



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ GIDALARDAN İZOLE EDİLMİŞ FARKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİN ÜRETME YETENEKLERİNİN VE BAKTERİYOSİN KISMİ KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Talha DEMİRCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Temmuz-2013
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEŞİTLİ GIDALARDAN İZOLE EDİLMİŞ FARKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİN ÜRETME YETENEKLERİNİN VE BAKTERİYOSİN KISMİ KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Talha DEMİRCİ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Nihat AKIN
2013, 50 Sayfa

Çalışmada hardaliye turşusu ve Sürk peynirinden izole edilmiş 72 adet laktik asit bakterisinin indikatör patojen bakteriler üzerine bakteriyosin benzeri aktiviteleri belirlenmiştir. Metot olarak çeşitli antibakteriyal etki belirleme metotları arasından Agar-Sandviç Yöntemi seçilmiştir. Bu metot uyarınca her deneme 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve bu bakteriyosin benzeri aktivite için optimum besiyeri başlangıç pH'sı ve inkübasyon sıcaklığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun yanında çeşitli enzimlerin bu bakterilerin oluşturduğu bakteriyosin benzeri aktivite üzerine etkisi de gözlenmiştir. Sonuç olarak en ideal inkübasyon sıcaklığı olarak 35°C, en ideal besiyeri başlangıç pH'sı olarak 4,5 bulunmuştur. Yine bazı bakteri izolatlarının oluşturduğu aktivitenin kısmen proteolitik enzimlerden etkilendiği bazılarının ise hiç etkilenmediği görülmüştür. Fakat hiçbir izolatın aktivitesi proteolitik enzim muamelesi sonrası tamamen kaybolmamıştır. Bakteriyosin benzeri aktiviteye en duyarlı bakterinin *S.aureus* olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Agar-Sandviç, antibakteriyal aktivite, bakteriyosin, laktik asit bakterisi.

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF BACTERIOCIN PRODUCING ABILITY OF DIFFERENT LACTIC ACİD BACTERIA SP. THAT ISOLATED FROM SOME FOODS AND BACTERIOCIN PARTIAL CHARACTERISTICS

Talha DEMİRCİ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN FOOD ENGINEERING

Advisor: Prof.Dr. Nihat AKIN

2013, 50 Pages

In this study bacteriocin-like activity of 72 lactic acid bacterias isolated from hardaliye pickle and Sürk cheese against to indicator pathogen bacterias were determined. Agar-Sandwich method was chose as a method from another antibacterial determination methods. Each experimentation was achieved three times in accordance with this method and optimum agar initial pH and incubation temperature were determined. Otherwise effect of different enzymes on bacteriocin-like antibacterial activity of these bacterias. Consequently 4,5 pH and 35°C were found optimum as initial agar pH and incubation temperature respectively. Some isolates were affected by proteolitic enzymes and the other some of isolates were not influenced by enzyme treatments. None of isolates lose activity completely by proteolitik enzyme treatment. *S. aureus* was the most sensitive against bacteriocin-like antibacterial activity.

Keywords: Agar-Sandwich, antibacterial activity, bacteriocin, lactic acid bacteria

ÖNSÖZ

Çalışmalarımda benden hiçbir desteği esirgemeyen, her türlü olanağı sunan ve beni yönlendiren değerli Hocam Prof. Dr. Nihat AKIN'a,

Hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da destek ve dualarını eksik etmeyen aileme,

Çalışmalarım sırasında desteklerini hep yanımda hissettiğim arkadaşlarım Arş. Gör. Hasan İbrahim KOZAN ve Arş. Gör. Muhammed ERCAN'a teşekkürü borç bilirim.

Talha DEMİRCİ
KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinleri 3
2.1.1. Laktik asit bakterilerinin genel özellikleri ve gıdalarda kullanımı 3
2.1.2. Laktik asit bakterilerinin metabolik ürünleri ve antimikrobiyel etkileri 6
2.1.2.1. Organik asit 7
2.1.2.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) 8
2.1.2.3. Diasetil 9
2.1.2.4. Reuterin 9
2.1.2.5. Karbondioksit 10
2.1.2.6. Bakteriyosin 10
2.1.2.6.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması 13
2.1.2.6.1.1. Sınıf I bakteriyosinler (Lantibiyotikler) 13
2.1.2.6.1.2. Sınıf II bakteriyosinler 15
2.1.2.6.1.3. Sınıf III bakteriyosinler 16
2.1.2.6.1.4. Sınıf IV bakteriyosinler 16

3. MATERYAL VE YÖNTEM **17**

3.1. Materyal 17
3.1.1. Laktik asit bakterileri ve kullanılan besiyerleri 17
3.1.2. İndikatör patojen bakteriler ve kullanılan besiyerleri 19
3.2.Yöntem 20
3.2.1. Agar-sandviç yöntemi 20
3.2.2. Bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi 20
3.2.2.1. Farklı besiyeri pH'larının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi 20
3.2.2.2. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi 21
3.2.2.3. Katalazın bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi 21
3.2.2.4. Proteolitik enzimlerin bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi 21

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 23

4.1. Laktik asit bakterisi izolatlarının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal madde üretimlerine farklı besiyeri başlangıç pH'larının etkisi 23
4.2.Laktik asit bakterisi izolatlarının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal madde üretimlerine inkübasyon sıcaklığının etkisi 26
4.3. Laktik asit bakterisi izolatlarının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal madde üretimlerine çeşitli proteolitik enzimlerin ve katalaz enziminin etkisi 29

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 39

5.1 Sonuçlar 39
5.2 Öneriler 40

KAYNAKLAR 41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

LAB	: Laktik asit bakterisi
MRS	: de Man Rogosa Sharpe
BHI	: Brain Heart Infusion
Lan	: Lanthionine
GRAS	: Generally recognized as safe
HACCP	: Hazard Analysis and Critical Control Point
NADH	: Nicotinamide adenine dinucleotid
UV	: Ultraviole
DNA	: Deoksiribonükleotid

1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı hastalıklar dünya genelinde en ciddi ve maliyetli sağlık sorunları arasındadır. Modern teknolojilere, iyi üretim uygulamalarına, kalite kontrol, hijyene ve risk değerlendirme ve HACCP gibi güvenlik konseptlerine rağmen rapor edilen gıda kaynaklı hastalık ve intoksikasyon sayısı son yıllarda artarak devam etmektedir (Garcia ve ark., 2010). *Campylobacter jejuni, Clostridium perfringens, Escherichia coli 0157:H7, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* ve *Toxoplazma gondii* ile bağlantılı gıda kaynaklı patojen vakaları gıda sanayini ve halkı mevcut koruma yöntemlerinin yeterliliği konusunda şüpheye düşürmüştür. Buna ilaveten kimyasal koruyucularla hazırlanmış gıdaların daha fazla tüketilmesi tüketicinin endişesini arttırmıştır ve daha 'doğal' ve 'az işlem görmüş' gıda talebini ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak doğal olarak üretilmiş antimikrobiyal etmenlere ilgi artmıştır (Cleveland ve ark., 2001).

Gıda güvenliği bu şekilde uluslararası alanda giderek daha önemli bir konu olmaya başlayalı gıda patojenlerini hedef alan laktik asit bakterilerinin ürettiği antimikrobiyal peptitlerin uygulamaları dikkat çekmeye başlamıştır (Cleveland ve ark., 2001). Son zamanlarda bakteriyosin terimi çoğunlukla çok geniş bir inhibisyon spektrumu gösteren, laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen küçük, ısıya dayanıklı ve katyonik peptitleri tarif etmede kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri gıda ile ilişkilendirileli ve güvenli olarak tanımlanalı beri gıda biyokoruması yoğun bir şekilde laktik asit bakterilerine odaklanmıştır (Garcia ve ark., 2010). Birçok laktik asit bakterisi bakteriyosinleri antibiyotik dirençliler de dahil çoğu gıda kaynaklı hastalık yapan ve bozulma yapan bakteriye karşı aktiftir. Gram negatif bakteriler dış membranın koruyucu rolü sayesinde dayanıklıdırlar.

Laktik asit bakterileri ve onların bakteriyosinleri aslında yıllardır farkında olmadan tüketilmiştir ve uzun bir güvenli kullanım geçmişine sahiptir. Bunların inhibisyon spektrumu, bakterisidal etki şekli, teknolojik şartlara toleransı (pH, NaCI, ısıl işlem vb.), ökaryotik hücrelere karşı toksisitesinin azlığı gıdadaki biyokoruyucu rolünü perçinler. Nisin'in 1950'lilerin başında peynirde geç çiçeklenmeden sorumlu *Cl. tyrobutyricum*'u inhibe etmesi için kullanılmasından beri literatürde birçok laktik asit bakterisi bakteriyosini hakkında yayın bulunmaktadır. Bakteriyosin uygulamalarının birincil gıda maddelerinin üretimindeki örnekleri veterinerlik, tarım ve su ürünleri yetiştiriciliğinde bulunmuştur (Garcia ve ark., 2010).

Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme konusundaki genel yetenekleri birçok suş üzerinde sağlanan önemli bir biyolojik rol anlamına gelmektedir. Bakteriyosin üretimi, yeterli miktarlardayken, üretici suş için bir avantaj olarak kabul edilebilir. Bu peptitler aynı ekolojik durum veya aynı besin havuzu için yarışan bakteriyi inhibe edebilir veya öldürebilir. Bu önemli rol birçok bakteriyosinin kısıtlı bir konakçı çeşitliliğine sahip olması ve aynı kıt kaynaklar için yarışan akraba bakterilere karşı çok etkili olması ile daha da önem kazanmaktadır Bakteriyosinler birçok gram negatif ve gram pozitif bakteri tarafından üretilmesine rağmen laktik asit bakterileri tarafından üretilenler –bu grup genellikle GRAS kabul edildiği için- gıda endüstrisinin asıl ilgisini çekenler olmuştur, Üstelik, bakteriyosin üretici laktik asit bakterilerinin çoğunluğu doğal gıda izolatlarıdır ve gıda uygulamalarına da kusursuz bir şekilde uyum sağlamaktadır (Deegan ve ark., 2006).

Gıda ve içeceklerin korunmasında bakteriyosin üretimi haricinde çeşitli metodlar kullanılmasına rağmen, sağlık bilincine ulaşmış halk fazlaca prosese maruz kalmış veya kimyasal koruyucular içeren gıdalardan sakınmaya çalışmaktadır. Bu yüzden laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler yalnızca bakterinin kendisi için bir avantaj değildir aynı zamanda gıda sanayi tarafından istenmeyen bakterileri kontrol için -doğal şekilde ve tüketici tarafından çok daha kabul edilebilir bir halde- bir araç olarak kullanılmaktadır (Deegan ve ark., 2006).

Bu bilgilerden hareketle bu çalışmada gıdalardan izole edilmiş çeşitli laktik asit bakterilerinin bakteriyosin benzeri aktiviteleri incelenmiş ve bu aktivitelerin çeşitli enzimlere, farklı pH ve inkübasyon sıcaklıklarına karşı stabiliteleri belirlenerek kısmi karakterizasyonları çıkarılmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinleri

2.1.1. Laktik asit bakterilerinin genel özellikleri ve gıdalarda kullanımı

Doğada çok yaygın olarak bulunduğu bilinen laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte başlamıştır. İlk kez 19. yüzyıl sonlarında sütte fermantasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda *Lactobacillaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmışlardır (Ertekin, 2007).

Gram pozitif, morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren (kısa veya uzun çomak veya kok şekilli), spor oluşturmayan ve katalaz negatif olan karbonhidratları ve yüksek alkolleri enerji kaynağı olarak kullanıp laktik asit oluşturan laktik asit bakterileri Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de Boone ve ark. (2001)' ın belirttiği sınıflandırmaya göre laktik asit bakterileri; *Firmicutes* şubesinin *Bacilli* sınıfına üyedirler. Bu sınıfın ikinci takımı *Lactobacillales*'dir. Takımda 6 familya yer almaktadır. *Lactobacillaceae, Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Leuconostoaceae, Streptococaceae*. Familya içerisinde en önemli laktik asit bakteri cinsleri *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Weissella, Carnobacterium, Tetragenococcus ve Bifidobacterium*'dur (Klein,1998)

Anaerobik kosullar altında gelişim gösterebilen laktik asit bakterileri pek çok anaerobik bakterinin aksine oksijene karşı duyarlı değildirler, yani oksijen varlığında da gelişim gösterebilmektedirler. Karbonhidrat metabolizmaları göz önüne alındığında homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki alt gruba ayrılırlar. Önceleri fenotipik özellikleri göz önüne alınarak (i) *Thermobacterium* (ii) *Streptobacterium* ve (iii) *Betabacterium* şeklinde üç alt gruba ayrılmaktayken günümüzde gelişen moleküler biyoloji teknikleri, özellikle de 16S rRNA sekans analizleri bu sınıflandırmanın çok da uygun olmadığını göstermiştir. (Beasley, 2004; Gürsoy ve Kınık, 2005; Madigan ve Matrinko, 2006)

Laktik asit bakterileri doğada sıkça bulunmaları, gıdalarda sıkça rastlanılan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretiminde gerçekleştirdikleri fermentasyonlar sayesinde temel fonksiyona sahip olmaları nedeniyle gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadırlar. Çiğ materyalin laktik asit bakterileri ile

fermente edilerek yeni gıdaların üretilmesi ve çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski muhafaza metotlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Süt bu bakteriler ile yoğurt, peynir, tereyağı vb. ürünlere işlenmektedir ve yine yaygın olarak tüketilen fermente et ürünleri ve farklı sebzelerden üretilen turşular laktik asit fermantasyonu ile hazırlanmakta ve muhafaza edilmektedir (Gökalp 1982, Andersson 1989, Mayra-Makinen ve Bigret 1993, Sánchez ve ark., 2000). Doğal olarak bulundukları yerler süt ve süt mamülleri, islenmemis, taze veya çürümüs bitkiler, insan ve hayvanların bağırsak mukoza ve içerikleridir (Schlegel, 1986; Tunail ve Köşker, 1989).

Laktik asit bakterileri fermente gıdanın üretiminde fermantasyonun yönlendirilmesi ve hızlandırılmasında, ham materyale katılan ve istenilen hücre sayısını artıran mikrobiyal araçlardır (Leroy ve De Vuyst, 2004). Laktik asit bakteri cinsine ait türlerin kullanıldığı yerler birbirinden farklılaşmıştır. Buna göre genellikle *Lactobacillus*'lar süt, et, sebze ve tahılda; *Lactococcus*'lar sütte, *Leuconostoc*'lar süt ve sebzede; *Pediococcus*'lar sebze ve ette, *Oenococcus*'lar sarapta; *Enterococcus*'lar ve *Streptococcus*'lar da sütte kullanılmaktadır (Ertekin, 2007).

Starter laktik asit bakterileri; mikrobiyal güvenliği sağlama, daha iyi organoleptik özellik gösterme, şeker polimerleri, aromatik bileşenler, vitaminler ve yararlı enzimler üretme gibi teknolojik anlamda faydalar sağlamanın yanı sıra besleyicilik faydaları ve probiyotik özellik göstermesi avantajlarıyla önem taşımaktadır (Paul Ross vd 2002; Leroy ve De Vuyst, 2004; Temmerman, 2004). Laktik asit bakterileri organik asitlerin üretimiyle ham materyalin asidifikasyonunu artırmakta, asetik asit, etanol, aroma bileşikleri, bakteriyosinler, ekzopolisakkaritler ve önemli birkaç enzimin üretimini sağlamaktadır ve son üründe tekstürün düzeltilmesine katkıda bulunmaktadır (Leroy ve De Vuyst, 2004).

Gıda ve sağlık arasındaki ilişki düşünüldüğünde laktik asit bakterilerinin tüketiciye büyük yarar sağladığı aşikardır. Buradan hareketle, laktik asit bakterilerinin ilgili suşlarıyla, sağlığı koruyucu özellikler gösteren gıda ürünlerinin marketlerde fonksiyonel gıdalar olarak satışa sunumunda son yıllarda önemli oranda artış görülmüştür (Ertekin, 2007). Yine laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri de son yıllarda fazlaca ön plana çıkmıştır. Bunlar içerisinde yer alan Lactobacillus'lar ve Bifidobacterium'ların yararlı etkileri uzun zamandır bilimsel çalışmalara konu olmaktadır. Günümüzde ticari ürünlerde kullanılan probiyotik bakterilerin baslıca üyeleri Lactobacillus ve Bifidobacterium cinsidir. Bu iki cinsin de *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus,*

Lactobacillus gasseri ve *Lactobacillus reuteri, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum* ve *Bifidobacterium infantis* suşları probiyotik olarak gıdalarda kullanılmaktadır (Heller, 2001; Soomroo ve ark., 2002). Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak gastrointestinal sistemdeki olumlu etkileri muhtemel iki farklı mekanizmaya bağlamaktadır. Bunlardan ilki laktik asit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyel etkili bileşikler oluşturmaları, ikinci etken ise bağırsak mukozasında patojenlerin tutunamayacağı bariyerler oluşturmalarıdır (Ehrrman ve ark., 2002).

