al.* 1989, Kalchayanand 1990, Motlagh *et al.* 1991, Motlagh *et al.* 1992b, Ray 1992d).

Üç farklı *Pediococcus acidilactici* (PO2, B5627 ve PC) suşu ve bir tane *Pediococcus pentosaceus* (MC-03) türünde bakteriyosin üretildiği gösterilmiş, bu bakterilerin fermente sosislerden izole edildiği bakteriyosin aktivitelerinin 5.5MDa'lık bir pilazmitte muhafaza edildiği söylenmiştir. Pediocin JD bakteriyosini *Pediococcus sp.* JD-23' ten izole edilmiş ve bu bakteriyosinin *Listeria monocytogenes*'e karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Richter *et al.* 1989, Berry *et al.* 1990,1991). *Pediococcus acidilactici* SJ-1'den elde edilen pediocin SJ-1'in moleküler ağırlığı 4.000 Da olarak ifade edilmiştir (Schved *et al.* 1993). *Pediococcus acidilactici* ve *Pediococcus pentosaceus* filogenetik olarak yakın ilişkili bulunmaktadır (Collins *et al.* 1991). Böylelikle bu bakterilerin ürettikleri pediocinlerin antimikrobiyal aktivie spektrumları çok benzer olup bakteriyosin üretimini kodlayan genler birçok korunmuş bölümü paylaşmaktadır (de Vuyst and Vandamme 1994). Rapor edilen yeni bakteriyosin pediocin PD-1 *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 tarafından üretilmiş olup *Pediococcus acidilactici* ve *Pediococcus pentosaceus*'la filogenetik olarak uzak kalmaktadır. Pediocin PD-1'in tahmini büyüklüğü 3.500 Da olarak tespit edildiğinde bunun 4.000 Da'lık pediocin SJ-1'den küçük olduğu görülmektedir. Pediocin N5p bakteriyosini *Pediococcus pentosaceus* türü tarafından üretilip Arjantin şarabından izole edilmiştir. Önceden karakterize edilmiş şarapta bulunan *Leuconostoc oenos* suşunun *Pediococcus pentosaceus* ve *Labtobacillus hilgardii* türleri üzerinde bakterisidal etki gösterdiği belirlenmiştir (Strasser de Saad and Manca de Narda 1993; Strassar de Saad *et al.* 1993). Pediocin N5p bakteriyosini şaraptan izole edilmiş türce üretilip üzüm suyunu şaraba dönüştürme işlemi olan vinifikasyon sırasında oluşan fiziko-kimyasal; pH, sıcaklık, etil alkol ve SO_2 gibi faktörlere karşı dirençlidir (Strasser de Saad *et al.* 1993, Strassar de Saad *et al*. 1995). *Pediococcus acidilactici* F suşu tarafından pediocin F'in üretildiği rapor edilmiştir (Osmanağaoğlu *et al.* 1997). Pediocin F, lipaz ve organik çözücülerle muamele edildiğinde bakteriyosinde bir aktivite kaybı olmamamaktadır bu da bakteriyosinin molekül yapısında lipit parçacıkları olmadığını göstermektedir. Saflaştırılmış pediocin F, pH 3-9 arasında stabil olup yüksek pH'lara çıkıldıkça

aktivitenin kaybolması molekülün degrade olmasından kaynaklanmaktadır. Pediocin F, 3 tane önemli bant vermiştir, indikator bakteriyle antimikrobiyal aktivite kontrolü yapıldığında boyanan jeldeki moleküler ağırlığı 4.460 Da olan bantta antimikrobiyal aktivite gözlemlenirken, diğer görülen bantlarda aktivite gözlemlenmemiştir. Geniş inhibitor spektrumu olan *Pediococcus acidilactici*'nin yeni bakteriyosini olan pediocin L50 İspanyol kurutulmuş fermente sosislerinden izole edilmiştir (Cintas *et al.* 1995). Pediocin L50'nin çoğu Gram-pozitif genera üyelerini inhibe ettiği test edilmiş, fakat bazı laktobasil türlerinin bu bakteriyosine karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. Laktik asit bakterilerinin diğer bakteriyosinleri gibi pediocin L50'de Gram-negatif mikroorganizmalara karşı aktif değildir. *Pediococcus acidilactici* L50'nin geniş pH aralığında stabil olması hem asidik hem de asidik olmayan gıdalarda kullanımının kullanışlı olacağını göstermektedir. Pediocin L50'nin kütlesi kütle spektrometresi kullanılarak 5.250 Da olarak bulunmuştur. Ayrıca *Pediococcus pentasaceus* ST18 tarafından üretilen ve bozadan izole edilen pediocin ST18 anti-listerial özellik gösteren bir bakteriyosindir (Todorov and Dicks 2004).

2.4 Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması ve Önemli Özellikleri

Günümüzde bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında etkin çalışmaları nedeniyle Todd R. Klaenhammer tarafından yapılan gruplandırmayı esas olarak kabul etmişler ve 'Klaenhammer Sınıflandırılması' olarak isimlendirmişlerdir (Jack *et al.* 1995, Oscariz and Pisabarro 2001).

Klaenhammer'in oluşturduğu sınıflandırmaya göre bakteriyosinler moleküler ağırlıkları, ısı stabiliteleri, etki mekanizmaları, enzim hassasiyetleri ve modifiye aminoasit içerikleri esas alınarak 4 gruba ayrılmışlardır (Klaenhammer 1993). Gram-negatif bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler, bu sınıflandırmada yer almamaktadır. Zira Gram-negatif bakterilerin ürettiği bakteriyosinler ayrı bir sınıf olarak kabul edilmektedir (Klaenhammer 1993, Nes *et al.* 1996, Ennahar *et al.* 2000).

2.4.1 Grup I bakteriyosinler

Bu bakteriyosinler lantibiyotikler olarak adlandırılmakla birlikte bu grup içerisinde translasyon sonrasında modifiye edilen küçük peptitler bulunmaktadır. Lantionin ve β-metillantionin gibi modifiye olmuş tioether aminoasitleri ve dehidroalanin, dehidrobütirin gibi α ve β amino asitleri içermeleriyle karakterize edilmektedir. Grup I bakteriyosinlerin moleküler ağırlıkları 1.9 kDa ile 4.6 kDa arasında değişmektedir. (Oscariz and Pisabarro 2001, O'Sullivan *et al*. 2002a).

Bu gruba ait Ia alt grubu bakteriyosinler net pozitif yüke sahip ve hidrofobik polipeptit yapısındadır, hedef hücrelerin membranında elektrolitik dengeyi bozarak porlar oluşturmak suretiyle etkiyen kısa peptit zincirleridir. Grup I bakteriyosinlerin ikinci alt grubu olan Ib bakteriyosinler yüksüz veya negatif yüke sahip olup, globüler peptit yapısındadır. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Twomey *et al.* 2002). Bu gruba giren önemli bakteriyosinler; nisin, lacticin 481, mutacin A ve duramicin gibi bakteriyosinleri içermektedir (Siegers *et al.* 1996, Oscariz and Pisabarro 2001).

2.4.2 Grup II bakteriyosinler

Bu gruba giren bakteriyosinler 10 kDa'dan küçük, genelde ısıya karşı dayanıklı ve modifiye olmayan aminoasitleri içeren oldukça geniş bir gruptur (Parente and Ricciardi 1999). Ampilik helikse, değişik oranlarda hidrofobiteye ve β-tabakalı yapıya sahiplerdir. Antimikrobiyal aktiviteleri membran aktif olmalarından kaynaklanmaktadır. Çok sayıda bakteriyosin içeren bu grup 3 alt gruba ayrılmaktadır (de Martinis *et al.* 2002). IIa alt grubu bakteriyosinler *Listeria* türlerine karşı aktivite gösteren pediocin benzeri anti-listerial bakteriyosinlerdir. Bu alt gruba dahil bütün bakteriyosinlerin peptit zincirlerinin N-ucundaki YGNGV (Y-Tirozin, G-Glisin, N-Asparajin, V-Valin) dizisi ortak özellikleridir (Callewaert *et al.* 1999). Peptit ortasında yer alan disülfit köprüsü oluşturmuş iki sistein aminoasidi evrimsel süreçte korunmuştur. Pediocin PA-1, leucocin A, sakacin A, sakacin P ve enterocin A IIa grubu üyesi olan bakteriyosinlerdir (Nes *et al.* 1996, Callewaert *et al.* 1999, Ennahar *et al.* 2000, O'Sullivan *et al.* 2002a).

Bakteriyosinler hücre membranındaki elektrolitik dengeyi bozarak organik fosfatın dışarı akması sağlamak suretiyle inhibisyon etkisi göstermektedir. Son yapılan çalışmalarda IIa alt grubu bakteriyosinlerin anti-listerial ajanlar olarak, nisin bakteriyosininden daha etkili oldukları gösterilmektedir. Ancak bu grup bakteriyosinler nisin kadar geniş aktivite göstermemektedir (Ennahar *et al.* 1999, Nes *et al*. 2002).

Grup II bakteriyosinlerinin 2. alt grubu olan IIb'de bulunan bakteriyosinlerin en önemli özelliği aktiviteleri için iki peptit dizisinin aynı anda bulunması ve aktiflik göstermesidir. Bu iki peptit dizisi bireysel olarak oldukça zayıf bir inhibisyon etkisi gösterdikleri halde aynı ortamda olduklarında sinerjist bir etkileşim ile çok daha aktif moleküller haline gelmektedirler (Fimland *et al.* 1996). Bu alt gruptaki önemli nonlantibiyotik bakteriyosinlere; ABP-118 (Flynn *et al.* 2002), brochocin-C (McCormick *et al.* 1998), enterocin 1071 (Balla *et al.* 2000), enterocin L50 (Cintas *et al.* 1998), lactacin F (Allison *et al.* 1994), lactocin 705 (Cuozzo *et al.* 2000), lactococcin G (Nissen-Meyer *et al.* 1992), lactococcin MN (Van Belkum *et al.* 1989), mutacin IV (Qi *et al*. 2001), plantaricin EF (Hauge *et al.* 1999), plantaricin JK (Hauge *et al.* 1999), plantaricin S (Jimenez-Diaz *et al.* 1995) ve thermophilin 13 (Marciset *et al.* 1997) gibi iki peptitli bakteriyosinler örnek verilmektedir (Çizelge 2.3). Ek olarak laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve ayrıca lantibiyotik iki peptitli bakteriyosinlerde Çizelge 2.4'te gösterilmiştir. Bunlar iki polipeptitin aktif hale gelmesiyle, hücre membranında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Hechard and Sahl 2002).

Grup II bakteriyosinlerin 3. alt grubu olan IIc'de bulunan bakteriyosinler, Grup II'deki bakteriyosinlerin özelliklerini gösteren, Grup IIa ve IIb dışındaki diğer bakteriyosinlerdir. Bu bakteriyosinlere tiyol ile aktif peptitlerde denilmektedir. Çünkü aktif durumda olabilmeleri için yapılarındaki sistein kalıntılarının indirgenmiş durumda olması gerekmektedir.

Çizelge 2.3 İki peptitli Sınıf IIb nonlanthibiotik bakteriyosinler

Bakteriyosin	**Peptitler**	**Üretici türler**	**MW (Da)**	**Amino asit no**
ABP-118	Abp118α Abp118β	*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118	4097	45 46
Brochocin-C	Brc-A Brc-B	*Brochothrix campestris* ATCC 43754	5243 3945	59 43
Enterocin 1071	Ent 1071A Ent 1071B	*Enterococcus faecalis* BFE 1071	4285 3899	39 34
Enterocin L50	Ent L50A Ent L50B	*Enterococcus faecium* L50		44 43
Lactacin F	Laf X Laf A	*Lactobacillus johnsonii* VPI11088		48 57
Lactocin 705	705- α 705- β	*Lactobacillus casei* CRL 505		33 33
Lactococcin G	Peptit α Peptit β	*Lactococcus lactis* LMG 2081	4346 4110	39 35
Lactococcin MN	Lcn M Lcn N	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4		48 47
Mutacin IV	Nlm A Nlm B	*Streptococcus mutans* UA140	4169 4826	44 49
Plantaricin EF	Pln E Pln F	*Lactobacillus plantarum* C-11		33 34
Plantaricin JK	Pln J Pln K	*Lactobacillus plantarum* C-11		25 32
Plantaricin S	Plc A PlcB	*Lactobacillus plantarum* LPCO10		27 26
Thermophilin 13	Thm A Thm B	*Streptococcus thermophilus* SFi13	5776 3910	62 43

Çizelge 2.4 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen iki peptitli bakteriyosinler

Bakteriyosin	**Peptitler**	**Üretici türler**	**MW (Da)**	**Amino asit no**
Acidocin J1132	J 1132- α J 1132- β	*Lactobacillus acidophilus* JCM 1132	6220 6280	-
Lactobin A	-	*Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139	4500 6000	-
Plantaricin NC8	PLNC- α PLNC- β	Lactobacillus plantarum NC8	3587 4000	28 34
Pediocin ST18	-	*Pediococcus pentosaceus* ST18	-	-
Durancin L28-1A	-	*Enterococcus durans* L28-1	2500 3400	-
Lactococcin Q	Lac Q- α Lac Q- β	*Lactococcus lactis* Q4	4260 4018	-
Enterocin A5-11	A5-11A A5-11B	*Enterococcus durans* A5-11	5206 5218	-
	Nonlantibiyotik iki peptitli bakteriyosinler			
Cytolysin	$CylL_L$ $CylL_S$	*Enterococcus faecalis*	3438 2032	38 21
Lacticin 3147	A1 A2	*Lactococcus lactis* DPC3147	3306 2847	30 29
Plantaricin W	Plw- α Plw- β	*Lactobacillus plantarum* LMG 2379	3280 3207	29 32
Staphylococcin C55	C55 α C55 β	*Staphylococcus aureus* C55	3339 2993	30 28

2.4.3 Grup III bakteriyosinler

Grup III bakteriyosinler yüksek moleküler ağırlığa sahip ve ısıya karşı duyarlı proteinlerden oluşmaktadır. Bu gruptaki bakteriyosinler 30 kDa'dan daha büyük kompleks protein yapısındadır. Bu gruba giren bakteriyosinlerin büyük kısmı *Lactobacillus* cinsi tarafından sentezlenir, bunun için bu gruba '*Lactobacillus* bakteriyosinleri' de denilmektedir (Klaenhammer 1993). Helveticin J, lacticin A, lacticin B, helveticin V-1829 ve enterocin A bu grubun üyeleridir. Gruptaki çoğu bakteriyosinin ısıya duyarlı proteinler olmasına rağmen helveticin J gibi ısı stabil üyelerde bulunmaktadır (Klaenhammer 1993, Ennahar *et al.* 2000, O'Sullivan *et al.* 2002a, Trotter *et al.* 2004).

2.4.4 Grup IV bakteriyosinler

Bakteriyosinler içerisinde yapıları en kompleks olanlardır, en önemli özellikleri aktiviteleri için polipeptit yapısına ek olarak lipoprotein veya glikoprotein gibi ek bazı moleküler grupların gerekli olmasıdır. Plantaricin S, lactocin 27, leuconocin S bu gruba dahil bazı bakteriyosinlerdir (Klaenhammer 1993, Nes *et al.* 1996, Ennahar *et al* 2000, Nes and Holo 2000).

2.4.5 Bakteriyosinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Çoğu bakteriyosin bir veya birden fazla proteolitik enzime karşı duyarlıdır (Klaenhammer 1993, Schillinger 1990). LAB bakteriyosinleri belirli Gram-pozitif bakterilere karşı inhibisyon etkisine sahip olmaktadır. Normal şartlarda Gram-negatif bakteriler LAB'nin ürettiği bakteriyosinlere karşı dayanıklıdır, fakat EDTA gibi şelatlayıcı maddelere, ısı ve donma işlemlerine maruz bırakıldıklarında nisine karşı duyarlı hale geldikleri belirlenmiştir (Delves-Broughton *et al.* 1996). LAB bakteriyosinleri biyokimyasal ve genetik olarak membran geçirgenlik özelliğine sahip olup ve sitoplazmik membran üzerinde etkisini göstermektedir. Bunlar, aminoasit sekansı bilinen çoğu α-heliks veya β-pilili ikincil yapıya sahip amfifilik katyonik peptitler olup, bu ikincil yapıların membran aktif peptitlerin biyolojik aktivitelerinde

önemli bir rolü olduğu saptanmıştır. Nisin ve pediocinin hayvanlar üzerinde toksik olmadığı ortaya konulmuştur (Ray 1992b). LAB bakteriyosinleri genellikle 100ºC'de 20 dakika veya daha fazla süreyi tolere edebilmekte aktivitelerinde önemli bir değişim olmaksızın otoklav koşullarına dayanabilmektedirler. Nisin ve pediocin AcH asidik koşullarda yüksek sıcaklıkta ısıl işleme daha dayanıklıdır. Yüksek pH değerleri aminoasitlerin sekansında veya yapılarında geri dönüşümsüz değişikliklere neden olmaktadır.

2.4.6 Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları

Klaenhammer 1988'de laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinleri inhibitör spektrumlarına göre 2'ye ayırmıştır (Klaenhammer 1988). Birinci grup; dar bir spektruma sahip olan veya kendisiyle aynı türe ait oldukça yakın bakterilere karşı aktif özellik sergileyen diplokok, lactocin 27, lacticin B ve helveticin J gibi bakteriyosinleri içermektedir. İkinci grup ise; oldukça geniş bir etkinlik spektrumuna sahip olan ve yanlızca Gram-pozitif bakterilere karşı aktif olan nisin, pediosin ve leucocin S gibi bakteriyosinleri içermektedir. Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları için ortaya konan ve yaygın olarak kabul gören yaklaşıma göre bakteriyosin iki aşamada harekete geçer ve bu aşamalar hücre ölümüyle sonuçlanan hücre yüzeyinde bakteriyosinlerin spesifik veya spesifik olmayan reseptörlerce adsorpsiyonunu kapsamaktadır (Tagg *et al*. 1976).

Bakteriyosinlerin büyük bir kısmı sitoplazma dışında ve çoğunlukla hücre duvarını geçmek suretiyle hücre membranı üzerinde etki göstererek inhibisyona yol açmaktadırlar. Spesifik bağlanma noktası gerektirmeksizin, sadece elektrolitik olarak yük dengesine bağlı olarak hücre membranının yapısını tahrip etmek suretiyle gerçekleşen inhibisyon şeklidir. Özellikle geniş etki spektrumuna sahip bakteriyosinler bu yolla etki göstermektedir. Spesifik bağlanma reseptörü gerektirmeyen bu tarz membran aktif bakteriyosinlerin en önemli örneği nisindir. Laktik asit bakterilerinin bazıları tarafından üretilen bakteriyosinler pozitif yüklü moleküller olup, sitoplazmik zar üzerinde etkili olmalarında sahip oldukları hidrofobik kısımlar önemli rol oynamaktadır. Duyarlı hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının etkisiyle ortaya çıkan elektrostatik etkileşim sonucu bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır

(Nes and Holo 2000, Twomey *et al.* 2002). Böyelikle hidrofobik kısım zar yapısının içine girerek gözenek oluşumuna yol açmaktadır. Nisin daha çok "barrel-stave" ve "wedge" denilen modellerde gözenek oluşumu sağlamaktadır. "Barrel-stave" modelde her bir nisin molekülü dikey bir şekilde zara bağlanarak, zarda iyon kanalı oluşturmaktadır. "Wedge" modelde ise; belirli sayıda nisin molekülü fosfolipitlerin baş gruplarıyla interaksiyona girdikten sonra lipit-protein gözeneği oluşmaktadır.

Üç boyutlu yapı özellikle hücre membranında spesifik bölgelere bağlanarak etkili olan bakteriyosinler için son derece önemli olmaktadır. Etki modelinde direkt bir etkiye sahip olmamasına rağmen üç boyutlu katlanmada önemli bir faktör olmasından dolayı ortam pH'sı bazı bakteriyosinlerin etki mekanizmasında önemli rol oynamaktadır (Jack *et al.* 1995). Bu durum, bakteriyosinlerin farklı asitlik derecelerinde inhibitör etkilerinin azalması veya artmasının temelini oluşturmaktadır. Diğer bir etki mekanizması ise anti-*listerial* özellik gösteren bakteriyosinlerde görülen spesifik bağlanma bölgesi gerektiren inhibisyon etkisidir. Bu gruptaki bakteriyosinlerin sahip olduğu YGNGV aminoasit dizisi sadece bu diziyi tanıyan spesifik bir membran reseptörüne bağlanır ve bu bağlanma diğer oluşumdakiyle benzer olarak membran üzerinde iyon kanalları oluşturarak potasyum ve magnezyum gibi önemli iyonların dışarı akmasına yol açmaktadır (Jack *et al.* 1995).

Çoğu araştırmacı Gram-pozitif bakterilerden elde edilen bakteriyosinlerin neden sadece Gram-pozitif bakterilere etki edip Gram-negatif bakterilere etki etmediği konusu üzerine yoğunlaşmıştır. Bhunia ve arkadaşları 1988'de ilk olarak Gram-negatif bakterilerin pediocin AcH'ı absorbe etmediğini göstermişlerdir (Bhunia *et al.* 1988). Diğer çalışmalarında Gram-pozitif bakterilerde bulunan lipoteikoik asit molekülünün pediocin AcH için reseptör olduğunu gösterilmiştir (Bhunia *et al.* 1991). Böylelikle Gram-negatif bakterilerin pediocin AcH'ı adsorbe edememesinin nedeni olarak hücre duvarında lipoteikkoik asitin olmayışı gösterilmiştir. Gram-negatif bakterilerde bulunan lipopolisakkarit molekülünün çoğu moleküllerin girişine karşı bariyer rolü oynadığı onaylanmıştır. Öldürücü olmadan zedelenen Gram-negatif bakteri hücrelerinde bariyer olma özelliği kaybolmakta ve pediocin AcH molekülü bozulmuş hücre duvarını

geçmektedir. Sitoplazma membranıyla bağlantı kurduktan sonra bunu destabilize edip hücrenin ölümüne neden olmaktadır.

Gram-pozitif bakterilerde bakterisidal etki muhtemelen iki aşamada oluşturulmaktadır. İlk olarak; bazı bakteriyosin molekülleri duyarlı Gram-pozitif hücrelerin yüzeylerinde lokalize olmuş reseptörler tarfından adsorbe edilmektedir. Böylelikle hücre duvarında oluşan üç boyutlu konformasyonel değişimle bakteriyosin molekülleri duvardan geçebilir hale gelmektedir. Bakteriyosin molekülleri hücre duvarından geçip sitoplazmik membranla temas ettikten sonra sitoplazmik membranın fonksiyonunu bozmaktadır. Bu da membran geçirgenliğinin değişmesi, membran transport mekanizmasının bozulması ve proton itici gücünün dağılmasını sağlamaktadır. Bütün bunlarda zaten enerji üretiminin engellemesine ve protein, nükleik asit biyosentezinin durmasına yol açmaktadır. Dirençli Gram-pozitif hücrelerde bu değişim ya oluşmamakta ya da immunite proteinleri pediocin AcH'ın sitoplazmik membranla olan etkileşimine karışmaktadırlar.

Bakteriyosinlerde görülen diğer bir etki mekanizması da direkt olarak proton itici kuvvet üzerine etkili olan inhibisyondur. Çalışmalar bu inhibisyon şeklinin hücre membranındaki elektrolitik dengenin bozulmasıyla oluşan inhibisyon şeklinden farklı olmadığını belirtmesine karşın bazı bilim adamları bu inhibisyon mekanizmasının sadece PMF bölgelerinde etkili olduğunu ve farklı bir mekanizma gerektirdiğini desteklemektedir (Jack *et al.* 1995, Cuesta *et al.* 2000). Özellikle yüksek molekül ağırlığına sahip bazı bakteriyosinlerde membran üzerinde iyon kanalları oluşturulması suretiyle inhibitör etki gerçekleştirilmektedir. Henüz kanıtlanmamış bir etki mekanizması ise bakteriyosinin hücre içerisine girerek RNA sentezini durdurmasıdır. (Papastathopolou *et al.* 1997). *Bacterides fragilis* tarafından üretilen bir bakteriyosinin hücrede DNA ve ATP sentezini etkilemediği ancak protein sentezini geciktirdiği açıklanmaktadır.

Yapılan bir çalışmada Pediocin DT10'un *Leuconostoc mesenteroides* OZ-N3 hücreleri üzerine etki mekanizması incelenmiş ve hücrelerin pediocin DT10 ile muamelesinin ardından ilk etkinin sitoplazmik membranda olduğu elektron mikroskobu altında plazma

membranındaki porların varlığıyla belirlenmiştir. Daha sonra önemli hücre bileşenlerinin dışarı sızması sonucu hücre zarı geçirgenliği ve membran potansiyeli bozulmuş ve son olarakta makromoleküllerin sentezinin durmasıyla birlikte hücre ölümü gerçekleşmiştir (Osmanağaoğlu *et al*. 2005).

2.5 Bakteriyosin Üreten Türlerin Belirlenmesi ve Bakteriyosin Üretim Koşulları

Bakteriyosin üreten türleri belirlemek için literatürde birçok yöntem mevcuttur. Bu yöntemler doğrudan ve dolaylı eleme yöntemleri olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Bunların birçoğu katı ve yarı katı kültür ortamı aracılığıyla duyarlı bir indikator organizmanın büyümesini engellemek için bakteriyosinlerin difüzyonuna dayanmaktadır. Geciktirilmiş antagonizm veya dolaylı yöntemler Gratia (1946) tarafından tanımlanan 'spot on lawn (nokta ekim) analizini ve Kekessy& Piguet. (1970)'in flip-streak metodunu içermektedir. "Nokta ekim" yönteminde, varsayılan bakteriyosin üreticisi agar ortamına yerleştirilmekte ve bireysel koloniler geliştirmek için kısa sürede inkübe edilmektedir, koloniler duyarlı bir indikatör organizmayla örtülüp inhibisyon bölgeleri oluşturmak için tekrar inkübasyona bırakılmaktadır. "Flip-streak" yönteminde, varsayılan bakteriyosin üreten tür ortama çizgi ekim yoluyla ekilmekte, inkübasyonun ardından bakteriyosin-duyarlı bir organizma agarın ters tarafında ilkine dikey olarak ekilmektedir. Bu iki metot için inhibisyon zonlarının net görülmesi deneme olarak bakteriyosin üretiminin sağlandığını göstermektedir. Direkt ayırma yönteminde; petride bulunan agar üzerine indikator bakteri hücreleri önceden inokule edilmiştir. Farz edilen bakteriyosin üreten kültürün süpernatantı keşilmiş agara yerleştirilmiştir. İnkubasyon izlendikten sonra antimikrobiyal aktivitenin olup olmadığı büyüme-gelişim inhibisyon zonunun varlığı veya yokluğuyla belirlenmektedir. Fakat bakteriyosinler duyarlı indikator organizmalar üzerinde inhibisyona yol açan tek antimikrobiyal madde değildir. İnhibitör aktivite, laktik asit, hidrojen peroksit vb. başta olmak üzere organik asitlerden de kaynaklanıyor olabilmektedir. Ayrıca, bakteriyofajlar da inhibisyon gelişiminden sorumlu olabilmektedir. Üretici türün pH'si nötrleştirilmiş, katalaz uygulanmış kültür süpernatantlarının kullanılması indikator türün gelişiminde laktik asit ve hidrojen peroksitten kaynaklanabilecek inhibitör etkileri ortadan kaldırmaktadır.

Laktik asit bakterileri arasındaki bakteriyosin üretim sıklığı kayda değer şekilde değişiklik göstermektedir. Örneğin, Barefoot ve Klaenhammer (1983), test edilen *Lactobacillus acidophilus* türlerinin % 63'ünün diğer laktik türleri inhibite ettiğini gözlemlemiştir. Harding ve Shaw (1990) laktik asit bakterisi türlerinin % 2-5'inin inhibitör olduğunu ve bunlardan yalnızca bir türün özellikle yakından ilişkili türlere inhibitör etki gösterdiğini tespit etmiştir. Bu tutarsızlıklar bakteriyosin üreten bakterilerin saptanmasının tamamen kullanılan indikator organizmalara bağlı olduğu varsayılarak açıklanabilir mi? Aslında, bakteriyosin üretimi karışık bir bakteriyel populasyondaki rekabetçilik için bir savunma mekanizması olabileceği için bütün bakterilerin bakteriyosin ürettiği ileri sürülebilmektedir. Bazı laktik türler geniş bir inhibitör spektruma sahipken diğerleri yalnızca birkaç türe karşı aktiftir.

Genel olarak pediocin aktivitesi üretici türlerin besince zengin besiyerinde gelişmesiyle analiz edilmektedir. Yapılan çalışmalarda MRS sıvı besiyerine % 2' lik maya ekstraktı eklendiğinde pediocin PA-1 üretiminin geliştiği rapor edilmektedir (Pucci *et al.* 1988). Pediocin PA-1 için aynı prosedur kullanılmış, hücreleri geliştirmek için MRS sıvı besiyerine maya ekstraktı ilave edilmiş, pH 6'ya ayarlanmış filtre edilmiş süpernatantın aktivitesi *Listeria ivarovii* türüne karşı analiz edildiğinde aktivite ünitesi 51200 AU/mL çıkmıştır (Nielsen *et al.* 1990). *Pediococcus acidilactici*'den pediocin üreten türlerin gelişimi için APT sıvı besiyeri kullanılmış fakat aktivite analiz edilememiştir (Hoover *et al.* 1989). Besiyerinin kompozisyonu, besiyerinin pH'ı, zaman ve inkübasyon sıcaklığının pediocin AcH'ın üretimine etkisi olduğu açıklanmıştır (Biswas *et al*. 1991). Araştırmalar, *Pediococcus acidilactici* H tarafından üretilen pediocin AcH'ın üretiminin besiyerinde tampon tuz olmadığı zaman ilk pH 6.5'te ve son pH 3.6-3.7 olduğunda 18-22 saat arasında 30-37ºC sıcaklıklarda yüksek olduğunu göstermektedir. İlk çalışmalar baz alınarak bileşimi gıda kökenli nisbeten basit bir besiyeri formüle edilmiş ve bu da TGE sıvı besiyeri olarak tasarlanmıştır. Bu besiyerindeki tripton, glukoz, maya ekstraktı ve Tween-80'in miktarı biraz arttırıldığında pediocin AcH'ın da üretimi artmaktadır. Sonraki çalışmalarda sıvı besiyerindeki pantoteik asitin pediocin AcH üretimini biraz arttırdığı gösterilmiştir. Besiyerinin başlangıç ve son pH'sının pediocin AcH üretim aşamalarında büyük etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Maksimum pediocin AcH üretimi ilk pH'ın 6.5 son pH'ın 3.6-3.7 olduğu zamanlarda gözlemlenmiştir. Son pH 5 veya 5'in

üzerindeyse kültürde çok az miktarda pediocin AcH belirlenebilmektedir. Akabininde yapılan çalışmalarda; düşük pH'ın pediocin AcH üretimiyle ilişkisi olmadığı görülmüştür. Düşük pH'ın inaktif pre-pediosinin aktif pediocin AcH'a dönüştürülmesinde hücre içi enzimatik post-translasyonel değişim için gerekli olduğu ve aktif moleküllerin hücreden çevreye taşınmasında gerekli olduğu söylenmiştir.

2.6 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Saflaştırılması

Bakteriyosinlerin saflaştırılmasında kullanılan metotlar genellikle proteinlerin saflaştırılmasında da sıklıkla kullanılan metotlardır. Çöktürme ve boyutlarına göre ayırma bakteriyosin saflaştırılmasında sıkça kullanılmaktadır. Özellikle laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan bakteriyosinlerin saflaştırılmasının zor bir iş olduğu bilinmektedir. Saflaştırma işlemi sırasında karşılaşılan sorunlar bu tür moleküllerin diğer moleküler maddelerle birleşmeye eğilimli olması ve hidrofobisite gibi nedenlere bağlanmaktadır. Ayrıca, son derece heterojen madde grupları oluşturduklarından dolayı her bakteriyosin için özel saflaştırma protokolleri deneysel olarak tasarlanmalıdır. Bu nedenle yalnızca birkaç bakteriyosin homojenlik derecesinde saflaştırılmıştır. Hücre bağımsız kültürlerden bakteriyosin elde etmede amonyum sülfat çöktürmesi metotuna itimat edilmektedir. Bu metot birçok laktik asit bakterisinin bakteriyosinini saflaştırmada kullanılmıştır. Bununla birlikte bu yöntemde üründen kazanç eldesi fazla olmayacaktır (Bhunia *et al.* 1988). Çünkü besiyerinde yer alan birçok protein de bakteriyosinlerle birlikte çökecek ve böylelikle spesifiklik azalacaktır. Çöktürülen proteinlerin daha saf hallerinin eldesi, aminoasit kompozisyonu ve sekansının belirlenmesi için araştırmacılar çeşitli kolon kromotografi tekniklerine başvurmaktadır.

Nes'in araştırma grubu (Nes 1992) laktik asit bakterilerinin düşük moleküler kütleli bakteriyosinlerinin saflaştırılması için yaklaşık olarak genel bir şema geliştirmiştir. Bu şema dört adımdan oluşmaktadır: (i) amonyum sülfat çöktürmesi, (ii) katyon değişim kromatografisi, (iii) hidrofobik etkileşim kromatografisi, (iv) ters-faz yüksek-performans sıvı kromatografisi. Amonyum sülfatla çöktürüp santrüfüj edilen proteinde genellikle lipite benzer yüzen madde gözlemlenmektedir. Bu hidrofobik lipit-protein maddesi bakteriyosin aktivitesinin çoğunu kapsamaktadır (Muriana and Klaenhammer

1991a, Mortvedt *et al.* 1991). Katyon değişimi ve hidrofobik etkileşim kromatografisinin uygulanması pozitif yüklü aminoasit artıklarından ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen birçok bakteriyosinin güçlü hidrofobik doğasından dolayı uygundur. Bazı bakteriyosinler bu yöntem kullanılarak saflaştırılmıştır. Lactoccocin A, lactocin S, carnocin UI49, pediocin PA-1, curvacin A, sakacin P, lactoccocin G, sakacin A ve nisin. Düşük pH çöktürmesi, jel filtrasyonu ve hidrofobik etkileşim kullanılarakta bakteriyosinlerde saflaştırmalar yapılmıştır (Hastings *et al.* 1991b).

Laktokokların bir türü tarafından üretilen lactacin 481, kültür sıvısından amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon, preparatif ve analitik kromografi yöntemiyle saflaştırılmıştır. SDS-PAGE'le laktasin 481'in moleküler ağırlığı 1.700 Da olarak belirlenmiştir (Piard *et al.* 1992). Bazı araştırmacılar tarafından pediokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerinde saflaştırılması yapılmıştır. *Pediococcus acidilactici* türlerine ait suşlar sıvı besiyerinde 18 saat geliştirildikten sonra hücreler santrüfujleme yoluyla uzaklaştırılmış, süpernatant membranda filtre edilmiş ve sonra da % 60'lık amonyum sülfatla çöktürmeye tabi tutulmuştur. 18 saatin ardından çökelti diyaliz edildikten sonra, iyon değişimi prosedurüne maruz bırakılmıştır. İlk olarak; DEAE Sephalex A-25 ve daha sonra da CM-Sephalex C-25 kromotografiyle saflaştırılma sağlanmıştır. Yüksek aktiviteli bakteriyosin elde edilip pediocin PA-1 olarak adlandırılmıştır (Gonzalez *et al.* 1987). Pediocin PA-1'in moleküler ağırlığı 16.000 Da olarak jel filtrasyonunda belirlenmiştir. *Pediococcus acidilactici* H tarafından bakteriyosin üretilmesi için ilk olarak hücreler kazeinli sıvı besiyerinde 18 saat geliştirilmişlerdir. Hücreler santrifüjleme ve filtrasyonla uzaklaştırılıp, % 70'lik amonyum sülfatla çöktürme sağlanmıştır. Distile suya karşı diyaliz yapıldıktan sonra ham pediocin AcH iyon değişim kromotografisi ve jel filtrasyon kromotografisiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan pediocin AcH'ın moleküler ağırlığının belirlenmesi için SDS-PAGE kullanılmış ve moleküler ağırlık tahminen 2.700 Da civarında tespit edilmiştir (Bhunia *et al.* 1987,1988). Venema'nın araştırma grubu (Venema *et al.* 1993) laktik asit bakterilerinin bakteriyosinlerini saflaştırmak için aşağı yukarı genel bir alternatif yöntem geliştirmiştir: (i) etanol (soğuk) çöktürmesi, (ii) hazırlayıcı pI-elektroforez. Bu saflaştırma prosedurü saf lactoccocin A, lactoccocin B ve pediocin PA-1 elde etmek için kullanılmaktadır. Sakacin A, *Lactobacillus sake* LB 706 tarafından üretilmekte olup

bunun saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromografisi, hidrofobik interaksiyonlar ve ters faz kromotografi kullanılmıştır. Saflaştırmanın akabininde moleküler ağırlığının 4308.7 Da olduğu hesaplanmıştır (Holck *et al.* 1992). *Leuconostoc gelidum* tarafından üretilen leucocin A-UAL 187'in moleküler ağırlığı 3930.3 Da olarak kütle spektrofotometresince belirlenmiştir (Hastings *et al.* 1991b). Bu bakteriyosinin saflaştırılmasında; amonyum sülfat çöktürmesi veya asit çöktürmesini izleyen hidrofobik interaksiyonlar, jel filtrasyon ve ters faz performans kromotografisi kullanılmıştır. *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilen mesentericin Y 105 afinite kromografi ve C4 kolondaki ters faz HPLC'yle saflaştırılmıştır. Mesenterocin Y 105'in aminoasit sekansı ve moleküler ağırlığı hesaplandığında leucocin A-UAL 187'ye benzediği gözlemlenmiştir (Hechard *et al.* 1992).

Yang ve arkadaşları (1992) laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genellikle üretici türlerin hücrelerine adsorbe edilme özelliği üzerine dayalı bir izolasyon (ayırma) prosedurü geliştirmiştir. Fermentasyondan sonra üretici bir türün sıvı kültürünün pH'ının hücre yüzeyindeki maksimum adsorpsiyon değerine ayarlanması (genellikle pH 6.0) hücrelere absorbe edilmiş bakteriyosin moleküllerinin sıvı kültürden santrifüjleme yoluyla kolayca ayrılmasını sağlamaktadır. Ardından peptitler düşük pH'ta (pH 1.5-2.0) seçici bir şekilde hücreden ayrılmaktadır. Bu yöntemin yüksek güçte ve daha konsantre bir şekilde peptitler ürettiği görülmektedir.

2.7 Pediosin Peptitlerinin Karakteristikleri ve Biyosentezi

Pediocin PA-1'in moleküler ağırlığı 16.500 Da olduğu ileri sürülmüştür (Gonzalez and Kunka 1987). Bununla birlikte ilerleyen çalışmalarda pediocin PA-1'in 44 amino asiti olduğu ve moleküler ağırlığının 4629 Da olduğu açıklanmıştır. Pediocin PA-1 post-translasyonel işlenme sonucu 62 amino asitinin 18'ini kaybetmiştir. Bu 44 amino asitin bulunduğu olgun bakteriyosin, 2 tane disülfit bağına sahiptir ve bu bağlar kangal konformasyonuyla -20ºC ila 100ºC arasında bakteriyosinin stabil olmasını sağlamaktadır (Van Belkum *et al.* 1991, Vanderburgh 1991). Son yıllarda yapılan araştırmalarla pediocin PA-1'in amino asit sekansı belirlenmiştir (Henderson *et al.* 1992, Lozano *et al*. 1992) (Çizelge 2.5). Pediocin AcH'ında yapılan çalışmalar sonucu

moleküler ağırlığı 4628 Da olarak tespit edilmiş ve izoelektrik noktası 9.6 olarak gösterilmiştir (Motlagh *et al.* 1992a, Ray 1992b). Pediocin AcH ve pediocin PA-1' in aminoasit sekansları karşılaştırılığında iki pediocinin de aynı olduğu açığa çıkmıştır. Aktif molekül 4 tane sistein ünitesi içermektedir. Bunlardan 9. ve 14. sistein arasında bir disülfit bağı, 24. ve 44. sistein arasında ise 2. disülfit bağı bulunmaktadır. Sonraki çalışmalarda pediocin indirgeyici ajanlardan dithiothreitolle muamele edildiğinde bu disülfit bağları kırılmakta ve pediosinin bakterisidal özelliğinin kaybolduğu gösterilmektedir. Bu da disülfit bağlarının pediocin PA-1/AcH'in antimikrobiyal aktivitesi için çok önemli olduğunu ileri sürmektedir. β- merkaptoetanolle muamele edilen pediosinin bakterisidal aktivitesi azalmaktadır. Bunu izleyen β-merkaptoetanolün uzaklaştırılması durumunda disülfit bağlarındaki düzelmeden dolayı aktivite önceki haline geri dönmektedir. Yapılan çalışmalarda 24. ve 44. aminoasitler arasındaki disülfit bağının pediocin PA-1/AcH'ın bakterisidal etkisi açısından 9. ve 14. aminoasitler arasında olan disülfit bağından daha önemli olduğu gösterilmiştir (Miller 1998a,b).

Bakteriyosinler, bakterilerin ribozomlarında sentezlenen proteinlerdir. Aktif pediocin AcH'tan elde edilen aminoasit sekansıyla pap-genlerdeki (pediocin AcH üretmeyen) Open Reading Frame (ORF) bölgesindeki 186 nükleotitten elde edilen aminoasit sekansı karşılaştırıldığında bunların karboksil sonlarında bulunan 44 amino asit özdeşlik göstermektedir. Bununla birlikte nükleotit sekansından 62 aminoasit elde edilmiş, N-terminal sonda bulunan extra 18 aminoasit sekansı aktif pediocin AcH'ın amino asit analizinden elde edilen sekansta belirlenememiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarda pediocin PA-1'in translasyon aşamasında 62 aminoasitlik pre-pediosini ürettiği söylenmekte, daha sonra N-terminal sonda bulunan 18 amino asitlik segmentin uzaklaştırılmasıyla 44 amino asitlik aktif pediocin PA-1 molekülü oluşturulmaktadır (Vanderbergh 1991). Pediocin AcH molekülü inaktif pre-pediocin olarak ifade edilmekte ve 62 aminoasitlik pre-molekül post-translasyonel işleme uğratılıp içerdiği N-terminaldeki 18 amino asitlik lider segment uzaklaştırılmaktadır. Bu aktivasyon yani pre-pediocinin aktif pediocine dönüşümü pH'ın 5'ten küçük olduğu yani düşük pH'ın bulunduğu ortamlarda gerçekleşmektedir (Johnson *et al.* 1992). Pre-peptitin içerdiği lider peptitin proteolitik enzimlerle

uzaklaştırılması için spesifik asit proteazlara ve yüksek miktarda katalitik aktiviteye ihtiyaç duyulacaktır bu da ancak düşük pH'ta gerçekleşecektir (Ray 1992d,f). 44 aminoasitlik segmente bulunan serin ve threonin moleküllerinin dehidratasyona uğrayıp akabininde sisteinler arasındaki thioether bağlantı şeklinin thioether halka şekline dönüştüğü sanılmaktadır (Motlagh *et al.* 1992a). Nisinde bulunan 171 baz çiftlik ORF bölgesi 57 aminoasitlik pre-nisini kodlamaktadır. C-terminalde bulunan 34 aminoasit nisinin önceden belirlenmiş amino asit sekansına tekabül etmektedir. N-terminalde bulunan 23 aminoasitlik lider bölge post-translasyonel işlem boyunca uzaklaştırılmaktadır. Nisin öncüsünün aktif nisine dönüşebilmesi için 3 aşamanın gerekli olduğu söylenmiştir (Kaletta and Entian 1989). Bunlar lider bölümün ayrılması, serin–threoinin gibi aminoasitlerin dehidrate olması ve dehidroamino asitlerle sistein arasında olan sülfit halka formasyonudur. Aktif hale gelmiş nisin hücre membranı boyunca salgılanmaktadır.

Çizelge 2.5 *Lactococcus lactis* türünden elde edilen Nisin A lanthionin (Ala-S-Ala) bakteriyosinin, *Pediococcus acidilactici* türünden elde edilen pediocin PA-1/AcH, *Leuconostoc gelidum* türünden elde edilen leucocin A ve *Lactobacillus sake* türünden elde edilen sakacin A nonlanthionin bakteriyosinlerin amino asit sekansları

Nisin A (34 amino asit)

Ile-Dhb-Ala-Ile-Dha-Ala-Abu-Pro-Gly-Ala-Lys-Abu-Gly-Ala-Leu-Met-Gly-Ala-Asn-Met-Lys-Abu-Ala-Abu-Ala-His-Ala-Ser-Ile-His-Val-Dha-Lys

Pediocin AcH/PA-1 (44 amino asit)

Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Thr-Cys-Gly-Lys-His-Ser-Cys-Ser-Val-Asp-Trp-Gly-Lys-Ala-Thr-Thr-Cys-Ile-Ile-Asn-Asn-Gly-Ala-Met-Ala-Trp-Ala-Thr-Gly-Gly-His-Gln-Gly-Asn-His-Lys-Cys

Leucocin A (37 amino asit)

Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-His-Cys-Thr-Lys-Ser-Gly-Cys-Ser-Val-Asn-Trp-Gly-Glu-Ala-Phe-Ser-Ala-Gly-Val-His-Arg-Leu-Ala-Asn-Gly-Gly-Asn-Gly-Phe-Trp

Sakacin A (41 Amino asit)

Ala-Arg-Ser-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Tyr-Cys-Asn-Asn-Lys-Lys-Cys-Trp-Val-Asn-Arg-Gly-Glu-Ala-Thr-Gln-Ser-Ile-Ile-Gly-Gly-Met-Ile-Ser-Gly-Trp-Ala-Ser-Gly-Leu-Ala-Gly-Met

Kaynak: Ray, B. 1996.

2.8 Pediosine Karşı İmmunite ve Bakteriyosinlerin Moleküler Genetiği

Pediococcus acidilactici türlerinin ürettiği pediocinin immunite proteinini kodlayan genlerin nerede bulundukları ile ilgili farklı varsayımlar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda; pediocin AcH'ın yapısal genlerinin ve pediosine karşı olan immunite genlerinin aynı pilazmitin üzerinde bulunduğu belirlenmiştir. *Pediococcus acidilactici* M için de aynı sonuçlar rapor edilmiştir (Kim *et al.* 1992). Bununla birlikte *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 tarafından üretilen pediocin PA-1 için farklı sonuçlar bulunmuştur (Gonzalez and Kunka 1987). *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0'ın ıslah edilmiş türü pediocin üretmeyi başaramazken, immunite muhafaza edilmiştir. Bu da pediocin immunite genlerinin kromozomlarca kodlandığını ileri sürmüştür. Hiçbir rapor PO_2, PC ve B5627 suşlarında immunite fenotipinin pilazmitlerle ilişkisini kullanmamıştır (Hoover *et al.* 1988). Laboratuvarlarda yapılan limitli çalışmalarda 4 tane *Pediococcu acidilactici* suşlarının (H,E,F,M) tüm özelliklerinin pSMB74 pilazmitiyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir. İmmunite proteini spesifik bir immunite geni tarafından kodlanmaktadır. İmmunite geni yapısal genlere çok yakın bir yerde lokalize olmaktadır (Kuipers *et al.* 1993). Çeşitli araştırmalarda nisinin üretimi için yüksek oranda immunite proteini üretimine ihtiyaç olduğu ileri sürülmektedir (Kuipers *et al.* 1993).

Bakteriyosin üretimiyle ilgili genler; kromozomlar, transpozonlar ve çeşitli büyüklükteki pilazmitler üzerinde yer almaktadır (Engelke *et al.* 1992, Klaenhammer 1993). Kromozomlarca kodlanan bakteriyosin örnekleri; nisin (Buchman *et al.* 1988), lactocin 27 ve lactocin F (Muriana and Klaenhammer 1991) içermektedir. Pilazmitlerce kodlanan bakteriyosinlerde; pediocin AcH (Ray 1994,1996), sakacin A (Schillinger 1994), lactoccocin A (van Belkum 1994), leucocin A-UAL (Hasting *et al.* 1991b) örnek olarak gösterilmektedir. Buchman ve arkadaşları (1988) ATCC 11454 türünün kromozomal DNA'sından nisinin yapısal genini izole edip sekanslamışlardır.

Pediococcus pentosaceus FBB61 tarafından üretilen pediocin A'nın üretiminin pilazmid profil analizlerinden 13.6 MDa'lık pilazmitçe kodlandığı kanıtlanmış ve bu pilazmite pMD136 adı verilmiştir (Daeschel and Klaenhammer 1985). Pediokok türlerindeki pediosin üretim fenotipinin 8.25 kbp ila 12.0 kbp aralığındaki pilazmitlerce kodlandığı

belirtilmiştir (Daeschel and Klaenhammer 1985). *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0'ın ürettiği pediocin PA-1 üretim fenotipinin 6.2MDa'lık yani 9.4kbp'lik pilazmitle ilişkili olduğu ve bunun da pSRQ11 olarak tasarlandığı belirtilmiştir (Gonzalez and Kunka 1987). *Pediococcus acidilactici* H,E,F ve M suşlarında pediocin AcH üretiminden sorumlu fenotipin küçük bir pilazmite bağlı olduğunu kanıtlamışlar ve bu pilazmiti pSMB74 olarak tasarlamışlardır. Sonraki çalışmalarda bütün 4 türün pediocin AcH üretiminden sorumlu fenotipin aynı pilazmite bağlı olduğu bu pilazmitin pSMB74 pilazmiti olup yaklaşık 8.9 kbp yani 7.4 MDa olduğu gösterilmiştir (Ray *et al.* 1992) Pediocin AcH üretim fenotipini kodlayan pilazmid haritalanmış ve pilazmidin tüm nükleotit sekansı belirlenmiştir. Restriksiyon enzim haritalamasında pSMB74 ve pSRQ11 pilazmitleri birbirleriyle çok benzer olarak bulunmuşlardır (Ray *et al.* 1992) Pediosin üretim özelliğinin pilazmitlerle bağlantısı Çizelge 2.6'da belirtilmiştir.