Lactobacillus cinsleri çomak şeklinde hücrelere sahiptir. Hücreler düzgün veya hafif kıvrık, bazı türlerde T, Y ve V şeklindedir. Çomakların uçları düzgünce yuvarlanmış, uzun kenarlar birbirine paralel durumdadır. Hücreler türe göre tek veya çift olarak bulunabilmekte, bazılarında kısa veya uzun zincirlere rastlamak da mümkün olmaktadır (Şahin, 2003).

Yaklaşık 50 türü bulunan *Lactobacillus* cinsi, obligat homofermentatif, fakültatif heterofermentatif ve obligat heterofermentatif grupları içermektedir. Termofilik olan *Lb. delbruckii* spp. *bulgaricus*, *Lb. delbruckii* spp. *lactis*, *Lb. acidophilus* ve *Lb helveticus* türleri obligat homofermentatiflerdir. Bu grup 6 karbonlu şekerleri (heksozlar) tümüyle laktik aside dönüştürmekte; ancak 5 karbonlu şekeri (pentoz) fermente edememektedir (Rousis, 1994; Holzapfel ve Stiles, 1997). *Lb. casei, Lb. plantarum, Lb. sake* fakültatif heterofermentatif grubu oluşturmaktadır. Bu türler heksozlardan laktik asit, pentozlardan ise laktik asit ve asetik asit, *Lb. brevis* ve *Lb fermentum* ise heksozlardan laktik asit, asetik asit ve karbondioksit (CO_2) oluşturmaktadır (Hammes ve Vogel, 1992; Rousis, 1994). Glikoliz (FBP yolu) enzimlerini kullananlar zorunlu homofermantatif, hekzos monofosfat yolu enzimlerini kullananlar zorunlu heterofermantatif, her iki yolun enzimlerine sahip olup öncelikle FBP yolunu tercih edenler fakültatif heterofermantatiftir (Tunail, 2009).

Gelişme sıcaklıkları 2-53 ºC, optimum gelişme sıcaklıkları ise 30-40 ºC arasındadır. Optimum pH istekleri 5.5-6.2'dir. Bununla birlikte gelişmenin 5.0 veya altındaki pH'larda gerçekleştiği görülür, alkali pH'larda gelişme yetenekleri düşüktür (Şen ve ark., 2004).

Lactobacillus plantarum diğer laktik asit bakterilerine göre daha yüksek asit toleransına sahip olduğu için meyve ve sebze fermantasyonunu 8 tamamlayan bakteridir. Salatalık ve lahana fermantasyonunda son ürünün kalitesinde ve mikrobiyel dengenin sağlanmasında önemli bir etkiye sahiptir (Lu ve ark., 2003). Büyük çoğunluğu glikoz, mannoz, galaktoz, arabinoz, sakkaroz, maltoz, laktoz, salisin ve rafinozu

kullanarak; bazıları ise sorbitol, mannitol, dekstrin, gliserol ve ksilozu kullanarak asit meydana getirmektedir. Ramnoz, nişasta ve inülini genellikle fermente edememektedirler. % 5.5 tuz yoğunluğunda gelişebilmektedirler. En iyi gelişme sıcaklığı 30-35 ºC arasında olmakla birlikte 10-40 ºC arasında gelişebilmektedir. Termal ölüm sıcaklığı 65-75 ºC'de 15 dakikadır. Süt, peynir, tereyağı, kefir, fermente patates, mısır, hıyar turşusu, domates turşusu gibi gıdalardan izole edilebilmektedir (Pederson,1938).

Lactobacillus brevis ise genel olarak fermente bitkilerde ve hayvansal ürünlerde bulunmaktadır. Peynir, süt, fermente patates, toprak, sauerkraut ve gübreden izole edilebilmektedir. Gram pozitif ve mikroaerofiliktir. Optimum gelişme sıcaklığı 30-35 ºC arasıdır, en fazla 40-45 ºC, en az 10-15 ºC aralığında gelişebilmektedir. Pentozlardan laktik asit ve asetik asit üretebilmektedir. Ksiloz, arabinoz, glikoz, galaktoz ve maltozu kullanarak laktik asit üretebilmektedir (Pederson, 1938). Türe bağlı olarak laktoz, sakkaroz, mannoz, rafinoz ve mannitolu fermente edebilmektedir. Sorbitol, gliserol, ramnoz, dekstrin, inülin ve nişastayı nadiren fermente etmektedir. Aldoheksozlardan laktik asit, asetik asit, etil alkol ve CO_2 üretebilmektedir (Pederson, 1938).

Lactobacillus paracasei de genellikle insan intestinal bölgesinde bulunan homofermantatif bir laktik asit bakterisidir. Fermente sebzelerde, et ve sütte doğal olarak bulunurlar. Bu türün suşları geleneksel fermente süt ve peynirlerin de dahil olduğu birçok gıdada bulunmaktadır. Yine bu türün seçilen suşları probiyotik gıdalarda ve diet supplementlerinde kullanılmaktadır (Mitsouka., 1996; Kandler ve Weiss, 1986)

2.1.2. Laktik asit bakterilerinin metabolik ürünleri ve antimikrobiyel etkileri

Laktik asit bakterilerinin homofermantatif karbonhidrat metabolizmalarının son ürünlerinin gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivitesi son on yıldır çok detaylı olarak araştırılmıştır. Heterofermantatif laktik asit bakterileri tarafından heksozun katabolizması sonucu oluşan eşit molarda laktik asit, asetik asit (veya etanol) ve CO_2 benzer bir koruyucu ve antagonistik etkiye neden olur. Bu koruyucu etki, karbonhidrat metabolizması sonucunda oluşan düşük pH değerlerinden kaynaklanır. Laktik asit bakterileri, metabolizmaları sonucu çok düşük miktarlarda da olsa hidrojen peroksit ve diasetil üretirler. Bu maddeler az da olsa antimikrobiyel etkiye katkıda bulunarak gıda korunmasında rol oynarlar (Somkuti,G.A., 2000). Son bilgilere göre laktik asit, asetik asit, H_2O_2, bakteriyosin gibi fermantasyon boyunca üretilen

birçok metabolik ürün antimikrobiyel özellik göstererek laktik fermente gıdaları güvenilir kılmıştır (Holzaphel, W.H., 2002).

2.1.2.1. Organik asit

Laktik asit bakterilerinin karakteristik fermentasyon ürünü olan laktik asit ve asetik asit pH düşüşünü sağlayarak bozulma etkeni (*Pseudomonas*) ve patojen (Salmonellae ve *Listeria* spp.) bakterilerin gelişimini sınırlamakta veya inaktive etmektedir. Ayrıca her iki asit direkt antimikrobiyal aktivite de göstermektedir.

Organik asitlerin mikroorganizmalar üzerine inhibitör olarak tesir etmesi, asitin sahip olduğu farklı üç potansiyel etkiye bağlanmaktadır:

1.Güçlü asitler, düşük eksternal pH'ya sahip, fakat hücre membranından geçememektedir. Bu asitler hücre yüzeyinde var olan enzimler üzerinde de düşük pH nedeniyle, enzimleri denatüre ederek inhibitör etkide bulunabilmektedir. Ayrıca, hücre içi ve dışı pH farkı çok büyük olduğu zaman hücre zarının proton geçirgenliği sonucu sitoplazmik pH'nın düşüşüne de neden olabilmektedir (Çon ve Gökalp, 2000).

2. Zayıf asitler; hücre membranından geçebilmektedir. Bu asitlerin birinci etkisi sitoplazmik pH'yı düşürmeleri nedeniyle olmaktadır. Fakat, doğrudan disosiye olmamış yapılar da metobolizma üzerine özel inhibitör etkiye sahiptir.

3. Sülfit, nitrat, karbonat gibi asit potansiyelli iyonlar düşük pH'da potansiyel inhibitördür (Çon ve Gökalp, 2000).

Zayıf asitler olan laktik ve asetik asidin çözünmemiş formları hidrofobik özellikleri nedeniyle bakteri içerisine nüfus ederek hücre içinde çözünmektedir. Sonuçta sitoplazmada gerçekleşen pH düşüşü nedeniyle, hücre ölümü meydana gelmektedir (Ray, 2001). Asetik asit çözünürlük sabitinin daha yüksek olması nedeniyle (pKa 4,75) belirli bir pH ve konsantrasyonda laktik asitten (pKa 3,1) daha güçlü antimikrobiyal etki göstermektedir (Holzapfel ve ark., 1995).

Yapılan bir çalışmada *Micrococcus luteus, Pseudomonas ssp*. ve *Staphylococcus aureus*'a karşı organik asitlerin (laktik, asetik ve propiyonik asit) antimikrobiyel etkisi test edilmiştir ve her üç organik asitin de tek başına ayrı ayrı antimikrobiyel etki gösterdiği fakat eşit konsantrasyonlardaki organik asitlerin disosiye olmayan formları karşılaştırıldığında, asetik asitin ve propiyonik asitin antimikrobiyel etkisinin laktik asitin etkisinden çok daha fazla olduğu belirtilmiştir (Tanıguchı ve ark.,1998).

Yine yapılan başka bir çalışmada da pH'nın ve çeşitli organik asitlerin (asetik, sitrik, malik asit ile L ve D-laktik asitin) 5–10 mM konsantrasyonlarda *E. coli* O157:H7 üzerine antimikrobiyel etkisi araştırılmıştır. Asitlerin 1–20 mM arası konsantrasyonları karşılaştırıldığında en büyük antimikrobiyel etkiyi D-laktik asitin gösterdiği belirlenmiştir. Sitrik asitin ise bu konsantrasyonlarda herhangi bir antimikrobiyel etki göstermediği belirtilmiştir. İnhibitör etkisi olmayan düşük pH tamponu olarak glukonik asitin kullanıldığı çalışmada, pH 3,2'de seçilen organik asitlerin varlığında ve yokluğunda *E. coli* 40 O157:H7 suşunun canlı kalabilme yeteneğinin araştırıldığı çalışmada, patojenin pH 3,2 değerine kolaylıkla adapte olduğu fakat organik asitlerin ortama ilavesiyle şaşırtıcı bir şekilde hücre sayısının 3 log'dan 2 log'a düştüğü belirlenmiştir (Bjornsdottir, 2006).

2.1.2.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

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

Laktik asit bakterileri katalaz enzimine sahip olmadığından ortamda biriken H_2O_2 *S. aureus* ve *Pseudomonas ssp.* gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etki gösterir (Adams, 1997). Bakteri membranlarını bozmada etkin rol oynayan bu bileşiğe en duyarlı bakteriler gram negatif bakterilerdir. H_2O_2 özellikle *E. coli*'de DNA'nın üzerinde denatürasyona sebep olabilir. Gerçekte kromozomik replikasyonu engelleyen nükleotid bazlarını açığa çıkararak DNA zincirinde kırılmalara sebebiyet verir (Kılıç, 2001).

H_2O_2'nin hücreler üzerine inhibitör etkisi onun konsantrasyonu ve muamele süresi ile mikrobiyel yük, sıcaklık, pH, inorganik iyonlar, UV veya diğer koruyucularla muamele edilmiş olması gibi faktörlerden etkilenmektedir (Çon ve Gökalp, 2000).

2.1.2.3. Diasetil

Süt ve süt ürünlerinde, bazen meyve sularında ve konsantre edilerek dondurulmuş meyve sularında da aroma oluşumu ile ilgisi olduğu bilinen özellikle tereyağına özgü aromayı kazandırması ile bilinen bu bileşiğin üretimi ortam bileşenleri, pH ve inkübasyon sıcaklığı gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişmektedir.

Başlıca dört laktik asit bakterisi cinsi olan streptokoklar, leukonostoklar, laktobasiller ve pediokoklar tarafından sentezlenebilmektedir (Jay, 1982). Diasetil, mayalar, gram negatif bakteriler ve laktik asit bakterileri dışındaki gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etki göstermektedir. GRAS statüsünde olmasına rağmen diasetilin gıda katkısı olarak kullanımı sınırlıdır. Antimikrobiyal etkinin sağlanabilmesi için diasetilin yüksek miktarlarda kullanımı gerekmektedir. Ancak yüksek düzeylerde diasetil kullanımı ürünün duyusal özelliklerini olumsuz etkileyebilmektedir. Yüksek uçucu özelliği nedeniyle diasetilin çeşitli malzemelerin ve yüzeylerin temizliğinde kullanımı önerilmektedir (Daeschel, 1989).

2.1.2.4. Reuterin

Reuterin; 3-hydroxypropanol (ß-hydroxypropionaldehyde) olarak tanımlanan ve yüksek çözünürlükte, nötr pH'lı, küçük boyutlu, antimikrobiyal özellikte, gliserolün fermantasyonu sırasında oluşan ara bir bileşiktir (Yang, 2000; Cleusix ve ark., 2007; Arslankoz, 2011). Anaerobik koşullarda gliserolden üretilen düşük molekül ağırlığında, protein yapıda olmayan yüksek çözünürlüğe sahip bir bileşiktir (Dobrogosz ve ark., 1989).

Lactobacillus reuteri insan ve hayvan kaynaklı bir heterofermantatif laktik asit bakterisidir (Cleusix ve ark., 2007). Bazı *Lactobacillus reuteri* suşları tarafından üretilen reuterin gıda kaynaklı patojenlere *(Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. gibi), *Candida* türü mayalara ve *Trypanosoma* protozoerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Daeschel, 1989). İnhibitör etkisinin DNA sentezine olan negatif etkisi ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Yang, 2000). *Lactobacillus reuteri* suşları probiyotik olarak kullanıldıklarında da mikrobiyolojik, kimyasal ve fiziksel streslerin zararlarına karşı koruyucu etki göstermektedir. Kolesterolün düşürülmesi, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi olumlu etkileri bulunmaktadır (Cleusix ve ark., 2007).

2.1.2.5. Karbondioksit

Heterofermantatif laktik asit bakterilerinin heksozu fermente etmeleri sonucu karbondioksit oluşur. CO_2 diğer metabolik yollarla da oluşsa bile esas olarak heterofermantatif laktik asit bakterilerinin heksozu fermente etmeleri süresince şekillenir. Karbondioksit anaerobik bir ortam oluşturarak, enzimatik dekarboksilasyonu inhibe etmekte, lipit membran yapısında birikerek, bu yapının geçirgenlik fonksiyonunu kaybetmesine neden olmaktadır (Yang, 2000). Antimikrobiyal etkisi bulunan CO_2 ortamdaki küf gibi zorunlu aerobik mikroorganizmaların üremesini inhibe etmek yoluyla da antimikrobiyal etki göstermektedir (Adams, 1997; Arslankoz, 2011). CO_2 özellikle gram negatif psikrotrofik bakterileri % 10 civarında, toplam bakteri miktarını % 50 civarında azaltmaktadır ve yine % 20-50'lik bir azaltma ile de antifungal etkiye sahiptir (Yang, 2000; Sezer, 2007)

2.1.2.6. Bakteriyosin

Çeşitli bakteri grupları tarafından ribozomal olarak sentezlenen, antimikrobiyal aktiviteye sahip peptit veya proteinlere bakteriyosin adı verilmektedir (Jack ve ark., 1995; Cotter ve ark., 2005; Zendo ve ark., 2010; Koral,2011). İlk kez 1925 yılında Gratia tarafından üretildiği tespit edilen bu maddeye -*E.coli* tarafından üretildiği için- kolisin adı verilmiştir (Gratia, 1925). Jacob ve ark., 1953 yılında bu spesifik antibakteriyel proteinler için genel bir terim olarak "bakteriyosin" terimini kullanmışlardır. Kolisin terimi ise artık *Enterobacteriaceae* ile yakın ilişkili türler ile *E. coli*'nin suşları tarafından üretilen bakteriyosidal proteinler için kullanılmaktadır (Sezer, 2007).

Bakteriyosinler bakteriler tarafından sentezlenerek ortama salgılanan ve genelde ilk olarak yakın türlerin inhibisyonunda etkili, kısa veya uzun zincirli protein tabiatında ikincil metabolit ürünleri olan antimikrobiyal etkili protein ya da peptitler olup, genellikle gastrointestinal sistemde proteazların etkisiyle inaktif hale gelen, çoğu küçük katyonik moleküllerdir. Genellikle 30 ila 60 arası amino asit içerirler (Holzapfel ve ark., 1995; Tagg ve ark., 1976; Kaya ve Gökalp, 2004).

Bakteriyosinlerin temel özellikleri, ribozomal olarak sentezlenmeleri ve protein yapısında olmaları ve yine özellikle yakın akraba türlere karşı antibakteriyel aktivite

göstermeleridir (Gillor ve ark., 2005; Koral, 2011). Aktivitelerinin benzerlik göstermesinden dolayı bakteriyosinler, birçok kaynakta antibiyotiklerle karıştırılmaktadır. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen ürünler olmaları antibiyotiklerin ise enzimatik işlenme aracılığıyla aktif formlarını kazanmaları; ve yine bakteriyosinlerin genellikle gelişme fazında üretilen birincil metabolitler olmaları antibiyotiklerin ise durma fazında üretilen ikincil metabolitler olmaları bakteriyosinleri antibiyotiklerden ayıran farklardandır. Her bakteriyosinin kendi dirençlilik proteini vardır. Dirençlilik proteinini kodlayan genlerin bakteriyosinin yapısal genleri ile bağlantılı olması antibiyotik dirençliliği yöneten genlerin ise yapısal antibiyotik genlerle bağlantısız olması bakteriyosinleri antibiyotiklerden ayıran bir diğer farktır. Aynı zamanda bakteriyosinlerin etki spektrumları antibiyotiklere göre çok daha dardır (Chen and Hoover, 2003; Gillor ve ark., 2005; Koral, 2011).

Çizelge 2.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırması ve elde edildikleri bakteriler

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

Enterocin B	*E. faecium*
3. Sınıf	
Helveticin J	*Lactobacillus helveticus*

Laktik asit bakterileri antimikrobiyal aktiviteli protein ve peptit üretme yeteneğine sahiptirler. Büyük proteinler (>20 kDa), çoğunlukla enzimatik aktiviteyle hedef bakterinin hücre zarına yönelir. Bakteriyosinlerin hedefi hücre zarı olsa da enzimatik olmayan aktivitelerini kullanarak da hedef hücre membranının bütünlüğünü bozarak veya hücre duvarının sentezini bozarak da etkili olabilmektedir (Twomey, 2002).

Bakteriyosinler farklı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Hücrenin sitoplazmik zarına bağlanarak, hücre içerisine girip zarda gözenekler oluşturmak suretiyle düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açmaktadırlar. İyonların -özellikle de ATP kaybı ve hücre içi pH dengesinin korunmasında etkili olan K+ iyonunun- hücre dışına sızması, hücrede enerji tüketimine neden olmaktadır. Hücredeki bu değişimler, DNA ve RNA gibi hücre için önemi büyük olan makromoleküllerin degredasyonuna, bu moleküllerin yanında protein ve peptidoglikan gibi biyolojik yapıların bozulmasına yol açmaktadır (Arslankoz, 2011).

Bakteriyosinlerin gıdalarda koruyucu olarak ilk kullanımları 1951 yılı olmasına rağmen, insanoğlu 8000 yıldır (peynir ve diğer fermente gıdaları üretmeye başladığından beri) farkında olmadan bakteriyosinlerden faydalanmaktadır. 1928 yılında çeşitli laktokok türlerinin diğer laktik asit bakterileri üzerinde inhibitör etki gösterdikleri belirlenmiştir. Nisin ilk olarak 1953 yılında ticari şekilde İngiltere'de satışa sunulmuştur ve günümüzde yaklaşık 50 ülkede kullanılmaktadır. 1969 yılında Gıda ve Tarım Organizasyonu/Dünya Sağlık Organizasyonu Gıda Katkıları Uzman Kurulu tarafından gıdalarda kullanımının güvenli olduğu onaylanmıştır (Akkoç ve ark., 2009; Arslankoz, 2007).

Laktik asit bakterilerinin pek çok üyesinin bakteriyosin ürettiği bilinmektedir. *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen acidophilin ve lactocidin, *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen plantarisin ya da *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin laktik asit bakterileri tarafından üretilen en bilinen bakteriyosinlerdir (Dinçer, 2007). Üretilen bakteriyosinler sayesinde -bakteriyosinin türüne bağlı olarak- özellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp*., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfiringens* gibi gıda kökenli patojen bakteriler inhibe olabilmektedir. Yine bakteriyosinlerin bazı gram

negatif bakteriler üzerinde de de etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Lewus ve ark., 1991; Messi ve ark., 2001).

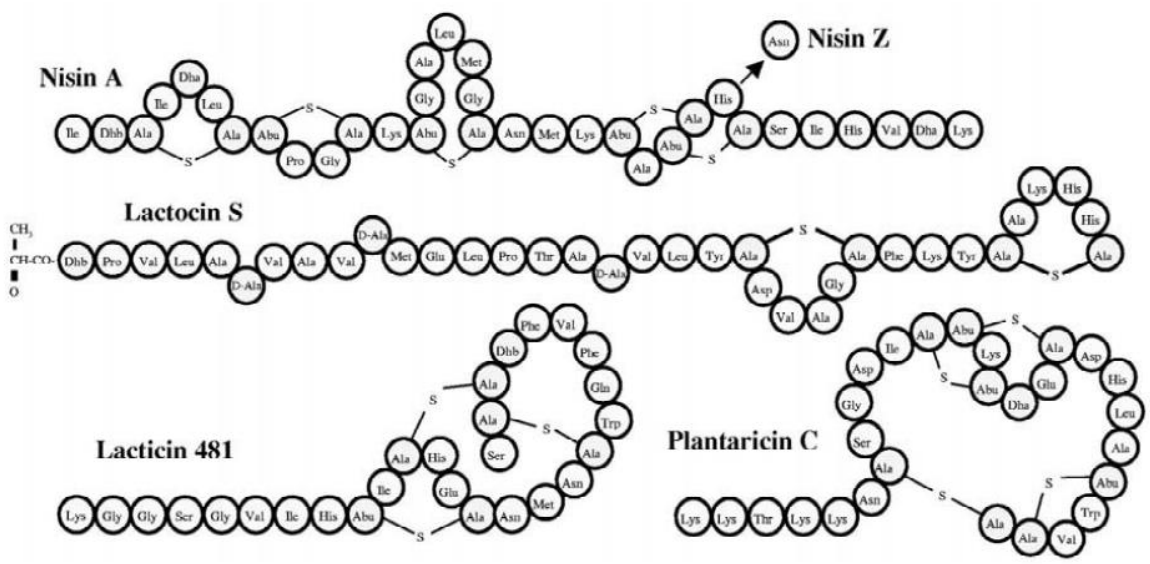
Bakteriyosinler protein yapısında bulundukları için proteazlara karşı duyarlıdırlar. Tripsin, α-kimotripsin ve pepsin gibi proteazlarla hidroliz işlemi bakteriyosinlerin protein yapısının tayini veya yeni bir bakteriyosinin karakterizasyonu amacıyla yararlanılan en yaygın uygulamadır. Bununla birlikte bakteriyosinlerin özellikle ısıl işlem uygulanan üretimlerde yüksek sıcaklıklara karşı gösterdikleri stabilite ve farklı pH değerlerindeki aktiviteleri de karakterizasyonlarında temel basamakları oluşturmaktadır (Cleveland ve ark., 2001; Desmazeaud, 1996).

2.1.2.6.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

Bakteriyosinler için spektrum ve aktivite mekanizması, moleküler yapı ve kütle, termostabilite, aktivitenin pH aralığı ve genetik determinantlar bakımından farklı sınıflandırmalar yapmak mümkündür. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, amino asit dizilimleri, etki mekanizmaları, biyolojik aktiviteleri, ısı toleransları, modifiye aminoasit varlıkları ve salgı mekanizmaları göz önünde bulundurularak 4 ana grup altında sınıflandırılmıştır (Klaenhammer, 1993; Diep and Nes, 2002; Jeevaratnam et al., 2005; Zendo et al., 2010).

2.1.2.6.1.1. Sınıf I bakteriyosinler (Lantibiyotikler)

Bu sınıf bakteriyosinler yapı ve bileşimleri modifiye olmuş amino asitleri içerir, bunlar “Lantibiyotik” olarak isimlendirilir. Lantibiyotikler yapılarında lanthionine bulundurdukları için bu ismi almışlardır. Lantibiyotikler, bilinen amino asitlerden farklı olarak lanthionine (Lan), α-methyllanthionine (MeLan), dehydroalanine ve dehydrobutyrine içeren küçük (<5kDa) ısıya dayanıklı polisiklik peptitlerdir (Cintas ve ark., 2001; Twoney, 2002; Chen ve Hoover, 2003).



Şekil 2.1. Farklı lantibiyotik gruplarının seçilen lantibiyotik peptidlerinin yapısının sembolik gösterimi

Lantibiyotikler translasyon sonrası modifiye olmuş peptitlerin amino asit kompozisyonu ve etki mekanizmaları esas alınarak Tip A ve Tip B lantibiyotikler şeklinde iki alt gruba ayrılmışlardır.

Pozitif yüklü Tip A lanbiyotikler, bakteri membranında porlar oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Biyokimyasal ve genetik düzeyde en iyi tanımlanmış olan "nisin" bir tip A bakteriyosindir. Nisin, 34 amino asit grubundan oluşan pentasiklik yapıda bir peptidir. Ortamda 3,75 ve 12,5 mg.kg-1 düzeylerinde nisin mevcudiyeti antibotülinal, antilisterial ve antistafilokokal aktivite sağlamaktadır (Hugas, 1998).

Vida şekilli katyonik kısa peptit zincirler halinde bulunan Tip A lantibiyotikler, duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranında elektrolitik dengeyi bozarak porlar oluşturmak suretiyle antimikrobiyal etki gösterirler. Tip A bakteriyosinlerin içerdiği modifiye amino asit sayısı 3–5 arasında değişmektedir. Nisin, subtilin, Pep5, epiderminin ve gallidermin Tip A bakteriyosinlerdendir. En bilinen tip Tip A bakteriyosini olan nisin 34 aminoasitten meydana gelen ve pentasiklik yapıda olan bir peptittir ve 3.75-12.5 mg/kg düzeyinde nisin antilisterial, antibotülinal ve antistafilokokal olarak etkilidir. Tip B lantibiyotikler ise daha küçük yüksüz veya negatif yüklü olup peptitlerden oluşan küresel şekilli protein molekülleridir. Antimikrobiyel aktiviteleri hedef hücre metabolizmasının esansiyel enzimlerinin inhibisyonuyla ilgilidir. Tamamı kısa peptit zincirlerinden oluşan tip B lantibiyotiklerin molekül ağırlıkları 1.9–4.6 kDa arasındadır. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyel etki gösterirler. Mersasidin ve sinnamisin tip B bakteriyosinlere örnektir.

(Gillor ve ark., 2005; Reunanen, 2007; Todorov, 2009; Chen ve Hoover, 2003; Twomey ve ark., 2002)

Günümüzde 30 farklı bakteri tarafından üretilen yaklaşık 50 adet lantibiyotik grubu bakteriyosin tanımlanmıştır (Patton ve Van der Donk, 2005; Breukink ve Kruijff, 2006; Koral,μμμ 2011). Sınıf 1 bakteriyosinlerin üretiminden sorumlu gen kümeleri, plazmidler veya transpozon gibi hareketli elemanlar üzerinde veya bakteri kromozomu üzerinde lokalize halde bulunabilirler (Gillor ve ark., 2005). Sınıf 1 bakteriyosinlerin çoğu için yapısal genleri içeren gen kümelerinin DNA dizisi belirlenmiştir. Lantibiyotik gen kümeleri çeşitli korunmuş genler içermektedir. Korunmuş bu genlerin translasyon ürünleri olan; öncü protein LanA, öncü proteinin modifikasyonundan sorumlu enzimler LanM veya LanB ve LanC, lider peptidin uzaklaştırılması için gerekli proteaz LanP, modifiye öncü peptidin taşınmasını sağlayan protein LanT, biyosentezi düzenleyen proteinler LanK ve LanR, dirençliliği sağlayan LanI ve LanFEG proteinleri farklı lantibiyotiklerin biyosentezinde benzer aktiviteleri gerçekleştirmektedir (Reunanen, 2007; Koral 2011).

2.1.2.6.1.2. Sınıf II bakteriyosinler

Karakterize edilmiş en geniş bakteriyosin grubu olan bu grup ısıya dayanıklı, küçük molekül ağırlığına sahip, lantiyonin, β-metillantiyonin, dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi peptitler içermeyen bakteriyosinlerin karakterize edildiği bakteriyosin grubudur. Bu grup üyesi bakteriyosinler, grup IIa, grup IIb, grup IIc ve grup IId olmak üzere 4 alt gruba ayrılmıştır (Cintas, 2001; Jeevaratnam ve ark., 2005; de Vuyst ve Leroy, 2007; Todorov, 2009).

Grup IIa bakteriyosin grubu Listeria türlerine karşı gösterdiği etkiden dolayı ‘pediyosin benzeri antilisteriyal bakteriyosinler’ olarak bilinirler. IIa alt grubunu antilisteriyal aktiviteli pediocin benzeri bakteriyosinler oluşturur. Pediyosin benzeri peptitler *L. monocytogenes* dahil Gram pozitif bakterilere karşı büyük bir antimikrobiyel etkiye sahiptir. Pediyosinler sporlara karşı çok etkili olmamasına rağmen et gibi bazı gıda sistemlerinde nisinden çok daha fazla etkilidir. Pediyosinler fermente etlerin üretiminde kullanılan esas starterlerdir. Ayrıca sebzelerin fermantasyonlarında da önemli görevler alırlar. Yine plantarisinler ve laktokoksinler de bu grubun önemli bakteriyosinleridir (Abee ve ark.,1995; Sezer 2007).

Bakteriyosinlerin çoğu ortama tek bir peptit salgılayarak etkili olurken Grup IIb bakteriyosin grubu ise aktivitelerini gösterebilmeleri için iki peptit birden salgılar. Bu iki peptit tek başlarına aynı antibakteriyel etkiyi göstermekten uzaktırlar (Sezer,2007). Grup IIc bakteriyosinleri de siklik bakteriyosinler olup, karakteristik olarak yukarıdaki bu 3 gruba dahil edilmeyen bakteriyosinler de grup II'de incelenir (Koral, 2011; Jeevaratnam ve ark., 2005; de Vuyst ve Leroy, 2007; Todorov, 2009).

2.1.2.6.1.3. Sınıf III bakteriyosinler

Yüksek molekül ağırlığına sahip (30 kDa ve üzeri) ve ısıya karşı hassas bakteriyosinler bu grupta incelenmektedir. Bu grupta bulunan bakteriyosinlerin çoğu '*Lactobacillus spp.*' bakteriyosinleridir (Klaenhammer, 1993; Sezer, 2007). *Lb. helveticus* tarafından üretilen helvetisin J, helvetisin V-1829 ve *Lb. acidophilus* tarafından üretilen laktisin B bu grup içerisinde yer almaktadır (Chen ve Hoover, 2003; Jeevaratnam ve ark., 2005; de Vuyst ve Leroy, 2007; Todorov, 2009; Koral 2011).