Çizelge 2.6 Pediosin üretim özelliğinin pilazmid bağlantısı

Üretici Türler	Pilazmid büyüklüğü	Pediosin ve pilazmidlerin tasarımı	Kaynaklar
Pediococcus pentosaceus FBB61, L7230	13.6 MDa (20.4 kbp)	Pediocin A; pMD136	Daeschel and Klaenhammer 1985
Pediococcus pentosaceus FBB63	10.5 MDa (15.8 kbp)	–	Graham and Mckay 1985
Pediococcus pentosaceus MC-03	5.5 MDa (8.2 kbp)	–	Hoover *et al.* 1989
Pediococcus acidilactici PAC 1.0	6.2 MDa (9.4 kbp)	Pediocin PA-1 pSRQ11	Gonzalez and Kunka 1987
Pediococcus acidilactici H,E,F,M	7.4 MDa (8.9kbp)	Pediocin AcH pSMB74	Ray *et al.* 1989, Kim *et al.* 1992, Ray *et al.* 1992
Pediococcus acidilactici PO_2, B5627, PC	5.5 MDa (8.2kbp)	–	Hoover *et al.* 1989
Pedicoccus pentosaceus Pep1	9.0 MDa	Pediocin P; pHD1.0	Osmanağaoğlu *et al.* 2000
Pediococcus acidilactici SJ-1	4.6 MDa	Pediocin SJ-1	Schved *et al.* 1993
Pediococcus acidilactici UVAI	9.5 kbp	-	Mathys *et al.* 2007
Pediococcus acidilactici MM33	6.2 MDa	Pediocin PA-1'e benzer	Millette *et al.* 2008
Pediococcus acidilactici MTTCC 5101	8.9 kbp	pCP289	Kaur and Balgir 2007
Pediococcus pentosaceus RS5	-	pRS5	Alegre *et al.* 2009
Pediococcus acidilactici LB42-923	7.4 MDa (8.9kbp)	pSMB74	Miller *et al.* 2005

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 MATERYAL

3.1.1 Bakteri kültürleri

Tez çalışmasında kullanılmış olan *Pediococcus acidilactici* PBF bakteriyosin üreten ana suş olup, *Leuconostoc mesenteroides* Ly, *Pediococcus acidilactici* PedL, *Lactobacillus plantarum* NCDO 955*, Enterococcus faecalis* MB1 ve *Lactococcus lactis* subsp. lactis OZ1 gibi pek çok genus'a ait Gram-pozitif bakteriler çalışma sürecinde indikatör bakteriler olarak kullanılmıştır. Yukarıda söylenilen indikatör bakteri suşları patojen özellik göstermemektedir. *Enterococcus faecalis* ve *Leuconostoc mesenteroides* Ly şuşları patojen özellik göstermemesine rağmen, et ve süt ürünlerinin bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca; gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan ve araştırmanın bazı kademelerinde indikatör olarak kullanılan suşlar, bu suşların gelişme ortamları ve optimum gelişim sıcaklıkları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan 20 adet bakteri kültürü, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2 Kültür ortamları

Bu çalışmada kullanılan; TGE, TGE buffer, Ellikier, M17, MRS, BHI ve Nutrient Broth (NB) gibi farklı besiyerlerinin hazırlanma metotları ve kompozisyon içerikleri **EK 1**' de açıklanmıştır.

3.1.3 Tampon ve çözeltiler

Bu çalışmada kullanılan farklı tampon ve solüsyonların hazırlanışı **EK 2'** de verilmiştir.

3.1.4 Moleküler markörler

Bu çalışma süresince kullanılan protein markörü **EK 3**' te verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri türleri, gelişme ortamları ve optimum gelişim sıcaklıkları

Suşlar	Besi ortamı	Gelişim koşulları
Pediococcus acidilactici PBF (Bac$^+$)	TGE	35°C, 18 h
Pediococcus acidilactici PedL	TGE	35°C, 18 h
Lactobacillus plantarum NCDO 955	TGE	30°C, 24 h
Enterococcus faecalis MB1	TGE	30°C, 24 h
Leuconostoc mesenteroides Ly	TGE buffer	30°C, 24 h
Lactococcus lactis subsp. *lactis* OZ1	TGE buffer	30°C, 24 h
Lactococcus lactis OZ1	TGE buffer	30°C, 24 h
Lactococcus lactis 1403	TGE buffer	30°C, 24 h
Micrococcus luteus RSKK 736	TGE	30°C, 24 h
Listeria innocua	NB	37°C, 24 h
Listeria monocytogenes RSKK 96475	NB	37°C, 24 h
Listeria monocytogenes RSKK 96040	NB	37°C, 24 h
Staphylococcus aureus (GATA1)	NB	37°C, 24 h
Staphylococcus aureus (GATA2)	NB	37°C, 24 h
*Bacillus sphericus*RSKK 382	NB	37°C, 24 h
Bacillus cereus RSKK 709	NB	37°C, 24 h
MRSA 13274 (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus)*	NB	37°C, 24 h
MRSA 13240 (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus)*	NB	37°C, 24 h
Salmonelle enteritidis (GATA)	NB	37°C, 24 h
Escherichia coli RSKK 234	NB	37°C, 24 h
Candida albicans RSKK 02007	NB	37°C, 24 h

3.1.5 Kimyasallar

Bu çalışma boyunca kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları **EK-4'** te verilmiştir.

3.1.6 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışma boyunca kullanılan tüm cam malzemelerin sterilizasyonu için pastör fırını (180ºC de 180 dakika), solüsyon ve besi ortamlarının sterizasyonu için otoklav kullanılmıştır (121ºC de 15 dakika).

3.1.7 Bakteri Kültürlerinin saklanması

İzolatlar uygun sıvı besi ortamında 18 saat geliştirildikten sonra 1 ml steril mikro santrüfüj tüplerine aktarılarak 10.000 rpm'de 75 sn santrifüj edilir, daha sonra pellet 1 ml steril distile su ile yıkanarak % 50'lik steril gliserol çözeltisinde -86^{o}C'de saklanır.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin optimum üretim koşullarının belirlenmesi ve antimikrobiyal aktivitesi

Pediococcus acidilactici PBF suşunun ürettiği antimikrobiyal maddenin karakterizasyonun ve saflaştırılmasının tam anlamıyla yapılabilmesi için bu bakterinin gelişimi için gerekli olan optimum inkubasyon zamanı, optimum gelişim sıcaklığı ve maksimum aktive gösterdiği besiyerinin tayini yapılmış ve ürettiği antimikrobiyal maddenin aktivitesinin belirlemesi için bazı testler uygulanmıştır.

3.2.1.1 Bakteri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi

% 50 gliserol çözeltisi içerisinde - 86ºC'de korunan bakteri stok kültürlerinden örnekler alınarak uygun besiyerinde uygun şartlar altında ard arda 2 kez aktifleştirme yapılmıştır. Sıvı besiyerinde geliştirilen kültürlerin tek tip kültürden oluştuğu katı besiyerlerine çizgi

ekim yapılmasıyla tespit edilmiş böylelikle suşlar karakterizasyon ve protein saflaştırma çalışmaları için kullanılacak hale getirilmiştir.

3.2.1.2 Ham (crude) bakteriyosinin elde edilmesi ve bakteriyosin üretiminin teşhisinde kullanılan temel metotlar

Pediococcus acidilactici PBF suşunun ürettiği bakteriyosinin antibakteriyel bir etkiye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Bakteriyosinlerin genellikle yakın türlerin inhibisyonunda etkili oldukları bilinmesine karşın antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla indikatör organizma olarak *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 kullanılmıştır. Bakteriyosin üretim özelliği belirlenecek olan mikroorganizmanın aktif kültürü TGE besiyeri içerisinde üretilip santrifügasyonla ayrılan süpernatant sıvısının indikatör mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *Pediococcus acidilactici* PBF suşu 35ºC'de TGE sıvı besiyerinde aktifleştirilip 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilmiş kültür, bakteriyosin elde etmek amacıyla 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrüfüjleme neticesinde hücrelerden ayrılan sıvı kısım hücre bağımsız süpernatant (CFS) olarak adlandırılıp 0.22 µm çaplı (Milex, Millipore) membrandan geçirilmiştir. Steril, hücrelerden arındırılmış filtrat içerisinde düşük pH, hidrojen peroksit ve bakteriyofajdan kaynaklanabilecek etkiyi ortadan kaldırmak için sırasıyla; pH değeri 1N NaOH ile 7.0'ye getirilip katalazla muamele edildikten sonra 95ºC'de 5 dakika kaynatılarak antimikrobiyal aktivitenin gözlenmesi için kullanılmıştır (Savagado *et al.* 2004). Yapılan işlemler sonucu elde edilen bu madde ***ham (crude) bakteriyosin ekstraktı*** olarak adlandırılmaktadır. 18 saat TGE sıvı besiyerinde geliştirilmiş indikatör *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 kültüründen 5 µl hacmindeki miktar 5 ml yarı-katı (TGE broth + %0.75 agar) besiyerine inokule edilmiştir. Bu arada; bakteriyosin üretiminin gözlemlenmesi için TGE katı agar (TGE broth + %1.5 agar) hazırlanmıştır. Petrilerdeki TGE katı agarın yüzeyine indikatörün bulunduğu yarı-katı besiyeri yayılmıştır. Katılaşan yarı-katı TGE besiyeri yüzeyine bakteriyosin örneği 5µl olacak şekilde 'spot on lawn' yöntemi adı verilen nokta ekim metotuyla direkt olarak ekilmiştir. Petriler 35ºC'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkubasyon süresi sonunda petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Bununla birlikte antibakteriyel aktivitenin belirlenebilmesi için farklı teknikler de kullanılmaktadır. Disk analiz metotunda, 'spot on lawn' yöntemi adı verilen nokta ekim yönteminden farklı olarak deney tüplerinde bulunan indikatörle dökme ekim yapılmış, TGE agar besiyeri yüzeyine steril kağıt diskler yerleştirilmiştir (Bhunia *et al.* 1988). Isıyla muamele edilmiş, pH'ı nötralize edilmiş ve katalazla muamele edilmiş kültür süpernatant sıvısı bakteriyosin analizinin yapılabilmesi için steril kağıt disklere mikropipet arayıcılığıyla emdirilmiştir. Daha sonra petri bir gece inkubasyona bırakılmış ve disklerin etrafında inhibisyon zonunun varlığı ya da yokluğu mikroorganizmanın bakteriyosin üretip üretmediğini göstermiştir. Ayrıca bakteriyosin aktivetesinin belirlenebilmesi için; kuyucuk difuzyon testi ve agar difuzyon testleri de kullanılmaktadır.

3.2.1.3 Optimum inkubasyon zamanı

Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *Pediococcus acidilactici* PBF suşu 100ml'lik TGE sıvı besiyerine 100µl aktifleştirilerek 35ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. Aktifleştirmenin hemen ardından 0.-2.-4.-..... olmak üzere toplam 24 saatlik süreçte 2 şer saat aralıklarla kültürden örnek alınmış ve eş zamanlı olarak pH'ı, optik yoğunluğu ölçülmüş elde edilen ham (crude) bakteriyosin ekstraktının aktivite üniteleri hesaplanmıştır. Böylelikle çalışılan *Pediococcus acidilactici* PBF suşuna uygun inkubasyon zaman aralığı belirlenmeye çalışılmıştır. pH'ın düşük olduğu, O.D ve A.U değerlerinin yüksek olduğu zaman aralığı optimum inkubasyon zamanı olarak şeçilmiştir.

3.2.1.4 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *Pediococcus acidilactici* PBF suşu 5 ml'lik TGE sıvı besiyerine 5 µl aktifleştirilerek **30ºC, 35ºC ve 40ºC'lik** farklı sıcaklıklarda 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Farklı sıcaklıklardaki inkubasyon sonunda, besiyerinin son pH'sı ve yoğunluğu, elde edilen ham (crude) bakteriyosin ekstraktının ise aktivite ünitesi belirlenmiştir. pH'ın düşük olduğu, OD ve AU değerlerinin yüksek olduğu sıcaklık optimum sıcaklık olarak seçilmiştir.

3.2.1.5 Maksimum aktiviteli besiyerinin belirlenmesi

Bu amaçla 5ml'lik tüplerde **TGE, TGE buffer, Ellikier, M17, MRS, BHI** sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Farklı besiyerlerine *Pediococcus acidilactici* PBF suşu 5µl aktifleştirilerek 18 saat 35ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilmiş kültürün bulunduğu her bir besiyerinin pH'sı ölçülmüş, ham (crude) bakteriyosin ekstraktının ise aktivite ünitesi tespit edilmiştir. Test sonuçlarına göre en çok aktivite gösteren besiyeri; pH'nın en düşük, aktitive ünitesinin en yüksek olduğu besiyeri olup, maksimum aktiviteli besiyeri olarak seçilmiştir.

3.2.1.6 Bakteriyosin aktivite ünitesinin ölçülmesi

Pediococcus acidilactici PBF suşunun ürettiği, 3.2.3.1 bölümünde anlatıldığı gibi kısmi olarak saflaştırılan liyofilize bakteriyosin ekstraktı (1 mgr'ı 100 µl TGE sıvı besiyerinde çözündürülmüş) hassas indikatör bakteriye karşı analiz edilmiştir (Bhunia *et al.* 1991, Biswas *et al.* 1991) Kısmi saflaştırılan bakteriyosin preparasyonu AU/ml değerini belirlemek için, steril deiyonize suyla 1:10-1:250 aralığında seri dilusyonlara tabi tutulmuştur. 3.2.1.2' de verilen bakteriyosin üretim tespit yöntemlerinden 'spot on lawn' nokta ekim metotu kullanılarak ekim yapılmıştır. Bir gece 35ºC'de inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar gözlenmiştir (Bhunia *et al.* 1991, Biswas *et al.* 1991). Aktivite ünitesi, inkubasyonun ardından her bir kültür ortamına ait AU/ml değeri petri plakada 2 mm veya daha fazla büyüme inhibisyon zonu veren en yüksek dilusyon değerinin 200'le çarpılması sonucunda bulunmuştur (AU/ml= dilusyon faktörü x 1000µl/ 5µl) (Yang *et al.* 1992).

3.2.1.7 Antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesi

Pediococcus acidilactici PBF suşu tarafından üretilen kısmi olarak saflaştırılmış liyofilize bakteriyosin ekstraktının antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenebilmesi için *Leuconostoc, Pediococcos, Lactobacillus, Enterococcus ve Lactococcus* genusuna ait patojen olmayan suşlarla birlikte, kullanılan patojenlerin bazılarının, gıdalarda yaygın olarak bulunan, bazılarının ise sık rastlanmayan fakat daha

yüksek oranda tehlike oluşturan mikroorganizmalardan seçilmesine özen gösterilmiştir. Kullanılan suşların isimleri Çizelge 3.1 de verilmiş olup, petri yüzeyine sürme ekim yöntemi ile indikatör-patojen bakteriler ekilmiştir. 3.2.1.2' de anlatılan 'spot on lawn' nokta ekim metotuyla kısmi olarak saflaştırılan liyofilize bakteriyosin ekstraktının antimikrobiyal aktivite spektrumu tespit edilmiştir. İnkubasyon koşulları indikatör suşa göre değişiklik göstermiş olup, inhibisyon süresi sonucunda zon oluşumu olup olmadığı gözlemlenmiştir.

3.2.2 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin stabilitesi

Pediococcus acidilactici PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosin molekülünün değişik pH değerlerine, sıcaklığa, organik çözücülere ve enzimlere karşı stabiliteleri kısmi saflaştırılan liyofilize bakteriyosin ekstraktı kullanılarak araştırılmıştır (Biswas *et al.* 1991, Bromberg *et al.* 2004).

3.2.2.1 pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Bu deneyde, kısmi olarak saflaştırılmış liyofilize bakteriyosin ekstraktının hangi pH aralıklarında aktivite gösterdiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen kısmi olarak saflaştırılmış bakteriyosin preparasyonu de-iyonize su içerisinde konsantrasyon 50mg/ml olacak şekilde çözülmüştür. Bu preparasyonlardan elde edilen numunelerin pH'sı 10mM NaOH veya 10mM HCI kullanılarak 3.0-12.0 değerleri arasında ayarlanmıştır. Final bakteriyosin konsantrasyonu 10mg/ml olarak düzenlenmiştir. pH'ları ayarlanan kültür üst sıvıları 0.22'lik membran filtreden (Millex, millipore) geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Bakteriyosin örnekleri 4 paralel çalışılmıştır. Numuneler 2 saat 25ºC'de, 24 saat 25ºC'de, 20 dk 100ºC'de ve otoklav sıcaklığında inkube edilmiştir. Çalışılan numunelerin pH değeri steril 4 mM fosfat tamponuyla pH 7 olacak şekilde nötralize edilmiş ve bir gece 35ºC'de inkubasyonun ardından antimikrobiyal aktivite test edilmiştir (Bhunia *et al.* 1987,1988).

3.2.2.2 Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi; söz konusu kısmi saflaştırılan liyofilize bakteriyosin ekstraktının 1mg'ının 1000 µl TGE sıvı besiyerinde çözündürülüp, bu örneğin 95ºC'de 5 dk, 30 dk, 60 dk ve 121ºC'de 15 dk olmak üzere farklı sıcaklıklarla muamele edilmesinden sonra belirlenmiştir. LAB leri tarafından üretilen bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesinin ısıya-dirençli olduğunu vurgulansa da uzun süre yüksek sıcaklık ile muamele bakteriyosinlerin aktivitelerini düşürmektedir. Bakteriyosin ekstratlarının aktiviteleri 3.2.1.2'de anlatılan 'spot on lawn' adı verilen nokta ekim yöntemiyle tespit edilmiştir. 35ºC'de 18 saat inkübasyon süresi sonunda petrilerde inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.2.3 Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine değişik enzimlerin etkisi; sıcaklığın etkisinin belirlendiği testte olduğu gibi, kısmi saflaştırılmış liyofilize kültür kullanılarak tanımlanmıştır. Bakteriyosin ekstraktının Çizelge 4.4 de verilen proteolitik ve diğer bazı enzimlere karşı duyarlılığının tespiti için; enzimler 4mM pH 7.0, fosfat tamponu içerisinde konsantrasyon 200µg/ml olacak şekilde çözündürülmüştür. 10µl kısmi saflaştırılmış liyofilize kültür 10µl enzimle mikrosantrifüj tüplerinde karıştırılmış ve mikrosantrüfüj tüpleri enzim aktivitesi amacıyla 1 saat etüvde bekletilmiştir. Bekletilen örnekler daha sonra 3.2.1.2'de anlatılan 'spot on lawn' yöntemi adı verilen nokta ekim metotuyla 5 µl olacak şekilde yüzeye ekilmiştir. Bir gece 35ºC'de inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar gözlenmiştir.

3.2.2.4 Organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Bu etkinin araştırılması içinde 3.2.3.1'de belirtildiği şekilde *Pediococcus acidilactici* PBF suşudan sağlanan kısmi saflaştırılmış liyofilize kültür üzerinden işlem yapılmıştır. Çizelge 4.5'de verilen organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerindeki etkileri gözlemlenmiştir. 10µl kısmi olarak saflaştırılan bakteriyosin ekstraktı 10µl organik çözücüyle mikrosantrifüj tüplerinde karıştırılmış ve mikrosantrüfüj tüpleri çözücülerin

uçurulması amacıyla 1 saat kapakları açık olarak 25ºC'de etüvde bekletilmiştir. Kurutulan örnekler steril deiyonize suyla çözünmüş, organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerinde yarattığı etki 'spot on lawn' adı verilen nokta ekim yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.3 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosin özelliği gösteren proteinlerin ayrılması

Karakterizasyon işleminin ardından bakteriyosin üretme yeteneğine sahip *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun ürettiği bakteriyosinin SDS-PAGE'le yapılan analizlerinde 3.2.3.1 bölümünde anlatıldığı gibi kısmi olarak saflaştırılan liyofilize kültür kullanılmıştır. Bir maddenin bakteriyosin olarak tanımlanabilmesi için en az 10 amino asitten oluşması, protein yapısında olması ve üretici suş tarafından düzenli olarak sentezlenmesi gerekmektedir (Klaenhammer 1993, de Vuyst and Callewaert 1999, Bierbaum 1999, Malik *et al.* 1994). Yapılan eleme çalışmalarındaki amaç; bakteriyosin benzeri kısa peptitlerin ve inhibitör etkisi mevcut olan bazı organik bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. *Pediococcus* cinsi bakteriler genellikle 10 kDa'dan küçük, ısıya karşı dayanıklı ve modifiye olmayan amino asitleri içeren Grup II bakteriyosinler üretmektedir.

3.2.3.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin üretici hücrelerden adsorbsiyonu ile kısmi olarak saflaştırılması ve eldesi

Bakteriyosin üreticisi *Pediococcus acidilactici* PBF suşu kültürlerinden 1600 ml TGE sıvı besiyerine 3200 µl ekim yapılmış ve 35ºC'de 18 saat inkubasyona bırakılmıştır. Besiyerleri şişeleri etüvden çıkarıldıktan sonra besiyeri ortamının pH'sı 10mM NaOH kullanılarak 6.5'a ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanan besiyeri 72ºC'de 30 dakika hafif çalkanarak sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Böylelikle istenmeyen hücrelerin ölmesi sağlanmıştır. 30 dk sonunda besiyerleri soğuması için 15 dk daha beklenmiştir. Soğuyan besiyeri 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüje tabi tutulmuştur. Süpernatant kısım atılıp, pellette kalan hücreler 5 mM pH 6.5 olan 60 ml sodyum fosfat tamponuyla ($NaPO_4$) yıkanmıştır. Ardından yeniden 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj tüplerinin içinde bulunan kültür sıvısının süpernant kısmı mikropipet

yardımıyla uzaklaştırılmış ve pellet kısmı 60 ml distile suyla yıkanmıştır. Daha sonra elde kalan kültür sıvısı tekrardan 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi bittikten sonra tüplerde kalan kültür sıvısının süpernatant kısmı bir mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmış, geriye pellet kalmıştır. Pellet 100 ml 0.1M NaCl'yle karıştırılmış karışımın pH'sı steril NaOH ve HCI'yle 2' ye ayarlanmıştır. Temel prensip; bakteriyosinlerin pH değişimiyle dışarı çıkıp ortamda muhafazalarının sağlanmasıdır. pH'sı 2'ye ayarlanan karışım +4ºC'de buzdolabında 1 saat manyetik karıştırıcıyla karıştırılmıştır. 1 saatin ardından buzdolabından alınan karışım tekrardan santrifüj tüplerine koyularak 29.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. pH değişimiyle birlikte bakteriyosinler serbest hale geçmiş ve karışımın süpernatant kısmında lokalize olmuşlardır. Karışımın süpernatant kısmı çok dikkatli bir şekilde mikropipet vasıtasıyla steril bir şırıngaya aktarılmış ve 0.22 μm por çaplı (Millex, millipore) membran filtreden geçirilerek steril bir şişeye konulmuştur. Daha sonra steril şişeden alınan karışım 24 saat distile suya karşı diyaliz membranda (Serva Spectra/pore MWCO 1000) +4ºC'de diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyaliz işleminin sağlıklı ve güvenli sonuçlar çıkarması için 2 saat aralıklarla diyaliz protokolünde kullanılan distile su değiştirilmiştir. 24 saat süren diyaliz işleminin ardından bakteriyosin kısmi olarak saflaştırılmıştır. Kısmi saflaştırma işlemi neticesinde bakteriyosinin sıvı hali elde edilmiştir. Yapılacak olan deneylerde ve SDS-PAGE'de daha kaliteli ve güvenilir sonuçlar bulmak için elde edilen sıvı bakteriyosin örneği liyofilizasyona tabi tutularak konsantre edilmiş ve toz haline getirilmiştir. Böylelikle *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosininin kısmi saflaştırılması tamamlanarak deneylerde kullanılacak olan ***kısmi saflaştırılmış liyofilize bakteriyosin kültürü*** elde edilmiştir (Yang *et al.* 1992).

3.2.3.2 Pediosin PBF'nin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforeziyle (SDS-PAGE) tesbiti ve moleküler ağırlığının hesaplanması

Saflaştırma aşamasında elde edilen antimikrobiyal etkiye sahip proteinin molekül ağırlığının tespit edilmesi için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforez yöntemi kullanılmıştır (Piard *et al.* 1992, Contreras *et al.* 1997, Schagger and Jagow 1987). Ayrımı sağlanan moleküllerin moleküler büyüklükleri, tanımlanmış protein markörlerle karşılaştırılarak (NOVEX Mark 12, Invitrogen) tespit edilmiştir. Dikey jel

sisteminde iki tane 10x10 cm ebatlarında cam plaka kullanılmıştır. Elektroforez plakaları % 70'lik etanol çözeltisiyle temizlendikten sonra sistem düzenlenmiştir. Jel tarağının 1cm altına gelecek şekilde % 12'lik yürütme jeli (resolving gel) dökülmüş ve üzerine 1 ml bütanol ilave edilmiştir. Jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklenmiş ve bütanol kurutma kağıdıyla geri çekilmiştir. Plakanın geri kalan kısmı % 5'lik yükleme jeli (stacking gel) ile tamamlanmış ve tarak ucunda hava kabarcıkları oluşmamasına dikkat edilerek yerleştirilmiş polimerizasyon için 30 dakika beklenmiştir. Daha sonra plakalar elektroforez tankına konulmuş tank içine elektrot tamponu boşaltılmış ve taraklar çıkarılmıştır.