2.1.2.6.1.4. Sınıf IV bakteriyosinler

Bu grup bakteriyosinlerin en önemli özellikleri, aktiviteleri için polipeptit yanında lipoprotein veya glikoprotein gibi kompleks grupların da gerekli olmasıdır. Molekül ağırlıkları sınıf III bakteriyosinlere çok yakındır. Plantarisin S, laktosin 27 ve leukonosin S bu grup içerisinde incelenmektedir (Ennahar ve ark., 2000; Nes ve Holo, 2000; Jeevaratnam ve ark., 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Laktik asit bakterileri ve kullanılan besiyerleri

Çalışmada fermente ürünlerden elde edilen laktik asit bakterileri kullanılmıştır. Kullanılan laktik asit bakterileri Namık Kemal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Temin edilen bu bakteriler önceki çalışmalarda biyokimyasal testlere ve 16S rRna sekans analizlerine tabii tutulmuştur. Bu bakterilerin bir kısmı Trakya yöresinde üretilen hardaliye turşusundan (50 adet) diğer bir kısmı ise yine Trakya yöresi mamulu Sürk peynirinden (20 adet) izole edilmiştir. Temin edilen bakteriler %20'lik steril gliserol ilaveli deMan Rogosa Sharp (MRS) besiyerinde -20°C'da muhafaza edilmiştir. Yine çalışma periyotlarında bu bakteriler haftalık transferler yapılarak +4°C'da bulundurulmuştur. Çizelge 3.1.'de çalışılan laktik asit bakterileri ve elde edildikleri kaynaklar belirtilmiştir. İlk aşamada antimikrobiyal özellikleri test edilen 72 adet laktik asit bakterisi zon çapları ve stabiliteleri göz önüne alınarak 24 adede indirilmiştir ve bu 24 adet bakterinin bakteriyosin benzeri antimikrobiyal etkileri karakterize edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterisi izolatları ve kaynakları

Tür	İzolat No	İzole Edildiği Kaynak
Lactobacillus plantarum	HR01*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR02*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus pentosus	HR14*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR21*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR22*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR27	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR30*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR33	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR34	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR35	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR37	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR38	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR39	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR40	Hardaliye Turşusu

Lactobacillus plantarum	HR42	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR43	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR48	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR49*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus pentasus	HR50*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus pentasus	HR51*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR54*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus pentasus	HR56	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR57*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus pentasus	HR59	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR60*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR62*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR64	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR75	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR77	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR84	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR85*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR86*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR88*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR89*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR91*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR92*	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR93	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR94	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus brevis	HR95	Hardaliye Turşusu
Lactobacillus plantarum	HR97	Hardaliye Turşusu
Pediococcus acidilactici	6	Sürk Peyniri
Lactobacillus brevis	L1	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	15	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	L29(i)	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	13	Sürk Peyniri
Lactobacillus brevis	L11	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	18	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	L8	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	L6	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	L25	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	L9	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	11	Sürk Peyniri
Lactobacillus paracasei	L19*	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	21	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	17	Sürk Peyniri

Lactobacillus paracasei	4	Sürk Peyniri
Lactobacillus brevis	L5*	Sürk Peyniri
Lactobacillus paracasei	L15	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	L23	Sürk Peyniri
Lactobacillus paracasei	L18	Sürk Peyniri
Lactobacillus brevis	L26	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	L29	Sürk Peyniri
Lactobacillus paracasei	L27	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	10	Sürk Peyniri
Lactobacillus paracasei	7	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	14	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	L22	Sürk Peyniri
Lactobacillus paracasei	L30*	Sürk Peyniri
Lactobacillus paracasei	L20	Sürk Peyniri
Lactobacillus paracasei	L16	Sürk Peyniri
Lactobacillus paracasei	L14	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	1	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	L7	Sürk Peyniri
Pediococcus acidilactici	9	Sürk Peyniri
Lactobacillus brevis	L24	Sürk Peyniri

* İlk denemelerin ardından çalışmanın zon çaplarına göre belirlenen ve denemenin kalanında çalışılan suşlar

3.1.2. İndikatör patojen bakteriler ve kullanılan besiyerleri

Çalışmada ilgili laktik asit bakterilerinin bakteriyosin benzeri antimikrobiyal özelliklerinin saptanmasında Konya İl Kontrol Müdürlüğü'nden temin edilen *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve Salmonella Typhimurium ATCC 14028 patojen bakterileri kullanılmıştır. Kullanılan bu indikatör patojen bakterilerin uzun vadeli muhafazası Brain Hearth Infusion (BHI) Broth besiyerinde %20'lik steril gliserol ilavesiyle -20°C'da gerçekleştirilirken, kısa vadeli muhafazası ise +4°C'da haftalık transferlerle sağlanmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Agar-sandviç yöntemi

Bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde yöntem olarak Mayr-Harting ve ark., (1972) tarafından bildirilen 'Agar-sandviç yöntemi' kullanılmıştır. MRS brothda mikroaerofilik olarak 30°C'da 24 saat inkübasyona bırakılıp aktifleştirilmiş olan laktik asit bakterisi izolatlarından, MRS agara (1 petri kutusunda 4 izolat olacak şekilde) 1µl damlatılmıştır. Laktik asit bakterileri gelişim için anaerobik ortamda 18 saat inkübe edilmiştir. 5 ml yumuşak agarlı (% 0,7 agar içeren) Brain Heart Infusion Broth (35-40°C'a kadar soğutulduktan sonra) üzerine belirtilen indikatör patojen bakterilerden 100 µl pipetlenmiştir ve iyice karıştırıldıktan sonra bu yumuşak agarlı besiyerleri -24 saat inkübasyon sonrası gelişen- laktik asit bakterisi izolatlarının üzerine yavaşça dökülmüştür. Besiyerleri katılaştıktan sonra indikatör bakteriler için optimum gelişme sıcaklıklarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda inhibisyon zonları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Denemeler 3 tekrarlı yapılmış ve sonuçlar inhibisyon zonlarının ortalamaları alınarak verilmiştir.

3.2.2. Bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi

3.2.2.1. Farklı besiyeri pH'larının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

Laktik asit bakterilerinin ekimi için hazırlanan MRS Agar besiyerlerinin pH'ları 1M NaOH ve 1M HCl kullanılarak 4.5, 5.5, 6.5 ve 7.5'a ayarlanmıştır. Sonrasında bakteriler bu farklı pH'lardaki besiyeri yüzeyine 1'er µl ekilmiştir (Hugas, 1998). İnkübasyonun ardından indikatör patojen mikroorganizmaları içeren % 0,7 agarlı BHI besiyeri, laktik asit bakterilerinin geliştiği petrilerin yüzeyine dökülmüştür. Besiyerinin katılaşmasını takiben bu petri kutuları 35°C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından zon çapları ölçülmüştür.

3.2.2.2. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

Bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivitenin hangi gelişme düzeyinde maksimum olduğunu gözlemleyebilmek amacıyla laktik asit bakterisi izolatları MRS Agar yüzeyine ekilmiş ve 25°C**,** 30°C, 32°C ve 35°C sıcaklıklarda 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda indikatör patojen mikroorganizmaları içeren % 0,7 agarlı BHI besiyeri, laktik asit bakterilerinin geliştiği petrilerin yüzeyine dökülmüştür. Besiyeri katılaştıktan sonra bu petri kutuları 35°C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında ise zon çapları ölçülüp kaydedilmiştir (Marshall, 1992).

3.2.2.3. Katalazın bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

Diğer enzimlerde olduğu gibi katalaz enzimi 4 mM (pH 7) fosfat tamponu ile son konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde çözündürülmüş ve 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Bhunia et al.,1988). MRS agara ekimi yapılıp 24 saat inkübasyona tabii tutulan laktik asit bakterilerinin üzerlerine sterilize edilen katalaz enziminden 1µl damlatılmıştır. Ve inhibisyon zonları Agar-Sandviç Yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve kaydedilmiştir.

3.2.2.4. Proteolitik enzimlerin bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

Bakteriyosin benzeri antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonunda "α-chymotrypsin" (Sigma-Aldrich, A.B.D.),"pepsin" (Sigma-Aldrich, A.B.D.)"trypsin" (Sigma-Aldrich, A.B.D.) enzimleri kullanılmıştır. Enzimler 4 mM (pH 7) fosfat tamponu ile son konsantrasyonu 1ųg/ml olacak şekilde çözündürülmüş ve 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Bhunia ve ark., 1988). MRS agara ekimi yapılıp 24 saat inkübasyona tabii tutulan laktik asit bakterilerinin üzerlerine steril edilen enzimlerden 1µl damlatılmıştır. Laktik asit bakterileri enzimlerle 37°C 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 5 ml yumuşak agarlı (% 0,7 agar içeren) Brain Heart Infusion Broth (35-40°C'a kadar soğutulduktan sonra) üzerine belirtilen indikatör patojen bakterilerden 100 µl pipetlendikten ve iyice karıştırıldıktan sonra -24 saat inkübasyon sonrası gelişen- laktik asit bakterisi izolatlarının üzerine

yavaşça dökülmüştür. Besiyeri katılaştıktan sonra optimum gelişme sıcaklığında 35°C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bilahare inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Denemeler 3 tekrarlı yapılmıştır (Omar ve ark.,2006).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Laktik asit bakterisi izolatlarının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal madde üretimlerine farklı besiyeri başlangıç pH'larının etkisi

Çalışmada laktik asit bakterilerinin ilgili indikatör patojen bakterilere karşı oluşturdukları zon çapları 4,5, 5,5, 6,5 ve 7,5 besiyeri pH'larında ölçülmüştür. Besiyeri başlangıç pH'sının inhibisyon zon çapına etkisi Çizelge 4.1.'de verilmiştir. En yüksek zon çapları pH 4,5'da ölçülmüştür. Bunu sırasıyla pH 5,5 ve pH 7,5'da ölçülen zon çapları takip etmiştir. En küçük inhibisyon zon çapları ise besiyeri pH'sı 6,5'a ayarlandığında ölçülmüştür.

İnhibisyon zon çapına besiyeri başlangıç pH'sının etkisi HR62 ve HR14 suşları üzerinden verilecek olursa; HR62 suşu pH 4,5'da indikatör patojenlere karşı 2,8 cm zon oluştururken pH 5,5'da ortalama 2,4 cm, pH 6,5'da ortalama 1,68 cm ve pH 7,5'da ortalama 2,1 cm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Yine HR14 suşu da indikatör patojen bakterilere karşı sırasıyla pH 4,5, 5,5, 6,5 ve 7,5'da 2,72 cm, 2,02 cm, 1,52 cm ve 1,6 cm inhibisyon zonu meydana getirmiştir.

Besiyeri başlangıç pH'sının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal madde oluşumuna etkisinin çalışıldığı çalışmalarda antimikrobiyal aktivitesi denenen laktik asit bakterisinin türüne göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Lactobacillus suşlarıyla çalışıldığında genellikle daha asidik pH'lar optimum diye nitelendirilirken, Enterecoccus, Lactoccoocus ve Pedioccoocus suşlarıyla çalışıldığında ise biraz daha nötrale yakın pH'ların (pH 6-6,5) optimum olduğu görülmüştür.



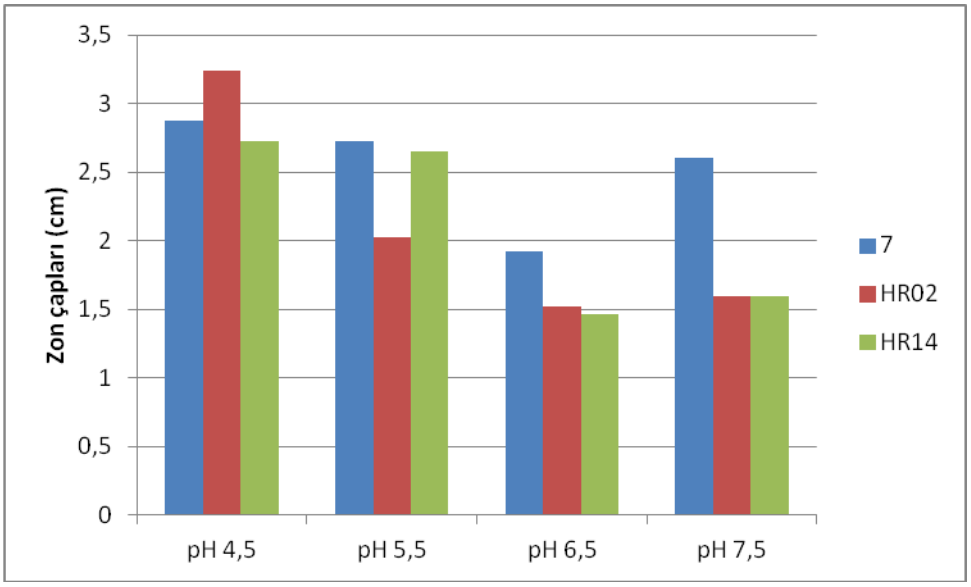
Şekil 4.1. pH 5.5'da *S. typhimurium*'a karşı üretilen zonların görüntüleri



Şekil 4.2. pH 6.5'da *L. monocytogenes*'e karşı üretilen zonların görüntüleri

Çizelge 4.1. Farklı besiyeri başlangıç pH'larının laktik asit bakteri izolatlarının indikatör patojen bakterilere karşı oluşturduğu inhibisyon zon çaplarına etkisi.

İndikatör Patojen Bakteriler	pH	İZOLATLAR (cm)																						
		7	**HR01**	**HR02**	**HR14**	**HR21**	**HR22**	**HR30**	**HR37**	**HR49**	**HR50**	**HR51**	**HR54**	**HR57**	**HR60**	**HR62**	**HR85**	**HR86**	**HR88**	**HR91**	**HR92**	**HR97**	**L19**	**L30**	**L5**
Escherichia coli	**4,5**	2	1,5	2,25	2,2	0,9	2,8	2,6	2,7	2	2,7	2,5	3	2,4	3	3	1,7	2,3	1,2	2,4	2	4,5	2,8	1,75	1,3
	5,5	2,6	1,8	1,4	3,5	2,4	2	2	1,7	4,5	1,1	1,5	2	0,7	3	2,4	3	2,6	2	2	1,5	1	1,2	1,4	1,4
	6,5	2,2	2,2	2,3	2,2	2,3	2,3	2,4	2,5	4	3	2,2	2,3	2,5	1,7	1,5	2,4	2,6	2,6	1,9	2	3	2,5	2	2,3
	7,5	3,5	1,1	2,4	1,8	2	2	2	1,8	2	2,5	1,5	2,5	2	3	1,2	3,5	1,5	2,5	1,5	1,5	2	1	2	2
Listeria monocytogenes	**4,5**	3,8	3	4,5	3	1	2	2,5	3	2	2,4	1,5	1,5	1,2	2	1,2	1,1	1,9	0,9	2	0,8	2	0,8	2,4	2
	5,5	1,2	2	1	2	1	2	0,8	1,1	1,5	1	1,8	1,7	1	0,8	1	0,9	1,7	1	0,8	1,2	1,8	1,5	1	1,7
	6,5	1,3	1,4	1	1,1	0,8	1,2	1,2	1,6	1,3	1,1	1,8	1,5	1,1	1,4	1,1	1,8	2,1	1,3	1,2	1,3	1,3	0,9	0,8	1
	7,5	2,5	0,8	1,2	1,6	2,3	2,2	2,7	1,34	2,2	1	2,2	1,7	1,5	2,3	2	3,2	1,9	1	2	3,1	1,2	1,4	1,2	2,4
Salmonella Typhimurium	**4,5**	1,7	2,4	2	1,8	0,7	2	1,8	1	2	0,5	1,5	1,4	2	0,8	2	2	1,6	1,6	1,7	1,5	1,2	1,4	0,8	1,2
	5,5	2,1	2	1	1,1	1,3	1,5	1,2	1,5	2	0,8	1	1,8	1,6	0,8	1,2	1,3	1,5	1,9	1,5	1,4	1,3	1,5	1,3	1,7
	6,5	1,5	0,9	0,8	1,35	0,7	1,6	1	2	2	1	1,9	1,6	1,4	1,5	1,1	1,6	1,5	1,8	1,1	1,4	1,4	0,85	0,8	1,4
	7,5	2	1,5	1,1	2	2	2	1,8	2	2	1,3	1,6	1,4	2	2,5	2,5	1,65	2	1,6	1,5	2,4	2	2	0,9	2
Staphylococcus auerus	**4,5**	4	4,8	4,2	3,9	5	5	5	4,6	4	4,2	5	5	4,3	5	5	4,8	4,7	5	5	4,6	4	3,8	4,2	5
	5,5	5	4	4,7	4	3	3	4	4	3,5	4,3	2,5	1,8	3	2,3	5	3,5	3,2	3,6	3,6	4	3,6	3,6	3,8	3,8
	6,5	2,7	2,3	2	1,2	3	2,6	3,1	3	2	3,2	2,4	3	2,5	3	3	2,5	4,5	3	2,9	2	2	1,5	1,7	3
	7,5	2,4	2	1,7	1	2,5	1,9	1,9	1,7	2,3	2,35	1,3	2	1,3	1,8	2,7	2,3	2,4	1	1,7	1,6	1,85	2,3	1,7	1,5



Şekil 4.3. 7, HR02 ve HR14 suşlarının farklı pH'larda tüm indikatörlere karşı oluşturdukları inhibisyon zonlarının ortalamaları.

Çalışmada elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur. *Lb. plantarum* NCIM 2084 tarafından üretilen plantarisin LP84'ün antimikrobiyal aktivitesinin karakterize edildiği bir çalışmada bu bakteriyosinin optimum aktiviteyi pH 4.5-4.8'de gösterdiği belirlenmiştir (Varadaraj ve ark., 1998).

Atsous ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada da tropikal bir meyve olan guavadan hazırlanan nektarlarda *Lb. plantarum* ATCC 8014 tarafından üretilen Plantarisinin *Bacillus cereus'a* karşı oluşturduğu etkinin pH 4'ün altında ve pH 5'in üzerinde inaktif olduğu fakat aynı bakteriye karşı *Lactococcus lactis* ssp. *lactis ATCC 11454* tarafından üretilen nisinin aktivitesinin pH 3-10 aralığında stabil ve aktif olduğu belirtilmiştir.

Fricourt (1994)'un yaptığı çalışmada Yayın balığından izole edilen *Lactobacillus plantarum* BF001'in ürettiği Plantaricin F'in pH 3,5'da en optimum aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Aynı çalışma grubunun yine *Lactobacillus plantarum* BF001'in ürettiği Plantaricin F üzerine yaptığı benzer bir çalışmada bu kez bakteriyosin aktivitesi için optimum pH 4 olarak tespit edilmiştir (Paynther, 1997).

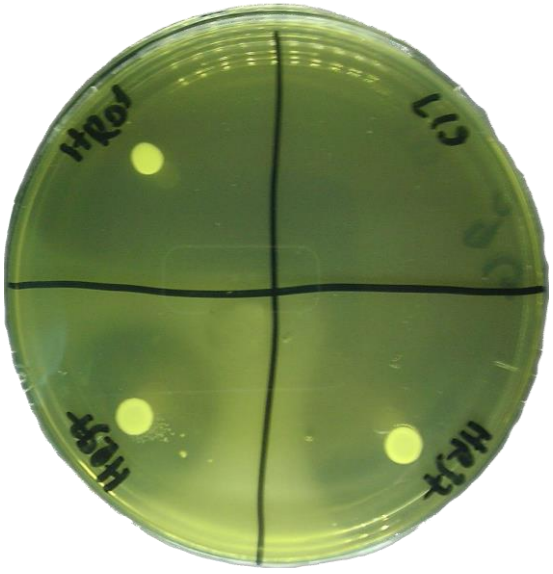
Benzer olarak yine plantaricin aktivitesine besiyeri pH'sının etkisinin araştırıldığı çalışmada en yüksek plantaricin aktivitelerinin pH 5 ve pH 5,5'da meydana geldiği saptanmıştır (Essam ve ark, 2013).