Kullanılan yöntemde 2 paralel SDS-PAGE aynı koşullar altında yürütülmüştür. 1. jel standart protein markörü içermekte olup (NOVEX Mark 12, Invitrogen), elektroforez sonrasında Coomassie Briliant Blue (CBB) ile boyanmış, protein markörle kıyaslanmak suretiyle elde edilen bantlarının büyüklükleri saptanmıştır. 2. jel ise; boyanmamış, indikatör bakteriye karşı göstermiş olduğu inhibisyon zon oluşumuna göre bakteriyosin bant(lar)ının tanımlanmasında kullanılmıştır (Yang *et al.* 1992, Bhunia *et al.* 1987). 1. jel için; liyofilize edilip kısmi saflaştırılan bakteriyosin molekülünün 1mgr'ı 100 µl distile su içerisinde çözünmüş ve çözünmüş bakteriyosin preparatı 1:1 oranında örnek tamponuyla karıştırılarak mikro santrüfüj tüplerinde 5 dk su içerisinde kaynatılmıştır. Böylelikle proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır. İkinci jel içinde yöntem gereği kullanılan çözeltilerin bileşiminden SDS çıkarılmıştır. Ayrıca hazırlık aşamasında örneklere merkaptoetanol ilavesi ve sıcaklık uygulaması yapılmamıştır (Laemli 1970). Preparasyonların bu şekilde hazırlanmasıyla proteinlerin denatüre olarak katlanmalarının önlenmesi ve sahip oldukları doğal moleküler yapının korunması amaçlanmıştır. Protein örnekleri 20 µl olarak jele yüklenmiştir. Yükleme jeli için 25 mA, yürütme jeli için ise; 75 mA elektrik akımı uygulanmıştır. İki SDS-PAGE jeli aynı şartlar altında yürütülmüştür. Elektroforez işlemi; 25 mA'da yaklaşık 1 saatte, 75 mA'da da yaklaşık 2 saatte gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra 1. jel CBB boya solusyonunda 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra boya geri alma solüsyonuna alınan jel, protein bantları netlik kazanana kadar bu solüsyonda bekletilmiş gözlemlenen proteinlerin moleküler ağırlıkları hesaplanmış ve jel fotoğraflanmıştır. Elektroforez sonrası elde edilen 2. jel mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki

gösterebilecek organik bileşiklerin uzaklaştırılması amacıyla 24 saat süresince steril distile suda bekletilmiştir. Durulamada kullanılan steril distile su 6 saat aralıklarla değiştirilerek kalan tüm maddelerin jelden uzaklaştırılması sağlanmıştır. İnhibisyonun gösterilmesi amacıyla jel büyük boyutlarda bir TGE katı agarlı petri yüzeyine yerleştirilmiştir. Sonra TGE katı agar yüzeyine yerleştirilen jel üzerine, -indikatör bakteri olan *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 ekilmiş- TGE yarı katı besiyeri dökülmek suretiyle jelin yüzeyi indikatör bakteriyi içeren yarı katı besiyeriyle kaplanmıştır. 35ºC'de 18 saatlik inkubasyon sonrasında petrilerde indikatör bakteri üremesinin engellendiği bölgelerde zon oluşumları kontrol edilmiştir (Yang and Ray 1992). 2. jeldeki inhibisyon zon veya zonlarının yer aldığı bölgeler boyanan ilk jeldeki bantlarla karşılaştırılmış ve buna göre hangi bant veya bantların antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğu belirlenmiş ve iki jelin görüntüsü KODAK JEL GÖRÜNTÜLEME (Gel Logic 200 Imaging System) cihazında fotoğraflanmıştır.

3.2.3.3 Protein büyüklüklerinin saptanması

Beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek KODAK jel görüntüleme cihazından alınan jel fotoğraflarında hücresel proteinlerin moleküler büyüklükleri NOVEX Mark 12 protein markörü (INVITROGEN) kullanılarak hesaplanmıştır (Laemmli 1970). R_f değeri proteinin kat ettiği mesafenin boyanın kat ettiği mesafeye bölünmesiyle bulunmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

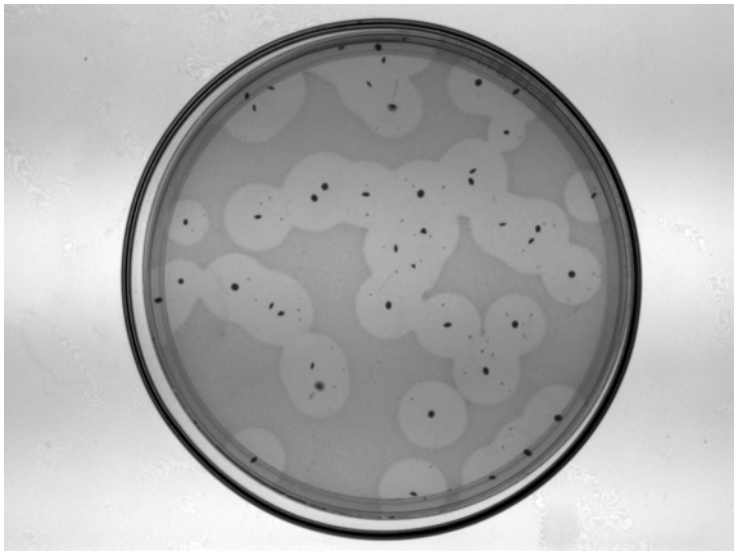
4.1 Antimikrobiyal Madde Üretim Özelliğinin Gösterilmesi

Ekim yapılan petriler 35ºC'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkubasyon süresi sonunda her hangi bir antimikrobiyal aktivitenin olup olmadığının anlaşılması için petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiş ve suşun indikatör bakteriye karşı oluşturduğu inhibisyon zonu incelenmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur (Şekil 4.1). Bu da kullanılan bakterinin antimikrobiyal aktivitesi olduğunu göstermiştir.

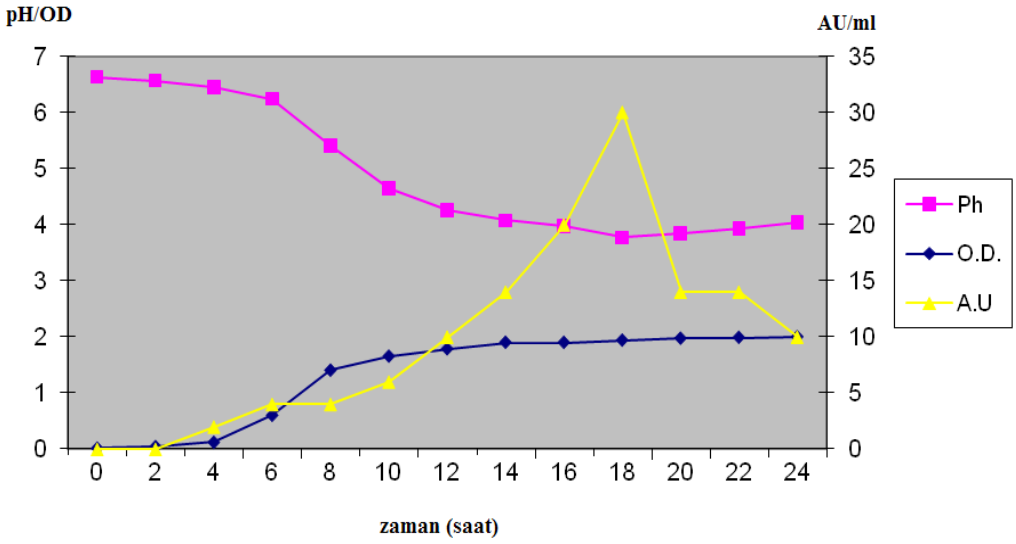
4.2 *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddenin Optimum Üretim Koşullarının Belirlenmesi

4.2.1 Optimum inkubasyon zamanının tespiti

Pediococcus acidilactici PBF suşunun gelişimi ve ürettiği antimikrobiyal maddenin optimum seviyede elde edilebilmesi için uygun inkubasyon zaman aralığı belirlenmiştir. pH'ın düşük olduğu, OD_{600} ve AU/ml değerlerinin yüksek olduğu zaman aralığı optimum inkubasyon zamanı olarak şeçilmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu **18. saatte** optimum oranda gelişme göstermiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin indikatör *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı oluşturmuş olduğu inhibisyon zonları



Şekil 4.2 TGE besi ortamında 35ºC' de gelişen *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun büyüme hızı (OD_{600} nm), asit üretimi (pH) ve pediosin üretimi (AU/ml)

4.2.2 Optimum sıcaklığın tespiti

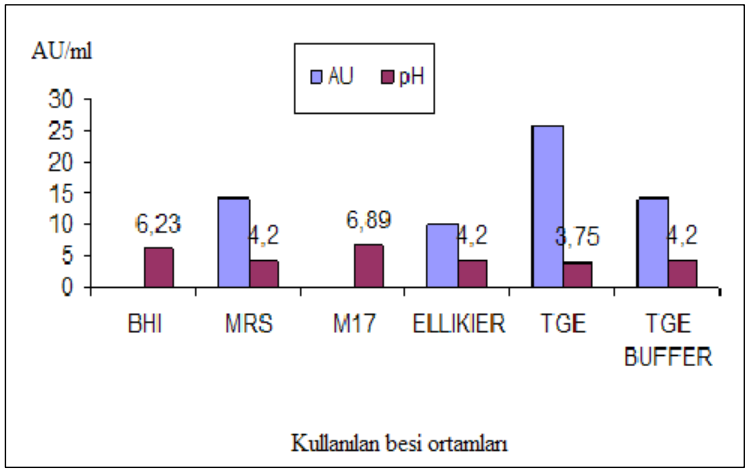
30ºC, 35ºC ve 40ºC sıcaklıklardaki *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun inkubasyonu neticesinde, besiyerinin son pH'sı ve yoğunluğu, elde edilen antimikrobiyal maddenin ise aktivite ünitesi belirlenmiştir. pH'ın düşük olduğu, OD_{600} ve AU/ml değerlerinin yüksek olduğu sıcaklık optimum sıcaklık olarak seçilmiştir. Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi *Pediococcus acidilactici* PBF suşu için optimum sıcaklık değeri **35ºC** olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 Sıcaklığın *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen pediosinin optik densitesi (OD_{600}), son pH ve aktivite ünitesi üzerindeki etkisi

PBF			
İnkübasyon sıcaklığı	**OD_{600}**	**Son pH**	**AU/ml(10^3)**
30ºC	1,922	3,8	20
35ºC	**1,989**	**3,75**	**30**
40ºC	1,787	3,94	14

4.2.3 Maksimum aktiviteli besiyerinin tespiti

Bu amaçla**;** TGE, TGE buffer, Ellikier, M17, MRS, BHI besiyerleri kullanılmıştır. Geliştirilmiş kültürün bulunduğu her bir besiyerinin pH'sı ölçülmüş, elde edilen antimikrobiyal maddenin ise aktivite ünitesi tespit edilmiştir. Yapılan testlerin sonuçlarında *Pediococcus acidilactici* PBF suşu için pH'nın en düşük, aktivite ünitesinin en yüksek olduğu **TGE** besiyeri maksimum aktiviteli besiyeri olarak seçilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 BHI, MRS, M17, Ellikier, TGE ve TGE buffer besi ortamlarında pediosin üretimi

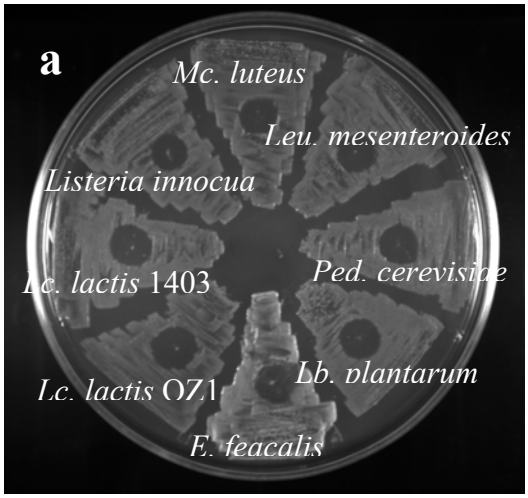
4.3 *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddenin Aktivite Ünitesinin Tespiti ve Antimikrobiyal Aktivite Spektrumu

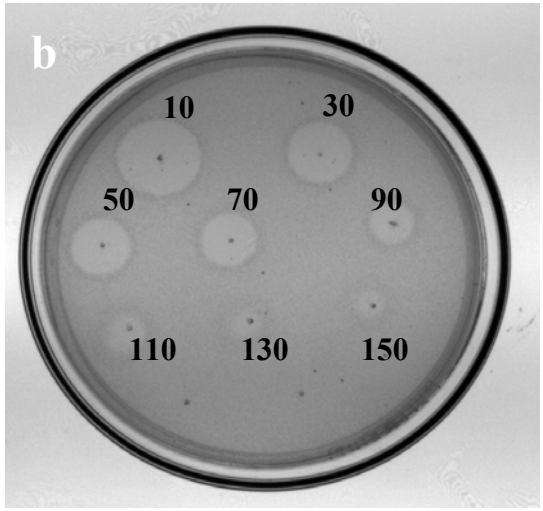
İnkübasyon süresi sonunda petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu için şekilde (Şekil 4.4.b) gösterilen 10 farklı dilusyon faktöründen 150'ye kadar olanlarda zon oluşumu gözlemlenmiştir. Bu da çalışılan kısmi saflaştırılmış antimikrobiyal maddenin aktivite ünitesinin 30.000 AU/ml olduğunu göstermiştir. Hesaplamayı yaparken en son zon görülen dilusyon faktörü 200' le çarpılarak sonuç bulunmuştur (Şekil 4.4.b) .

Bakteriyosin sınıflandırılmasında kullanılan yöntemlerin ilk aşamasında bakteriyosin üreticisi suşların aktivite spektrumlarının belirlenmesi esastır (Geis *et al.* 1983; Nes *et al.* 1996). Ayrıca; bakteriyosinler üzerinde yapılan araştırmalarda bakteriyosinlerin patojenler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi de amaçlanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin bazı gıda patojeni ve indikatör bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisi çalışılmıştır (Çizelge 4.2). Mikroorganizmalar, gıda kaynaklı intoksikasyon ve enfeksiyonlarda son yıllarda etkili olan ve gıda mikrobiyolojisinde sıkça kullanılan Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı test edilmiş. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin gıdalarda bozulmalara ve gıda

kökenli hastalıklara sebep olan birçok Gram-pozitif mikroorganizmaya karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, *Yersinia enterocolitica* ve *Escherichia coli* gibi çalışmada kullanılan Gram-negatif bakteriler üretilen antimikrobiyal maddeden etkilenmemiştir. Çalışma kapsamında antimikrobiyal madde üretim özelliği gösteren *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermemesi litaratür verileriyle uyum sergilemektedir. Ancak; Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin subletal etkiye maruz bırakılmış bazı Gram-negatif suşları etkilediği, dirençli suşları ise EDTA gibi yardımcı maddelerin yardımıyla inhibe edebildiği bilinmektedir (Ganzle *et al.* 2000).

Başta söz edilen laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc mesenteroides* Ly, *Pediococcus acidilactici* Ped L, *Enterococcus faecalis* MB1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* OZ1 ve *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 gibi farklı indikatör suşlar *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun üretmiş olduğu antimikrobiyal maddeye karşı hassasiyetleri bakımından denenmiş ve *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* ve *Salmonella enteritidis* gibi Gram-negatif bakteriler ve bir maya olan *Candida albicans* dışında çalışmada kullanılan tüm indikatör suşları üretilen antimikrobiyal maddeye karşı duyarlı bulunmuştur (Şekil 4.4.a, Çizelge 4.2). Bu sonuçlar dahilinde kullanılan indikatör *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşu çalışmanın geri kalan bölümünde de güvenli bir şekilde tercih edilmiştir.





Şekil 4.4 (a)*Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin çeşitli indikatörlere karşı sergilemiş olduğu antimikrobiyal etki spektrumu, (b)Kısmi olarak saflaştırılmış ekstraktın kullanımı ile belirlenen aktivite ünitesi (AU).

* Sıcaklık ile muamele edilen ham ekstrakt steril su ile 1:10-1:250 arasında seri dilüsyona tabi tutuldu ve her bir dilüsyondan alınan 5µl yüzeyi *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 ile overlay edilmiş katı besi ortamının yüzeyine nokta-ekim yapıldı. Bir gece inkübasyondan sonra, plakalar noktaların etrafında zon oluşumu açısından gözlemlendi ve net bir zon oluşumu sağlayan en yüksek dilüsyon preparasyondaki AU/ml değerini belirleyebilmek için 200 (1000 µl/5 µl) ile çarpıldı. *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin AU değeri 1:150 dilüsyonunda zon oluştorduğu için 30.000 AU/ml olarak belirlendi.

Çizelge 4.2 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivite spektrumu

Bakteri türleri	Antimikrobiyal madde aktivitesi
Pediococcus acidilactici Ped L	+
Lactobacillus plantarum NCDO 955	+
Enterococcus faecalis MB1	+
Leuconostoc mesenteroides Ly	+
Lactococcus lactis subsp. *lactis* OZ1	+
Lactococcus lactis 1403	+
Listeria innocua	+
Micrococcus luteus RSKK 736	+
Listeria monocytogenes RSKK 96475	+
Listeria monocytogenes RSKK 96040	+
Listeria ivanovi	+
Staphylococcus aureus (GATA1)	+
Staphylococcus aureus (GATA2)	+
Bacillus sphericus RSKK 382	+
Bacillus cereus RSKK 709	+
MRSA 13274 (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)	+
MRSA 13240 (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)	+
Staphylococcus aureus (gıda izolatımız)	+
Clostridium perfringens (gıda izolatımız)	+
Bacillus subtilis (gıda izolatımız)	+
Bacillus cereus (gıda izolatımız)	+
Yersinia enterocolitica (gıda izolatımız)	–
Escherichia coli RSKK 234	–
Salmonella enteritidis (GATA)	–
Candida albicans RSKK 02007	–

4.4 *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddenin Tabiatı

Pediococcus acidilactici PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin gıdalarda güvenli bir şekilde kullanılabilmesi amacıyla molekül bazı çevresel faktörlerle muamele edilmiştir. Üretilen bu antimikrobiyal maddenin bakteriyosin olup olmadığını saptamak için kısmi olarak saflaştırılmış liyofilize ekstrakt çeşitli muamelelere tabi tutulmuş ve aktivitede bir kayıp meydana gelip gelmediği kontrol edilmiştir. Böylelikle karakterizasyon testleri neticesinde yapı özellikleri bakımından kararlılık gösteren antimikrobiyal maddenin gıdalardaki işlenme proseslerine karşı da aynı dayanıklılığı göstereceği kanıtlanmış olacaktır.

4.4.1 pH

Yapılan deneyde, inkübasyon süresi sonunda petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir. Farklı pH değerinde muamele gören *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin pH 3 ile 7 arasında maksimum aktivite gösterdiği pH 3' ün altında ve pH 7' inin üzerinde aktivitenin bir kısmının kaybolduğu, pH 9 ve 10' ün üzerinde ise aktivitenin tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3). Düşük pH' larda aktivite gösteren gerçek bakteriyosinlerin nötral pH' larda az da olsa bir etki göstermesi beklenmiştir. Yani; protein yapısındaki bakteriyosinlerin optimal pH koşulları dışında da aktiviteleri azalmakla birlikte etkileri sürmektedir (Yang *et al.* 1992). Bununla birlikte yüksek pH' larda aktivitenin yitirilmesinin moleküllerin yıkımından kaynaklandığı düşünülebilir. Nötral pH' ın altında belirlenen yüksek aktivitenin ise mevcut katyonik moleküldeki pozitif yüklerin sayısındaki artmadan oluşan agregasyondaki azalmadan nihayetlendiği söylenilebilmektedir. Kullanılan antimikrobiyal madde ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinin (AU/ml) düşük pH'ta yüksek, nötral pH ve üzerinde ise düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumunda düşük pH' ta yüksek antimikrobiyal madde çözünürlüğünden veya düşük pH'ta suşların antimikrobiyal maddeye hassasiyetlerinin yüksek olmasından kaynaklandığı sanılmaktadır. pH'ın 10'un üzerinde olduğu inkubasyonlar dışında antimikrobiyal aktivitede kayıp oluşmamıştır.

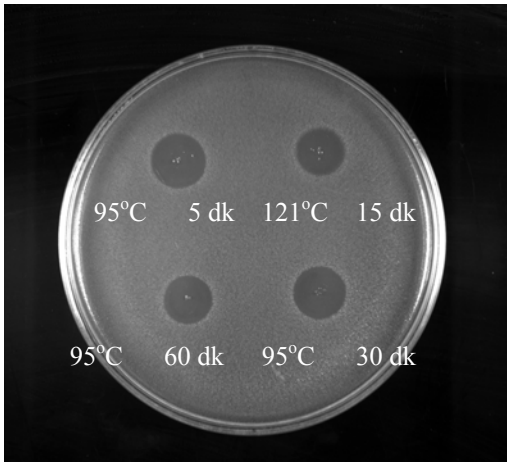
Çizelge 4.3 Geniş aralıktaki değişik pH değerlerinin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri

	AKTİVİTE*		
pH	25°C de 2 saat	25°C de 24 saat	121°C de 15 dk
3.0	+	+	+
4.0	+	+	+
5.0	+	+	+
6.0	+	+	+
7.0	+	+	+
8.0	+	+	+
9.0	+	+	+
10.0	+	–	–
11.0	–	–	–
12.0	–	–	–

* *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşunun indikatör olarak kullanıldığı ve nokta-ekim yöntemiyle aktivitenin kontrol edildiği çalışma sonucunda +, antimikrobiyal aktivitenin varlığını; -, aktivitenin kaybını simgelemektedir.

4.4.2 Sıcaklık

Yapılan deneyde inkübasyon süresi sonunda petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde muamele edildiği sıcaklıklara karşı direçli olup otoklavlanma işleminden (121°C 15 dk) sonra bile yüksek bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Şekil 4.5). Bu da, çalışılan *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun üretmiş olduğu kısmi saflaştırılmış antimikrobiyal maddenin muamele edildiği sıcaklıklara karşı aktivitesinin kaybolmadığını göstermiştir Aynı zamanda 95°C'de 5, 15, 30 ve 60 dk muameleler sonucunda da antimikrobiyal aktivite kaybı söz konusu değildir.



Şekil 4.5 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin farklı sıcaklıklarla muamelesi sonucunda *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı göstermiş olduğu aktivite

4.4.3 Enzim

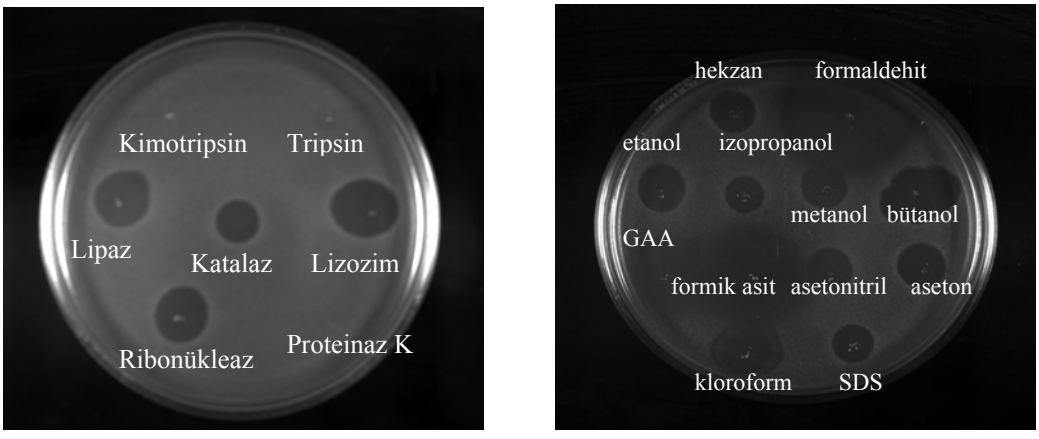
Yapılan deneyde inkübasyon süresi sonunda petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesi α-kimotripsin tripsin, papain ve proteinaz K gibi proteolitik enzimlerle inkübasyon sonucunda kaybolmuştur (Şekil 4.6.a) (Çizelge 4.4). Bununla birlikte RNAz, DNAz, lipaz, lizozim ve katalazla muamele neticesinde üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesinin kaybolmadığı belirlenmiştir. Çalışmada

kullanılan proteolitik enzimlerin tamamında *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddede aktivite kaybı söz konusudur.

Laktik asit bakterilerinde tanımlanan tüm bakteriyosinlerin, proteolitik enzim muamelesi sonunda aktivitelerini ya tamamen ya da büyük ölçüde kaybettikleri saptanmıştır (Dobrzanski *et al.* 1982, Van Belkum *et al.* 1989, Jimenez-Diaz *et al.* 1990, Piard *et al.* 1990, Dieye *et al.* 2001). *Proteinaz K, α-kimotripsin ve tripsin muamelesi sonucu etkinin tamamen ortadan kalkması antimikrobiyal maddenin antimikrobiyal peptit (protein) ya da bakteriyosin olabileceğini ortaya koymaktadır.* Üretilen antimikrobiyal maddenin proteinaz K, α-kimotripsin ve tripsin gibi proteolitik enzim uygulamasından etkilenmemesi durumunda antimikrobiyal aktivitenin peptit benzeri yapıdan kaynaklanmadığı anlaşılmış olacaktır.

4.4.4 Organik çözücüler

Yapılan deneyde inkübasyon süresi sonunda petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesi Çizelge 4.5 de verilen 12 farklı organik çözücüye karşı test edilmiştir. Çalışma sonucunda üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesinin hiçbir organik çözücüye karşı kaybolmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.b).



Şekil 4.6 (a) Farklı enzimlerin (b) organik çözücülerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri

Çizelge 4.4 Farklı enzimlerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri

Yapılan işlem	Bakteriyosin aktivitesi
Kimotripsin	–
Katalaz	+
DNAz	+
Fisin	–
Lipaz	+
Lizozim	+
Papain	–
Proteinaz K	–
RNAz	+
Tripsin	–

* *Lactobacillus plantarum NCDO 955* suşunun indikatör olarak kullanıldığı ve nokta-ekim yöntemiyle aktivitenin kontrol edildiği çalışma sonucunda +, antimikrobiyal aktivitenin varlığını; -, aktivitenin kaybını simgelemektedir.

Çizelge 4.5 Farklı organik çözücülerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri

Yapılan işlem	Bakteriyosin aktivitesi
Hekzan	+
Formaldehit	+
Etanol	+
İzopropanol	+
Metanol	+
Bütanol	+
Glasiyal asetik asit	+
Formik asit	+
Asetonitril	+
Aseton	+
Kloroform	+
SDS	+

* *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşunun indikatör olarak kullanıldığı ve nokta-ekim yöntemiyle aktivitenin kontrol edildiği çalışma sonucunda +, antimikrobiyal aktivitenin varlığını simgelemektedir.

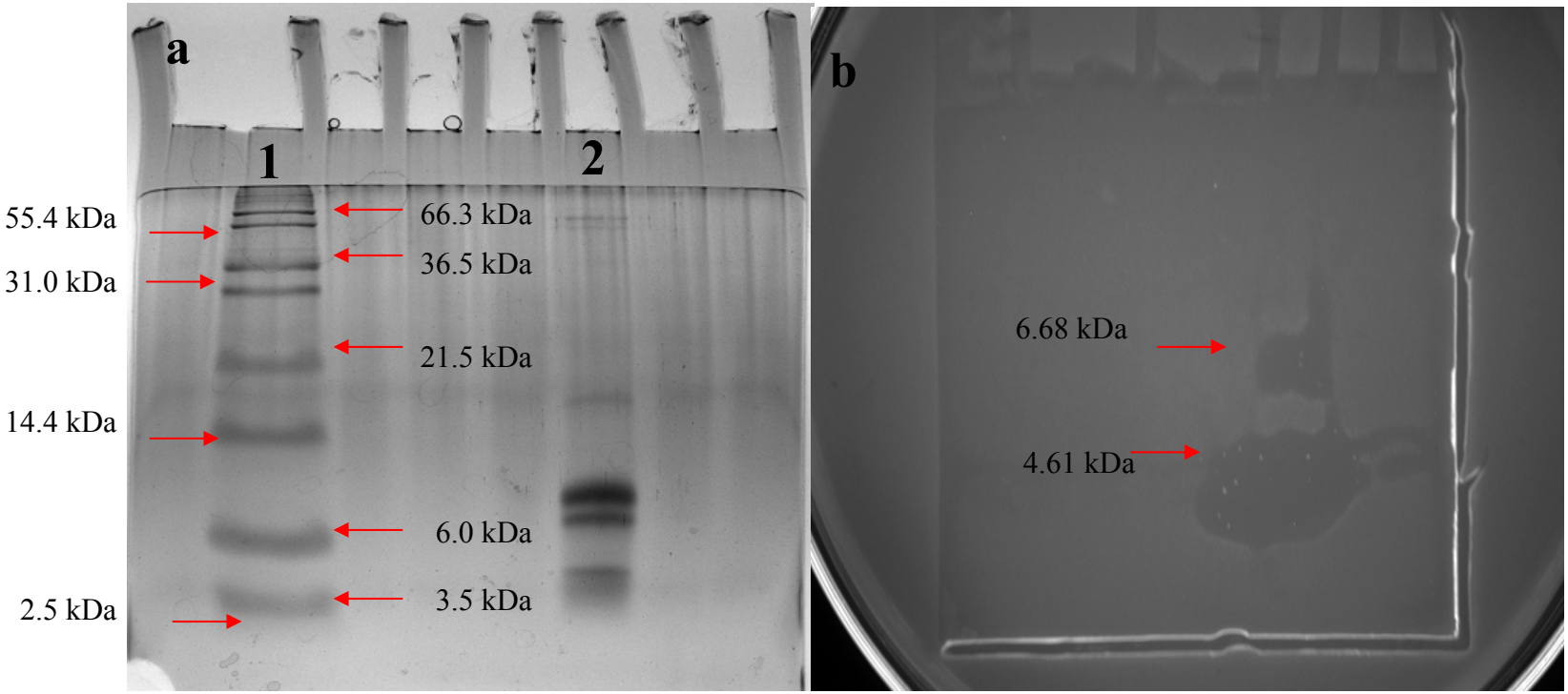
4.5 Kısmi Saflaştırılması Yapılan Bakteriyosin Bant(lar)ının SDS-PAGE Yöntemiyle Moleküler Büyüklüklerinin Tespiti

Bakteriyosin proteinini kontamine maddelerden arındırma işlemi, daha sonra yapılacak SDS-PAGE analizleri için kolaylaştırıcı bir ön işlemdir. Yang ve arkadaşları (1992) laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinleri saflaştırmak için yeni bir metot geliştirmişlerdir. Bu metotun temeli; Gram-pozitif bakterilerin hücre yüzeyine tutunma veya hücre yüzeyini bırakması şeklinde olan pH değişim prensibine dayanmaktadır. pH aralığında maksimum tutunmanın ve minimum tutunmanın her bakteriyosin için değişiklik göstermesine rağmen hücre yüzeyine yüksek tutunma oranı ortalama olarak pH 6.5'ta hücre yüzeyinden bırakılmada maksimum pH 2.0'de gerçekleşmiştir. Bakteriyosin moleküllerinin kümeleşmesini ve dolayısıyla santrifüjleme sırasında ortadan kalkmasını engellemek amacıyla 0.1 M NaCl kullanılmıştır. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin eldesini sağlayan bu metot, yalnızca yüksek oranda ve oldukça saf olarak bakteriyosin üretimini sağlamaz bunun yanında toplam kayıpta oldukça düşüktür. Antimikrobiyal özellik gösteren bakteriyosin proteinlerinin kısmi saflaştırma sürecinde elde edilip liyofilizasyona tabi tutularak konsantre edilmesinden sonra SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yöntemde 2 paralel SDS-PAGE aynı koşullar altında yürütülmüştür. CBB'le boyanan 1. jelde 6 tane bant gözlemlenmiştir. Gözlemlenen bantların moleküler ağırlıkları jeldeki protein markörden (invitrogen) faydalanarak sırasıyla 4.61 kDa, 6.68 kDa, 8.08 kDa, 17.56 kDa, 51.20 kDa ve 59.21 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7a). CBB'le boyanan 1. jelde görülebilen 6 banttan hangilerinin antimikrobiyal aktivite gösterdiğinin belirlenmesi için, indikatörle kaplanmış 2. jeldeki inhibisyon bölgelerinin 1. jeldeki bantların bulunduğu alanlarla lokalizasyon kıyaslaması yapılmıştır.

4.6 İnhibitör Proteinlerin SDS-PAGE'le Ayrılması ve Bakteriyosin Etkisinin Gösterilmesi

Yapılan çoğu çalışmada bakteriyosinlere ait bazı proteinlerin PAGE yöntemiyle ayrıldıktan sonra jel üzerinde aktivitelerini koruyabildikleri tespit edilmiştir (Contreras *et al.* 1997, Messi *et al.* 2001). Jelde difüzyona uğrayan proteinler indikatör bakteriyi inhibe edebilmektedir (Toba *et al.* 1991). 2. jelde, *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen kısmi olarak saflaştırılmış liyofilize bakteriyosin proteininin

indikatör bakteriye karşı göstermiş olduğu inhibisyon zon veya zon bölgeleri 1. jelde, SDS-PAGE'de elde edilen bant veya bantların hangisinin antimikrobiyal aktiviteye sebebiyet verdiğinin öğrenilmesi maksadıyla kullanılmıştır. 2.jelde oluşan inhibisyon zonu veya zonları 1.jelde gözlenen bantlarla kıyaslandığında hangi moleküler büyüklüğe sahip bant(lar)ın antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğu anlaşılmıştır. 2. jelde iki tane inhibisyon zonuna rastlanmıştır (Şekil 4.7.b). Bu da üzerinde çalışılan *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun 2 peptitli bir bakteriyosin üretebileceğini düşündürmüştür. Bazı laktik asit bakterileri iki farklı peptitlerden oluşmaktadır. Bu iki peptitte optimal bakterisidal aktivite için gerekli olmaktadır. İki peptitin genleri aynı operon içerisinde birbirlerine yakın bir şekilde lokalize olmuştur. Her iki peptit aynı operonda bulunan açık okuma çerçevelerince (ORF) kodlanmakta, transkribe edilmekte ve birlikte sentezlenmektedir. Sonuç olarak 2 peptitin sinerjitik etkisi genel olarak peptitleri tam aktif hale getirmekte, peptitler yalnızken aktivite gösterememekte veya aktiviteleri azalmaktadır. Çoğu yapılan çalışmada peptitlerin optimal kombinasyon oranının yaklaşık 1:1 olduğu söylenmiştir. Lactococcin G ilk olarak izole edilip, karakterize edilen ve sekanslanan iki peptitli bakteriyosindir (Nissen–Meyer *et al.* 1992). Her bir bakteriyosin için tamamlayıcı olan peptiti diğerini helikal yapılanmaya teşvik etmektedir (Hauge *et al.* 1998, 1999). Ampifilik α- heliksler hücre membranının geçirgenliğinde rol oynayan önemli yapısal motiflerdir. Bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında nonlantibiyotik iki peptitli bakteriyosinler 2. grup bakteriyosinlerin B bölümünde yer almaktadır. Bu sınıflandırmaya dahil edilen bakteriyosinlere örnek olarak; enterocin 1071, enterocin L50, lactococcin G, plantaricin EF, plantaricin JK ve plantaricin S gibi iki peptitli bakteriyosinler gösterilmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun üretmiş olduğu bakteriyosinin 2. jelde göstermiş olduğu 2 tane inhibisyon zonu muhtemelen CBB'yle boyanan 1. jeldeki 4.61 kDa'lık ve 6.68 kDa'lık moleküler büyüklüğe sahip bantlarla özdeşleştirilmektedir. Böylelikle *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin iki peptitli bakteriyosin olabileceği varsayılıp 4.61 kDa ve 6.68 kDa büyüklüğünde iki peptit tarafından sentezlendiği düşünülmektedir.



Şekil 4.7 (a) Coomassie Blue ile boyanmış SDS-PAGE jel I: Kuyucuk 1, Moleküler ağırlık standartı (NOVEX Mark 12, INVITROGEN). Kuyucuk 2; *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen proteinler (20µl) (b) PAGE jel II (biyoanaliz için): Antimikrobiyal aktiviteden hangi bant(lar)ın sorumlu olduğunun belirlenmesi için indikatör bakteriyle kaplanmış jel. Kuyucukta *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosin (20µl) yer almaktadır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gıdaların güvenliği açısından gıdada bulunması istenmeyen mikroorganizmaların gelişiminin önlenmesi gerekmektedir. Gıdalarda gelişen patojen mikroorganizmalar üzerinde antagonistik mikroorganizmaların ve bakteriyosin gibi metabolik ürünlerin etkili olması nedeniyle, gıda güvenliğinde bakteriyosin kullanımının önemi oldukça artmıştır (Kurt ve Zorba 2005). Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmaların önemli bir kısmı antimikrobiyal bileşenler üretmelerine rağmen, gıdaların biyokontrolünde laktik asit bakterilerinin ayrı bir önemi mevcuttur. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal peptitler veya bakteriyosinler potansiyel gıda biyopreservatifleri olarak ilgi görmektedir (Ray 1992c). Bu bakteriler fermentasyon teknolojisinin tipik bakterileri olup, gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. LAB hücreleri ve bu hücrelerden üretilmekte olan metabolitler fermente gıdalar yoluyla insanlar tarafından binlerce yıldır tüketilmektedir. Bakteriyosinlerin gıdalarda antimikrobiyal aktivitelerinin yanında, doğal olmaları, renksiz ve tatsız olmalarıda ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir. Peptit veya protein yapısında olan bakteriyosinler pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden ve mide salgılarından etkilenebilmektedir. Bu da insan vücüdunda bunların sindirilebileceklerini göstermektedir. Ayrıca bazı bakteriyosinlerin ısı stabilitelerinin olması (Grup II) yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliği sağlamaktadır (de Martinis *et al.* 2002, Delves-Broughton *et al.* 1996). Hatta bazı bakteriyosinler otoklavlama sıcaklığında bile stabil hallerini koruyabilmektedir. Dolayısıyla bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır.

Pediokoklar genellikle sosis ve turşu gibi fermente ürünlerden elde edilebilmektedir. Bunun yanı sıra, çeşitli sebzelerde safrofit olarak bulunabilen Gram-pozitif homofermentatif bir laktik asit bakteri grubu olarakta bilinmektedir. Endüstriyel açıdan pediokoklar sebze (Pederson 1949) ve etlerin (Smith and Palumbo 1981) fermentasyonunda da kullanılmaktadır. Pediokoklar inek işkembesi ve hindi dışkısınıyla birlikte çiğ sosis, taze balık ve çiğ kümes hayvanı etinden de elde edilmiştir (Ray 1994).

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen antibakteriyel etkiye sahip, protein ya da proteinle birlikte bazı prostetik gruplarda içerebilen metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Tagg *et al.* 1976, Klaenhammer 1993). Gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımına karar verilmeden önce bakteriyosinin antimikrobiyal etki spektrumu, biyokimyasal ve genetik karakteristikleri, gıda sistemlerindeki uyumluluğu ve düzenleyici içerikleri hakkında bilgi sahibi olunmalıdır. Üzerinde durulması gereken bir başka faktör ise, ekonomik açıdan gıdalarda bakteriyosin kullanmanın maliyeti olacaktır. Maliyeti azaltmanın en önemli yolarından birisi; bakteriyosin üretimi için en uygun ölçütleri belirlemektedir.

5.1 *Pediococcus acidilactici* PBF Tarafından Üretilen Pediosin PBF

Bu çalışmada *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından hücre dışına antimikrobiyal bir maddenin salgılandığı bulunmuştur. Salgılanan bu antimikrobiyal maddenin determinasyonunun pozitif olarak teyit edilmesinden önce bazı faktörlerin elimine edilmesi gerekliliği öngörülmüştür. *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin etkisinin organik asitlerden, hidrojen peroksitten ve bakteriyofajlardan kaynaklanmadığının gösterilmesi amacıyla sırasıyla; kültür süpernatant sıvısının pH'ı 7'ye ayarlanarak ortam nötralleştirilmiş, katalazla muamele edilmiş ve 95°C'de kaynatma işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu uygulamalar neticesinde antimikrobiyal aktivitenin bakteri tarafından üretilen metabolitten kaynaklandığı anlaşılmıştır.

Bakteriyosinlerin etkin bir biçimde ticari olarak kullanılabilmeleri üretimleri için gerekli olan gelişim parametrelerinin optimize edilmesini gerektirmektedir. Çalışmanın bu aşamasında gelişim sıcaklığı, inkubasyon zamanı ve kullanılan besiyeri gibi farklı parametrelerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen pediosin PBF bakteriyosininin üretimini aşamalı olarak nasıl etkilediği araştırılmıştır. Maksimum pediosin sentezinin maksimum biyokütle formasyonuyla ilişkili olduğu bilinmektedir. 4.0'ın altındaki düşük final pH'larında büyük bir hücre kütlesi görülmekle birlikte yüksek derecede pediosin üretimi gerçekleşmektedir. Yapılan deneyler neticesinde *Pediococcus acidilactici* PBF suşu maksimum oranda pediosin PBF üretimini pH'ın

3.75 civarında olduğu aralıkta gerçekleşmiştir. Bakteriyosinler ribozomlar tarafından sentezlenen proteinlerdir (Garneau *et al.*2002). Bu moleküller translasyondan sonra inaktif prepediosin öncüleri şeklinde bulunmaktadır. Ardından post-translasyonel kimyasal modifikasyonlar neticesinde aktif pediosin molekülüne dönüşüm söz konusudur. Düşük pH inaktif prepediosinin aktif pediosine dönüşmesinde hücre içi enzimatik post-translasyonel değişim için ve aktif moleküllerin hücreden ortama salgılanmasında önemli bir rol üstlenmektedir.

Bu çalışmada *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen aktif bakteriyosinin farklı besiyerinde üretimleri test edilmiştir. Bunlar içerisinde TGE, TGE buffer, MRS, BHI ve Ellikier sıvı besiyerleri yer almıştır.Pediosin PBF üretiminin maksimum olduğu pH'ın en düşük ve aktivite ünitesinin (AU/ml) en yüksek olduğu **TGE sıvı besiyeri maksimum aktiviteli besiyeri olarak belirlenmiştir.**

Diğer bir çalışmada TGE besi ortamında 35ºC'de gelişen *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun büyüme hızı, asit üretimi ve pediosin üretimi 24 saatlik zaman zarfında 2'şer saat aralıklarla ölçülmüştür. Büyüme hızının ve pediosin üretiminin en yüksek olduğu, final pH'ının ise en düşük olduğu **18. saat optimum inkubasyon zamanı olarak belirlenmiştir**.

Optimum gelişim sıcaklığının bulunmasında ise; bakteriyosin üretici suş olan *Pediococcus acidilactici* PBF 30ºC, 35ºC ve 40ºC olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta TGE sıvı besiyerinde 18 saat inkubasyona bırakılmıştır. Büyüme hızının (OD_{600}/ nm) en fazla olduğu, final pH'sının en düşük olduğu ve pediosin PBF üretiminin (AU/ml)'nin de en yüksek olduğu **35ºC optimum gelişim sıcaklığı olarak belirlenmiştir**.

Böylelikle suşun gelişip maksimum antimikrobiyal madde üretilebileceği zaman aralığı, sıcaklık ve besiyeri çalışmalara başlamadan önce tayin edilmiştir.

Pediococcus acidilactici PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin etkinliği fiziksel işlemler ve kimyasal maddelerle yapılan uygulamaların ardından korunmuştur. Fakat *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal metabolit

proteolitik enzimlerle test edildiğinde aktivitesinin kaybolduğu görülmüştür. Bu da üzerinde çalıştığımız antimikrobiyal bileşenin protein veya peptit yapısında olabileceğine işaret etmektedir. Bakteriyosinlerin protein yapısında olması ve proteolitik enzimlerle yapılan uygulamalarda da çalışılan antimikrobiyal maddenin aktivitesini kaybetmesi, elde edilen antimikrobiyal maddenin bakteriyosin tabiatında olabilme ihtimalini güçlendiren kanıtlar arasında yer almıştır. Örneğin, *Pediococcus pentasaceus* ST18 tarafından üretilip bozadan izole edilen anti-*listerial* pediocin ST18'in kültür süpernatantı da proteaz IV ve pronase E'leyle muamele edildiğinde tamamen inaktive olmaktadır (Todorov and Dicks 2004). Aynı şekilde, *Leuconostoc carnosum* OZ tarafından üretilen leucocin OZ proteolitik enzimlere karşı duyarlılık göstermektedir (Osmanağaoğlu 2005).

Lipaz ve organik çözücülerle yapılan işlemler *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesinde kayba neden olmamıştır. Lipazla muamele sonucu aktivitede bir değişim olmaması hücre dışına salgılanan bu antimikrobiyal maddenin yapısında lipit moleküllerinin olmadığını göstermektedir. Ayrıca, ribonükleaz ve lizozim gibi enzimlerle yapılan testlerin ardından antimikrobiyal etkinliğin değişmemesi bu maddenin saf protein yapısında olabileceğini desteklemektedir. *Pediococcus acidilactici* PBF'nin ürettiği antimikrobiyal madde bu özelliğini formaldehit, kloroform ve etanol gibi organik çözücülere karşı korumuştur. Üretilen antimikrobiyal madde 121°C'de 15 dk otoklavlama sıcaklığına maruz bırakıldıktan sonra da aktivitesini muhafaza etmiştir. Bu açıdan, leucocin OZ (Osmanağaoğlu 2005), plantaricin 423 (van Reenen *et al*. 1997), Bac21 (Iqbal *et al*. 1999), carnocin UI149 (Stoffels *et al.* 1992), pediocin PA-1 (Gonzalez and Kunka 1987), pediocin A (Daeschel and Klaenhammer 1985), lactacin B (Barefoot and Klaenhammer 1983), lactocin 27 (Upreti and Hinsdill 1975), nisin (Bailey and Hurst 1971) ve diplococcin (Davey and Richardson 1981) gibi diğer laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerle benzerlik göstermektedir. Çalışılan antimikrobiyal madde yüksek ısıl işlemden ve nispeten düşük pH'la muameleden sonra da aktif olarak kalabilmektedir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal metabolit otoklavlandıktan sonra pH: 3-9, 2 saat 25 °C'de inkubasyonun ardından pH: 3-10 ve 24 saat 25 °C'de inkubasyonun ardından pH: 3-9 aralığında biyolojik etkinliğini

korumaktadır. Asidik koşullarda bazik koşullara kıyasla daha fazla kararlılık göstermektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen; pediocin L50 (Cintas *et al.* 1995), pediocin ST18 (Todorov and Dicks 2004), leucocin OZ (Osmanağaoğlu 2005), pediocin PD-1 (Green *et al.* 1996), plantaricin 423 (van Reenen *et al*. 1997), enterocin EL1 (Lyon *et al.* 1995), Bac21 (Iqbal *et al*. 1999), carnocin UI149 (Stoffels *et al.* 1992), pediocin PA-1 (Gonzalez and Kunka 1987), pediocin A (Daeschel and Klaenhammer 1985), pediocin AcH (Bhunia *et al.* 1987), lactacin B (Barefoot and Klaenhammer 1983), lactocin 27 (Upreti and Hinsdill 1975), nisin (Bailey and Hurst 1971) ve diplococcin (Davey and Richardson 1981) gibi bakteriyosinler için tanımlanan pH aralıklarıyla *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde için elde edilen sonuç aralıkları benzerlik göstermektedir. Geniş pH aralığında bu metabolit tarafından gösterilen kararlılık onun gıda ürünlerinde antimikrobiyal madde olarak kullanılmasına katkıda bulunacaktır. 9 ve üzeri pH değerlerindeki alkaliye maruz kalmanın ardından moleküldeki etkinliğin azalması veya kaybolması muhtemelen antimikrobiyal aktivite için molekülün yapısında bulunan önemli 2.'cil yapıların varlığını ortaya koymaktadır. Alkali işlem neticesinde bu yapılar yıkılmakta ve böylelikle aktivitenin kaybolduğu gözlemlenmektedir.

Fermente sosis kaynaklı *Pediococcus acidilactici* PBF suşu gıdalarda yaygın olarak rastlanan pek çok laktik asit bakterisiyle birlikte gıda kökenli hastalıklara ve gıdalarda bozulmalara sebep olan birçok bakteriye karşı inhibisyon etkisi gösteren antimikrobiyal bir peptit üretmektedir. Bu üretilen peptit Gram negatif bakterilere (*Escherichia coli* RSKK 234 *Yersinia enterocolitica* ve *Salmonella enteritidis* GATA) ve *Candida albicans* RSKK 02007'ye karşı etkinlik gösterememiştir. Bu aktif maddenin sahip olduğu geniş aktivite skalası ve protein tabiatı (proteolitik enzimlerle inaktive olması molekülün protein yapısında olduğunu göstermektedir) bu aktif maddenin "bakteriyosin" olduğunu göstermektedir. *Pediococcus* spp. tarafından üretilen bakteriyosinlerin nispeten geniş bir etkinlik spektrumuna sahip olduğu görülmektedir (Bhunia *et al*. 1988, Daeschel and Klaenhammer 1985). Bu özellik pediocin PBF için de doğrulanmaktadır. Bu çalışmada denenen Gram pozitif bakterilerin pediocin PBF'ye karşı duyarlı olduğu test edilmiştir. Gıdalarda mevcut patojen özellik taşımayan fakat çoğu et ve süt ürünlerinin bozulmasına sebebiyet veren bakteriler arasında

Enterococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Lactococcus Pediococcus'a ait tür ve suşlar bulunmaktadır. Aynı zamanda *Clostridium botulinum, Bacillus subtilis, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes* gıdalarda mevcut patojen özellik gösteren türler arasında yer almaktadır. Gıda enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalar arasında *Listeria monocytogenes* oldukça önemli bir potansiyele sahiptir. Bunun sebebi ise +4°C'de (buzdolabı sıcaklığı) dahi *Listeria monocytogenes*'in hızla çoğalabilme özelliğini devam ettirmesidir. Böylelikle bakteri gıda kaynaklı enfeksiyonlar oluşturarak ciddi bir tehdit haline dönüşmektedir. Bakteriyosinler özellikle *Listeria monocytogenes* benzeri patojenler başta olmak üzere istenmeyen bakteriyel kontaminasyonun kontrol edilmesinde güvenli ve doğal bir yöntem sunmaktadır. Bakteriyosinlerin kullanımıyla bu tür patojenlerin sütte, ette ve diğer gıda maddelerinde gelişimi engellenip kontrol altında tutulması daha da kolaylaşacaktır. Dolayısıyla *Listeria monocytogenes* gibi gıda kökenli patojenlerin üremelerini engelleyen bakteriyosinlere (anti-listerial) ait çalışmalar ve bu bakteriyosinlerin gıda ürünlerinde bu patojenin gelişimini kontrol etmek amacıyla biyopreservatif olarak kullanımı gıda endüstrisi için özellikle cazip bir konuma gelmiştir. Fermente edilmiş et ürünlerinde sıklıkla bulunan stafilakokal türler gıda zehirlenmesine yol açmaktadır (Smith and Pintauro 1981). Bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri gıdaların muhafazasında potansiyel bir uygulamaya sahip olmalarından dolayı bakteriyosin türü maddelerin karakterizasyonu ve identifikasyonuna ait ilgi ve çalışmalar son yıllarda hızlı bir artış göstermektedir. Laktik asit üreten starter kültürler tarafından üretilen bakteriyosinler bazı doğal fermente gıda maddelerinde bulunduğu için gıdalara saflaştırılmış bakteriyosin ilavesi tüketici için herhangi bir risk taşımamaktadır. Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olan ve starter kültür olarak kullanılan *Pediococcus* tür ve suşları fermente ürünleri kontamine eden, gıda kökenli hastalıklara ve gıdalarda bozulmalara neden olan *Listeria, Staphylococcus* ve *Leuconostoc* tür ve suşlarının gelişimini kontrol altında tutabilmek için oldukça yarar sağlamaktadır. Birbirine coğrafi olarak uzak iki farklı turşu fabrikasından alınan *Pediococcus pentosaceus* FBB-61 ve L-7230'un (pediocin A üretirler) Gram-pozitif bakterilere karşı benzer inhibitör etki gösterdikleri gözlemlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada *Pediococcus pentosaceus* FBB-61'un *Bacillus cereus, Clostridium perfringens ve Staphylococcus aureus* türleri üzerinde antagonistik etkisi rapor

edilmiştir (Spelhaug and Harlender 1989). Aynı çalışmada 14 çeşit *Listeria monocytogenes*'te *Pediococcus pentosaceus* FBB-61 tarafından inhibe edilmiştir. Daeschel ve Klaenhammer'in yaptığı çalışmada (1985) pediocin A olarak adlandırılan *Pediococcus pentosaceus* FBB-61 ve L-7230 türleri tarafından üretilen antimikrobiyalin nisine benzeyen geniş bir aktivite spektrumu olduğu belirtilmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen pediocin PBF; pediocin A, pediocin AcH, pediocin PA-1 ve nisine (Hurst 1981) benzeyen geniş bir antimikrobiyal spektruma sahiptir.