Yine bir diğer çalışmada da peyniraltı suyundan izole edilen Lactobacillus plantarum LL441 tarafından üretildiği tespit edilen Plantaricin C nin optimum aktiviteyi pH 5'de gerçekleştirdiği saptanmıştır. Yine Lactobacillus brevis OG1 suşunun ürettiği bakteriyosinin karakterizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada ise optimum besiyeri ilk pH'sının 5,5 olduğu saptanmıştır (Ogunbanwo ve ark., 2003). Çiğ sütten izole edilen *Lb. plantarum'*un ürettiği bakteriyosinin karakterizasyonun yapıldığı bir çalışmada araştırıcılar maksimum bakteriyosin aktivitesinin pH 5'de gerçekleştiğini tespit etmişlerdir (Sankar, 2012).

4.2.Laktik asit bakterisi izolatlarının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal madde üretimlerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

İzolatların bakteriyosin benzeri madde üretimlerine inkübasyon sıcaklıklarının etkisi incelenirken 25°C, 30°C, 32°C ve 35°C sıcaklıkları denenmiştir ve bu sıcaklıklarda ölçülen zon çapları kaydedilmiştir. Çizelge 4.2.'de de görüldüğü üzere 30°C, 32°C ve 35°C'da inkübe edilen laktik asit bakterilerinin oluşturduğu inhibisyon zon çaplarının birbirine yakın olduğu gözlenmekle birlikte en yüksek inhibisyon zon çapı ortalaması 35°C inkübasyon sıcaklığı uygulamasında görülmüştür. 25°C'da inkübe edilen izolatlar ise çok düşük zon çapları vermiştir.

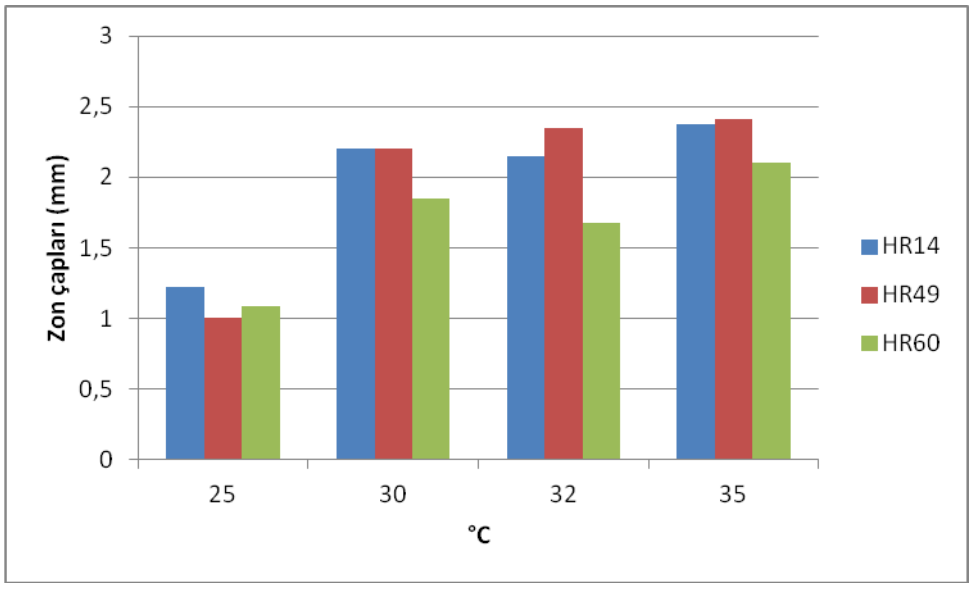
Suşlar üzerinden örnek verilecek olursa HR49 suşu 35°C'da indikatör patojen bakterilere karşı ortalama 2,41 cm zon verirken 32°C'da ortalama 2,35 cm, 30°C'da 2,2 cm ve 25°C'da ise 1 cm'lik vermiştir. HR14 suşu için ise 35°C'da ortalama 2,37 cm zon gözlenirken 32°C, 30°C ve 25°C'da ölçülen zon çapları sırasıyla 2,15 cm, 2,2 cm ve 1,22 cm olmuştur.



Şekil 4.4. 32 C^0'de *E. coli*'ye karşı üretilen zonların görüntüleri

Çizelge 4.2. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının laktik asit bakteri izolatlarının indikatör patojen bakterilere karşı oluşturduğu inhibisyon zon çaplarına etkisi.

İndikatör Patojen Bakteriler	°C	İZOLATLAR (cm)																							
		7	**HR01**	**HR02**	**HR14**	**HR21**	**HR22**	**HR30**	**HR37**	**HR49**	**HR50**	**HR51**	**HR54**	**HR57**	**HR60**	**HR62**	**HR85**	**HR86**	**HR88**	**HR91**	**HR92**	**HR97**	**L19**	**L30**	**L5**
Listeria monocytgenes	**25**	1,3	0,8	1,85	1,2	0,85	1,3	1,15	1,5	1,1	1,5	1	1,1	1,4	0,85	0,95	0,85	1	0,9	1,5	1	1,3	0,8	1	1,2
	30	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1	1,2	1	1,1	1	1,5	1,2	1,3	1,7	1	1	1,2	1,4	1	1	1,2	1,3	0,9	1	1
	32	2	1	1,8	1,3	1,3	1,35	1,6	1,7	1,5	0,75	1	1,6	1,5	1,1	0,95	1,4	1,3	0,8	0,9	1,4	1,5	1	1,2	1,2
	35	1,8	1,7	2,25	2,5	2	1,7	1,8	1,5	1,9	0,75	1,8	1,7	2	2,7	2	1,6	1,6	2,2	1,2	1,7	2	2	1,8	1,4
Salmonella Tymphirum	**25**	1	1,3	1,3	1,5	1,1	1,5	1,4	1,3	1	1,3	1,5	1,5	2	1	1	0,9	1	1	1,5	1	0,8	1,5	0,8	1,3
	30	1,6	1,7	1,2	1,4	1,2	1,6	1,3	1,5	1,5	1,9	1,5	2	1,1	1,5	1,5	1,5	1,2	1,4	1,5	2	1,8	1,6	0,9	1,5
	32	1,7	1,3	1,8	1,4	1,4	2,2	1,6	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	2,5	1,4	1,8	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	35	1,4	1,5	1,8	2	1,35	2,2	1,4	1,4	1	1	1,4	1,2	1,1	1,1	1,2	1,7	1,6	0,8	1,4	1,6	1,4	1,5	1,4	1,5
Staphylococcus aureus	**25**	1,5	2,9	5	1,3	2,6	2,6	3,5	5	1	2,2	5	3	4	1,8	2,3	1,2	4	2,4	2,5	2,6	3	2	2	1
	30	5	5	5	5	4	5	3	5	5	5	3	5	4	4	5	5	**3**	3,2	1,3	2,8	2,7	2,4	5	5
	32	2,4	5	3	5	3,8	5	3,2	3	5	1,6	5	3,6	5	3,2	3,6	3	4	5	5	5	3,5	3,4	4,8	1,8
	35	5	3,2	2,6	3	3	3,5	3	3,6	5	3,6	3	3	3,6	3	3	4	3,4	1,8	3,2	3	3,6	3	3,1	4
Echerichia coli	**25**	0,9	1,1	0,75	0,9	1	1,5	1,35	1	0,9	0,8	1,5	1	1	0,7	0,75	1	1	1	0,7	0,7	1,4	0,95	0,85	1
	30	1,1	1,3	1,3	1,2	0,9	1,2	1,1	1,3	1,3	0,9	1,4	1,4	1,4	0,9	1	1,1	1,2	1,3	2,8	1	1	0,9	1	1
	32	1,4	1,3	2	0,9	1,3	1,8	1	1,6	1,4	1	1,9	1,35	1,5	1	0,9	1,3	1,5	1,4	0,5	1,5	1,4	0,5	1	0,85
	35	1,3	2	1,5	2	2,1	1,5	1,2	1,7	1,75	1,2	1,2	1,5	1,2	1,6	1,35	1,5	2,2	1	1,2	2	1,5	1,3	1,5	1,3



Şekil 4.5. HR14, HR49 ve HR60 suşlarının farklı sıcaklıklarda oluşturdukları inhibisyon zon ortalamaları.

Lb. plantarum ve *Lb. acidophilus* izolatlarının bakteriyosin aktivitelerine inkübasyon sıcaklığının etkisinin incelendiği bir çalışmada *Lb. plantarum* için optimum inkübasyon sıcaklığı 30°C olarak saptanırken, *Lb. acidophilus* için maksimum bakteriyosin aktivitesi 35°C'da gözlenmiştir (Essam ve ark., 2013).

Pediococcus acidilactici PBF suşunun ürettiği pediyokokun karakterizasyonunun yapıldığıbir çalışmada bakteriyosin aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının (30°C, 35°C ve 40°C) etkisi gözlenmiş ve sonuç olarak en ideal sıcaklık olarak 35°C bulunmuştur.

Ogunbanwo ve ark. (2003), *Lactobacillus brevis OG1* suşunun ürettiği bakteriyosinin karakterizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada optimum bakteriyosin aktivitesinin 30°C inkübasyon sıcaklığı kullanışdığında elde edildiğini belirtmişlerdir.

Malini ve Savitha (2012), Hindistan'ın yerel peynirlerinden izole ettiği laktik asit bakterilerinin bakteriyosinojenik özelliklerini araştırdığı çalışmasında *Lb. paracasei* suşunun ürettiği bakteriyosin için farklı inkübasyon sıcaklıkları arasından 35°C en ideal bakteriyosin üretiminin ve aktivitesinin saptandığı sıcaklık olarak bildirilmiştir.

İnkübasyon sıcaklığı ve gelişme fazının enterosin HZ üretimi ve aktivitesi üzerine etkisini saptamak için *E. faecium* HZ 25, 32 ve 37°C'da inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda *E. faecium* HZ'nin bakteriyosin üretimi ve aktivitesi açısında incelendiğinde 32°C ve 37°C inkübasyon koşullarında enterosin HZ üretiminin maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir (Bilgin, 2008).

Karagül, (2010), 9 adet *Lb. plantarum*, 5 adet *Lb. paracasei* ve 5 adet *Lb. brevis*'in meydana getirdiği laktik asit bakterilerinin farklı gelişme sıcaklıklarında geliştirilmesi sonrasında oluşturdukları bakteriyosin benzeri antimikrobiyal maddeleri incelemiş ve 25 ve 42 °C'da geliştirilen LAB izolatlarının meydana getirdiği zon çaplarının daha az, 30 ve 35 °C' da geliştirilen laktik asit bakterilerinin oluşturduğu zon çaplarının daha geniş olduğunu saptamıştır.

Sifour ve ark. (2012), *Lactobacillus plantarum F2* bakterisinin bakteriyosinin *Listeria monocytogenes* patojenine karşı inhibisyon aktivitesini gözlerken inkübasyon sıcaklığının (30°C, 37°C ve 40°C) bakteriyosin üretimine etkisini araştırmışlardır. Sonuçta en optimum bakteriyosin üretiminin 37°C'da gerçekleştiği sonucuna varmışlardır.

Malezya'nın geleneksel fermente balık ürünü olan 'Budu'dan izole etikleri *Lb. paracasei* LA07 suşunun üretiği bakteriyosini katakterize edildiği çalışmada 25°C, 30°C, 35°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıkları denenmiştir. Bu sıcaklıklardan en ideal inkübasyon sıcaklığı 30°C olarak bulunmuş, yine 35°C az bir farkla 2. en ideal sıcaklık olarak bulunmuş ve 25°C'de ise bakteriyosin aktivitesinin çok düştüğü gözlenmiştir (Sahar ve ark., 2011).

Yine 30°C, 37°C ve 45°C inkübasyon sıcaklıklarının farklı et ve süt ürünlerinden izole edilen laktobasillerin bakteriyosin aktivitelerinin gözlendiği bir çalışmada en yüksek inhibisyon zon çapları 30°C'da inkübe edilen bakterilerde, ardından 37°C'da inkübe edilenlerde görülmüştür (Djadouni ve Kihal, 2012).

4.3. Laktik asit bakterisi izolatlarının bakteriyosin benzeri antimikrobiyal madde üretimlerine çeşitli proteolitik enzimlerin ve katalaz enziminin etkisi

Bakteriyosinler protein kökenli maddeler oldukları için bakteriyosin karakterizasyonu çalışmalarında çeşitli proteolitik enzimler kullanılmaktadır. α-kimotripsin, pepsin ve proteinaz K gibi proteolitik enzim uygulaması sonucu inhibitör etkinin tamamen veya kısmen ortadan kalkması üretilen antibakteriyel maddenin bakteriyosin olduğunu, proteolitik enzim uygulamasına karşı stabil olması ise üretilen antibakteriyel maddenin bakteriyosin dışında başka bir inhibitör madde olabileceğini göstermektedir. Bunun yanında bakteriyosin benzeri aktivite nedeniyle oluşan inhibisyon zonu aynı zamanda H_2O_2 sebebiyle de gerçekleşebileceği için katalaz enzimi

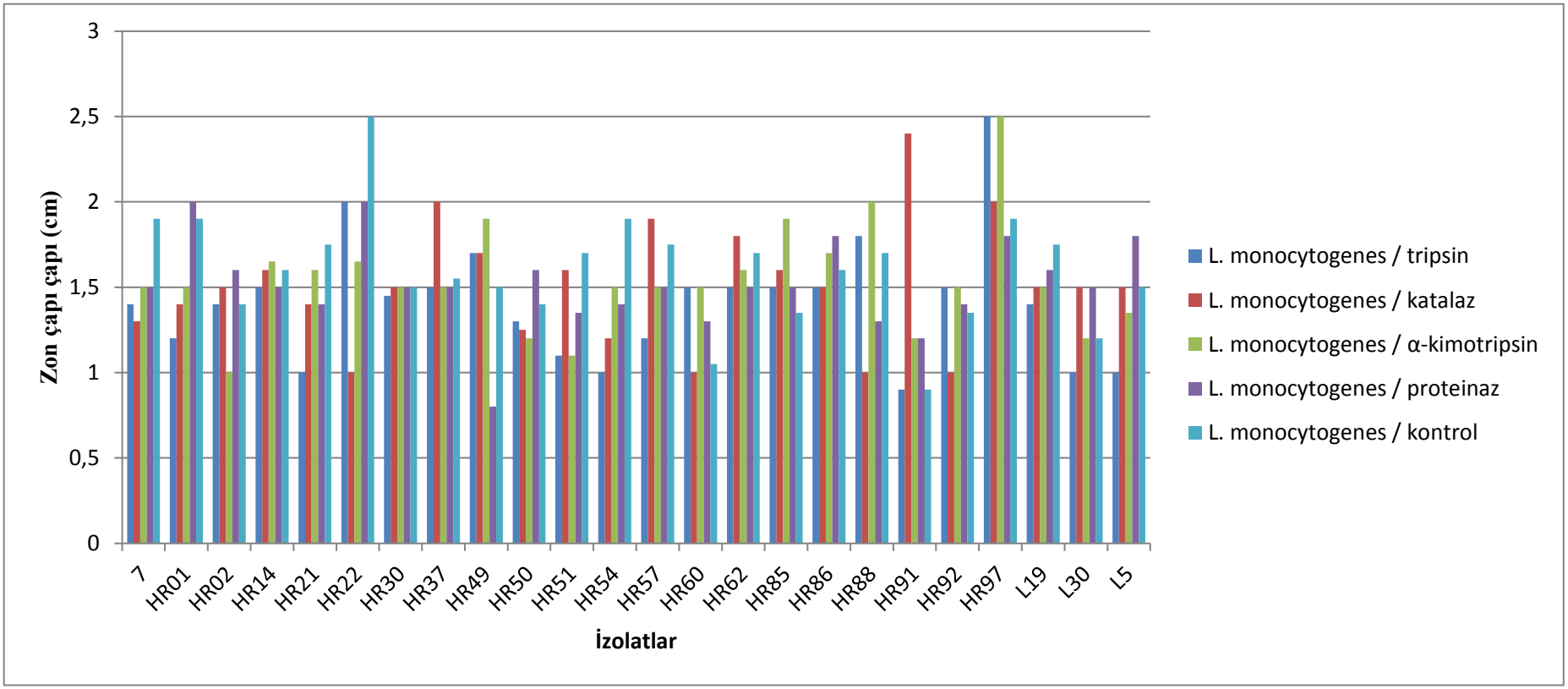
ilavesi de yapılmaktadır. Yine eğer antimikrobiyal etki H_2O_2 kaynaklı değilse katalaz enzimi ilavesi sonrasında da aktivitenin aynen korunması beklenmektedir.