Farklı araştırma gruplarının gerçekleştirdiği çalışmalarda suş tarafından üretilen bakteriyosinin duyarlı bakterilere karşı bakterisidal etkisini ölçmek için standart bir yöntem kullanılmaktadır (TGE katı besiyerine ekilen *Lactobacillus plantarum* NCDO955 indikatör bakterisine karşı AU/ml). *Pediococcus* suşları tarafından üretilen bakteriyosin preparasyonunun antimikrobiyal özelliklerini karşılaştırabilmek için tek analiz yöntemi kullanmak oldukça önemlidir, yani aynı indikatör suşun kullanılarak aynı yöntemle belirlenmiş AU değeri. Biswas ve arkadaşları (1991) tarafından önerilen yöntem kullanıldığında *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosin preparasyonunun aktivite ünitesi (AU) 30.000 AU/ml olarak belirlenmiştir. Bu değer oldukça aktif kabul edilse de pediocin AcH ile mukayese edildiğinde daha az aktif kabul edilmektedir (Bhunia *et al.* 1987).

Bakteriyosinlerin saflaştırılmasında kullanılan metotlar daha çok protein saflaştırılmasında da kullanılan metotlardır. Bakteriyosinler son derece heterojen madde grupları oluşturduklarından her bakteriyosin için özel saflaştırma protokolleri deneysel olarak tasarlanmaktadır. Bu nedenle sadece birkaç bakteriyosin homojenlik derecesinde saflaştırılmıştır. Hücre bağımsız kültürden bakteriyosin elde etmede amonyum sülfat çöktürmesi metotuna itimat edilmektedir. Fakat bu yöntemde üründen kazanç eldesi fazla olmayacaktır (Bhunia *et al*. 1988). Çünkü besiyerinde yer alan birçok proteinde saflaştırılmak istenen bakteriyosinle birlikte çökecek ve böylelikle spesifiklik azalacaktır. Yang ve arkadaşları (1992) laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin saflaştırılması için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem; Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin hücre yüzeyine tutunma veya hücre yüzeyinden salınmaları (bırakmaları) için gerekli olan pH değişim

prensibine dayanmaktadır. Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen nisin (Hurst 1981) ve pediocin AcH (Bhunia *et al.* 1991) için en uygun adsorpsiyonun olduğu pH değerleri rapor edilmiştir. Bu rapor Yang ve arkadaşlarının (1992) çalışmaları için temel teşkil etmektedir. Farklı pH aralıklarındaki maksimum adsorpsiyon her bakteriyosin için değişiklik göstermesine rağmen hücre yüzeyine maksimum adsopsiyon için ortalama olarak pH'ın 6.5 hücre yüzeyinden maksimum salınmada ise pH'ın 2.0 olduğu değer aralıkları kullanılmıştır. Bakteriyosin moleküllerinin kümeleşmesini ve dolayısıyla santrifügasyon sırasında ortadan kalkmasını engellemek için saflaştırma esnasında 0,1M NaCl ile işlem yapılmıştır. Burada Yang ve arkadaşları (1992) tarafından kullanılan metot yalnızca yüksek oranda ve oldukça saf şekillerde üretimi sağlamaz, aynı zamanda toplam kayıpta oldukça düşüktür. Gıda biyoprezervatifi olarak kullanılmak üzere laktik asit bakterilerinden elde edilen bakteriyosinlerden bol miktarda üretmek için tercih edilen bu yöntem en ekonomik yöntemler arasında yer almaktadır. Çalışmalarda izlenen saflaştırma prosedüründe pH değişimi prensibi baz alındığından biyolojik sistemlerden elde edilen farklı proteinlerin saflaştırılması için de bu protokol kullanılabilmektedir. Bu metotla hazırlanan kısmi saflaştırılmış pediocin PBF, moleküler ağırlığın tespiti için kullanılmıştır. Bhunia ve arkadaşları (1987) elde edilen bantların indikatör türe karşı inhibisyon bölgesi oluşturma özelliğinden yararlanarak SDS-PAGE jelinde pediocin AcH tarafından oluşturulmuş olan hangi bantın doğrudan antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğunu belirlemek için farklı bir prosedür geliştirmişlerdir.

Sodyum dodesil sülfatın (SDS) bulunduğu poliakrilamid jeldeki elektroforez protein alt birimlerini ayırmada faydalı bir araçtır. Bakteriyosin üretiminden sorumlu bantların moleküler ağırlıklarının belirlenmesi SDS-PAGE neticesinde sağlanmaktadır. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen kısmi olarak saflaştırılan bakteriyosin % 5'lik yükleme ve % 12'lik yürütme jel protokolüne göre analiz edilmiştir. Elektroforez işlemi bittikten sonra Coomassie Brilliant Blue ile boyanmış 20 µl miktarında kısmi olarak saflaştırılmış pediocin PBF örneği yüklenen jelde 6 ana protein bantına rastlanılmıştır. Gözlemlenen bantların moleküler ağırlıkları jelde bulunan protein markörden (NOVEX Mark 12, Invitrogen) faydalanarak sırasıyla; 4.61 kDa, 6.68 kDa, 8.08 kDa, 17.56 kDa, 51.20 kDa ve 59.21 kDa olarak hesaplanmıştır. CBB ile boyanan jelde görülen 6 banttan hangilerinin antimikrobiyal aktiviteden

sorumlu olduğunun belirlenmesi için *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 ile kaplanmış diğer jeldeki inhibisyon bölgelerinin CBB ile boyanan jeldeki bantların bulunduğu alanlarla lokalizasyon kıyaslaması yapılmıştır. Antimikrobiyal özelliği belirlemek için kullanılan biyoanaliz jelinde oluşan inhibisyon bölgeleri 4.61 kDa'lık moleküler ağırlığa sahip en alt ve onun bir üzerinde yer alan 6.68 kDa'lık moleküler ağırlığa sahip diğer bir banta karşılık gelmektedir. Bu değerler laktik asit bakterileri tarafından üretilen diğer bakteriyosinlerin bazıları için belirlenen aralıklardadır. Örneğin; 3 *Pediococcus* türü olan *Pediococcus acidilactici* NCIM 2292, *Pediococcus pentosaceus* NCIM 2296 ve *Pediococcus cerevisiae* NCIM 2171 türlerinin ürettikleri bakteriyosinlerin moleküler ağırlıkları 3.5 kDa ila 5.0 kDa arasında değişmektedir (Jamuna and Jeevaratnam 2004). *Pediococcus parvulus* 133 türü tarafından üretilen kısmi olarak saflaştırılmış bakteriyosinin moleküler ağırlığı 5.0 kDa olarak tahmin edilmektedir (Schneider *et al.* 2005). *Leunostoc carnosum* tarafından üretilen anti-listerial diğer bir bakteriyosin leucocin OZ'nin moleküler ağırlığıda 3.5 kDa olarak bulunmuştur (Osmanağaoğlu 2005). *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 tarafından üretilen antimikrobiyal bakterisidal bakteriyosin pediocin PD-1 yaklaşık olarak 3.5 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir (Green *et al.* 1996). Kısmi saflaştırılan *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen plantaricin 423'ün büyüklüğü trisin SDS-PAGE ile yaklaşık olarak 3.5 kDa olarak rapor edilmiştir (Van Reenen *et al.* 1997). *Enterococcus faecalis* RJ-11 türü tarafından üretilen enterocin RJ-11'in moleküler ağırlığı SDS-PAGE analizleri neticesinde 5.0 kDa olarak gösterilmiştir (Yamamoto *et al*. 2003). *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilen anti-listerial bakteriyosin mesentericin Y105'in SDS-PAGE'den sonra moleküler ağırlığı 2.5- 3.0 kDa aralığında tespit edilmiştir (Hechard *et al*. 1992). *Carnobacterium* sp.'den izole edilen ve saflaştırılan carnocin UI49 olarak adlandılan bakteriyosinin moleküler ağırlığı kütle spektrofotometresi kullanılarak 4.635 kDa olarak tespit edilmiştir (Stoffels *et al.* 1992). Amino asit kompozisyonu ve sekansı belirlenen pediocin AcH'ın moleküler ağırlığı 4.600 kDa olarak rapor edilmiştir (Motlagh *et al.* 1992a,b). *Pediococcus acidilactici* F tarafından üretilen pediocin F'in moleküler ağırlığı 4.460 kDa olarak hesaplanmıştır (Osmanağaoğlu *et al.* 1997). Saflaştırılmış *Pediococcus cinsi* bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler arasında şimdiye kadar moleküler ağırlığı en büyük olan pediocin A'dır. *Pediococcus*

pentasaceus FBB-61 suşu tarafından üretilen bu bakteriyosinin moleküler ağırlığı yaklaşık 70 kDa civarındadır. (Piva and Headon 1994).

Yapılan SDS-PAGE neticesinde *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen bakteriyosinlerin; küçük, sıcaklığa dayanıklı, yapısında lantiyonin ve farklı amino asitler içermeyen grup II bakteriyosinlere dahil olduğu söylenebilmektedir. Bununla beraber, elektroforez neticesinde biyoanaliz için kullanılan jelde iki tane inhibisyon zonuna rastlanılmıştır. Bu da üzerinde çalışılan *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun 2 peptitli bir bakteriyosin ürettiğini düşündürmüştür. Bu tür, grup II bakteriyosinlerin alt grubu olan IIb'de bulunmaktadır. Grup IIb'de bulunan bakteriyosinlerin en önemli özelliği aktiviteleri için iki peptit dizisinin aynı anda bulunması gerekliliğidir. Bu iki peptit dizisi bireysel olarak oldukça zayıf bir inhibisyon etkisi gösterdikleri halde birlikte olduklarında sinerjist bir etkileşim ile molekül çok daha aktif bir hal almaktadır (Fimland *et al.* 1996). İki peptitin genleri aynı operon içerisinde birbirine yakın bir şekilde lokalize olmuştur. Her iki peptit aynı operonda bulunan açık okuma çerçevelerince (ORF) kodlanmakta, transkribe edilmekte ve birlikte sentezlenmektedir. Çoğu yapılan çalışmada peptitlerin optimal kombinasyon oranının yaklaşık 1:1 olduğu söylenmektedir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun biyoanaliz jelinde göstermiş olduğu iki tane inhibisyon zonu muhtemelen CBB ile boyanan jeldeki 4.61 kDa ve 6.68 kDa'lık moleküler büyüklüğe sahip bantlarla özdeşleştirilmektedir. Böylelikle *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin iki peptitli bakteriyosin olduğu varsayılarak 4.61 kDa ve 6.68 kDa büyüklüğünde iki peptit tarafından sentezlendiği savunulmaktadır.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde lactococcin G'nin ilk olarak izole edilip, karakterize edilen ve sekanslanan iki peptitli bakteriyosin olduğu görülmektedir (Nissen-Meyer *et al*. 1992). Lactococcin G α ve β olarak adlandırılmak üzere iki peptit içermektedir. Lactococcin Gα, 4.346 kDa moleküler ağırlığa sahip olup 39 amino asit içermekte, lactococcin Gβ ise 4.110 kDa olup 35 amino asit içermektedir (Nissen-Meyer *et al.* 1992). Lactococcin G tarafından üretilen iki peptitli bakteriyosin nonlantibiyotik iki peptitli bakteriyosinler grubunda yer almaktadır. Bunun haricinde nonlantibiyotik iki peptitli başka bakteriyosinlerde bulunmaktadır.

Lactococcin MN, LcnM ve LcnN olmak üzere iki peptitten oluşmaktadır. Peptitler sırasıyla 48 ve 47 amino asite sahiptir (van Belkum *et al.* 1989).

Lactacin F, LafX ve Laf A olmak üzere iki peptitten oluşmaktadır. Peptitler sırasıyla; 48 ve 57 amino asit içermektedir (Allison *et al*. 1994).

Plantaricin S, *Lactobacillus plantarum* LPC010'dan izole edilmiş olup α ve β peptitlerinin 27 ve 26 amino asit içerdikleri rapor edilmiştir (Jimenez-Diaz *et al.* 1995).

Thermophilin 13, *Streptococcus thermophilus* SFi 13'ten izole edilmiştir. ThmA ve ThmB olarak adlandırılan iki peptiti sırasıyla; 5.776 kDa ve 3.910 kDa'lık moleküler ağırlığa sahiptir. Bu peptitlerin yapılarında 62 ve 43 amino asit bulunmaktadır (Marciset *et al.* 1997).

Brochocin-C, *Brochothrix campestris* ATTCC 43754 suşu tarafından üretilen ısı-stabil bir bakteriyosin olup Brc-A ve Brc-B gibi iki peptitten oluşmaktadır. Bunların sırasıyla; 5.243 kDa 59 amino asit ve 3.945 kDa 43 amino asitten oluştuğu rapor edilmiştir (McCormick *et al.* 1998).

Plantaricin EF, *Lactobacillus plantarum* C-11'den izole edilmiştir. Plantaricin A'nın keşfinden sonra aynı organizmadan farklı altı bakteriyosin daha izole edilmiştir. Bunların arasından E ve F peptitler sinerjitik olarak kombine olmuşlardır. Peptitlerin uzunlukları sırasıyla; 33 ve 34 amino asit olup diğer plantaricin bakteriyosinleriyle çok az bir sekans benzerliği göstermektedirler (Anderssen *et al*. 1998, Moll *et al*. 1999).

Plantaricin JK'da *Lactobacillus plantarum* C-11'den izole edilmiş iki peptitli bir bakteriyosindir. Yapısında 25 ve 32 amino asit içeren Pln J ve Pln K peptitlerini bulundurmaktadır (Anderssen *et al*. 1998, Moll *et al*. 1999).

Enterocin L50, *Enterococcus faecium* L50 suşu tarafından üretilmekte olup enterocin L50A ve enterocin L50B olmak üzere iki peptitten oluşmaktadır. Bu peptitler sırasıyla

44 ve 43 amino asit içermektedir. İki peptit % 72'lik sekans homolojisine sahiptir (Cintas *et al.* 1998, 2000).

Enterocin 1071, *Enterococcus feacalis* BFE 1071 suşu tarafından üretilmekte olup enterocin1071A ve enterocin1071B olmak üzere iki peptitten oluşmaktadır. Bu peptitler sırasıyla; 4.285 kDa ve 3.899 kDa olup 39 ve 34 amino asit içermektedirler (Balla *et al*. 2000).

Lactobacillus casei CRL 505 tarafından üretilen iki peptitli bakteriyosin lactocin 705 olarak isimlendirilmiştir. Bu bakteriyosin 705-α ve 705-β olarak tasarlanmış iki preptitten oluşmaktadır. Peptitler sırasıyla; 33 ve 34 amino asit içermektedir (Cuozzo *et al.* 2000).

Mutacin IV yeni iki peptitli bakteriyosini *Streptococcus mutans* UA140'tan izole edilmiştir. Bu peptitlerin hem kütle spektrometresiyle büyüklüğü saptanmış hem de kısmi sekansı belirlenmiştir. Tek operondaki iki gen tarafından kodlanan peptitler başarıyla gösterilmişlerdir. NlmA ve NlmB olarak adlandırılan peptitler sırasıyla; 4.169 kDa ve 4.826 kDa'lık moleküler ağırlığa sahiptir. Yapılarında 44 ve 49 amino asit bulunmaktadır (Qi *et al.* 2001).

Lactobacillus salivarius subsp. salivarius UCC118 suşu tarafından üretilen ABP-118, α ve β olarak tasarlanmış iki peptitli bakteriyosinler 4.097 kDa moleküler ağırlıkta olup 45 ve 46 amino asit içeren peptitler tarafından üretilmektedir (Flynn *et al.* 2002).

Bununla birlikte lantiyonin amino asitleri yapısında bulunduran lantiyonin iki peptitli bakteriyosinlerde mevcuttur. Cytolysin (Booth *et al.* 1996), lacticin 3147 (Ryan *et al.* 1999), plantaricin W (Holo *et al.* 2001) ve staphylococcin C55 (Navaratna *et al.* 1998) bu örnekler arasında yer almaktadır.

Lactobacillus acidophilus JCM 1132 tarafından üretilen iki komponentli ısı stabil bakteriyosin acidocin J1132 olarak isimlendirilmiş olup dar bir etki spektrumuna sahiptir. İki peptitten oluşan acidocin J1132'nin peptitleri sırasıyla α ve β olarak ifade

edilmiştir. Bu peptitler; 6.220 kDa ve 6.280 kDa'lık moleküler ağırlığa sahiptir (Tahara *et al.* 1996).

Lactobacillus amylovorus LMG P-13139 suşu tarafından iki bakterisidal etki gösteren peptitin üretildiği rapor edilmiştir. Bu peptitlerin moleküler ağırlıkları denature edilmiş SDS-PAGE'e bağlı kalınarak sırasıyla 4.5 kDa ve 6.0 kDa olarak bulunmuştur. 4.5 kDa'lık moleküler ağırlığa sahip olan peptit saflaştırılıp karakterize edilmiş ve lactobin A olarak dizaynlanmıştır (Contreras *et al.* 1997).

Yeni bir kültür olan *Leuconostoc carnosum* 4010 vakumla paketlenmiş etlerde tanımlanan bir biyokoruyucudur. *Leuconostoc carnosum* et ürünleri üzerinde istenmeyen hiçbir aroma bileşeni üretmemesinden ve güçlü bir anti-listerial aktiviteye sahip olmasından ötürü çoğu zaman biyokoruyucu olarak tercih edilmektedir. Bu nedenle *Leuconostoc carnosum* 4010 tarafından üretilen bakteriyosin üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. Saflaştırılan bakteriyosinin SDS-PAGE analizleri sonucunda inhibitör aktiviteden sorumlu moleküler ağırlıkları 4.6 kDA ve 5.3 kDa olan iki bantın varlığıyla karşılaşılmıştır. N-terminal amino asit sekansı üretilen bakteriyosinlerin yüksek oranda leucocin C ve leucocin A ile benzerlik gösterdiğini rapor etmiştir (Budde *et al.* 2002).

Yeni iki peptitli bakteriyosin plantaricin NC8 olarak adlandırılmış ve *Lactobacillus plantarum* NC8 suşundan izole edilmiştir. İki peptitten oluşan plantaricin NC8'in peptitleri sırasıyla α ve β olarak ifade edilmiştir. PLNC α 3.587 kDa olup 28 asit içermekte, PLNC β ise 4.000 kDa olup 34 asit asit içermektedir (Maldonado *et al.* 2003).

Pediococcus pentosaceus ST18'den izole edilen bakteriyosin pediocin ST18 adını almıştır. Bu bakteriyosini saflaştırmak için yapılan işlemler neticesinde HPLC uygulaması esnasında farklı dakikalarda iki tane antimikrobiyal aktivite gösteren pig rapor edilmiştir. Bu da pediocin ST18'in iki peptitli bakteriyosin olabileceğini ileri sürmektedir (Todorov and Dicks 2004).

Topraktan izole edilen *Enterococcus durans* L28-1 tarafından üretilen durancin L28-1A kısmi olarak saflaştırılıp Trisin-SDS-PAGE işlemine tabi tutulduktan sonra 2.5 kDa'lık ve 3.4 kDa'lık iki spesifik banta antibakteriyel aktivite gözlemlendiği rapor edilmiştir (Yanagida *et al*. 2005).

Lactococcus lactis Q4 bakteriyosin üreten bir tür olup mısırdan izole edilmiştir. Ürettiği bakteriyosin lactococcin Q olarak adlandırılmış ve geniş aralıkta Gram-pozitif indikatör türler arasında sadece *Lactococcus lactis* türlerine karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. İki peptitten oluşan lactococcin Q'nun peptitleri sırasıyla α ve β olarak adlandırılmıştır. Moleküler ağırlıkları 4.260kDa ve 4.018 kDa olarak rapor edilmiştir. Yeni bulunan iki peptitli bakteriyosinin amino asit ve DNA sekans analizleri enterocin 1071 ve özellikle lactococcin G ile homolog olduğunu göstermektedir (Zendo *et al.* 2006).

Enterococcus durans'tan izole edilen bir başka iki peptitli bakteriyosinde enterocin A5-11 olarak adlandırılmıştır. Bu antimikrobiyal ajan saflaştırıldıktan sonra SDS-PAGE analizine tabi tutulmuştur. SDS-PAGE'de antimikrobiyal aktivitenin yaklaşık olarak 3.5 kDa ve 6.5 kDa moleküler ağırlıktaki bantlar arasında gözlemlendiği belirlenmiştir. Daha sonradan yapılan kütle spektrometre analizlerinde enterocin A5-11A ve enterocin A5-11B olarak adlandırılan iki peptitli bakteriyosinin moleküler ağırlığı sırasıyla; 5.206 kDa ve 5.218 kDa olarak rapor edilmiştir. Yapılan amino asit sekans çalışmaları bu iki peptitin farklı olduklarını göstermiştir (Batdorj *et al*. 2006).

Çalışmada kullanılan *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen pediocin PBF'ninde elde edilen araştırma bulguları neticesinde yeni bir iki peptitli bakteriyosin olabileceği savunulmaktadır. Elde edilen bulguların daha fazla geçerlilik kazanabilmesi için HPLC analizleriyle desteklenmesi düşünülebilmektedir. Bunun yanısıar SDS-PAGE yöntemiyle molekül büyüklüğünü belirlemeye yönelik çalışmalar kütle spektroskopisi yöntemiyle yapılarak daha net ve kesin sonuçlar alınmaktadır. Bakteriyosin analizleri yapılarında bulunan amino asitlerin sekanslarının belirlenmesine kadar sürdürülmelidir. Ayrıca antimikrobiyal aktiviteden sorumlu bantlar jel üzerinden kesilerek membrana aktarılıp blotlama işlemi yapılması ve Edman degradasyonu

arayıcılığıyla N-terminal amino asit analizleri gerçekleştirildikten sonra mevcut protein sekans verileri sağlanması bulguları daha da destekleyici nitelikte olacaktır. Böylelikle yeni üretilen bakteriyosinin kimyasal ve genetik benzerlikleri kendinden önce rapor edilen bakteriyosinlerle kıyaslanmış olacaktır. Eğer yeni bir bakteriyosin elde edildiği düşünülüyorsa; üretici suşun 16S rRNA analizi yapılarak tür düzeyinde teşhislerin ortaya konması gelecek için yapılacak bakteriyosin çalışmalarında, gıda sanayinde starter kültür olarak kullanım olanağı bulabilecek kültürlerin elde edilmesinde ve probiyotik mikroorganizmaların elde edilmesine yönelik çalışmalarda büyük bir adım atılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Alegre, M.T., Rodríguez, M.C.and Mesas, J.M. 2009. Characterization of pRS5: A theta- type plasmid found in a strain of *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine that can be used to generate cloning vectors for lactic acid bacteria. Plasmid, 61(2);130-134.

Allison, G.E., Fremaux, C.and Klaenhammer, T.R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptites encoded within the lactacin F operon. Journal of bacteriology, 176; 2235-2241.

Anderssen, E.L., Diep, B.D., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H. and Nissen-Meyer, N. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new peptite bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Applied and Environmental Microbiology, 64; 2269-2272.

Andersson, R.E., Daeschel, M.A.and Hasson, H.M. 1988. Antibacterial activity of plantaricin SIK 83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Biochimie, 70; 381-390.

Ariyapitipun, T., Mustapha, A. and Clarke, A.D. 1999. Microbial shelf-life determination of vacuum-packaged fresh beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin solutions. Journal of Food Protection, 62(8); 913-920.

Atrih, A., Rekhif, N., Milliere, J.B. and Levebvre, G. 1993. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. Canadian Journal of Microbiology, 39; 1173–1179.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology, lactic acid bacteria. Microbiology and Functional Aspects, 1-73.

Bacus, J.N. and Brown, W.L. 1981. Use of microbial culture; meat products. Food Technology, 35(1); 74-8.

Bailey, F.J. and Hurst, A. 1971. Preparation of an high active form of nisin from *Streptococcus lactis*. Canadian Journal of Microbiology, 17;61-67.

Balla, E., Dicks, L.M.T., Du Toit, M., Van Der Merwe, M.J.and Holzapfel, W.H. 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B two antimicrobial peptites produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. Applied and Environmental Microbiology, 66; 1298-1304.

Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of lactocin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 45; 1808-1815.

Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin B. Antimicrobial agents and chemotherapy, 26; 328-334.

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

Bayoumi, S. 1991. Nisin and yoghurt manufacture. Chemical Microbiology Technology Lebensmittel, 13; 65-69.

Berry, E.D., Liewen, M.B. Mandigo, R.W. and Hutkins, R.W. 1990. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausages. Journal of Food Protection, 54; 194-197.

Berry, E.D., Hutkins, R.W. and Mandigo, R.W. 1991. The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control post processing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. Journal of Food Protection, 54; 681-686.

Bhowmilk, T. and Marth, E.H. 1989. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. Journal of Dairy Science, 73; 859-66.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptite of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. Journal of Industrial Microbiology, 2; 319–322.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology, 65; 261-268.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacteria strains. Journal of Applied Bacteriology, 70; 25–33.