Çalışmada kullanılan tripsin, α-kimotripsin ve pepsin enzimleriyle muamele sonrası laktik asit bakterisi suşlarından hiçbirinin inhibisyon zonu oluşumunda tamamen kayıp gözlenmemiştir. Birçok suşta inhibisyon zonunda kısmi azalmalar görülmüşken yine birçok suşta da enzim ilavesi sonrası zon çapının değişmediği gözlenmiştir. Yine katalaz enzimi sonrasında da kısmi azalmalar görüldüğü gibi zon çapında herhangi bir değişiklik olmayan suşlar da bulunmaktadır. Literatürde rastlanan çalışmalarda bütün bakteriyosinlerin enzimlere karşı bir homejen tepki göstermediği görülmüştür. Bazı bakteriyosinlerin bir proteaza karşı stabilken diğeriyle muamele edildiğinde aktivitesini tamamen yitirdiği, yine bazı bakteriyosinlerin de tüm denenen proteazlara karşı stabilken sadece bir proteaz muamelesinde çok az aktivitesini kaybettiği görülmüştür. Yine bazı çalışmalarda da enzimler farklı konsantrasyonlarda izolatlara muamele edilmiş, örneğin 1mg/ml konsantrasyonda bakteriyosin aktivitesine etki etmediği, 10 mg/ml konsantrasyonda ise aktiviteyi kısmen veya tamamen bitirdiği gözlenmiştir. Elde edilen veriler genel olarak literatürle herhangi bir tezat içermemektedir.

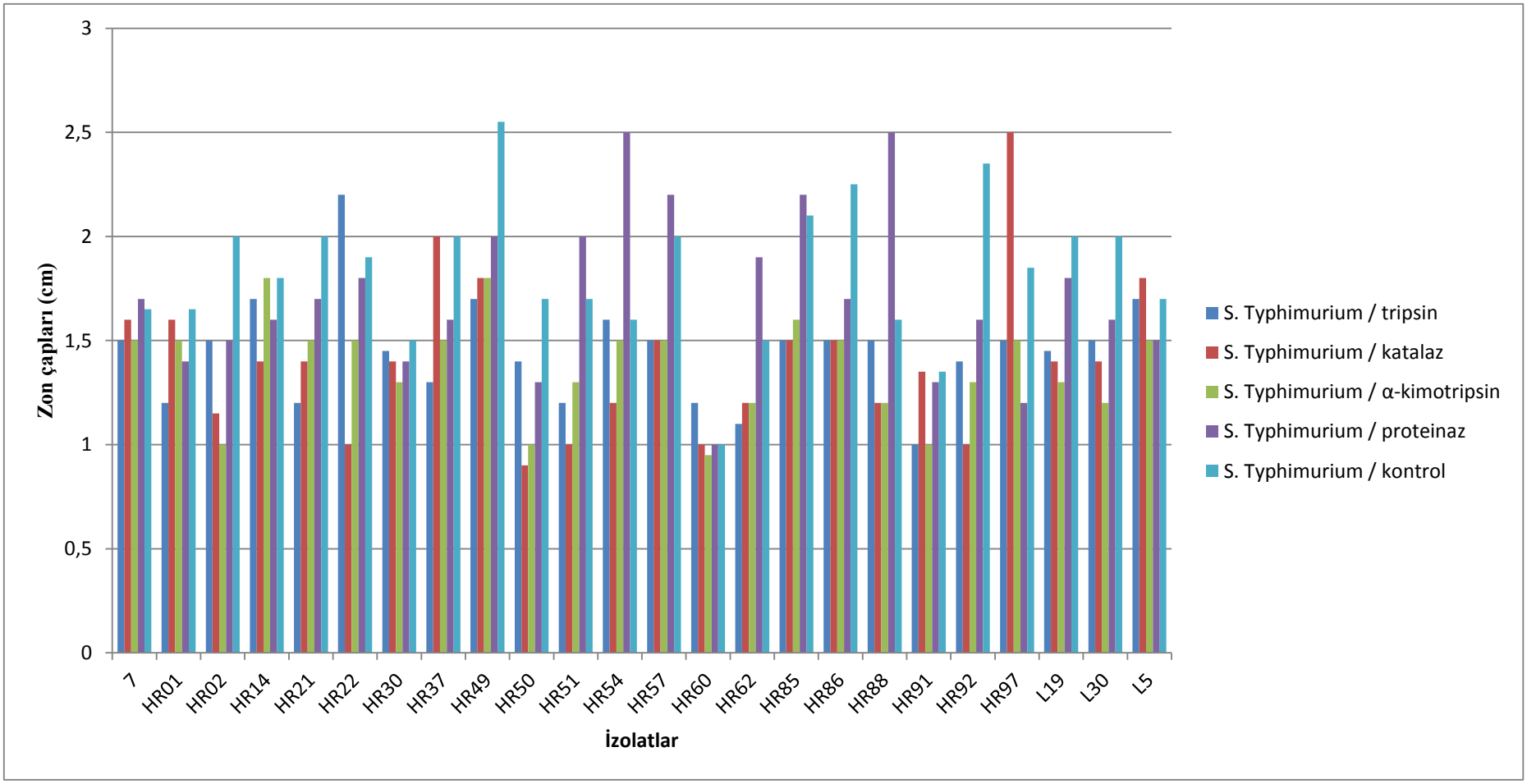
Çalışılan laktik asit bakterisi suşlarından HR57 suşu Salmonella Typhimurium' a karşı enzim muamelesi olmadan 2 cm zon verirken proteinaz enzimi ilavesi sonrası zon çapı yine 2 cm'de kalmıştır. Pepsin, α-kimotripsin ve katalaz enzimi ilavelerinden sonra ise zon çapı 1,5 cm'ye düşmüştür. Bu sonuç bu suşun aktivitesinin hem protein kaynaklı olduğunu aynı zamanda da bu aktivitede H_2O_2 etkisinin de bulunduğu göstermektedir. Yine HR30 suşunun *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibisyon zonu enzim muamelesi yapılmadan 1,5 cm iken bu rakam proteinaz, α-kimotripsin, pepsin ve katalaz enzimi ilavesi sonrasında ise hiç değişmemiş ve hep 1,5 cm'de kalmıştır. Bu da bu antimikrobiyal etkinin protein kaynaklı olmadığını yani bakteriyosin olamayacağını ve H_2O_2 etkisiyle de gerçekleşmediğini göstermektedir.

Çizelge 4.3. Çeşitli enzimlerin laktik asit bakteri izolatlarının indikatör patojen bakterilere karşı oluşturduğu inhibisyon zon çaplarına etkisi.

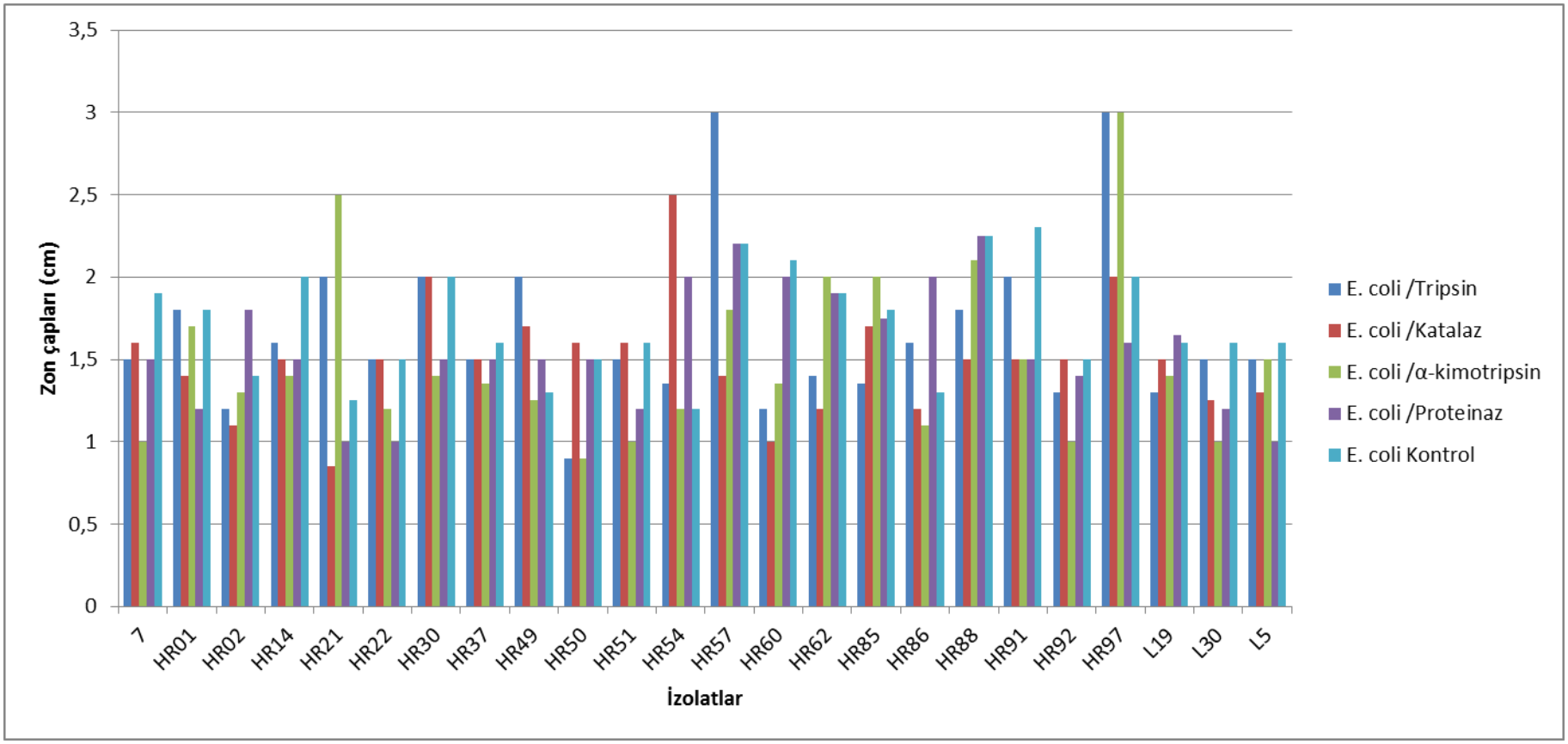
İndikatör patojenler	Enzimler	İZOLATLAR																						
		7	HR01	HR02	HR14	HR21	HR22	HR30	HR37	HR49	HR50	HR51	HR54	HR57	HR60	HR62	HR85	HR86	HR88	HR91	HR92	HR97	L19	L30	L5
Salmonella Tymphirium	Tripsin	1,5	1,2	1,5	1,7	1,2	2	1,45	1,3	1,7	1,4	1,2	1,6	1,5	1,2	1,1	1,5	1,5	1,5	1	1,4	1,5	1,4	1,5	1,7
	Katalaz	1,6	1,6	1,15	1,4	1,4	1	1,4	2	1,8	0,9	1	1,2	1,5	1	1,2	1,5	1,5	1,2	1,35	1	1,5	1,4	1,4	1,7
	α-kimotripsin	1,5	1,5	1	1,8	1,5	1,5	1,3	1,5	1,8	1	1,3	1,5	1,5	0,9	1,2	1,6	1,5	1,2	1	1,3	1,5	1,3	1,2	1,5
	Proteinaz	1,7	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,4	1,6	2	1,3	2	1,6	2	1	1,9	2,2	1,7	2	1,3	1,6	1,2	1,8	1,6	1,5
	Kontrol	1,7	1,65	2	1,8	2	2	1,5	2	2,5	1,7	1,8	1,6	2	1,2	1,5	2,2	2,2	1,6	1,3	2,3	1,8	2	2	1,7
Listeria monocytogenes	Tripsin	1,4	1,2	1,4	1,5	1	2	1,5	1,5	1,7	1,3	1,1	1	1,2	1,5	1,5	1,5	1,5	1,8	0,9	1,5	2	1,4	1	1
	Katalaz	1,3	1,4	1,5	1,6	1,4	1	1,5	2	1,7	1,25	1,6	1,2	1,9	1	1,8	1,6	1,5	1	2,4	1	2	1,5	1,5	1,5
	α-kimotripsin	1,5	1,5	1	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,9	1,2	1,1	1,5	1,5	1,5	1,6	1,9	1,7	2	1,2	1,5	2	1,5	1,2	1,3
	Proteinaz	1,5	2	1,6	1,5	1,4	2	1,5	1,5	0,8	1,6	1,3	1,4	1,5	1,3	1,5	1,5	1,8	1,3	1,2	1,4	1,8	1,6	1,5	1,8
	Kontrol	1,9	1,9	1,6	1,8	1,75	2,5	1,5	1,6	2	1,8	1,7	1,9	1,9	1,1	1,8	1,9	1,8	2	1	1,6	2	1,7	1,5	1,6
Staphilococcus auerus	Tripsin	4,6	3	3	3,2	2	4	4	4	3	5	2,8	3,2	3,6	3	2,6	2,8	4	1,7	3	5	3	1,8	2,5	4,5
	Katalaz	4	3,6	3	4,5	3,2	4	3	3	2,1	3	3,4	2,2	3,6	4	3,8	2	3	3	2,8	4,2	3	3,2	3	2,5
	α-kimotripsin	4,2	3,6	3	1,9	2	3,4	2,2	3,2	2,8	2,7	3,4	4,5	3,2	4	3,5	3,9	3,6	3	3	4	3	4,5	2,4	4
	Proteinaz	3	3	1,9	3,2	4	2,4	3,4	4	2	4,5	2,5	4,5	4	3,2	3,8	4	4,4	3	3	3	3	4	2,2	3,2
	Kontrol	1,8	4	3	3,5	4	4	3,2	4	3	3	3,9	4,5	3	4	3,7	3,9	3	3	3	2,7	3	3,4	3	3
Escherichia coli	Tripsin	1,5	1,8	1,2	1,6	2	1,5	2	1,5	2	0,9	1,5	1,35	3	1,2	1,4	1,35	1,6	1,8	2	1,3	3	1,3	1,5	1,5
	Katalaz	1,6	1,4	1,1	1,5	0,85	1,5	2	1,5	1,7	1,6	1,6	2,5	1,4	1	1,2	1,7	1,2	1,5	1,5	1,5	2	1,5	1,2	1,3
	α-kimotripsin	1	1,7	1,3	1,4	2,5	1,2	1,4	1,35	1,25	0,9	1	1,2	1,8	1,35	2	2	1,1	2,1	1,5	1	3	1,4	1	1,5
	Proteinaz	1,5	1,2	1,8	1,5	1	1	1,5	1,5	1,5	1,5	1,2	2	2,2	2	1,9	1,75	2	2,25	1,5	1,4	1,6	1,6	1,2	1
	Kontrol	1,9	1,8	1,4	2	1,25	1,5	2	1,6	1,3	1,5	1,6	1,2	2,2	2,1	1,9	1,8	1,3	2,25	2,3	1,5	2	1,6	1,6	1,6



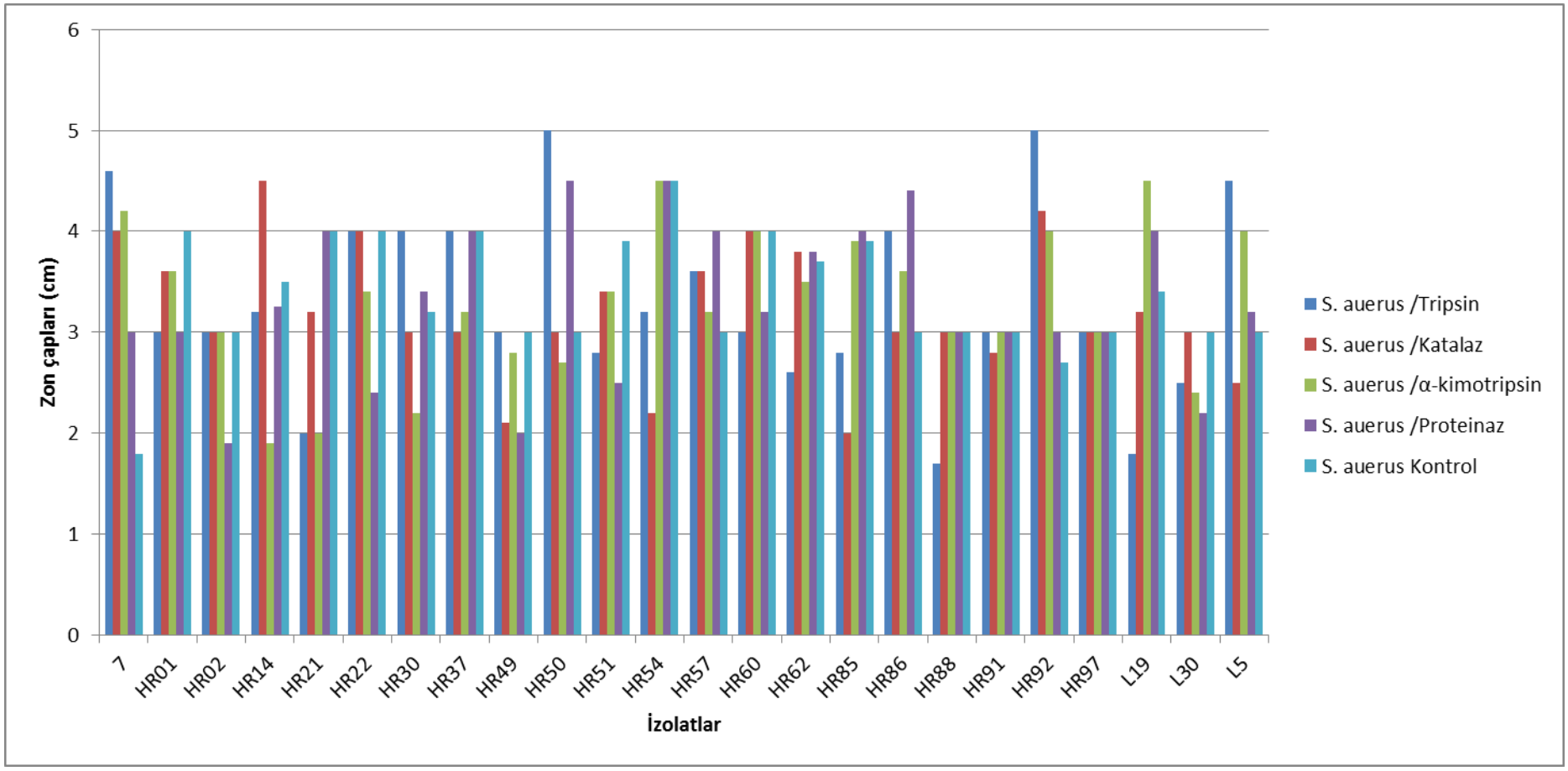
Şekil 4.6. Laktik asit bakterisi izolatlarının *L.monocytogenes* indikatör bakterisine karşı enzim muameleri sonrası zon çapları.