Bierbaum, G. 1999. Antibiotische Peptite-Lantibiotica. Hemoterapie Journal., 8. Jahrgang 6; 204-209, Bonn.

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

Booth, M.C.,Bogie, C.P., Sahl,H.G., Siezen, R.J., Hatter, K.L.and Gilmore, M.S. 1996. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lanthibiotic. Molecular Microbiology, 21; 1175-1184.

Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.L., Delboni, R.R. and Oliveira, J. 2004. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and ITS spectrum of inhibitory activity. Brazillian Journal of Microbiology, 35; 137-144.

Buchman, G.W., Banerjee, S., and Hansen, J.N. 1988. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor nisin, a small protein antibiotic. Journal of Biological Chemistry, 263; 260- 266.

Budde, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V.and Koch, A.G. 2002. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. International Journal of Food Microbiology, 83; 171-184.

Callewaert, R., Holo, H., Devreese, B., Beeumen, J.V. and Vuyst, L.D. 1999. Characterization and production amylovorin amylovorus DCE 471 by a novel three-step method. Microbiology, 145; 2559-2568.

Caseus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. and Holo, H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiology, 143; 2287- 2294.

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

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chinkindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71; 1-20.

Cintas, L.M., Rodriguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F, Hernandez, P.E. and Holo, H. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. Applied and Environmental Microbiology, 61**;** 2643-2648.

Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., and Haverstein, L.S. 1998. Enterocins L5OA and L50B, two novel bacteriocins from Enterococcus faecium L50, are related to staphylococcal hemolysis. Journal of Bacteriology, 180; 1988-1994.

Cintas, L.M., Casaus, P., Herraz, C., Haverstein, L.S., Helge, H., Harnandez, P. and Nes, I.F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N- terminal extension termed enterocin Q. Journal of Bacteriology, 182; 6806-6814.

Cogan, T.M. 1996. History and taxonomy of starter cultures in dairy starter cultures. Wiley-VCH Inc, 1-25.

Cogan, T.M. and Hill, C. 1993. Cheese starter cultures. In: P.F. Fox, Editor, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (2nd ed.), Chapman & Hall, London. pp. 193–255.

Collins, M.D., Williams, A.M. and Wallbanks, S. 1990. The phylogency of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rDNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* generation novel. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters, 70; 255-62.

Collins, M.D., Rodrigues, U.M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E.and Martinez-Murcia, A.1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters, 77; 5-12.

Contreras, B.G.L., De Vuyst, L., Devreese, B., Busanyova, K., Raymaeckers, J., Bosman, F., Sablon, E. and Vandamme, E.J. 1997. Isolation, purification and amino acid sequence of Lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovous* LMG P-13139. Applied and Environmental Microbiology, 37; 13-20.

Coma, V., Sebti, I., Pardon, P., Deschamps, A. and Pichavant, F.H. 2001. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. Laboratorie de Chimie des Substances, Bordeaux I, Talence.

Cuesta, M.C.M., Kok, J., Herranz, E., Plaez, C., Requena, T. and Buist, G. 2000. Requirement of autolytic activity for bacteriocin induced lysis. Applied and Environmental Microbiology, 69; 3174- 3179.

Cuozzo, S.A., Sesma, F., Palacios, J.M., de Ruiz Holgado, A.P.and Raya, R.R. 2000. Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705 atwo peptite bactericin from *Lactobacillus casei* CRL 705. FEMS Microbiology Letters, 185; 157-161.

Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J. and Lacroıx, C. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Applied and Environmental Microbiology, 57; 3450- 3455.

Daeschel, M.A., and Klaenhammer, T.R. 1985. Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Applied and Environmental Microbiology, 50; 1538-1541.

Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technology, 43;164-167.

Daeschel, M.A., McKenney, M.C. and McDonald, L.C. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C11. Food Microbiology, 7; 91–98.

Davey, G.P. and Richardson, B.C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. Applied and Environmental Microbiology, 41; 84-89.

De Klerk, H.C. and Smit, J.A. 1967. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. Journal of General Microbiology, 48; 309-316.

De Martinis, E.C.P., Alves, V.F. and Franco, B.D.G.M. 2002. Fundamentals and perspectives for use of bacterocins produced by lactic acid bacteria in meat products. Food Review International, 18(2-3); 191-208.

De vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1991. Microbial manipulation of nisin biosynthesis and fermentation. Nisin and novel lanthibiotics. ed. Jung, G. and Sahl, H.G., ESCOM Science Publishers, 397-409, Leiden , The Netherland.

De vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis subsp.lactis* batch fermentations. Journal of General Microbiology, 138; 571-578.

De Vuyst, L., and Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. ed. De Vuyst, L. and Vandamme, E.J, Blackie academic and Professional, 91-142, London.

De Vuyst, L. and Callewaert, R.I. 1999. Expanded bed adsorption as a unique unit operation for the isolation of bacteriocins from fermentation media. Biopreservation, 8; 159-168.

Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torrani, S. 1995. The genus *Leuconoctoc*. The Genera of Lactic Acid Bacteria, Volume 2; 235-279.

Delves-Broughton, J. 1990a. Nisin and its application as a food preservative. Journal of the Society of Dairy Technology, 43(3); 73-76.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek, 69; 193-202.

Diep, D.B., Havarstein, L.S., Nissen-Meyer, J. and Nes, I.F. 1994. The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. Applied and Environmental Microbiology, 60; 160–166.

Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A. and Piard, J.C. 2001. Design of a protein targeting system for lactic acid bacteria. Journal of Bacteriology, 183; 4157-4166.

Dobrzanski, W.T., Bardowski, J., Kozak, W. and Zajdel, J.K. 1982. Lactostrepcins. Bacteriocin of lactic streptococci. In: Microbiology. ed. Schlessinger, D., American Society for Microbiology, 225-229 ,Washington DC.

Doming, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus spp*. 2.pheno- and genotypic criteria. International Journal of Food Microbiology, 88; 165-188.

Drinan, D.F.,Tobin, S. and Cogan, T.M. 1976. Citric acid metabolism in hetero and homofermantative lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 31(14); 481-486.

Eaton, D. and Klaassen, E.D. 1996. Cassaret & Doull's Toxicology. 5. Baskı 2. Bölüm sayfa 13, McGraw Hill, 1111 s. New York.

Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, H.P., Brurberg, M.B. and Nes, I.F. 1998. Comparative Studies of Class IIa Bacterocins of Lactic Acid Bacteria. Applied and Environmental Microbiology, September 1998; 3275- 3281.

Engelke, G., Gutowski Eckel, Z., Hammelmann, M. and Entain, K.D. 1992. Biosynthesis of the lanthibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the Nis B protein. Applied and Environmental Microbiology, 58; 3739- 3743.

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87; 705-716.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews, 24; 85-106.

Etchells, J.L., Costilow, R.N., Anderson, T.E. and Bell, T.A. 1964. Pure culture fermentation of brined cucumbers. Applied Microbiology, 12; 523-535.

Felix, J.V., Papathanasopoulos, M.A., Smith, A.A., Von Holy, A. and Hastings, J.W. 1994. Characterization of leucocin B-Ya11a: a bacteriocin from *Leuconastoc carnosum* Ta11a isolated meat. Current Microbiology, 29; 207- 212.

Fimland, G. I., Blingsmo, O. R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I. F. and Nissen-Meyer, J. 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin like bacteriocin the C-terminal region is important for determing specificity. Applied and Environmental Microbiology, 62; 3313-3318.

Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L. and Jimenez-Diaz, R. 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from Enterococcus faecium 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. Applied and Environmental Microbiology, 64; 4883-4890.

Flynn, S., van Sinderen, D., Thornton, G.M., Holo, H., Nes, I.F., Collins, J.K. 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118 anovel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. Microbiology, 148; 973-984.

Fricourt, B.V., Barefoot, S.F., Testin, R.F. and Hayasaka, S.S. 1994. Detection and activity of plantaricin F, an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. Journal of Food Protection, 57; 698–702.

Ganzle, G.M., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G. and Hammes, W.P. 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. Applied and Environmental Microbiology, 66; 4325-4333.

Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas, J.C. 2002. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie, 84; 577-592.

Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T. and Monfort, J.M. 1993. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. Journal of Applied Bacteriology, 75; 142–148.

Garvie, E.I 1986. Genus *Pediococcus* Claussen 1903. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, ed. Sneath, P.H. A., Vol. 2, Williams and Wilkins, 1075-1079, Baltimore.

Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. 1983. Potential of lactic Streptococci to produce bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology, 45; 205-211.

Geisen, R., Lück, E.K. and Kröckel, L. 1992. Starter and protective cultures for meat and meat products. Fleischwirt, 72; 894-898.

Gherna, R. and Pienta, P.1989. American Type Culture Collection: Catalogue of Bacteria and Phages, 17th edition American Type culture collection, s.158, Rockville.

Gilliland, S.E. 1986. Bacterial starter cultures for foods. CRC Press Inc., Boca Raton, 205, Florida.

Gonzales, C. F., and Kunka, B.S. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici.* Applied and Environmental Microbiology, 53; 2534-2538.

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

Gorris, G.M.L. 1996. Bacteriocins: Potential Applications In Food Preservation. Food preservation by combined processes. Final Report Flair. Concerted Action No:7 Subgroup B.

Graham, D.C. and McKay, L.L. 1985. Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus.* Applied and Environmental Microbiology, 50; 532-534.

Gratia, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. Comptes rendus des seances de la socıete de bıologıe et de ses fılıales, 93; 1040-1042.

Gratia, A. 1946. Techniques selectives pour la recherche sytematique des germes antibiotiques. Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie, 40; 433-6, Paris.

Gratia, A. and Fredericq, P. 1946. Diversité des souches antibiotiques de *E. coli* et étendue variable de leur champs d'action. Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie, 140; 1032-1033.

Green, G., Dicks, L.M.T., Bruggeman, G., Vandamme, E.J. and Chikindas, M.L. 1996. Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptite from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. Journal of Applied Microbiology, 83; 127-132.

Hanlin, M.B., Kalchayanand, N., Ray, P. and Ray, B. 1993 Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria in combination have greater antibacterial activity. Journal of Food Protection, 56; 252-255.

Hammes, W.P., Bantleon, A. and Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews, 87; 165-174.

Hammes, W.P. and Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus.* The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol 2; 19-55.

Hansen, J.N. 1994. Nisin as a model food preservative. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34(1); 69-93.

Harding, C.D. and Shaw, B.G.1990. Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against related species and *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Bacteriology, 69; 648- 654.

Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. and Klaenhammer, T.R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 52; 384- 387.

Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. 1991b. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. Journal of Bacteriology, 173; 7491–7500.

Hastings, J.W., Stiles, M.E. and Von Holy, A. 1994. Bacteriocins of *Leuconostoc* isolated from meat. İnternational Journal of Food Microbiology, 24; 75- 81.

Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F. and Eijsink, V.G.H. 1998. Amphiphilic alpha-helices are important structural motifs and beta peptites that constitude the bacteriocin lactococcin G: Enhancement of helix formation upon alpha-beta interaction. European Journal of Biochemistry, 251; 565-572.

Hauge, H.H., Mantzilas, D., Eijsink V.G.H. and Nissen-Meyer J. 1999. Membran – mimicking entities induce structuring of the two peptite bacteriocins plantaricin E/F and J/K. Journal of Bacteriology, 181; 740-747.

Hechard, Y., Derijard, B., Lettelier, F. and Cenatiempo, Y. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. Journal of General Microbiology, 138; 2725-2731.

Hechard, Y. and Sahl, H.G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. Biochimie, 84; 545-557.

Henderson, J.T., Chopko, A.L. and Van Wasserman, P.D. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Archives of Biochemistry and Biophysics, 295; 5-12.

Henning, S., Metz, R. and Hammes, W.P. 1986. Studies on the mode of action of nisin. International Journal of Food Microbiology, 3; 121-134.

Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S., Aukrust, T. and Blom, H. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. Journal of General Microbiology, 138; 2715–2720.

Holo, H., Nilssen, Ø. and Nes, I.F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococccus lactis subsp. cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. Journal of Bacteriology, 173; 3879-3887.

Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. and Nes, I. 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-component lantibiotics. Microbiology, 147: 643-651

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, 9. Edition, USA.

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

Hoover, D.G., Walsh, P.M., Kolaetis, K.M. and Daly, M.M. 1988. A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with a 5.5 megadalton plasmid. Journal of Food Protection, 51; 29-31.

Hoover, D.G., Dishert, K.J. and Hermes, K.A.1989. Antagonistic effect of *Pediococcus* species against *Listeria monocytogenes.* Food Biotechnology 3: 183-189.

Hoover, D.G. and Steenson, L.R. 1993. Bacterocins of lactic acid bacteria. Academic Press Inc, San Diego, CA.

Horn, N., Fernandez, A., Dodd, H.M., Gasson, M.J. and Rodriguez, J. 2004. Nisin – controlled production of pediocin PA-1 and colisin V in nisin and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. Applied and Environmental Microbiology, 70; 5030-5032.

Hurst, A. 1981. Nisin. Advances in Applied Microbiology, 27; 85-103.

Iqbal, A., Ahmed, S., Alı, S.A. and Rasool, S.A. 1999. Isolation and partial characterization of Bac21: A plasmid- associated bacteriocin-like inhibitory substance from *Staphylococcus aureus* AB201. Journal of Basic Microbiology, 39; 325-336.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiology Reviews, 59; 171-200.

Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. and Wollman, E. 1953. Définition de quelques termes relatifs a la lysogénie. Annales De l' Institut pasteur, 84; 222-224.

Jamuna, M. and Jeevaratnam, K. 2004. Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. Applied Microbiology and Biotechnology, 65; 433-439.

Jimenez-Diaz, R., Piard, J.C., Ruiz-Barba, J.L. and Desmazeaud, M.J. 1990. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. Third symposium on lactic acid bacteria. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews, 87; 91.

Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz- Barba, J.L. and Piard, J.C. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 59; 1416–1424.

Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L. and Cathcart, D.P. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptites. Applied and Environmental Microbiology, 61; 4459–4463.

Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. Journal of Bacteriology, 167; 439-446.

Johnson, M.C., Hanlin, M.B. and Ray, B. 1992. Low pH and lactate are necessary for conversion of prepediocin to pediocin AcH in *pediococcus acidilactici H*. Abstract of Annual Meeting of American Society for Microbiology, New Orleans, LA, May 26-30 (Abstract 081).

Juven, B.J., Meinersmann, R.J. and Stern, N.J., 1991. Antagonistic effects of Lactobacilli and Pediococci to control intestinal colonization by human entero-pathogens in live poultry. Journal of Applied Bacteriology, 70; 95-103.

Kalchayanand, N., Ray, B., Field, R.A. and Johnson, M.C. 1989. Spoilage of vacuum-packaged refrigerated beef by *Clostridium*. Journal of Food Protection, 52; 424-426.

Kalchayanand, N. 1990. Extension of shelf-life of vacuum-packaged refrigerated fresh beef by bacteriocins of lactic acid bacteria. Doctor of Philosophy (PhD) Thesis, University of Wyoming, Laramie, WY.

Kaletta, C. and Entian, K.D. 1989. Nisin, a peptite antibiotic: cloning and sequencing of the nisA gene and posttranslation processing of its peptite product. Journal of Bacteriology, 171; 1587-1601.

Kanatani, K., Tahara, T., Yoshida, K., Yamada, K., Miura, H., Sakamoto, M. and Oshimura, M. 1992. Inhibition of hiochi-bacteria by nisin. Journal of Fermentation and Bioengineering, 74(3); 194-195.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. In Bergey's manuel. Regular Non-Sporing Gram positive Rods. Williams and Wilkins Publishers, Volume 2; 1209-1234, Baltimore.

Kato, T., Matsuda, T. and Ogawa, E. 1994. Plantaricin 149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. Journal of Fermentation and Bioengineering, 77; 277–282.

Kaur, B., and Balgir, P. P. 2007. Pediocin CP2 gene localization to plasmid PCP289 of *Pediococcus acidilactici* MTCC 5101. The internet Journal of Microbiology, Volume 3; number 2.

Kekessy, D.A. and Piguet, J.D. 1970. New metot for detection bacteriocin production. Applied Microbiology, 20; 282-3.

Kim, W.J., Ray, B. and Johnson, M.C.1992. Plasmid transfers by conjugation and electroporation in *Pediococcus acidilactici.* Journal of Applied Bacteriology, 72; 201-207.

Kitahara, K. 1974. Genus *Pediococcus Balcke* 1884, 247. In Bergey's Manual of Determinenative Bacteriology, ed. Buchanan, R.E. and Gibbons N.E. 8th edition. Williams and Wilkins, 513-15, Baltimore.

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie, 70; 337-349.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews, 12; 39-86.

Klaenhammer, T.R., Ahn, C., Fremaux, C. and Milton, K. 1995. Moleculer properties of *Lactobacillus* bacteriocins. Bacteriocins, microcins and lantibiotics, NATO ASI Series, Volume H 65; 37-58.

Kneifel, W., Jaros, D. and Erhard, F. 1999. Microflora and acidification properties of yoghurt and yoghurt related products fermented with commercially available starter cultures. International Journal of Food Microbiology, 18; 179-189.

Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. and Topisirovic, L. 1991. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacitilactis* S50. Applied and Environmental Microbiology, 57(6); 1835-1837.

Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, W.T. 1977. Lactostrepcin-a bacteriocin produced by *Streptococcus lactis.* Bulletin de Academie Polonaise des Sciences, 25; 217-221.

Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., De Vos, W.M. and Siezen, R.J. 1993. Biosynthesis and secretion of a precursor of nisin Z by *Lactococcus lactis* directed by the leader peptite of the homologous lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis*. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Letters, 330; 23-27.

Kurt, Ş. ve Zorba, Ö. 2005. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. Yüzüncüyıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 16; 77-83.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227; 680-685.

Laukova, A. and Czikkova, S. 1998. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. Letters in Applied Microbiology, 26; 215-218.

Liepe, H.V. 1983. Starter cultures in meat production. In Biotechnology ed. Reed, G. Volume 5; 40 & 424, Weinheim: Verlag Chemie.

Liu, W. and Hansen, J.N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactocoocus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 56(8); 2551-2558.

Lozano, J.C.N., Meyer, J.N., Sletten, K., Pelaz, K. and Nes, I.F.1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici.* Journal of General Microbiology, 138; 1985-90.

Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbayer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludwigsen, A., Wallner, G., Bachleitner, M., Fischer, U. and Scheleifer, K.H. 1993. Phylogenetic relationships of bacteria. Antonie Van Leuwenhoek, 64; 285-304.

Lyon, W.J., Olson, D.G. and Murano, E.A. 1995. Isolation and purification of Enterocin EL1, a bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecium*. Journal of Food Protection, 58(8); 890-898.

Magdoub, M.N.I., Shehata, A.E., El-Samragy, Y.A. and Hassan, A.A. 1984. Interaction of heat shock, manganese, L-alanine, B-alanine and nisin in spore germination of some psychrotrophic *Bacillus* strains in milk. Milchwissenschaft, 39(3); 159-162.

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L. and Jime´nez-Díaz, R. 2003. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8 a novel coculture-inducible two peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. Applied and Environmental Microbiology, 69(1); 383-389.

Malik, R.K., Kumar, N., Nageswara, R.K. and Mathur, D.K., 1994. Bacteriocins-antibacterial proteins of LAB: A review. Microbiologie-Aliments Nutrition, Volume 12; 117- 132.

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M.C., Mollet, B. and Poolman, B. 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions wihtout a receptor. Journal of Biological Chemistry, 272; 14277-14284.

Marugg, J.D., Gonzales, C.F., Kunka, B.S., Ledeboer, A.M. , Pucci, M.J., Toonen, M.Y., Walker, S.A., Zoetmulder, L.C.M. and Vandenbergh, P.A.1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Applied and Environmental Microbiology, 58; 2360-2367.

Mathieu, F., Sudirman Suwannhi, I., Rekhif, N., Milliere, J.B. and Lefebvre, G. 1993. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* FR52. Journal of Applied Bacteriology, 74; 372- 379.

Mathys, S., von Ah, U., Lacroix, C., Staub, E., Mini,R., Cereghetti, T. and Meile, L. 2007. Detection of the pediocin gene *pedA* in strains from human faeces by real-time PCR and characterization of *Pediococcus acidilactici.*UVA1. Biomedcentral Biotechnology, 7;55.

McCormick, J.K., Poon, A., Sailer, M., Gao, Y., Roy, K.L., Mc-Mullen, L.M., Vederas, J.C., Stiles, M.E. and van Belkum, M.J. 1998. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C an antibotulinal two peptite bacteriocin produced by Brochothrix campestris ATTC 43754. Applied and Environmental Microbiology, 64; 4757-4766.

Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Batini, R. and Manicardi, G. 2001. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* strain. International Journal of Food Microbiology, 64; 193-198.

Miller, K., Schamber, R., Chen, Y. and Ray, B. 1998a. Production of active kimeric pediocin AcH in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus* pap operon. Applied and Environmental Microbiology, 64; 14-20.

Miller, K., Schamber, R., Osmanağaoğlu, Ö. and Ray, B. 1998b. Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. Applied and Environmental Microbiology, 64(6); 1997-2005.

Miller, K.W., Ray, P., Steinmetz, T., Hanekamp, T. and Ray, B. 2005. Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. Letters in Applied Microbiology, 40; 56-62.

Millette,M., Dupont, C., Shareck, F.,Ruiz, M.T., Archambault, D. and Lacroix, M. 2008. Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33 a new human intestinal strain. Journal of applied Microbiology, 104; 269-275.

Moll, G.N., Akker, V.D., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J.,Nes, I.F., Konings, W.N. and Driessen, A.J.M. 1999. Complementary and overlapping selectivity of the two peptite bacteriocins plantaricin EF and JK. Journal of Bacteriology, 181; 4848-4852.

Montville, T.J. and Chen, Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved question. Applied Microbiology and Biotechnology, 50; 511-519.

Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K. and Nes, I.F. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Applied and Environmental Microbiology, 57; 1829–1834.

Motlagh, A.M., Jonhson, M.C. and Ray, B. 1991. Viability loss of food-borne pathogens by starter culture bacteria. Journal of Food Protection, 54; 873-878.

Motlagh, A.M., Bhunia, A.K., Szostek, F.T., Hansen, R., Johnson, M.C. and Ray, B. 1992a. Nucleotide and amino acid sequence of pap-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H. Letters in Applied Microbiology, 15; 45-48.

Motlagh, A.M., Holla, S., Johnson, M.C., Ray, B. and Field, R.A. 1992b. İnhibition of *Listeria ssp.* in sterile food systems by pediocin AcH, a bacterocin from *Pediococcus acidilactici* H. Journal of Food Protection, 55; 337-343.

Mulders, J.W.M., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J. and De Vos, W.M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. European Journal of Biochemistry, 201; 581-584.

Muriana, P.M., Klaenhamer, T.R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088.Applied and Environmental Microbiology, 57; 114-121.

Navaratna, M.A.D.B., Sahl, H.G. and Tagg, J.R. 1998. Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lanhibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. Applied and Environmental Microbiology, 64; 4803-4808.

Nes, I.F. 1992. Non nisin-like bacteriocins in lactic acid bacteria. Paper present at Biotieteen Paivat, Helsinki, Finland.

Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70; 113-128.

Nes, I.F. and Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptites from lactic acid bacteria. Biopolymers, 55; 50-61.

Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H. and Nissen-Meyer, J. 2002. Unmodified peptite-bacteriocins (ClassII) produced by lactic acid bacteria. In: Peptite antibiotics; discovery, modes of action, and applications. eds. Dutton, C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.A. I. and Wax, R.G., Marcel Dekker Inc., 81-115, New York.

Nettles, C.G. and Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. Journal of Food Protection 56; 338–356.

Nielsen, J.W., Dickson, J.S. and Crouse J.D. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Applied and Environmental Microbiology, 56; 2142-2145.

Nieto Lozano, J.C., Nissen Meyer, J., Sletten, K., Pelaez, C. and Nes, I.F. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of General Microbiology, 138; 1985–1990.

Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K. and Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptites. Journal of Bacteriology, 174; 5686-5692.

Nissen-Meyer, J., Larsen, A.G., Sletten, K., Daeschel, M. and Nes, I.F. 1993. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptites. Journal of General Microbiology, 139; 1973–1978.

O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002a. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, 84; 593-604.

Ogden, K., Waites, M.J. and Hammond, J.R.M. 1988. Nisin and brewing. Journal of the Institute of Brewing and Distilling, 94; 233-238.

Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M. and Nakanishi, K.2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. Journal of Applied Microbiology, 88; 81-89.

Oscariz, J.C. and Pisabarro, A. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Review Article. Springer-Verlag and a system for enumerating models (SEM), 12; 123-127.

Osmanağaoğlu, Ö., Gündüz, U., Beyatlı, Y. and Çökmüş C. 1997. Purification and characterization of pediocin F, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici.* Turkish Journal of Biology, 22(1998); 217-228.

Osmanağaoğlu, Ö., Beyatlı, Y., Gündüz, U. and Saçılık, S.F. 2000. Analysis of the genetic determinant for production of the pediocin P of *Pediococcus pentosaceus* Pep1. Journal of Basic Microbiology, 40;233-241.

Osmanağaoğlu, Ö. 2003. Behaviour and biological control of bacteriocin-producing *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum-packaged sucuk. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27; 471-480.

Osmanağaoğlu, Ö. 2005. Detection and characterization of Leucocin OZ, a new anti-listerial bacterocin produced by *Leuconostoc carnosum* with a broad spectrum of activity. Food Control, 18(2007); 118-123.

Osmanağaoğlu, Ö., Kıran, F. and Gül, N. 2005. Effect of pediocin DT10 on *Leuconostoc mesenteroides* OZ-N3 cells. Journal of Food Safety, 25; 303-317.