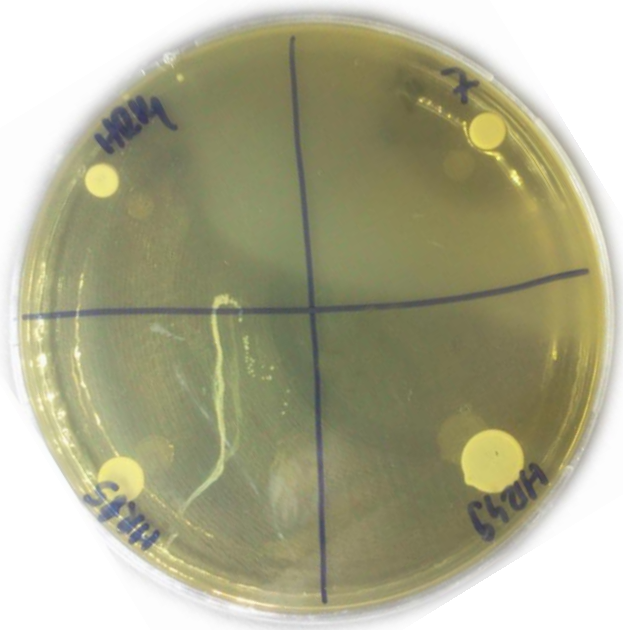
Şekil 4.7. Laktik asit bakterisi izolatlarının S.Typhimurium indikatör bakterisine karşı oluştuduğu zon çaplarına çeşitli enzimlerin etkisi.



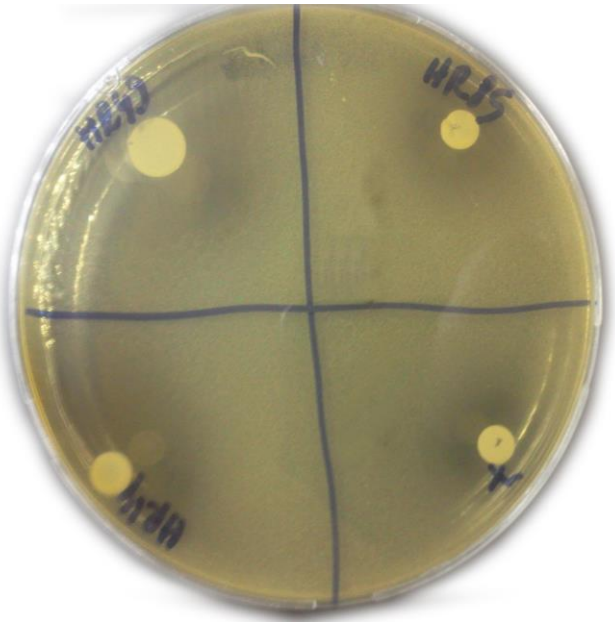
Şekil 4.8. Laktik asit bakterisi izolatlarının *E. coli* indikatör bakterisine karşı oluştuduğu zon çaplarına çeşitli enzimlerin etkisi.



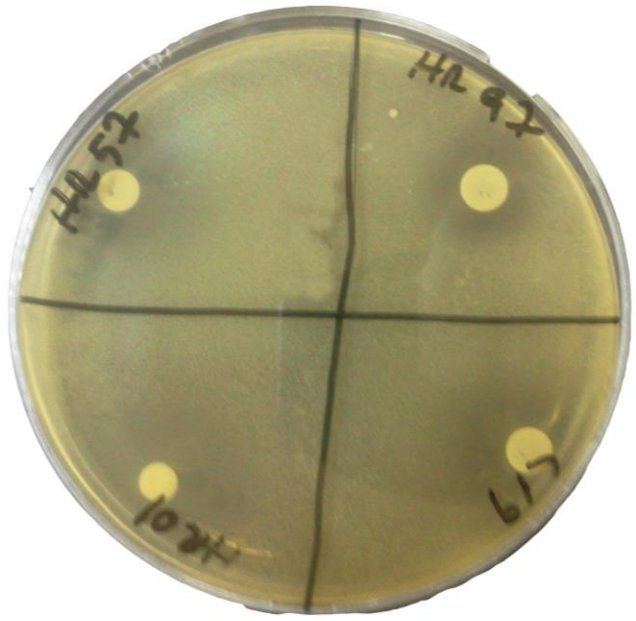
Şekil 4.9. Laktik asit bakterisi izolatlarının *S. auerus* indikatör bakterisine karşı oluştuduğu zon çaplarına çeşitli enzimlerin etkisi.



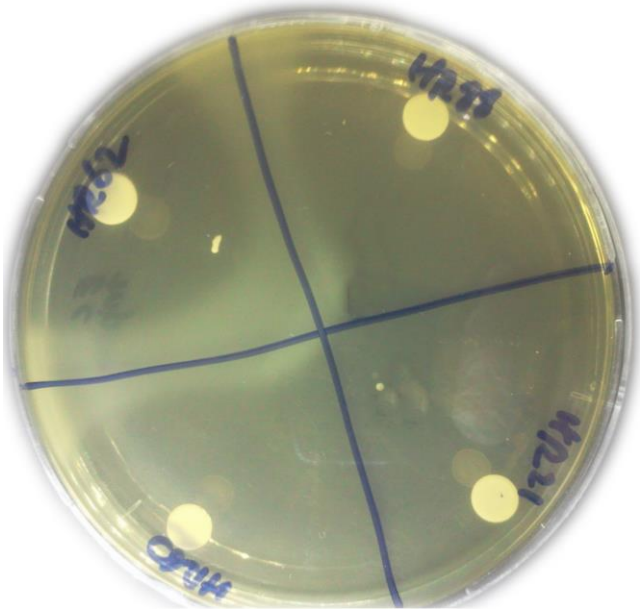
Şekil 4.10. α- kimotripsin enzimi ile muamele sonrası *E. coli*'ye karşı üretilen zonların görüntüleri



Şekil 4.11. Katalaz enzimi muamelesi sonrası *L. monocytogenes'*e karşı üretilen zonların görüntüleri



Şekil 4.12. Katalaz enzimi muamelesi sonrası *L. monocytogenes'*e karşı üretilen zonların görüntüleri



Şekil 4.13. Tripsin enzimi muamelesi sonrası *E. coli*'ye karşı üretilen zonların görüntüleri

Bakteriyosinler veya bakteriyosin benzeri yapılar insan sindirim sistemindeki protezlarla indirgenmesine karşın bazı enzimlere karşı direnç gösterebilmektedirler. Örneğin 1. sınıf bakteriyosinlerden nisin tripsin, pepsin, erepsin enzimlerine (Hoover ve Hurst, 1993); lacticin 3147B pepsine (Guder ve ark., 2000); plantaricin C ise pepsin ve proteinaz K enzimlerine direnç göstermektedir (Gonzales ve ark., 1994). Aynı şekilde Chobert ve ark. (2006) *Enterococcus durans*'dan izole edilen bakteriyosinin tripsin ve pepsine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir.

Bakteriyosin aktivitesine enzimlerin etkisinin incelendiği farklı çalışmalarda Lactis B14 bakteriyosinin (*L. lactis* subsp. *lactis* B14) proteinaz K, pronaz E ve pepsine duyarlı, tripsin, kimotripsin ve rennine dayanıklı (Ivanova et al., 2000); *L. lactis* spp. *lactis* A164 bakterisinin ürettiği nisinin β-kimotripsin, α-kimotripsin ve pronaz E'ye hassas, tripsin ve pepsine stabil (Cheigh ve ark., 2000); *L. lactis* spp. *lactis* H-559'in ürettiği bakteriyosin H-559'un α-kimotripsin ve proteaza duyarlı, pepsin ve tripsine dayanıklı (Ahn ve ark., 1999); *L. lactis* NK 24'in ürettiği bakteriyosinin proteaza duyarlı, tripsine stabil (Lee ve Paik, 2001); *L. lactis* subsp. *lactis* HV219'un ürettiği bakteriyosin HV219'un proteinaz K, pronaz ve tripsine duyarlı olduğu bildirilmiştir (Asutay, 2007).

Yapılan bir çalışmada da *Ped. pentosaceus* suşuna katalaz enziminin uygulanması sonucunda antimikrobiyal aktivitede bir değişim olmadığı, öte yandan papain, tripsin, alfa-kimotripsin ve pronaz proteazlarının uygulanması sonucunda ise antimikrobiyal aktivitenin tamamen kaybolduğu, pepsin uygulaması sonrasında aktivitenin % 74,15'inin korunduğunun gözlendiği bildirilmiştir (Köseoğlu, 2007).

Yine bir çalışmada *Lb. plantarum* ve *L. fermentum* tarafından üretilen JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ ve JW15BZ bakteriyosinlerinin tripsin, pronaz, proteinaz K, pepsin ve papaine duyarlı ve katalaz enzimine karşı dayanıklı olduğu ifade olduğu bildirilmiştir (Todorov ve ark., 2006).

Başbülbül (2009), yaptığı çalışmada proteolitik enzim olarak proteinaz K, pronaz E ve papain enzimleri kullanmakla birlikte aynı zamanda 2 farklı enzim konsantrasyonu da denemiştir. Enzim final konsantrasyonlarının 1 mg/ml olduğu denemelerde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aktivitede hiç kayıp olmadığı gözlemlenmiştir. Daha sonra enzimlerin final konsatrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde deneme tekrar kurulmuş ve sonuçta HBB-218 bakterisinin proteinaz K muamelesi sonrasında aktivitenin tamamen, pronaz E ve papain muamelesi sonrasında ise aktivitenin kısmen kaybolduğu görülmüştür. HBB-247'nin ise proteolitik enzimlerle 10 mg/mL final konsantrasyonda muamelesi sonrası 24 kısmen kaybolduğu gözlenmiştir.

Bacillus licheniformis P40 suşunun ürettiği bakteriyosin benzeri bileşik, final konsantrasyonları 2 ve 10 mg/ml olacak şekilde papain, tripsin ve pronaz E enzimleri ile 1 saat 37 ºC'de inkübe edilmiştir. Sonuçta sadece pronaz E'nin aktivitede kayba (%75) yol açtığı bulunmuştur. Pepsin ve tripsin enzimleri aktivitede hiçbir kayba neden olmamışlardır. Bu durum bazı *Bacillus* türlerinin alışılmadık aminoasitler içeren halkasal antimikrobiyal maddeler üretmesine ve antimikrobiyal maddelerin proteazlara daha dayanıklı olmasına bağlanmıştır (Cladera-Oliviera ve ark., 2004).

Geniş spektrumlu antimikrobiyal bileşik üreten *Bacillus cereus* ATCC 14579 suşu ile yapılan çalışmada, pronaz E ve proteinaz K enzimleri 10 mg/mL son konsantrasyonda (37 ºC'de 4 saat inkübasyon) kullanılmıştır. Pronaz E ile muameleden sonra kalan aktivite % 10; proteinaz K ile muameleden sonra kalan aktivite ise %25 olarak saptanmıştır (Riosen ve ark., 2004).

Asutay (2007), *L. lactis* spp. *lactis* BO tarafından üretilen laktokoksin BO'nun protezlardan papain, pepsin ve tripsine karşı duyarlı olduğunu, diğer enzimlerden ise etkilenmediği bildirmiştir, katalazdan etkilenmemesini ise inhibitör aktivitenin H_2O_2'den kaynaklanmadığına bağlamıştır.

Bilgin (2008), *Enterococcus faecium'un* ürettiği enterosin HZ'nin papain, tripsin ve pankreatin muamelesi sonrası aktivitesini kaybettiğini ancak pepsin ve katalazdan etkilenmediğini belirlemiştir. *Enterococcus faecium* GM-1 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine proteazların etkisinin denendiği başka bir çalışmada ise proteinaz K (7-14 U/mg), papain (10 U/mg), tripsin (7500 BAEE/mg) ve pepsin (10 U/mg) enzimleri ile yapılan denemelerde, proteolitik enzimlerden hiçbiri aktivitede tamamen kayba neden olmadığı bildirilmiştir (Kang ve Lee, 2005).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Çalışmada ilk aşamada Hardaliye turşusu ve Sürk peynirinden izole edilmiş 70 adet suş kullanılmış ve bu suşlar *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* ve Salmonella Typhimurium indikatör patojenlerine karşı paralelli olarak denenmiştir. Bu ilk denemelerin ardından daha fazla ve stabil zon veren 24 adet suş seçilmiş ve çalışmanın kalan kısmı bu suşlar üzerinden yürümüştür. Seçilen bu laktik asit bakteri suşları Agar-Sandviç Metodu uyarınca bakteriyosin benzeri aktivite açısından testlere tabii tutulmuştur. Çalışmada bu suşların meydana getirdiği bakteriyosin benzeri aktivitenin farklı besiyeri başlangıç pH'ları, farklı inkübasyon sıcaklıkları, farklı proteolitik enzim ve katalaz enzimi uygulamaları karşısında değişimleri gözlenmiştir.

Laktik asit bakteri suşlarının diğer indikatör patojen bakterilere kıyasla *Stapylococcus aureus*' a karşı çok daha yüksek inhibisyon zonları verdiği gözlenmiştir. Buradan hareketle bu izolatların oluşturduğu bakteriyosin benzeri aktiviteye karşı en duyarlı patojen bakteri olarak *S. aureus* bulunurken bu aktiviteye karşı en stabil patojen bakterilerin ise *L.monocytogenes* ve *E.coli* oldukları gözlenmiştir. *S. aureus*'un en duyarlı patojen bakteri olarak belirlenmesi bu konuda yapılan diğer çalışmaların sonuçlarını da destekler niteliktedir.

Çalışmada karşılaşılan zon çapları diğer metotlarla yapılan çalışmalarda rastlanan zon çaplarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Agar-Sandviç Metodu daha önce yapılan çalışmalarla da sabit olduğu gibi diğer metotlara göre hep daha fazla zon vermektedir ki bu durum diğer metodlardan farklı olarak bu metotta laktik asit bakterisi ile indikatör bakterinin direkt muhatap olmasına bağlanmaktadır.

Bakteriyosin benzeri antibakteriyal etkiye pH'nın etkisi incelendiğinde en ideal pH olarak 4,5 olarak bulunmuştur. Bu pH'yı takiben sıraısyla 5,5 ve 7,5 pH'lar uygun bulunurken en düşük inhibisyon zon çaplarına 6,5 pH'da rastlanılmıştır. Yine bakteriyosin benzeri antibakteriyal etkiye inkübasyon sıcaklıklarının etkisi incelendiğinde de en ideal sıcaklığın 35°C olduğu görülmüş, bu sıcaklığı takiben 32°C ve 30°C'da da yüksek inhibisyon zonları saptanmıştır. Fakat 25°C'ın antibakteriyal aktivitenin izharı için uygun bir besiyeri inkübasyon sıcaklığı olmadığı görülmüştür.