Papastathopolou,A., Bezirtoglou, E. and Legalis, N.J. 1997. Bacteriodes fragilis production and sensitivity to bacteriocins. Anaerobe, 3; 203-206.

Papathanasopoulos, M.A., Hastings, J.W. and Von Holy, A. 1994. Antibacterial activity of three *Leuconostoc* strains isolated from vacuum- packaged processed meats. Journal of Basic Microbiology, 34; 173-182.

Parente, E. and Hill C. 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes.* Journal of Food Protection, 55; 497-502.

Parente, E. and Ricciardi, A. 1999. Production recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 52; 628-638.

Pasteur, L. and Joubert, J. 1877. Charbon et septicemic. Les Comptes rendus de l'Académie des sciences, 85; 101-115.

Pederson, C.S. 1949. The genus *Pediococcus.* Bacteriology Reviews, 13; 225-232.

Piard, J.C., Delorme, F., Giraffa, G., Commisaire, J. and Desmazeaud, M. 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. Netherland Milk and Dairy Journal, 44; 143-158.

Piard, J.C. and Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antimicrobial substances. Lait, 72; 13-142.

Piard, J.C., Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Desmazeaud, M.J. and Klaenhammer, T.R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. Applied and Environmental Microbiology, 58; 279-284.

Piva, A. and Headon, D.R. 1994. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB-61. Microbiology, 140; 697-702.

Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. and Vandenbergh, P.A. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.O. Applied and Environmental Microbiology, 54; 2349-2353.

Qi, F., Chen, P. and Caufield, P.W. 2001. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lanthibiotic mutacin I and a nonlanthibiotic bacteriocin, mutacin IV. Applied and Environmental Microbiology, 67; 15-21.

Rammelsberg, M. and Radler, F. 1990. Antibacterial polypeptites of *Lactobacillus* species. Journal of Applied Bacteriology, 69; 177-184.

Ray. B., Motlagh, A.M., Johnson, M.C. and Bozoğlu, F. 1992. Mapping of pSMB74,a plasmid encoding bacteriocin pediocin AcH production trait in *Pediococcus acidilactici* H. Letters in Applied Microbiology, 15; 35-37.

Ray, B. and Daeschel, M.A. 1992a. Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Ray, B. 1992b. The need for biopreservatives. In food biopreservatives of microbial orijin. 1-23, Boca Raton, FL.

Ray, B. 1992c. Bcteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives: an overview. In Food biopreservatives of microbioal orijin. eds. Ray, B. and Daeschel, M.A., CRC Press Inc., 177-206, Boc Raton, FL.

Ray, B. 1992d. Pediocin(s) of *Pediococcus acidilactici* as a food biopreservative: an overview. In Food biopreservatives of microbial orijin. eds. Ray, B. and Daeschel, M.A., CRC Press Inc., 267-319, Boca Raton, FL.

Ray, B., Motlagh, A.M. and Johnson, M.C. 1992f. Processing of prepediocin in *Pediococcus acidilactici.* FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews, 12; 191-193.

Ray, B. 1994. Pediocins of *Pediococcus* species. In bacteriocins of lactic acid bacteria. eds. De vuyst, L. and Vandamme, E.J., Blackie Academic and Professionals, 465-495, NY.

Ray, B. 1996. Characteristics and applications of pediocin(s) of *Pediococcus acidilactici.* Pediocin AcH/Pediocin PA-1: an overview. In Lactic acid bacteria: current advances in metabolism, genetics and applications. eds. Bozoğlu Faruk, T. and Ray, B. NATO ASI Series, Springer Press, 155-197, Germany.

Ray, S.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1989. Bacteriocin plasmids of *Pediococcus acidilactici.* Journal of Industrial Microbiology, 4; 163-171.

Revol- Junelles, A.M., Mathis, R., Krier, F., Fleury, Y., Delfour, A. and Lefebvre, G. 1996. *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* FR52 synthesises two distinct bacteriocins. Letters in Applied Microbiology, 23; 120- 124.

Richter, KS., Mustapha, A., Liewen, M.B. and Hutkins, R.W. 1989. Properties of a bacteriocin produced by *Pediococcus sp.* active aganist *Listeria monocytogenes.* Abstract book 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, s-8, New Orleans, LA.

Riley, M. 1998. Moleculer mechanism of bacteriocin evolution. Annual review of Genetics, Volume 32; 253-278. ISSN: 0066-4197.

Rodgers, S. 2001. Preserving non- fermented refrigerated food wiht microbial cultures- A review. Trends in Food Science& Technology. 12; 276–284.

Rogers, L.A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus.* Journal of Bacteriology, 16; 321-325.

Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P. de Vos, W.M. and Siezen, R.J. 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptite nisin by protein engineering. Applied and Environmental Microbiology, 61; 2873-2878.

Rueckert, P.W. 1979. Studies on a bacteriocin-like activity produced by *Pediococcus* and effect aganist Gram-positive organisms. Master's thesis, Michigen State University, East Lansing, U.S.A.

Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C. and Jimenez-Diaz, R. 1991. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. Journal of Applied Bacteriology, 71; 417–421.

Ryan, M.P., Jack, R.W., Josten, M., Sahl, H.G., Jung, G., Ross, R.P. and Hill, C. 1999. Extensive post-translational modification, including serine to D-Alanine conversion, in two-component lanthibiotic, lacticin 3147. Journal of Biological Chemistry, 274; 37544-37550.

Samelis, J., Kakouri, A. and Rementzis, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 ˚C. Food Microbiology, 17; 329-340.

Savagado, A., Cheik, A.T.O., Bassole, H.N.I. and Traore, A.S. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. Pakistan Journal of Nutrition, 3; 1174- 179.

Scannel, A.G., Ross, R.P., Hill, C. and Arendt, E.K. 2000. An effective lacticin biopreservatives in fresh pork sausage. Journal of Food Protection, 63; 370-375.

Schagger, H. and von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry, 166; 368–379.

Schillinger, U. and Lücke, F.K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiology, 4; 199-208.

Schillinger, U. 1990. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biotechnology and food Safety. eds. Bills, D.D. and Kung, S., Butterworth-Heinemann, 55-74, Boston.

Schillinger, U. 1994. Sakacin A produced by *Lactobacillus* sake Lb706. Bacteriocins of lactic acid bacteria. eds. De vuyst L., and Vandamme E.J., Blackie Academic and Professionals, 419-435, England.

Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* geneneration novel. Systematic and Applied Microbiology, 6; 183-195.

Schneider, R., Fernandez, F.J., Aguilar, M.B., Guerrero-Legarreta, I., Alpuche-Solis, A. and Ponce-Alquicira, E. 2005. Partial characterization of class IIa pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican "chorizo"). Food Control, 17; 909-915.

Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y. and Juven, B.L. 1993. Purification, partial characterization and plasmid linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology, 74; 67–77.

Scott, V.N. and Taylor, S.L. 1981. Effects of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. Journal of Food Science, 46; 117-120, 126.

Sharpe, M.E. and Pettipher, G.R.L. 1983. Food spoilage by lactic-acid bacteria. In Economic Microbiology, Volume 8. Food Microbiology. ed. Rose, A.H., Academic Press, 199-223, New York.

Shaw, B.G., and Harding, C.D. 1984. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packaged beef, pork, lamb and bacon. Journal of Applied Bacteriology, 56; 25-40.

Siegers, K., Heinzmann, S. and Entian, K.D. 1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptite occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. Journal of Biological chemistry, 271; 12294-12301.

Smith, J.L. and Palumbo, S.A. 1981. Microorganisms as food additives. Journal of Food Protection, 46; 997-1006.

Smith, J.L. and Pintauro, N.D. 1981. New preservatives and future trends. In Development in Food Preservatives. Tilbury R.H. (ed.) Applied Science Publishers Ltd., 137-160. Barking, England.

Spelhaug, S.R. and Harlender, S.K. 1989. Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus.* Journal of Food Protection, 52; 856-862.

Splittstoesser, D.F. and Stoyla, B.O. 1989. Effects of various inhibitors on the growth of lactic acid bacteria in a model grape juice system. Journal of Food Protection, 52(4); 240-243.

Stiles, M.E. and Hastings, J.W. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria potential for use in meat preservetion. Trends Food Science and Technology, 2; 247-251.

Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leewenhoek, 70; 331-345.

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

Stoddard, G.W., Petzel, J.P., Van Belkum, M.J., Kok, J. and McKay, L.L. 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* WM4. Applied and Environmental Microbiology, 58; 1952-1961.

Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottır, A., Sletten, K., Holo, H. and Nes, I.F. 1992. Purification and characterization of a new bacteriocin ısolated from a *Carnobacterium* sp. Applied and Environmental Microbiology, 58(5); 1417-1422.

Strasser de Saad, A.M. and Manca de Nadra, M.C. 1993. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. Journal of Applied Bacteriology, 74; 406-410.

Strasser de Saad, A.M., Pasteris, S.E. and Manca de Nadra, M.C. 1993. Stability of pediocin N5p. Microbiologie Aliments Nutrition, 11; 371-375.

Strasser de Saad, A.M., Pasteris, S.E. and Manca de Nadra, M.C. 1995. Production and stability of pediocin N5p in grape juice medium. Journal of Applied Bacteriology, 78; 473-476.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriology Reviews, 40; 722-756.

Tahara, T., Oshımura, M., Umezawa, C. and Kanatani, K. 1996. Isolation partial characterization and mode of action of Acidocin J1132 a two component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. Applied and Environmental Microbiology, 62(3); 892-897.

Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J. 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture independent methods. Trends in Food Science and Technology, 15; 348-359.

Toba, T., Yoshioka, K. and Itoh, T. 1991. Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. Letters in Applied Microbiology, 12; 106-108.

Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2004. Pediocin ST18 , an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza , a traditional cereal beverage from Bulgaria. Process Biochemistry, 40 (2005); 365-370.

Toit, M.Du., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T. and Holzapfel, W.H. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. Journal of Applied Microbiology, 88; 482-494.

Trotter, M., McAuliffe, O.E., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Ross, R.P. and Coffey, A. 2004. Variable bacteriocin production in the commercial starter *Lactococcus lactis* DPC4275 is liked to the formation of the cointegrate plasmid pMRC02. Applied and Environmental Microbiology, 70; 34-42.

Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B. and Hill, C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. eds. Sizezen, R.J., Kok, J., Abee, T. and Schaafsma, G., Kluwer Academic Publishers, 165-185, Dordrecht.

Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J.R. and Holzapfel, W.H. 1992. Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. International Journal of Food Microbiology, 16(2); 141-151.

Upreti, G.C. and Hinsdill, R.D. 1973. Isolation and characterization of a bacterocin from a homofermentative *Lactobacillus.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 4; 487-494.

Upreti, G.C. and Hinsdill, R.D. 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7; 139-145.

Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. Applied and Environmental Microbiology, 55; 1187-1191.

Van Belkum, M.J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I.F., Konings, W.N. and Abee, T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein mediated manner. Journal of Bacteriology, 173; 7934–7941.

Van Belkum, M.J. 1994. Lactococcins, bacteriocins of *Lactococcus lactis.* Bacteriocins of lactic acid bacteria. ed. De vuyst, L., Vandamme, E.J., Blackie Academic and Professionals, 301-318, England.

Van Belkum, M.J. and Stiles, M.E. 1995. Molecular characterization geenes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. Applied and Environmental Microbiology, 61; 3573- 3579.

Van Laack, L.J.M., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1992. Characterization and partial purification of a bacteriocin by *Leuconostoc carnosum* LA 44A. International Journal of Food Microbiology, 16; 183-217.

Vanderbergh, P.A. 1991. Pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici.* Annual Meeting, Society for Industrial Microbiology, August 4-9, Abstract S101, Philadelphia, PA.

Vandenbergh, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews, 12; 221-237.

Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.L. 1997. Isolation, purification and partial characterization of plantaric,n 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology, 84; 1131-1137.

Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Kok, J., Konings, W.N. and Venema, G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 59; 1041-1048.

Vignolo, G., Palacios, J., Farias, M.E., Sesma, F., Schillinger, U., Holzapfel, W. and Oliver, G. 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various Listeria species in broth and meat system. Current Microbiology, 41; 410-416.

West, C.A. and Warner, P.J. 1988. Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters, 49; 163–165.

Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M. and Okazaki, M. 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. Applied and Environmental Microbiology, 69(10); 5746-5753.

Yanagida, F., Chen, Y., Onda, T. and Shinohara, T. 2005. Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococus durans* L28-1, isolated from soil.Letters in Applied Microbiology, 40(6); 430-435.

Yang, R. and Ray, B. 1992. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiology, 11; 281- 291.

Yang, R., Johnson, M.C. and Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 58; 3355–3359.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Prevelence and biological control of bacteriocin producing psychotrophic *Leuconostoc* associated with spoilage of vacuum- packaged meats. Journal of Food Protection., 57(3); 209-217.

Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. 2002. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. Süt mikrobiyolojisi ve katkı maddeleri, VI. Süt ve Süt ürünleri Tebliğler Kitabı, 247-253.

Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 67; 1616-1619.

Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. Lactococcin Q a novel two peptite bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. Applied and Environmental Microbiology, 72(5); 3383-3389.

Zezza, N., Pasini, G., Lombardi, A., Merceiner, A., Spettoli, P., Zamorani, A. and Nuti, M.P. 1993. Protection of a bacteriocin active on lactate-fermenting Clostridia by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* immobilized in coated alginate beads. Journal of Dairy Research, 60; 581-591.

EKLER

EK 1 BAKTERİLERİN GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI

EK 2 TAMPON ve ÇÖZELTİLER

EK 3 PROTEİN ANALİZİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖR

EK 4 KİMYASALLAR

EK 1 BAKTERİLERİN GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI

(TGE) Sıvı ve Agar:	**% gr**
Tripton	1.0
Glukoz	1.0
Maya ekstraktı	1.0
Tween-80	0.1
MnSO4	0.005
MgSO4	0.005

Besiyeri içerikleri 100 ml distile su içerisinde çözülerek %1.5 agar ilavesinden önce pH: 6,8'e ayarlanmıştır. Sterilizasyon 121ºC' de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

M17 Besi ortamı:	**% gr**
Polipepton	5.0
Fitopepton	5.0
Maya ekstraktı	2.5
Et ekstraktı	5.0
B disodyum gliserofosfat	19.0
MgSO4. 7H2O	1ml
Laktoz (%10)	50 ml
Askorbik asit	0.5

Besi yeri içerikleri 950 ml distile su içerisinde çözülerek %1.5 agar ilavesinden önce pH 7.15'e ayarlanmıştır. Sterilizasyon 121ºC' de 15 dakika süre ile yapılmıştır. Ortam su banyosunda 45ºC' de soğutulduktan sonra 0.22 µm çapındaki Millex millipore membran filtreden geçirilen laktoz çözeltisi ilave edilmiştir.

MRS Sıvı Besi ortamı	**% gr**
Kazein pepton	10
Et ekstraktı	10
Maya ekstraktı	5
D-glukoz	20
Di potasyum hidrojen fosfat	5
Di amonyum sitrat	2
Sodyum asetat	5
MgSO4.7H2O	0.5
MnSO4.4H2O	0.2
Tween 80	1
Distile su	1 L

pH 5.7 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam içerikleri 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş ve sterilizasyon, 121 °C'de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

Elliker Broth (Difco Manual, 1984)	**% gr**
Tripton	20
Maya ekstraktı	5
Jelatin	2.5
Dekstroz	5
Laktoz	5
Sakkaroz	5
Sodyum klorür	4
Sodyum asetat	1.5
Askorbik asit	0.5
Distile su	1 L

pH 6.8 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Jelatin, 100 ml distile su içerisinde kaynar su banyosunda eritildikten sonra soğutularak besi yeri ortamına ilave edilmiştir. Ortam 121ºC' de 15 dakika tutularak sterilizasyon gerçekleştirilmiştir.

Brain Heart Infusion (BHI) Broth (OXOID)	**% gr**
Calf brain infuzyon solids	12.5
Beef heart infuzyon solids	5.0
Proteoz pepton	10.0
Glukoz	2.0
Sodyum klorit	5.0
Di sodyum fosfat	2.5
Distile su	1 L
pH 7.4 ± 0.2	

37 g dehidre besiyeri 1 L distile suda çözündürülür. Tüplere dağıtılır ve 121ºC' de 15 dakika sterilize edilir.

TGE Buffer:	**% gr**
Tripton	1.0
Glukoz	1.0
Maya ekstraktı	1.0
Tween-80	0.1
$MnSO_4$	0.005
$MgSO_4$	0.005
Sodyum sitrat	0.1
Sodyum asetat	1
Di potasyum fosfat	0.05

Besiyeri içerikleri 100 ml distile su içerisinde çözülerek pH: 6,8'e ayarlanmıştır. Sterilizasyon 121ºC' de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

Nutrient Broth:

Hassas terazide 13 gr Nutrient broth besi yeri tartılarak (Oxoid) 1000 ml distile su içerisine çözündürülmüştür. Hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak steril edilmiştir.

EK 2 TAMPON ve ÇÖZELTİLER

EK 2.1 KARAKTERİZASYON ve SAFLAŞTIRMADA KULLANILAN TAMPONLAR

Sodyum Fosfat Tamponu:

5 μM $NaPO_4$ tamponu hazırlamak için; 0.07098 gr Na_2PO_4 tartılıp 100 ml'lik dH_2O' da çözülmüştür. pH 6.5'a ayarlanmış ve buzdolabı sıcaklığında saklanmıştır.

0.1 M NaCl Tamponu :

0.585 gr NaCl tartılıp, 100 ml'lik dH_2O' da çözülmüştür. Buzdolabı sıcaklığında saklanmıştır.

Potasyum di hidrojen Fosfat Tamponu :

Enzim aktivite testinde kullanılmak üzere 5 μM KH_2PO_4 tamponu hazırlamak için; 0.034 gr KH_2PO_4 tartılmıştır. Ve 50 ml'lik dH_2O' da çözüldükten sonra pH 7'ye ayarlanmıştır. Şişelenip 121ºC' de 15 dakika steril edilmiştir.

EK-2.2 SDS-PAGE

Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi:	**(%) gr**
Akrilamid	29.2
Bis-akrilamid	0.8
dH_2O	100 ml

Whatman kurutma kağıdından geçirildikten sonra karanlık bir şişeye alınır ve buzdolabı sıcaklığında saklanır.

SDS Çözeltisi:	**(%) gr**
SDS	10
dH_2O	100 ml

Toplayıcı Jel Tamponu (0.5 M , pH 6.8) :	**(%) gr**
0.5 M Trizma Base	6.05
SDS	0.4
dH_2O	100 ml

Trizma Base ve SDS 75 ml distile suda çözülmüştür. Tamponun pH'sı 6 N HCl'yle 6.8'e ayarlanarak son hacim distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır. Whatman kurutma kâğıdından geçirildikten sonra karanlık bir şişeye alınmış ve buzdolabı sıcaklığı olan +4ºC' de muhafaza edilmiştir.

Ayırıcı Jel Tamponu (1.5 M , pH 8.8) :	**(%) gr**
1.5 M Trizma Base	36.33
SDS	0.2
dH_2O	200 ml

Trizma Base ve SDS 150 ml distile suda çözülmüştür. Tamponun pH'sı 6 N HCl ile 8.8'e ayarlanarak son hacim 200 ml'ye tamamlanmıştır. Whatman kurutma kağıdından geçirildikten sonra karanlık bir şişeye alınmış ve buzdolabı sıcaklığı olan +4ºC' de muhafaza edilmiştir.

Amonyum persülfat (APS) Çözeltisi:	**gr/ml**
Amonyum persülfat	0.1
dH_2O	1 ml

Elektrot tamponu:	
Tris	1.65 gr
Glisin	8 gr
SDS	1.4 gr
dH_2O	1100 ml

Ayırıcı jel (Resolving jel):	
dH_2O	3.30 ml
Akril-Bisakrilamit	4.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl
%10 Amonyum persülfat	100 µl
TEMED	5.5 µl

Toplayıcı jel (Stacking jel):

dH_2O	3.4 ml
Akril-Bisakrilamit	830 µl
0.5 M Tris (pH 6.8)	630 µl
% 10 SDS	50 µl
%10 Amonyum persülfat	50 µl
TEMED	5.5 µl

Coomasie brillant blue boya çözeltisi:

Commasie brillant blue R 250	1 gr
Metanol	400 ml
Glasiyal asetik asit	100 ml
dH_2O	500 ml

Boya geri alma çözeltisi (decolorizing solüsyonu):

Metanol	400 ml
Glasiyal asetik asit	100 ml
dH_2O	500 ml

Jel fiksasyon çözeltisi:

Glasiyal asetik asit	70 ml
dH_2O	930 ml

Örnek Tamponu :	**10 mL için**
% 0.1 Bromofenol mavisi	10 mgr
%10 Gliserol	1 ml
Tris (pH 6.8, 50 μM)	1 ml
dH_2O	7.6 ml
Merkaptoetanol	400 μl
SDS	0.2 gr

0.45 mikron- por çaplı membran filtreden geçirilip steril edilmiştir.

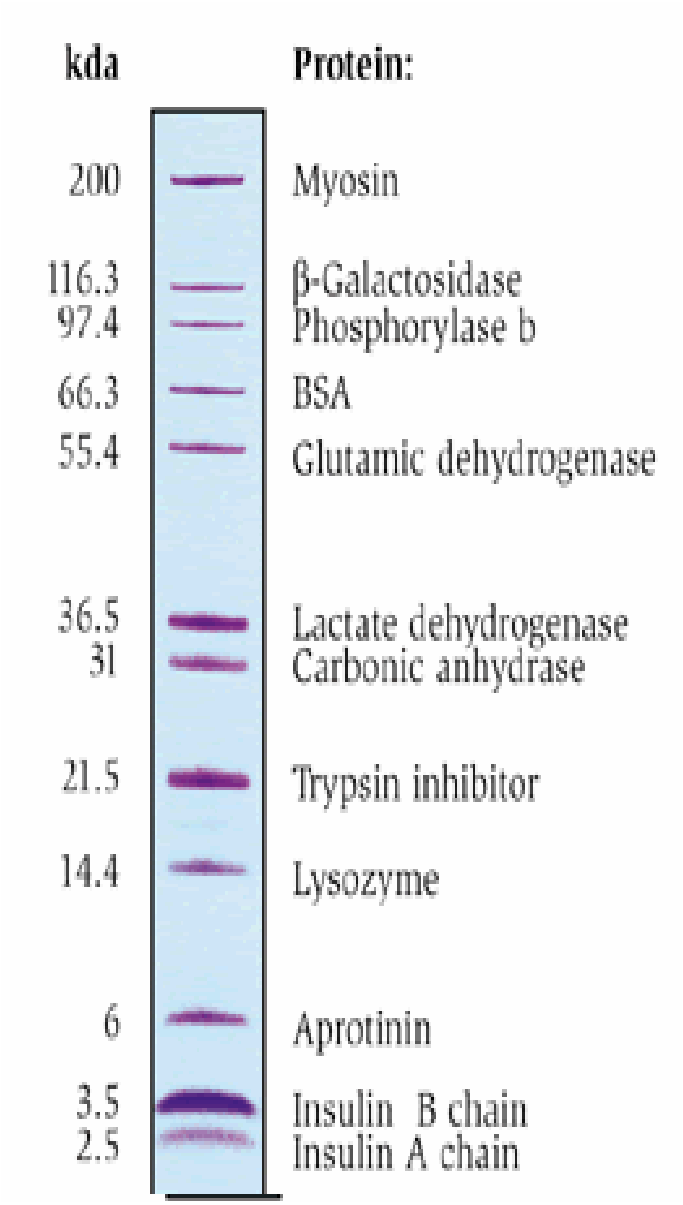
Doymuş Bütanol Solüsyonu :

Bütanol	1 ml
dH_2O	10 ml

Polimerleşme esnasında jelin hava ile temasını kesmek amacıyla jelin en üst kısmı doymuş bütanol ile kapatılır.

EK 3 PROTEİN ANALİZİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖR

PROTEİN markör (NOVEX Mark12)
(İNVİTROGEN)



EK 4 KİMYASALLAR

Kimyasal Adı	Marka
SDS, Lipaz, Ribonükleaz	**Sigma**
Amonyum persülfat	**Applichem**
0.22 ve 0.45 -mikron por çaplı membran filtre	**M. Millipore**
Mark 12 wide range protein standart(invitrogen)	**Novex**
Tripton, Agar, M17 Besiyeri, Jelatin	**Lab M**
Aseton, Asetonitril	**S. Aldrich**
Metanol	**R. Haen**
MWCO 1000 29.0 mm diyaliz membran	**Serva**
Nutrient Broth, BHI broth, AntibiyobiyoGram diskleri	**Oxoid**
Glukoz, Maya ekstraktı, Tween-80, Bütanol, Lizozim, Proteinaz K, N-N'-Methylenebisakrilamid, Bisakrilamid, Trisma Base, TEMED, Merkaptoetanol, Glasial asetik asit, Glisin, Bromofenol Blue, NaCl, Commassie Brilliant Blue R250, KH_2PO_4, Etanol, $MnSO_4$, $MgSO_4$, HCl, Gliserol, Sodyum sitrat, Sodyum asetat, di potasyum fosfat, Askorbik asit, Kloroform,Formaldehit, İzopropanol, Laktoz, Sakkaroz, Katalaz, Kimotripsin, Tripsin, MRS Broth.	**Merck**

ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı	: Burcu Biler
Doğum Yeri	: Ankara
Doğum Tarihi	: 02.12.1981
Yabancı Dil	: İngilizce TÖMER:62
Medeni Durumu	: Bekar
Eğitim Durumu:	
Lise	: 50. Yıl Süper Lisesi (Hazırlık 1995) İpek Koleji (1996- 1999)
Lisans	: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji (2001- 2005)
Yüksek Lisans	: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. (Şubat 2006-Mayıs 2009)