Ortalamaya bakıldığında 35°C ve pH 4,5 en ideal sıcaklık ve pH'lar olarak gözükse de suş bazında bakıldığında en yüksek inhibisyon zonunu 32°C veya 30°C'de veren veya en yüksek antibakteriyal aktiviteyi pH 5,5 ve 7,5'da gösterdiği saptanan suşlar bulunmaktadır. Bununla beraber açıkça görülmüştür ki pH 6,5 ve 25°C koşulları çalışılan laktik asit bakterilerinin bakteriyosin benzeri antibakteriyal aktivite göstermeleri için uygun değildir.

Yine bakteriyosin benzeri aktiviteye proteolitik enzimlerin etkisinin belirlenmesi için yapılan denemelerde bazı izolatların oluşturduğu zonların enzim uygulaması sonrası kısmen azaldığı, bazılarının zonlarının ise bu uygulamadan hiç etkilenmediği görülmüştür. Fakat hiçbir izolatın oluşturduğu aktivite proteolitik enzim uygulaması sonrası tamamen ortadan kalkmamıştır. Yine katalaz uygulaması sonrasında da bu enzimden etkilenen suşlar olduğu gibi bu enzime karşı stabil suşlar da gözlenmiştir.

Antibakteriyal aktivite gösteren bir suşun bu aktiviteyi meydana getiren maddesine bakteriyosin denilebilmesi için proteolitik enzim muamelesi sonrası protein tabiatlı olup olmadığının saptanması, ardından katalaz uygulaması ile H_2O_2 bir etki olup olmadığının belirlenmesi ve yine organik asitler kaynaklı bir etki olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir. Bütün bu işlemler ancak sonucunda bir antibakteriyal maddeye bakteriyosin denilebilmektedir. Bu çalışmada bu prosedür tamamlanmadığı için 'bakteriyosin' ifadesi yerine 'bakteriyosin benzeri aktivite' ifadesi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda incelenen 24 suşun da bu 4 indikatör patojen bakteriye karşı bakteriyosin benzeri antibakteriyal aktivite gösterdiği görülmüştür.

5.2 Öneriler

Katkı maddelerinin gıdalarda kullanımının fazlasıyla arttığı günümüzde doğal ve güvenilir katkı olarak mikroorganizmalardan ve bunların ürettiği ürünlerden faydalanma yoluna daha çok gidilmelidir. İnsan sağlığını tehdit ettiği bilinen patojen mikroorganizmalara karşı bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri antibakteriyal maddelerin etkisi bir süredir bilinmekte ve üzerinde sıkça araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmaların artması, sonuçlarının toplumun kullanımına sunulması ve ticarileştirilmesi gerekmektedir. Yapılan bu çalışmanın, ardından gelecek çalışmalara kaynak teşkil etmesi umulmaktadır.

KAYNAKLAR

Abee, T., Krockel, L. and Hill, C., 1995, Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning, *Int. J. Food Microbiol.,* 28, 169- 185.

Achemchem, F., Martinez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia1, E. ve Maqueda, M., 2005, *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco, *J. Appl. Microbiol.,* 99, 141–150

Adams, M.R., and Nicolaides, L., 1997, Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation, *Food Control,* 8 (5-6), 227–239.

Ahn, J., Lee, H., Joo, Y., Park, C., Kım, S., Hwang, I., Mheen, T., 1999, Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from Kimchi, *J. Biosci. Bioeng.,* 88(2), 153-159.

Akkoç, N., Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M., 2009, Bakteriyosinler: alternatif gıda koruyucuları, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25 (1-2), 59-70

Andersson, R.,1989, Lactic acid bacteria in the production of food, SIK- Publication, *Food Laboratory Newsletter*, 14, 17-21.

Arslankoz,N., 2011, Ankara çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi.

Asutay, D., 2007, Yöresel bir gıdadan izole edilen bakteriyosin üreten bakterinin teşhisi ve bakteriyosinin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat.

Assous, M. T. M., Khalaf-Allah, A. M., Sobhy, H. M., and Amani, M. I. H., 2012, Inhibition of *Bacillus cereus* in fresh guava-nectar by Plantaricin and Nisin, 7 (1), 93-100.

Başbülbül,G., 2009, Çeşitli doğal kaynaklardan izole edilen termofilik bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması, Doktora Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Aydın.

Beasley, S.,2004, Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota, Academic Dissertation in Microbiology, *University of Helsinki Faculty of Agriculture and Forestry Sciences*, Finland.

Biler, B., 2009, *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu ve saflaştırılması, Yüksek lisans tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Bilgin,H., 2008, Fermente süt ürününden izole edilen bakteriyosinojenik bir bakterinin antimikrobiyal aktivitesi, Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat.

Bizani, D., Dominguez ,A.P.M., Brandelli, A., 2005, Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A, *Letters in Applied Microbiology* 41, 269-273.

Breukink, E. and de Kruijff B., 2006, Lipid II as target for antibiotics, *Nature Reviews Drug Discovery*,1-11.

Bruno,J.M.F., Siñeriz,D.G.L.,Ana R.,and Juan E.S., 1998, Chemostat production of Plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL441, *Appl Environ Microbiol.*, 64(9), 3512–3514.

Bjornsdottir, K., Breidt, F.J., McFeeters, R.F., 2006, Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol*., 72 (1), 660–4.

Boone, D.R. and Castenholz**,** W**.,** 2001, The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Springer-Verlag, New York - Berlin- Heidelberg.

Cheıgh, C.I., Choı, H.J., Park, H., Kım, S.B., Kook, M.C., Kım, T.S., Hwang, J.K., Pyun, Y. R., 2002, Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis s*ubsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Biotech*. 95, 225–235.

Chen, H., and Hoover, D.G., 2003, Bacteriocins and their food applications, *Comprehensive Reviews for Food Science and Food Safety.*, 2, 81–100.

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

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. and Hernandez, P.E., 2001, Review: Bacteriocin of lactic acid bacteria, *Food Sci. Tech. Int*., 7 (4), 281–305.

Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M. and Gwenaelle, L. B., 2007, Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria, BMC Microbiology, 7, 101.

Cladera-Oliviera F., Caron, G.R. and Brandelli, A., 2004, Bacteriocin-like substance production by Bacillus licheniformis strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 251-256.

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

Cotter, P.D., Colin, H. and Ross, R.P., 2005, Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential, *Current Protein and Peptide Science*, 6, 61-75.

Çon, A.H. ve Gökalp, H.Y., 2000, Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel metabolitleri ve etki şekilleri, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 30, 180- 190.

Dinçer,E., 2007, Et ve et ürünlerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bunların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.

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

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P., 2006, Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension, *International Dairy Journal*, 16 (9).

Desmazeaud, M., 1996, Growth inhibitors of lactic acid bacteria, *Int. Dairy Starter Cultures,* VCH Publishers, Inc., 133-140.

Djadouni, F. and Kihal, M., 2012, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods, *Food/Feed Scıence and Technology*, 55,3.

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

Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J. and Vogel, R.F.**,** 2002, Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol*., 2, 966–975.

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

Ertekin, Ö., 2007, Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin nümerik taksonomisi, Yüksek lisans tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Denizli.

Essam, F.A.J., Rana, H.R. and Hassan, A.A., 2013, Determination of Optimal Conditions for Plantaricin Production from Lactobacillus plantarum isolate, *Online International Interdisciplinary Research Journal*, 3(4).

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(8),698-702.

Garcia, P., Roudrigez, L., and Martinez, B., 2010, Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages anda endolysins, *Trends in Food Sciences and Technology*, 21 (8).

Gillor, O., Nigro, L.M. and Riley, M.A., 2005, Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials, *Current Pharmaceutical Design*, 11, 1-9.

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

Gökalp, H.Y., 1982, Değişik olgunlaşma sıcaklıklarında farklı starter kültürleri uygulayarak Türk tipi sucuk üretimi, Doçentlik Tezi, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü*, Erzurum.

Gratia, A., 1925, Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille, C.R. Seances Society of Biology. 93, 1040–1041.

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

Gürsoy, O. ve Kınık, Ö., 2006, Peynir üretiminde probiyotik bakterilerin kullanımı: probiyotik peynir, *Mühendislik Bilimleri Dergisi,* 12 (1), 105–116.

Hammes, W.P. ve Vogel, R.F., 1992, The genus *Lactobacillus*, In The Genera of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic and Professional, London, 19-54.

Heller, K.J., 2001, Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2, 374-379.

Holzapfel, W.H., Geisen, R. and Schillinger, U., 1995, Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol*., 24 (3), 343–62.

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

Holzaphel, W.H., 2002, Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries, *Int. J. Food Microbiol.,* 75, 197–212.

Hurst, A. and Hoover D.G., 1993, Nisin. In: Antimicrobials in Foods, New York: Marcel Dekker, Inc., 369-407.

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

Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S., and Dousset, X., 2000, Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance

produced by *Lactoccous lactis* subsp. *lactis* B14 ısolated from boza Bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatalysis: Fundamentals & Applications,* 41, 6, 47-53.

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, L. and Wallman, E., 1953, Definition de quelques termes relatifs a la Pysogenie, Ann Inst Pasteur Paris, 84, 222–4.

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

Jeevaratnam, K., Jamuna, M. and Bawa A.S., 2005, Biological preservation of foods-Bacteriocin of lactic acid bacteria*, Indian Journal of Biotechnology*, 4, 446- 454.

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

Kandler, O. and Weiss, N., 1986, Genus Lactobacillus, p. 1209-1234. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland

Kang, J.H. ve Lee, M.S., 2005, Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant, *J. Appl. Microbiol*., 98, 1169– 1176.

Karagül,B., 2010, Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Yetenekleri, Yüksek Lisans tezi, *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Eskişehir.

Kaya, M., ve Gökalp, H.Y., 2004, Sucuk üretiminde starter kültür kullanımının ve farklı nirit dozlarının *Listeria monocuytogenes*'in gelişimi üzerine etkisi, *Turk J. Vet. Anim. Sci.,* 28, 1121–1127,

Kılıç, S., 2001, Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri, Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, No: 542, Ege Üniv. Basımevi, İzmir.

Klaenhammer, T.R., 1993, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.,* 12, 39–86.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G.**,** 1998, Taxonomy and physilogy of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.,* 41, 103–125.

Koral,G., 2011, Bozadan izole edilen *lactococcus lactıs* subsp. *Lactıs* Gyl32 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Lee, N.K., and Paık, H.D., 2001, Partial characterization of lacticin NK24, a newly identifed bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 Isolated From Jeot-Gal. *Food Microbiol.,*18, 17-24.

Leroy, F. and De Vuyst, L., 2004, Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67-78.

Lewus, C.B., Kaiser, A. and Montville, T.J., 1991, Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriosins from lactic acid bacteria isolated from meat, *Applied and Environmental Microbiology,* 57 (6), 1683–1688.

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

Losteınkıt, C., Uchıyama, K., Ochı, S., Takaoka, T., Nagahısa, K. , Shıoya, S., 2001, Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes, *Bioscience And Bioeng*, 91, 390-395.

Lu, Z., Breidt, F., Fleming, H.P, Altermann, E., and Klaenhammer, T.R., 2003, Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage øJL-1 from a cucumber fermentation, *Int. J. Food Microbiol*., 84, 225-235.

Madigan, M.T. and Martinko, J.M., 2006, Brock Biology Of Microorganisms, Pearson Education, Inc. Eleventh Edition, 375–378.

Malini, M. and Savitha, J., 2012, Heat stable bacteriocin from Lactobacillus paracasei subsp. tolerans isolated from locally available cheese: An in vitro study, *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, 3(2), 28-41.

Marshall, R.T., 1992, Standart Methods for The Examination of Dairy Products, 16th ed., APHA,Washington, 532-539.

Mayra- Makinen, A. and Bigret, M., 1993, Industrial use and production of lactic acid bacteria, Lactic Acid Bacteria, Marcel Dekker Inc., New York, 65-96.

Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Batini, R. and Manicardi, G., 2001, Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain, *International Journal of Food Microbiology*, 64, 193-198.

Mitsuoka, T., 1996, Intestinal flora and human health. *Asia Pacific J. Clin. Nutr*., 5, 2-9

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

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., and Onilude, A. A. ,2003, Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1, *African Journal of Biotechnology,* 2 (7) 179–184.

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, *J. Appl. Microbiol*., 88, 81–89.

Omar,N.B., Abriouel H., Lucas R., Martinez-Canamero, M., Guyot,J.,P. and Galvez,A., 2006, İsolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel frual Burkina Faso, *İnternational Journal of Food Microbiology,* 112,44-50.

Patton, G.C. and van der Donk, W.A., 2005, New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action, *Current Opinion in Microbiology*, 8, 543- 551.

Paul Ross, R., Morgan, S. and Hill, C., 2002, Preservation and fermentation: past, present and future, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.

Paynter, M.J.B., Brown, K.A. and Hayasaka, S.S., 1997, Factors affecting the production of an antimicrobial agent, Plantaricin F, by *Lactobacillus plantarum* BF001, Letters in Applied Microbiology, 24, 159-167.

Pederson, C., 1938, The gas-producing species of the genus lactobacillus, *J.Bacteriol,* 35 (2), 95–108.

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

Reunanen, J., 2007, Lantibiotic nisin and its detection methods, Department of Applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki Graduate School in Biosciences University of Helsinki,42, Helsinki.

Riosen, P.A., Ronning, P., Hegna, I.K., Kolsto, A.B., 2005, Characterization of a broad range antimicrobial substance from Bacillus cereus, *Journal of Applied Microbiology, 96 (4), 648-65.*

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

Russel, A.D., Hogo, W.B. and Ayliffe, G.A.J., 1992, Principles and practise of disinfection, preservation and sterilization, Balckwell Science, Oxford.

Sahar, A., Ramakrishnan, N.R., Tengku, A.T.I., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M., Hassan,H.M.D. and Arbakariya,B.A., 2011, Effect of medıum composıtıon and culture condıtıon on the productıon of bacterıocın-lıke ınhıbıtory substances (blıs) by *lactobacıllus paracaseı* la07, a straın ısolated from budu, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 25,4.

Sánchez, M.M., Delgado, T., Alonso, L. and Baltasayar, M., 2000, Phenotypic and genetic characterization of a selected set of *Lactococcus lactis* strains isolated from a starter-free farmhouse cheese. *Food Microbiology*, 17, 449-460.

Sankar, N.R., Priyanka,V.D., Reddy,P.S. Rajanikanth,P., Kumar, V.K. and Indira, M., 2012, Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from cow milk, *International Journal of Microbiological Research*, 3 (2), 133-137.

Schlegel, H.G., 1986, General Microbiology, *Cambridge University Press*, Cambridge.

Sezer,Ç., 2007, Gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin araştırılması, Doktora tezi, *Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Kars.

Somkuti**,** G.A., 2000, Lactic acid bacteria. In: Encyclopedia of Microbiology, Second edition, Academic Press.

Soomro, A.H., Masud, T. and Anwear, K., 2002, Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health- a review, *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 20-24.

Stepper,J, 2009, The moleculer and cellular characterisation of the first glycocin: Plantaricin KW30, Doctorate thesis, *Massey University* Palmerston North.

Şen, A., Toprak, N., Güneş ve E., Halkman, K, 2004, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2 (3),1-6.

Tagg, J.A., Dajani, A.S. and Wanamaker, L.W., 1976, Bacteriocins of gram– positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40 (3), 722–756.

Taniguchi, M., Nakazawa, H., Takeda, O., Kaneko, T., Hoshino, K., Tanaka, T., 1998, Production of a mixture of antimicrobial organic acids from lactose by co-culture of *Bifidobacterium longum* and *Propionibacterium freudenreichii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 (8), 1522–7,

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

Todorov, S.D., 2009, Bacteriocins from *Lactobacıllus plantarum* production, genetic organization and mode of action, *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 209-221.

Toıt, M., Franz, C.M.A.P., Dıcks, L.M.T., Holzapfel, W.H., 2000**,** Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces, *J. of Appl. Microbiol.*, 88: 482–494.

Tunail, N. ve Köşker, Ö., 1989, Süt Mikrobiyolojisi, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.

Tunail, N., 2009, Mikrobiyoloji, Pelin Ofset, Ankara.

Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B. and Hill**, C.,** 2002, Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82 (1–4), 165–85.

Yang, Z., 2000, Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structure and properties. Academic Dissertation. *Department of food technology University of Helsinki*, 61, Helsinki.

Zendo, T., Yoneyama, F., and Sonomoto, K., 2010, Lactococcal membrane permeabilizing antimicrobial peptides, Applied Biotechnology and Microbiology, 88, 19.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Talha DEMİRCİ
Uyruğu	**:**	Türk
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Isparta / 1988
Telefon	**:**	0 332 223 29 59
Faks	**:**	
e-mail	**:**	talhademirci@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Lise	:	Isparta Anadolu Lisesi, Merkez, ISPARTA	2006
Üniversite	:	Süleyman Demirel Üniversitesi, Merkez, ISPARTA	2010
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	-
Doktora	:	-	

UZMANLIK ALANI

Gıda Mikrobiyolojisi

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR