

Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Benzeri
Madde Üretme Yetenekleri

Başak KARAGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran, 2010

Bacteriocin Like Substance Production Capabilities of Lactic Acid Bacteria Isolated
from Various Sources

Başak KARAGÜL

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

June, 2010

Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Benzeri Madde
Üretim Yetenekleri

Başak Karagül

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

Haziran 2010

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Başak Karagül'ün YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Yetenekleri" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye : Doç. Dr. Cansu FİLİK İŞÇEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, 8 tulum peyniri, 3 kefir, 1 pastörize ve 1 çiğ süt örneğinden 125 muhtemel LAB izole edilmiş ve bakteriyosin benzeri madde üretme yetenekleri belirlenmiştir. Bakteriyosin benzeri madde varlığı disk difüzyon ve agar-sandviç yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. En az bir test bakterisine antogonistik etkili olan 34 LAB belirlenmiş ve bunların tür tayinleri API CH50 ve API 20 Strep test kitleriyle yapılmıştır. İzolatların 9'u *Lactobacillus plantarum*, 5'i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, 5'i *Lb. brevis*, 2'si *Lb. pentosus*, 1'i *Lb. rhamnosus*, 2'si *Enterococcus faecium*, 3'ü *E. durans*, 1'i *Streptococcus thermophilus*, 1'i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'dir. LAB izolatının, pepsin ve tripsin gibi proteolitik enzimlerle muamelesi sonunda, sadece 13'ünün protein yapısında maddeler ürettiği belirlenmiştir. Bakteriyosin benzeri madde üreten LAB izolatlarının tamamının 0,011-2,9 µl/ml arasında H₂O₂ ürettikleri belirlenmiştir.

LAB' nin bakteriyosin benzeri madde üretimi için optimum koşullar; 30 °C, pH 6,5 ve 24 saat olarak tesbit edilmiştir. Bakteriyosin benzeri maddelere en hassas test bakterileri LAB, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, Methicillin-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) iken, en dirençli olanlar Vancomycin-dirençli *Enterococcus* (VRE) ve *Acinetobacter baumannii*' dir. Antogonistik etki spektrumu en geniş LAB izolatı ise *Lactobacillus plantarum* 'dur.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyosin, Laktik Asit Bakterileri, Antogonistik Aktivite

SUMMARY

In this study, 125 possible LAB were isolated from the samples of 8 tulum cheese, 3 kefir and 1 raw milk and 1 pasteurized milk, and bacteriocin like substance producing capacity were determined. The presence of bacteriocin like substance were determined using disc diffusion method and agar-sandwich method. We determined 34 LAB which had antagonistic effect on at least one test bacteria. Their species level identification were done by using API CH50 and API 20Strep test kits. These isolates identified as; 9 *Lactobacillus plantarum*, 5 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, 5 *Lb. brevis*, 2 *Lb. pentosus*, 1 *Lb. rhamnosus*, 2 *Enterococcus faecium*, 3 *E. durans*, 1 *Streptococcus thermophilus*, 1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. After the cultures of LAB isolates producing bacteriocin like substance were processed with proteolytic enzymes such as pepsin and trypsin, it was determined that 13 of them produced matters in the structure of proteins. All of the isolates had the capacity of producing H₂O₂ between the concentration of 0.011 and 1,52-2,9 µl/ml.

The optimum conditions for LAB to produce bacteriocin like substance were determined as 30 °C, pH 6,5 and 24 hours. The test bacteria which are most sensitive to bacteriocin like substances are LAB, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The test bacteria which are most resistant to bacteriocin like substances are Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) and *Acinetobacter baumannii*. The isolates which have wide antagonistic activity spectrum are *Lactobacillus plantarum*.

Key words: Bacteriocins, Lactic acid bacteria, Antagonistic activity.

TEŞEKKÜR

Laboratuar çalışmalarında, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarında, bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan danışmanım Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU'na,

Çalışmalarım sırasında bana destek ve yardımları için arkadaşım Saniye ÜTKÜN'e,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi çalışmalarım da her türlü destekleri ve sevgileriyle yanımda olan annem Saadet KARAGÜL'e ve babam Yılmaz KARAGÜL'e, en içten dileklerle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET | v |
| SUMMARY | vi |
| TEŞEKKÜR | vii |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xi |
| ÇİZELGE DİZİNİ | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2. 1. Laktik Asit Bakterileri..... | 4 |
| 2. 2. LAB Bakteriyosinleri | 4 |
| 2. 2. 1. Tanımı ve tarihçesi | 4 |
| 2. 2. 2. Sınıflandırma | 6 |
| 2. 2. 3. Biyosentezi | 9 |
| 2. 2. 4. Antimikrobiyal etki mekanizması | 13 |
| 2. 2. 5. Antimikrobiyal etki spektrumunu | 15 |
| 2. 2. 6. Üretimleri, aktiviteleri ve stabiliteleri etkileyen faktörler | 16 |
| 2. 2. 7. Saflaştırma | 17 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 19 |
| 3. 1. Materyal | 19 |
| 3. 1. 1. Gıda Örnekleri | 19 |
| 3. 1. 2. Test bakterileri | 19 |
| 3. 1. 3. Besiyerleri | 21 |
| 3. 1. 3. 1. MRS agar | 21 |
| 3. 1. 3. 2. Beyin kalp infusion agar | 21 |
| 3. 1. 3. 3. Oxford Listeria selective | 22 |
| 3. 1. 3. 4. Eosin methylene blue agar | 22 |
| 3. 1. 3. 5. MRS broth | 23 |
| 3. 1. 3. 6. Beyin kalp infusion broth | 23 |

İÇİNDEKİLER (devamı)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| 3. 1. 3. 7. Nutrient broth | 24 |
| 3. 1. 3. 8. Nutrient agar | 24 |
| 3. 1. 3. 9. M17 broth | 24 |
| 3. 1. 3. 10. M17 agar | 25 |
| 3. 1. 3. 11. Sporulasyon ortamı | 25 |
| 3. 1. 3. 12. Gliserollü stok besiyeri | 26 |
| 3. 1. 4. Kullanılan Boyalar | 26 |
| 3. 1. 4. 1. Lugol | 26 |
| 3. 1. 4. 2. Safranin | 27 |
| 3. 1. 4. 3. Kristal violet | 27 |
| 3. 1. 4. 4. Malaşit yeşili | 27 |
| 3. 1. 5. Kullanılan Çözeltiler | 28 |
| 3. 1. 5. 1. Fizyolojik tuzlu su | 28 |
| 3. 1. 5. 2. Sodyum fosfat tamponu | 28 |
| 3. 1. 5. 3. Fosfat tamponu | 28 |
| 3. 1. 5. 4. 1 M NaCl çözeltisi | 28 |
| 3. 1. 5. 6. 1 N H ₂ O ₂ çözeltisi | 29 |
| 3. 1. 5. 7. Amonyum mobildat çözeltisi | 29 |
| 3. 1. 5. 8. Potasyum iyodür çözeltisi | 29 |
| 3. 1. 5. 9. 1 M NaOH çözeltisi | 29 |
| 3. 1. 5. 6. 1 M sitrik asit çözeltisi | 29 |
| 3. 2. Yöntem | 30 |
| 3. 2. 1. Süt ve süt ürünlerinin homojenizasyonu ve dilüsyon yapımı | 30 |
| 3. 2. 2. LAB izolasyonu | 30 |
| 3. 2. 3. Agar-sandviç yöntemi ile antimikrobiyal etkili LAB nin izolasyonu | 31 |
| 3. 2. 3. 1. Gram boyama | 32 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 3. 2. 3. 2. Spor boyama | 32 |
| 3. 2. 3. 3. Katalaz testi | 32 |
| 3. 2. 4. LAB izolatlarının API test kitleriyle tanımlanması | 33 |
| 3. 2. 5. Bakteriyosin benzeri madde üreten LAB'nin antimikrobiyal spektrumunun belirlenmesi | 34 |
| 3. 2. 5. 1. Disk difüzyon yöntemi | 35 |
| 3. 2. 5. 2. Agar-sandviç yöntemi | 36 |
| 3. 2. 6. Proteolitik enzimlerin bakteriyosin benzeri madde aktivitesine üzerine etkisi | 36 |
| 3. 2. 7. LAB' nin hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) üretme yetenekleri | 37 |
| 3. 2. 8. LAB' nin bakteriyosin benzeri madde üretimlerine etki eden faktörler | 38 |
| 3. 2. 8. 1. İnkübasyon sıcaklığının etkisi | 38 |
| 3. 2. 8. 2. pH değerinin etkisi | 38 |
| 3. 2. 8. 3. İnkübasyon süresi | 38 |
| 3. 2. 9. Alkali-Asit hidrolizi | 39 |
| 3. 2. 10. Bakteriyosin benzeri maddeyi konsantre etme çalışmaları | 39 |
| 3. 2. 11. Bakteriyosin benzeri madde üreten LAB kültürleri peroksidaz enzimiyle muamelesi | 41 |
| 3. 2. 12. Bakteriyosin benzeri madde üreticisi olan LAB kültürlerinin kendi kültürlerine karşı antagonistik etkisinin belirlenmesi | 42 |
| 4. BULGULAR..... | 43 |
| 4. 1. LAB nin izolasyonu ve tanımlanması | 43 |
| 4. 2. Bakteriyosin benzeri madde üreten LAB' nin belirlenmesi | 45 |
| 4. 3. Disk difüzyon yöntemi | 45 |
| 4. 4. Agar sandviç yöntemi ile elde edilen sonuçlar | 50 |
| 4. 5. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) üretiminin belirlenmesi | 53 |
| 4. 6. Bakteriyosin benzeri maddelerin proteolitik enzimler ile muamelesi | 54 |

İÇİNDEKİLER (devamı)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| 4. 7. İnkübasyon sıcaklığının bakteriyosin benzeri madde üretimine etkisi | 57 |
| 4. 8. Besiyeri başlangıç pH değerinin bakteriyosin benzeri madde üretimine etkisi | 60 |
| 4. 9. Bakteriyosin benzeri madde üretimi için optimum inkübasyon sürenin belirlenmesi | 62 |
| 4. 10. Bakteriyosin benzeri maddeler ile yapılan ekstraksiyon ve konsantre etme çalışmaları | 68 |
| 4. 10. 1. Alkali-Asit hidrolizi | 68 |
| 4. 10. 2. Bakteriyosin benzeri maddeleri konsantre etme çalışması | 69 |
| 4. 10. 3. Bakteriyosin benzeri maddeler üreten LAB kültürlerinin peroksidaz enzimiyle muamelesi | 69 |
| 4. 10. 4. Bakteriyosin benzeri madde üreticisi olan LAB kültürlerinin kendi kültürlerine karşı etkisinin antagonistik etkisinin belirlenmesi | 71 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 72 |
| KAYNAKLAR..... | 78 |

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 2. 1. Lantibiyotiklerin gen organizasyonu (Asutay, 2007) | 10 |
| Şekil 2. 2. Wedge- Model mekanizması ile por oluşumu (Kopenon, 2004)..... | 14 |
| Şekil 2. 3. Barrel-stave mekanizması ile por oluşumu (Mumcu, 1997)..... | 14 |
| Şekil 4. 1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) üretimi standart eğrisi..... | 53 |
| Şekil 4. 2. Farklı inkübasyon sürelerinde 26 nolu izolatın (<i>Lactobacillus plantarum</i>) Bakteriyosin benzeri madde üretimi | 63 |
| Şekil 4. 3. Farklı inkübasyon sürelerinde 32 nolu izolatın (<i>Lactobacillus plantarum</i>) bakteriyosin benzeri madde üretimi..... | 64 |
| Şekil 4. 4. Farklı inkübasyon sürelerinde 33 nolu izolatın (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) bakteriyosin benzeri madde üretimi..... | 65 |
| Şekil 4. 5. Farklı inkübasyon sürelerinde 34 nolu izolatın bakteriyosin benzeri madde üretimi..... | 66 |
| Şekil 4. 6. <i>Bacillus subtilis</i> ' e karşı 26 (<i>Lactobacillus plantarum</i> , 2y), 33 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ,14y) ve 34 (15y) nolu izolatların 12. saatte oluşturdukları zonlar | 67 |
| Şekil 4. 7. <i>Bacillus subtilis</i> ' e karşı 32 (<i>Lactobacillus plantarum</i>) nolu izolatın 24. saatte oluşturdukları zonlar | 67 |
| Şekil 4. 8. MRSA'ya karşı 32 (13y) nolu izolatın 24. saatte oluşturdukları zonlar | 68 |

ÇİZELGE DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Çizelge 2. 1. Bazı bakteriyosinler ve bakteriyosinleri üreten üretici mikroorganizmalar | 8 |
| Çizelge 2. 2. Lantibiyotik olan ve olmayan bakteriyosinlerin üretici suşları..... | 10 |
| Çizelge 3. 1. Antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan test bakterileri..... | 20 |
| Çizelge 4. 1. İzole edilen bakterilerin morfolojik, fiziksel özellikleri ve API strep 20 ve API 50 CHL testinin sonuçları..... | 44 |
| Çizelge 4. 2. LAB izolatlarının çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemiyle belirlenmesi | 47 |
| Çizelge 4. 3. LAB izolatların çeşitli standart LAB suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin disk difüzyonu yöntemiyle belirlenmesi | 49 |
| Çizelge 4. 4. İzolatların agar-sandviç yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi..... | 51 |
| Çizelge 4. 5. İzolatların agar-sandviç yöntemiyle LAB karşı antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi..... | 52 |
| Çizelge 4. 6. LAB' nin MRS besiyerinde ürettikleri H ₂ O ₂ miktarları | 54 |
| Çizelge 4.7. Proteolitik enzim muamelesi sonrası LAB izolatlarının çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi | 55 |
| Çizelge 4. 8. Proteolitik enzim muamelesi sonrası LAB izolatlarının standart LAB suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi | 56 |
| Çizelge 4. 9 Bakteriyosin benzeri madde üretimine sıcaklık etkisinin çeşitli patojenler üzerinde denenmesi | 58 |
| Çizelge 4. 10. Bakteriyosin benzeri madde üretimine sıcaklık etkisinin çeşitli standart LAB strainleri üzerinde denemesi | 59 |
| Çizelge 4. 11. Bakteriyosin benzeri madde üretimine pH değeri etkisinin çeşitli patojenler üzerinde denenmesi | 61 |

ÇİZELGE DİZİNİ (devam ediyor)**Sayfa**

| | |
|---|----|
| Çizelge 4. 12. Bakteriyosin benzeri maddenin ekstraksiyonu sonrasında elde edilen inhibisyon zonları | 69 |
| Çizelge 4. 13. Bakteriyosin benzeri maddeler üreten LAB kültürlerinin peroksidaz enzimiyle muamelesi sonrasında meydana gelen inhibisyon zonları... | 70 |

1.GİRİŞ

Gıdalarda bulunan mikroorganizmaların temel özellikleri bozulmaya neden olanlar, faydalı fonksiyonları olanlar, sağlığa zarar verenler ve inört yani ne faydalı ne de zararlı olan mikroorganizmalar olarak düşünülmektedir. Gıdanın kalitesi ve güvenliği için birçok çeşitli patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların kontrolünün sağlanması oldukça önemli olmaktadır. Bunun için düşük sıcaklık veya ısıtma işlem uygulaması, paketlenme yöntemleri ve kimyasal madde eklenmesi gibi yöntemlerin uygulanmasında artış gözlenmektedir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar gıdaların raf ömrü uzatılmasında ve gıda güvenliğinin sağlanmasında bu proseslere veya kimyasal maddelere alternatif olarak gıdaların mikrobiyotasında bulunan mikroorganizmaların ve onların antimikrobiyal ürünlerinin kullanılması araştırılmaktadır (Stiles, 1996; De Martinis et al., 2002).

Laktik asit bakterileri (LAB) içerdikleri doğal koruyucu ve duyuşsal özellikleri nedeniyle çok eski zamanlardan beri fermente gıda uygulamalarında kullanılmaktadır. LAB kültürleri bu özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaktadırlar (Leroy and De Vuyst, 2004; Wood and Holzapfel, 1995). LAB, Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, kok/basil/kokobasil şeklinde, mezofilik ve termofilik özellikte olabilen bakterilerdir. Biyokoruma amacıyla en yaygın kullanılan mikroorganizma grubudur (Axelsson, 1998). Antimikrobiyal etkileri ürettikleri organik asit (laktik, asetik asit vb.), hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal peptitlerden kaynaklanmaktadır (Zhennai, 2000). Biyokoruma yöntemlerinden birisi de laktik asit bakterilerinin starter kültür, koruyucu kültür veya yardımcı kültür olarak kullanılmasıdır. Böylece gıdanın depolama ömrü iyileştirilmekte ve gıda güvenliği artmaktadır (Steffen, 2005; De Vuyst and Leroy, 2007).

Tüketicilerin sentetik gıda katkı maddelerinin kullanımına karşı gösterdiği hassasiyet nedeniyle, bunların yerini alabilecek doğal kaynaklı, tüketen insanlara ve çevreye zararlı olmayan, kolayca parçalanabilen ve güvenli maddelerin kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır. Bu kapsamda ilgi çeken biyomoleküllerden birisi de bakteriyosinlerdir. Bakteriyosinler klasik antibiyotiklerden farklı olarak mide ve ince

bağırsaklardan geçerken proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanmaktadırlar. Bu nedenle vücutta absorbe edilmezler ve kalın bağırsak mikrobiyotasına ulaşamazlar.

Bakteriyosin üretebilen laktik asit bakterilerinin gıda kaynaklı çeşitli bakterilere özellikle de Gram pozitif olanlara sidal ya da statik etkili olmaları, onların gıda koruma amaçlı olarak kullanım potansiyelleri bulunduğunu göstermektedir. Günümüzde, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin, peynir, et ve içeceklerin üretim sürecinde raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan (1-25 ppm) geniş spektrumlu bir bakteriyosindir. Ancak çoğunun etki spektrumlarının dar olması (tür yada strain seviyesinde) kullanım olanaklarını sınırlayan en önemli unsurdur. Bu olumsuzluk için bir çözüm yolu; karışık kültürlerin kullanımı olabilir. Bu nedenle bu çalışmada, süt ve fermente süt ürünlerinden bakteriyosin benzeri madde üretme potansiyeline sahip LAB izolasyonu yapılarak, bunların tanımlanması ve antimikrobiyal etki spektrumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla süt, peynir, kefir gibi gıdalardan LAB izole edilmiştir. İzolatların tür ve cins seviyesinde tanımlamaları yapılmıştır. LAB'nin ürettiği bakteriyosin-benzeri maddelerin, çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif test bakterilerine karşı antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir.

LAB izolatları tarafından üretilen ve test bakterilerinin gelişimini engelleyen maddenin protein yapısında olup olmadığı, pepsin ve tripsin gibi proteolitik enzimler kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca, antimikrobiyal aktivitede hidrojen peroksitin etkili olup/olmadığı da peroksidaz enzimi kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi ve ortam pH' ı gibi çeşitli ortam koşullarının LAB'nin bakteriyosin-benzeri maddelerin üretiminde meydana getirebilecekleri değişimler incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Laktik Asit Bakterileri

1857’ de Louis Pasteur tarafından LAB’nin laktik asit fermentasyonunu gerçekleştirdikleri ortaya konmuştur (Kleerebezem and Mierau, 2005). LAB, homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere 2 gruba ayrılır ve şekerleri fermentasyona uğrattıklarında esas ürün olarak laktik asit üretirler. Laktik asit yanında özellikle heterofermentatifler ikincil ürün olarak etil alkol, asetik asit, CO₂, diasetil, asetoin gibi bileşikler de oluştururlar (Hayaloglu ve Erginkaya 2001; De Vuyst et al., 2004; Stiles and Holzapfel, 1997).

Bir grup olarak LAB’nin ilk tanımı, koliform bakterileri de kapsayan, sütü fermente ve koagüle etme yeteneklerine dayandırılmıştır. Beijerinck tarafından 1901 yılında koliformlar bu grup içerisinde çıkarılmıştır. Daha sonra Orla-Jensen (1919) “gerçek laktik asit bakterileri”nin Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, çubuk ve koklar şeklinde, karbonhidratları ve yüksek alkollerini fermente ederek genellikle laktik asit oluşturan doğal bir grup olduklarını ifade etmişlerdir. LAB grubu içinde yer alan cinsler *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactosphaera*, *Dolosigranulum*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Alloiococcus*, *Weissella*, *Bifidobacterium*, *Globicatella*, *Vagococcus*, *Enterococcus* ve *Aerococcus*’dur. Gıda endüstrisi açısından özellikle *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* türleri önem arz etmektedir (Axelsson, 1993; Stiles and Holzapfel, 1997).

LAB kültürleri gıdalarda birçok mikroorganizmanın gelişmesini engeller, gıda korumasında ve emniyetiyle ilgili önemli antimikrobiyal özellikleri vardır. Süt ürünlerinde starter kültürlerin kullanılmalarında temel amaç kendine özgü aroma özellikleri taşıyan ürünün elde edilmesidir. Bununla birlikte, ürün elde edilirken ortaya çıkan laktik asit gibi doğrudan ürün ile ilgili metabolitleri ve ürün eldesinde doğrudan etkili olmayan veya duyuşal olarak fark edilmeyen H₂O₂ gibi metabolitlerin ürünleri ürettikleri belirlenmiştir. Bu metabolit ürünlerin gıdaya bulaşabilen çeşitli kontaminant mikroorganizmaların gelişmesi üzerinde çeşitli düzeylerde inhibisyon etkisi olduğu

belirlenmiştir (Barefoot and Nettles, 1993; Daeschel, 1989; Lewus and Montville 1991).

LAB, gıda fermentasyon süreçlerinde önemli rol oynar. Özellikle gıdalarda fermentasyon sürecinde raf ömrünün uzatılması için kullanılmaktadır (Stiles, 1996). LAB leri ürettikleri organik asitler özellikle de laktik asitle kullanıldıkları hammadde de hızlı asitlenmeye neden olurlar. Geçmişte geneksel yöntemle LAB kullanılarak hazırlanan gıdalarda fermentasyon kendiliğinden gerçekleşmesine bağlıyken, bugün ise endüstriyel gıda fermentasyonun da kontrollü olarak ilave edilen LAB starter kültür olarak gıda maddelerine eklenerek uygulanmaktadır. Bu buluş sayesinde fermentasyon süreci ve ortaya çıkan ürün kontrolü sağlanmıştır (Leroy and De Vuyst, 2004).

Gıdaların korunmasında LAB gibi koruyucu kültürlerin kullanımı yanında, bu kültürlerden elde edilen bakteriyosin gibi metabolitler de kullanılmaktadır. Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenerek salgılanan, protein yapısındaki antimikrobiyal etkiye sahip bileşenlerdir (De Martinis et al., 2002; Riley, 1998).

2.2. LAB Bakteriyosinleri

2.2.1. Tanımı ve tarihçesi

1857'de Pasteur ve asistanı Joubert üründen izole etikleri bir bakteriyle (muhtemel *Escherichia coli*) şarbon basilini aynı ortama ektikten sonra in vivo ve in vitro olarak şarbon bakterisine karşı kontrolünün bulduğunu bildirmişlerdir. Böylelikle bakteriler arasındaki ilk antagonistik etki Pasteur ve asistanı Joubert tarafından belirlenmiştir (Riley and Chavan, 2007). Bakteriyosin tanımı ilk kez Jacob ve ark. (1953) tarafından yapılmıştır. Bu tanım daha çok farklı türler arası antagonistik ilişkileri kapsamaktaydı. Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarda buna benzer çok fazla madde bulununca terimin kapsamı da genişletilmiştir (Eckner, 1992).

1976 yılında Tagg ve ark. tarafından yapılan bakteriyosin tanımına göre bakteriyosinler, protein tabiatında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakteriye, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip makromoleküllerdir (Jack et al., 1995; Tagg et. al., 1976).

Gıdalarda kullanılan LAB kültürleri tarafından ribozomal olarak sentezlenen bakteriyosinlerin polipeptid veya protein yapıda oldukları bilinmektedir. Bakteriyosinlerin duyarlı bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterirken kendisini üreten bakterilere bağışıklık sağlamaktadırlar (Jack et al., 1995; Miller et al., 1998). Bu nedenle doğal antibiyotik olarak nitelenmekle birlikte, bakteriyosinler klasik antibiyotiklerden farklı olarak mide ve ince bağırsaklardan geçerken proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanmaktadırlar. Bu nedenle vücutta absorbe edilmezler ve kalın bağırsak mikrobiyotasına ulaşamazlar. Doğal kaynaklı olmaları, insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etme özellikleri ile bakteriyosinler son yıllarda üzerinde çok fazla çalışılan bir konu haline gelmiştir (Banwart, 1981; Geisen et al., 1992; Howard et al., 1993).

Bakteriyosinlerin genel özellikleri şöyle aşağıda verilmiştir.

- Protein yapısındadırlar.
- Duyarlı hücrelerin spesifik hücre duvarı reseptörleri bulunur.
- Bakterisidal aktiviteye sahiptirler.
- Etki mekanizmaları sınırlıdır ve genellikle Gram pozitif mikroorganizmalara etkilidirler.
- Bakteri hücrelerini parçalamadan inhibe ederler. Etki mekanizmaları, hücre duvarının çift yönlü geçirgenliğini artırarak, sitoplazmik maddelerin hücre dışına çıkmasına neden olmasına dayanmaktadır.
- Proteolitik enzimlerle inaktive olurlar.

Bakteriyosin tanımı yapılan çalışmalarda bakteriyosinlerin antimikrobiyal spektrum genişliği, özellikle gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakteriler üzerinde etkilerinin bulunmasıyla genişletilmiştir. Bakteriyosinlerin gıdalardaki kullanımları; doğrudan gıdada kullanımları; doğrudan gıdanın formülasyonuna ekleme, gıdayı bakteriyosin çözeltisine daldırmak ve bakteriyosin üreten suşlarla inokülasyonla gıdada gelişmesiyle hedeflenen patojeni inhibe etmektedir (Okereke and Montville, 1991).

2.2.2. Sınıflandırılması

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, doğal olarak mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler. Ribozomal olarak sentezlenen bakteriosinler, küçük katyonik amfifilik, antimikrobiyal peptidlerdir. Spektrum ve aktivite mekanizması, kütle ve moleküler yapı, termostabilite, aktivitenin pH aralığı ve genetik determinantlar açısından farklılık gösteren geniş grup içinde yer almaktadırlar. Yapısal, fizikokimyasal ve moleküler özellikler temelinde LAB bakteriyosinleri olmak üzere 3 ana sınıfa ayrılmaktadır (Bauer and Dicks, 2005; O'Sullivan et al., 2002). Çizelde 2. 1. 'de bakteriyosin sınıflandırması verilmiştir.

Sınıf I bakteriyosinleri (lantibiyotikler), daha çok lanthionine içerdikleri için lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Yapılarında bilinen amino asitlerden farklı olarak lanthionine (Lan) ve methyl lanthionine (MeLan) amino asit türevleri içermektedirler (Twomey et al., 2002). Düşük molekül ağırlığına sahip (<5 kDa) membran aktif peptid aminoasitler olan lantionin ve dehidro olmuş aminoasitler içermektedirler (Klaenhammer, 1993; Tagg et al., 1976;). Lantibiyotikler yapılarına göre 2 alt gruba ayrılmaktadırlar. Tip A lantibiyotikler, lineer, esnek ve pozitif yüke sahip moleküller olarak bilinmektedirler. 2-5 kDa arasında molekül ağırlığına sahiptirler. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin bu gruba ait en iyi karakterize edilen lantibiyotiklerdir. Ayrıca *Staphylococcus gallinarum* tarafından üretilen gallidermin, *Streptococcus salivarius* tarafından üretilen salivarisin A ve *L. lactis* tarafından üretilen laktisin 481 bu gruba örnek olarak verilebilmektedirler. Tip B lantibiyotikler globüler yapıda olup yaklaşık 2 kDa molekül ağırlığına sahip yüksüz ya da negatif yüklü enzim inhibitörleridir. Tip B lantibiyotiklere mersasidin, aktagardin, ankovenin örnek verilebilmektedir (Bauer and Dicks, 2005; Koponen, 2004; Papagianni, 2003).

Sınıf II bakteriyosinleri Sınıf I'den farklı olarak lanthionine içermemektedir. Molekül ağırlıkları 10 kDa dan daha düşüktür ve ısı stabilitesine sahiptirler. Tip IIa *Listeria*'ya karşı aktif ve N-terminalinde Try-Gly-Asn-Val-Xaa-Cys amino asit dizisi içermektedir. Örnek olarak pediosin PA-1, sakasin A, sakasin P, curvasin A ve mesenterisin Y105 verilebilir. Tip IIb bakteriyosinlerinin aktivite gösterebilmesi için iki peptide gereksinim duymaktadır. Laktasin F, laktokoksin G ve M örnek olarak

verilebilir. Tip IIc bakteriyosinlerine thiol'la aktif edilen peptitler denilmektedir. Asidosin B, enterosin P örnek olarak verilebilir (Tagg et al., 1976 ; Klaenhammer, 1993; Papagianni, 2003).

Sınıf III bakteriosinler daha büyük molekül ağırlığına (>30 kDa) sahiptirler, ısıya daha duyarlı peptid zincirlerinden oluşmaktadır. Helvetisin J, laktosin A ve B, enterosin A bu grup içinde yer almaktadır (Zhennai, 2000).

Çizelge 2.1. Bazı bakteriyosinler ve bakteriyosinleri üreten üretici mikroorganizmalar (Camilla et. al., 2010, Chen and Hoover, 2003; Ishizaki et al., 1999; Nes et. al., 1996; Riley and Chavan, 2007; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

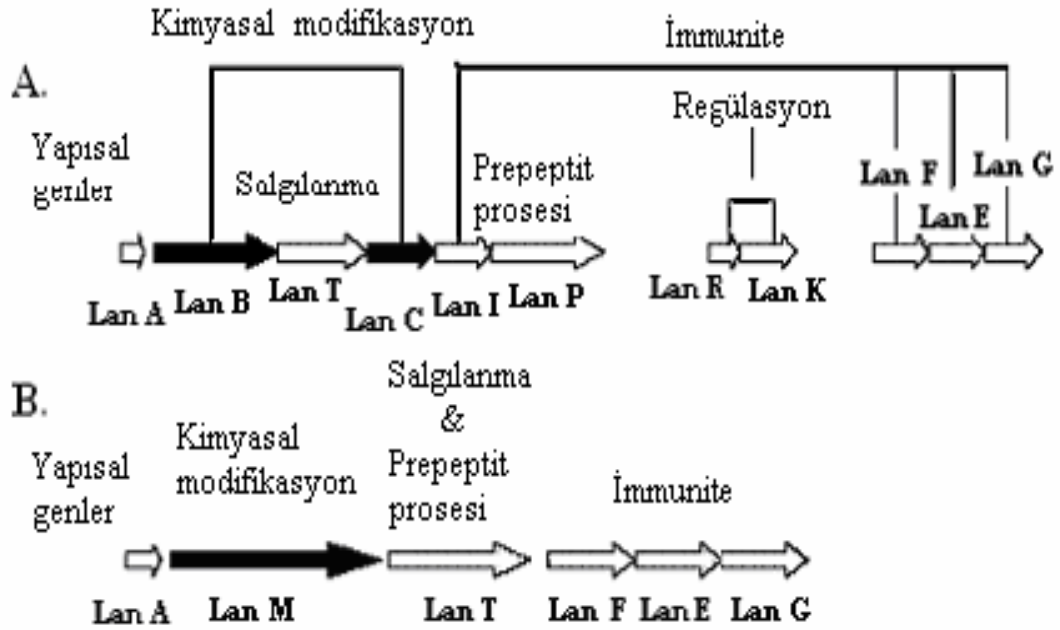
| | |
|---|---|
| <p><u>SINIF I</u></p> <p><u>Tip A- lantibiyotik</u> Nisin A Nisin U Laktosin S Epidermin Laktisin 481 Gallidermin Streptin</p> <p><u>Tip B- lantibiyotik</u> Duramisin Mersasidin Aktogardin Ansovenin Cinnamisin</p> <p><u>SINIF II</u></p> <p><u>Tip IIa</u> Leukosin A/B Mesenterisin Y105 Diversin V41 Lactococcin</p> <p><u>Tip IIb</u> Laktokoksin G Plantarisin A Plantaricin S Plantarisin EF Lactocin F Plantarisin JK</p> <p><u>Tip IIc</u> Asidosin B Enterosin P Enterosin B Carnobacteriocin A Divergicin A</p> <p><u>SINIF III</u> Helvetisin J Helvetisin V-1829</p> | <p><i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Staphylococcus gallinarum</i> <i>Streptococcus pyogenes</i></p> <p><i>Streptomyces cinnamoneus</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Actinoplanes</i> spp. <i>Actinoplanes</i> spp. <i>Streptomyces cinnamoneus</i></p> <p><i>Leuconostoc gelidum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Lactococcus lactis</i></p> <p><i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i></p> <p><i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Carnobacterium piscicola</i> <i>C. divergens</i></p> <p><i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i></p> |
|---|---|

2.2 3. Biyosentezi

Bakteriyosin üretimi ve immüneyi kodlayan genler, plazmid, kromozom ve her ikisi veya transposon üzerinde bulunabilmektedir. Bakteriyosin üretiminin plazmid tarafından gerçekleştirildiğini göstermek için fenotipik, fiziksel ve genetik olarak ispat edilmesi gerekmektedir (Montville and Winkowski, 1997).

Bakteriyosinler ribosomal olarak sentezlenmektedir. Bakteriyosin üretimi ve immüneyi kodlayan genler genellikle operonlarda düzenlenmektedir. Çoğu bakteriyosinin yapısal genleri operana benzer bir yapı gösterir (Klaenhammer, 1993). Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin üretiminin gerçekleştirilebilmesi için dört farklı gene ihtiyaç vardır: (i) prepeptidi kodlayan yapısal gen, (ii) immüneye geni, (iii) ABC-taşıyıcısını kodlayan gen ve (iv) bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan proteinini kodlayan gen (Chen and Hoover, 2003; Deegan et al., 2006; Garneu et al., 2002; Savadogo et al., 2006).

Bir lantibiyotik biyosentezi prelantibiyotik oluşumu, dehidrasyon ve çapraz bağlanma (kimyasal modifikasyon), lider peptidin parçalanması ve salgılanmasını içermektedir. Lantibiyotiklerde 2 tür genetik organizasyon belirlenmiştir (Şekil 2.1). Nisin, epidermin, subtilin ve Pep 5 lantibiyotikleri LanB ve LanC enzimleri tarafından modifiye edilirken, laktisin 481, laktosin S, sitolisin ve mersasidin, LanM enzimi tarafından modifiye edilmektedir (Kopenon, 2004). Genetik isimlendirme bütün lantibiyotikler için kullanılmaktadır. Bunlar prekürsör peptit LanA, spesifik modifikasyonları gerçekleştiren LanB, C ve M enzimleri, lider peptidin uzaklaştırılmasından sorumlu olan LanP proteazı, ABC sistemle peptidin taşınmasını sağlayan LanT, biyosentezi regüle eden LanR ve K proteinleri ve bağışıklık sağlayan LanI ve LanFEG'dir (Erinç ve ark., 2006; Kopenon, 2004; Takala, 2005).



Şekil 2.1. Lantibiyotiklerin gen organizasyonu (Asutay, 2007)

İmmünite proteinlerini kodlayan genler diğer bakteriyosin yapı ve proses genlerine genetik yakınlık içindedir. Yapısal bakteriyosin geni ve immünite geninin aynı operonda bulunması ve genellikle bir diğerinden sonra olması yaygındır. Lantibiyotik üretici bakterilerin kendi bakteriyosinine karşı immünesinin ilk önce bir immünite geninden kaynaklandığı düşünülmüştür (örneğin nisin için *nisI*, subtilin için *spaI*). Fakat diğer genlerin yok edilmesiyle konukçu immünetisini değiştirdiği görüldüğünden beri bu bakteriyosinlerin immünesinin birçok proteinin etkisinin bir sonucu olduğu saptanmıştır. Örneğin nisin üretmeyen nisin dirençli *Lactococcus lactis* suşlarının *NisI* proteinini kodlayan genetik elementleri yoktur. Fakat *nisF*, *nisE* ve *nisG*'ye benzer dizileri vardır. Belirtilen genlerin bu suşları nisine karşı direncine yardım ettiği kabul edilmektedir. *nisG*'nin yok edilmesi hücreleri nisine karşı daha az dirençli hale getirmektedir (Cleveland et al., 2001, Van Kraaij et. al., 1999).

Lantibiyotik olmayan bakteriyosinlerin immünesi ise daha basittir. İmmünite proteinini bir gen kodlamaktadır. İmmünite proteinleri üretici bakteriyi kendi bakteriyosinine karşı tamamen, diğer bakteriyosinlere karşı kısmen korumaktadır. İmmünite proteinleri arasında amino asit dizi benzerliği düşük olmasına karşın ortak

bazı özellikler taşımaktadırlar. Bunlar katyonik ve hidrofilik moleküller olup α -heliks yapısına sahiptirler. Transmembran bölmelerine (hidrofobik) sahip olmamaları bunların hem hücre dışına salgılanabildiklerini hem de hücre içinde kalabildiklerini göstermektedir (Ennahar et al., 2000; Ishizaki et.al., 1999; Jack et al., 1995; Montville and Winskowski, 1997). Çizelge 2.2.' de lantibiyotik olan ve olmayan bakteriyosinlerin üretici suşları verilmiştir.

Hücre mebranında gözenek (por) oluşturan bakteriyosinlere (örneğin nisin ve pediosin) karşı immunité birkaç değişik yolla sağlanabilir. İmmunité proteini bakteriyosinin membrana adsorpsiyonunu önleyebilir, membrana adsorbe olan bakteriyosini dış ortama geri gönderebilir veya bakteriyosini hücre içine alınarak parçalayabilir (Erinç ve ark., 2006).

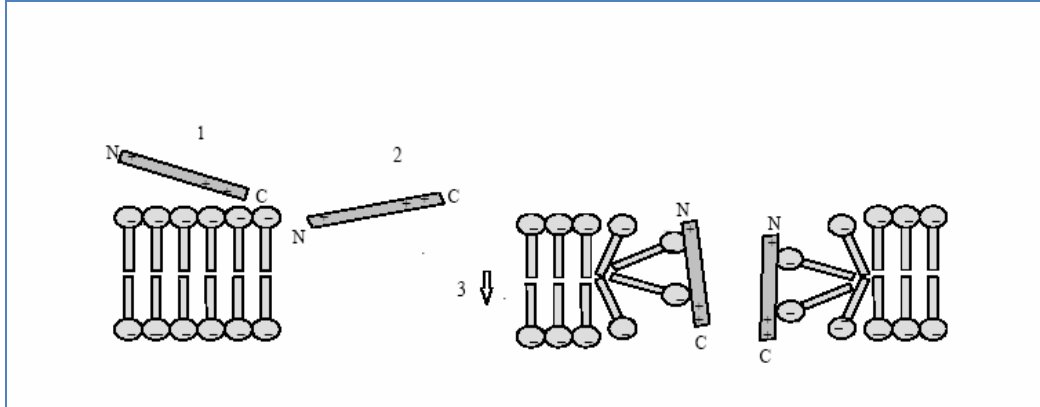
Çizelge 2.2. Lantibiyotik olan ve olmayan bakteriyosinlerin üretici suşları
(Garneau et al., 2002)

| Bakteriyosin | Üretici suş |
|-------------------------|--|
| Lantibiyotik olanlar | |
| Sitolisin | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| Laktisin 3147 | <i>Lc. lactis</i> DPC3147 |
| Plantarisin W | <i>Lb. plantarum</i> LMG 2379 |
| Stafilokoksin C55 | <i>Staphylococcus aureus</i> C55 |
| Lantibiyotik olmayanlar | |
| ABP-118 | <i>Lb. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> |
| Brokhosin-C | <i>Bacillus campestris</i> ATCC 43754 |
| Enterosin 1071 | <i>Enterococcus faecalis</i> BFE 1071 |
| Enterosin L50 | <i>Enterococcus faecium</i> L50 |
| Laktasin F | <i>Lb. johnsonii</i> VPI11088 |
| Laktosin 705 | <i>Lb. casei</i> CRL 505 |
| Laktokoksin G | <i>Lc. lactis</i> LMG 2081 |
| Laktokoksin MN | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4 |
| Leukosin H | <i>Leuconostoc</i> MF215B |
| Mutasin IV | <i>Streptococcus mutans</i> UA 140 |
| Plantarisin EF | <i>Lb. plantarum</i> C-11 |
| Plantarisin JK | <i>Lb. plantarum</i> C-11 |
| Plantarisin S | <i>Lb. plantarum</i> LPCO10 |
| Termofilin 13 | <i>Streptococcus thermophilus</i> SFi13 |

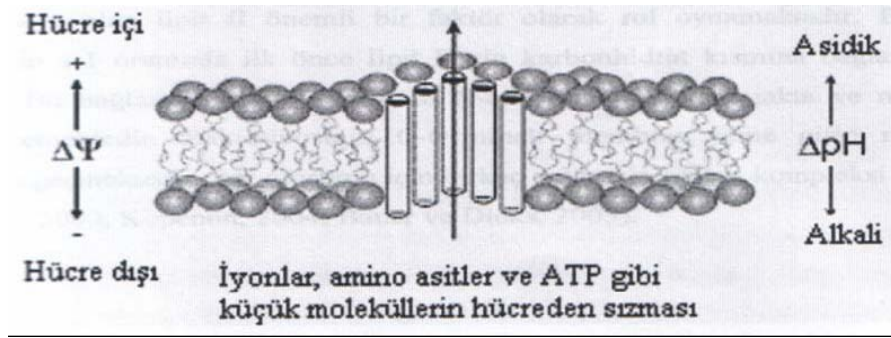
2.2.4. Antimikrobiyal etki mekanizması

LAB bakteriyosinleri duyarlı bakterilerin membranlarının karalılığını bozarak etki gösteren peptitlerdir. Duyarlı bakterilerin hücre membranlarında iyonik gözenekler oluşturarak potasyum ve inorganik fosfat sızmasına ve buna paralel olarak membran iyonik dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda transmembran potansiyeli ve/veya pH gradientinin kısmen veya tamamen yok olması nedeniyle proton itici gücü ortadan kalkmaktadır. Proton itici güç, hücre içinde iyonların ve metabolitlerin birikmesi ile ATP sentezi gibi sitoplazmik membranda enerjiye bağlı birçok hayati işlemleri yürütmektedir. Proton itici gücün yok olması veya bozulması direk olarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Bruno and Montville, 1993).

Lantibiyotiklerin duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranda por oluşturmalarıyla ilgili olarak öne sürülen modeller “Barrel–Stave”, “Wedge–Model” (Şekil 2.2) ve “Lipit II Model”dir. Barrel–Stave mekanizması ile por oluşumunda bakteriyosinlerin katyonik yük taşıyan C-terminali fosfolipitlerin baş grupları ile elektrostatik interaksiyona girerek bu bölgede membranın incelmesine neden olurlar (Şekil 2.3). Membran potansiyeli varlığında membran içine girip oligomerize olmakta ve böylece membranda iyonik por oluşturmaktadırlar. Peptitler merkezi kanalın etrafında dizilmekte ve hidrofobik yüzeyler membrana doğru, hidrofilik yüzeyler ise por’un merkezine doğru yönelmektedir (Garneau et al., 2002; Kopenon, 2004; McAuliffe et al., 2001). Wedge–model’inde lantibiyotiklerin pozitif yüklü C-terminali anyonik fosfolipitlerle iyonik interaksiyona girip membran yüzeyine sıkıca tutunmakta ve lipit dinamiğinin bozulmasına neden olmaktadır. Yeterli miktarda potansiyel varlığında (-100 mV), bakteriyosin molekülleri fosfolipitlerle olan interaksiyonlarını kaybetmeksizin membran içine girip membranda bükülmelere veya kıvrımlara ve dolayısıyla porların oluşmasına neden olmaktadır (Bauer and Dicks, 2005; Brötz and Sahl, 2000; Kopenon, 2004).



Şekil 2.2. Wedge- Model mekanizması ile por oluşumu (Kopenon, 2004)



Şekil 2.3. Barrel-Stack mekanizması ile por oluşumu (Mumcu, 1997)

Lipit II modeline göre por oluşumunda ise bir peptidoglukan prekürsürü olan lipit II önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır. Bu modelde bakteriyosin ilk olarak 1:1 oranında lipit II nin karbonhidrat kısmına bağlanmaktadır. Bakteriyosinin N-terminal kısmı bu bağlanmada rol oynamakta ve negatif bir yüzey gerekmemektedir. Lantibiyotiğin C-terminali membran içine girip membranın karşı tarafına geçmektedir. Por oluşumu için birkaç bakteriyosin/lipit II kompleksi gereklidir (Kopenon, 2004).

2.2.5. Antimikrobiyal etki spektrumları

LAB'nin ürettikleri bakteriyosinler genellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde inhibitör aktivite gösterirler; ancak son zamanlarda Gram negatif bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip bakteriyosinler de tespit edilmiştir (De Kwaadsteniet et al., 2005; Lee and Paik, 2002).

LAB'lerinde en iyi tanımlanmış ve en yaygın kullanım alanına sahip bakteriosin, bazı *Lactobacillus lactis* spp. *lactis* suşları tarafından üretilen nisindir. Nisin, aralarında *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* ve *Listeria* cinslerinin de dahil olduğu birçok türe karşı aktivite gösteren geniş etki spektrumuna sahip bir bakteriosindir. Ancak Gram-negatif bakterilere karşı etkili değildir. Dış membranını zarar görmüş (EDTA ile muamele edilmiş, ısı şoku veya soğuk şoka uğramış Gram negatifler) üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. EDTA, dış membranı tahrip eder ve nisinin penetrasyonuna izin verir (Cleveland et al., 2001; Hauben et al., 1996; Liu and Hansen, 1990; Schved et al., 1994;).

Fermente gıdalardan izole edilen LAB'nin bakteriyosinleri ile ilgili bir çalışmada *Lactobacillus*, *Carnobacterium* ve *Lactococcus* cinslerine ait bakteriyosinlerin antimikrobiyal etki spektrumları belirlenmiştir. *Lactococcus crispatus* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen bakteriyosinler nisine benzer şekilde geniş aktivite spektrumu göstermişlerdir. *Lactococcus curvatus* ve *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen bakteriyosinler *Brochetrix thermosphacta*, *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Listeria* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Carnobacterium* sp. ve *Streptococcus thermophilus*'u kapsayan farklı çeşitlilikte aktivite spektrumları gösterirken, *Carnobacterium divergens* tarafından üretilen bakteriyosin *Lc. curvatus*, *Listeria* sp., *Enterococcus* sp. ve *S. tehrmophilus*'u kapsayan sınırlı çeşitlilikte aktivite spektrumu göstermiştir. İncelenen hiçbir bakteriyosin Gram negatif bakteriler ya da mayalara karşı aktivite göstermemiştir (Coventry et al., 1997)

2.2.6. Bakteriyosin üretimini, aktivitelerini ve stabilitesini etkileyen faktörler

Bakteriyosin üretimi, aktivitesi ve stabilitesini etkileyen faktörler sırasıyla; besiyerinin bileşimi, üretici bakterinin gelişme fazı, besiyeri başlangıç pH değeri, fermantasyon şekli (kesikli ve sürekli), inkübasyon sıcaklığı ve süresi, ısı işlem, proteolitik enzimler ve depolama koşullarıdır. Basit bir besiyerinde bakteriyosin üretimi, optimum pH ve bakteri için spesifik besin öğelerinin ilavesi ile artırılabilir. Kullanılan besiyerindeki bazı bileşenler (örneğin triptofan, maya ekstraktı vb.) bakteriyosinleri koruduğu, bazılarının ise stabilitesini azalttığı belirtilmektedir. Bakteriyosinin üretimi için en uygun sıcaklık ise bakterilerin optimum gelişme sıcaklığıdır. Genellikle yüksek hücre yoğunluğunu sağlayan koşullar yüksek bakteriyosin üretimini de sağlamaktadır (Aasen et. al., 2000; Kaiser et. al., 1998; Yang and Ray, 1994; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

Enterosin ON-157 (*E. faecium* NIAI 157) amilaz ve proteolitik enzimlere duyarlı, LAB ve *L. monocytogenes*' e karşı aktif, pH 2-7 bakteri gelişimi ile birlikte üretildiği, 37 °C de MRS besiyerinde maksimum düzeyde üretildiği saptanmıştır. Ayrıca asidik (2-5 pH) koşullarda ısıleme (100 °C de 30 dk) dayanıklı olmasına karşın, nötr ortamlarda (6-7 pH) ısıleme (100 °C de 30 dk) duyarlı olduğu da belirlenmiştir (Ohmomo et al., 2000).

Peynirden izole edilen *Enterococcus faecium* RZS C5 susunun pH 6.5 ve 20-35 °C inkübasyon sıcaklığında maksimum düzeyde bakteriyosin ürettiği ve bu bakteriyosinin *Listeria*'ya karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Leroy and De Vuyst, 2002).

Leuconostoc mesenteroides E131 gelişimi için optimum sıcaklık (25-30 °C) ile maksimum bakteriyosin aktivitesinin görüldüğü sıcaklık (25 °C) birbirine yakındır. Bu suş için en iyi hücre gelişimi pH 6.5 iken maksimum bakteriyosin aktivitesi pH 5.5'tir (Drosinos et al., 2006).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* A164 tarafından üretilen nisin benzeri bakteriyosinin üretiminin karbon ve azot kaynaklarından fazlaca etkilendiği görülmüştür. A164 suşunun M17 besiyerinde diğer karbon kaynakları yerine laktoz kullanıldığında 4 kat daha fazla bakteriyosin ürettiği gözlenmiştir. % 3 düzeyinde maya ekstraktı ilavesi optimum azot kaynağı olarak bulunmuştur. Söz konusu bakterinin optimum gelişme sıcaklığı 37 °C iken maksimum düzeyde bakteriyosin üretimi için

gerekli sıcaklığın 30 °C olduğu gözlenmiştir. Gelişme için optimum pH aralığının 5.5-6.5 arasında değişirken bakteriyosin üretimi için optimum pH'nın 6.0 olduğu belirlenmiştir. Maksimum aktivite M17L broth (% 3 laktoz), 30 °C ve pH 6.0'da erken durgun gelişme fazında gözlemiştir (Chingh et al., 2002).

Lactococcus sp. GM005 inkübasyon koşulları 30 °C ve pH 6.0'da sabit tutularak geliştirildiğinde ürettiği bakteriyosinin aktivitesinin, kontrolsüz pH koşullarına göre 8 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Onda et al., 2003).

Pediococcus acidilactici NRRL B-5627'nin ürettiği pediosinin aktivitesini tripsin, papain, subtilisin ve pepsin ile 15 dakika muamele sonucunda kaybettiği görülmüştür. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 tarafından üretilen nisinin tripsin, subtilisin ve pepsin ile muamele edildiğinde aktivitesini kaybettiği, papain ile muamele edildiğinde ise aktivitesini % 50 oranında kaybettiği belirlenmiştir. Pediosin ve nisin asidik pH'lar ile kısa sürelerde en yüksek ısı stabilesi göstermişlerdir (Guerra et al., 2001).

Lc. lactis ssp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 ve *E. mundtii* USC-51 tarafından maksimum bakteriyosin üretiminin gelişimlerinin durgun fazında olduğu belirlenmiştir. Tüm bakteriyosinler proteinaz K ile inaktive olmuştur. Tüm bakteriyosinlerin 100 °C de 60 dakika veya 121 °C de 15 dakika ısıl işleme dayanıklı olduğu görülmüştür. *L. monocytogenes*'e karşı olan aktiviteleri suşa bağlı olarak pH 3.5-5.5 veya 3.5-6.5 aralığında devam etmiştir (Campos et al., 2008).

2.2.7. Saflaştırılması

Bakteriyosinlerin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler bakteriyosinlerin katyonik hidrofobik moleküller olmaları, üreten bakterinin ve diğer Gram pozitif bakterilere adsorbe olabilmeleri ve adsorpsiyonun pH'ya bağlı olması özelliklerine esas alınarak geliştirilmiştir. Saflaştırmanın ilk aşamasında temel amaç hacim azaltması ve istenmeyen bazı protein ve lipid gibi bileşikler uzaklaştırmak olduğundan tuzla çöktürme, asitle veya diğer organik çözücülerle pıhtılaştırma, diyaliz, ultrafiltrasyon, üretici bakteriye, silikik asit ve çeltik kabuğu külüne adsorpsiyon/desorpsiyon gibi yöntemlerden yararlanılır. İkinci aşamada, besiyerinden ve hücre metabolizmasından

kaynaklanan kontamine proteinlerden iyi derecede bir arındırma sağlamak olduğundan jel filtrasyonu, anyon veya katyon değiştirici kromatografisi, hidrofobik interaksiyon kromatografisi gibi kromatografik yöntemler kullanılmaktadır (Coventry et al., 1997; Leer et. al., 1995; Yang and Ray,1994; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Gıda örnekleri

Bu çalışmada, Çorum yöresinden temin edilen 8 tulum peyniri ve farklı bölgelerden getirilen 3 kefir, 1 pastörize ve 1 mandıra çiğ süt örneği LAB izolasyonu amacıyla kullanılmıştır. Test edilen peynirler Çorum daki aile işletmelerinden, kefir örnekleri ise üreticilerinden alınmıştır. Örnekler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünün Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı' na getirilerek 24-48 saat içinde analize alınmış, izolasyon işlemleri tamamlanana kadar +4 °C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Test bakterileri

LAB bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanılan test bakterileri Çizelge 3. 1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan test bakterileri.

| Strain adı | Strain no | Kaynak | |
|---|---------------|---|---|
| <i>Escherichia coli</i> O157 | ATCC 35150 | American Type Culture Collection, USA. | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 | | |
| <i>Escherichia coli</i> | LMG 8223 | Belgian Co-Ordinated Collections of Micro-Organisms. BCCM/LMG, Gent, BELGIUM. | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | LMG 13305 | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | LMG 8821 | | |
| <i>Bacillus subtilis</i> | NRRL 744 | ARS Culture Collection (Northern Regional Research Laboratory). Microbial Genomics & Bioprocessing Research, USA. | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | NRRL B-2354 | | |
| <i>Streptococcus lactis</i> | NRRL B-633 | | |
| <i>Lactobacillus buchneri</i> | NRRL B-1837 | | |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | NRRL B-548 | | |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> | NRRL B- 4562 | | |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | NRRL B- 4560 | | |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | NRRL B- 442 | | |
| <i>Lactobacillus casei</i> | NRRL B-1922 | | |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | NRRL 4562 | | |
| <i>Lactobacillus paramesenteroides</i> | NNRL B-3252 | | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Klinik izolat | | Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı |
| Vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i> (VRE) | Klinik izolat | | |
| Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) | Klinik izolat | | |
| <i>Salmonella</i> sp. | Klinik izolat | | |

3.1.3. Besiyerleri

3.1.3.1. MRS agar (CM 361 Oxoid)

| | |
|---------------------------------|---------|
| Pepton | 10,0 g |
| Lab-Lemco powder | 8,0 g |
| Yeast ekstrat | 4,0 g |
| Glukoz | 20,0 g |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| Di Potasyum hidrojen fosfat | 2,0 g |
| Sodyum asetat 3H ₂ O | 5,0 g |
| Tri amonyum sitrat | 2,0 g |
| Magnezyum sülfat | 0,2 g |
| Mangan sülfat | 0,05 g |
| Agar | 10 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra 15' er ml aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

3.1.3.2. Bevin kalp infusion agar (Acumedia)

| | |
|----------------------|---------|
| Brain heart infusion | 17,5 g |
| Enzimatik digest | 16,0 g |
| Dekstroz | 2,0 g |
| Sodyum klorit | 5,0 g |
| Di sodyum fosfat | 2,5 g |
| Agar | 13,5 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra 15' er ml aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

3.1.3.3. Oxford Listeria selective agar (1.07004 Merck)

| | |
|---------------------------|---------|
| Pepton | 23,0 g |
| Nişasta | 1,0 g |
| Sodyum klorit | 5,0 g |
| Agar agar (Columbia Agar) | 13,0 g |
| Aesculin | 1,0 g |
| Amonyum iron III Sitrat | 0,5 g |
| Lityum klorit | 15,0 g |
| Distile su | 1000 ml |

Zenginleştirici içeriği (1.00983 Merck) ;

| | |
|-----------------|--------|
| Siklohekzimit | 200 mg |
| Kolistin sülfat | 10 mg |
| Akriflavin | 2,5 mg |
| Kefotetan | 1 mg |
| Fosfomisin | 5 mg |

Besiyeri içeriği distile suda zldkten sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Zenginleştiricinin şişesine 2,5 ml steril distile su ve 2,5 ml etil alkol ilave edilmiş ve znmştir. Agar 45-50 °C' ye kadar soğutulup 500 ml agar için bir şişe zenginleştirici ilave edilmiş ve agara karışması sağlanmıştır. Zenginleştirici ilave edilen agar 15' er ml aseptik petrilere dklmştir.

3.1.3.4. Eosin methylene blue agar (EMB) (1.01342 Merck)

| | |
|-----------------------------|--------|
| Pepton | 10,0 g |
| Di potasyum hidrojen fosfat | 2,0 g |
| Laktoz | 5,0 g |
| Sukroz | 5,0 g |
| Sarımsı Eosin | 0,4 g |

| | |
|--------------|---------|
| Metilen mavi | 0,07 g |
| Agar Agar | 13,5 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra 15' er ml aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

3.1.3.5. MRS broth (1.10661 Merck)

| | |
|-----------------------------|---------|
| Pepton (from casein) | 10,0 g |
| Et ekstratı | 8,0 g |
| Yeast ekstrat | 4,0 g |
| G (+) glukoz | 20,0g |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| Di potasyum hidrojen fosfat | 2,0 g |
| Sodyum asetat | 5,0 g |
| Di amonyum hidrojen sitrat | 2,0g |
| Magnezyum sülfat | 0,2 g |
| Mangan sülfat | 0,04 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C ye kadar soğutulduktan sonra 15' er ml aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

3.1.3.6. Beyin kalp infusion (BHI) broth (1.10493 Merck)

| | |
|---------------------|---------|
| Beyin kalp infusion | 17,5 g |
| Enzimatik digest | 10,0 g |
| Dekstroz | 2,0 g |
| Sodyum klorit | 5,0 g |
| Di sodyum fosfat | 2,5 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C’ de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C’ ye kadar soğutulduktan sonra 15’ er ml aseptik koşullarda petrilere dklmştir.

3.1.3.7. Nutrient broth (1.05443 Merck)

| | |
|-------------|---------|
| Pepton | 5,0 g |
| Et ekstratı | 3,0 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C’ de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C’ ye kadar soğutulduktan sonra 15’ er ml aseptik koşullarda petrilere dklmştir.

3.1.3.8. Nutrient agar (1.05440 Merck)

| | |
|--------------|---------|
| Pepton | 5,0 g |
| Meat extract | 3,0 g |
| Agar-agar | 12,0 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C’ de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C’ ye kadar soğutulduktan sonra 15’ er ml aseptik koşullarda petrilere dklmştir.

3.1.3.9. M17 broth (1.15029 Merck)

| | |
|----------------|-------|
| Soya peptonu | 5g |
| Et pepton | 2,5 g |
| Kasein peptonu | 2,5 g |
| Yeast ekstrat | 2,5 g |
| Et Ekstratı | 5g |
| D (+) Laktoz | 5 g |

| | |
|--------------------|---------|
| Askorbik Asit | 0,5 g |
| N0-β-Gliserofosfat | 19 g |
| Magnezyum sülfat | 0,25 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra 15' er ml aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

3.1.3.10. M17 agar (1.15108 Merck)

| | |
|--------------------|---------|
| Soya peptonu | 5,0 g |
| Et pepton | 2,5 g |
| Kasein peptonu | 2,5 g |
| Yeast ekstrat | 2,5 g |
| Et Ekstratı | 5,0g |
| D (+) Laktoz | 5,0 g |
| Askorbik Asit | 0,5 g |
| N0-β-Gliserofosfat | 19,0 g |
| Magnezyum sülfat | 0,25 g |
| Agar | 12,75 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra 15' er ml aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

3.1.3.11. Sporulasyon ortamı

| | |
|-------------------|---------|
| MnSO ₄ | 0,04 g |
| CaCl ₂ | 0,1 g |
| Pepton | 5,0 g |
| Meat extract | 3,0 g |
| Agar-agar | 12,0 g |
| Distile su | 1000 ml |

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra 15' er ml aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

3.1.3.12. Gliserollü stok besiyeri

1 litre MRS broth içerisine 250 ml gliserol eklendikten sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir. Steril ependorf tüplerine, MRS brothta tazelenmiş kültürden 0,5 ml ve 1 ml gliserollü besiyeri konulmuştur. Hazırlanan stok kültürler -80 °C de saklanmıştır.

3.1.4. Kullanılan Boyalar

3.1.4.1. Lugol

| | |
|----------------------|--------|
| İyot | 5,0 g |
| Potasyum iyodür (KI) | 10,0 g |
| Distile su | 100 ml |

Potasyum iyodür 20-30 ml distile suda çözülmüş ve üzerine iyot eklenmiştir. Hazırlanan çözelti distile su ile 100 ml 'ye tamamlanmıştır (Tamer ve ark., 1989).

3.1.4.2. Safranin

| | |
|-------------------|--------|
| Safranin | 0,5 g |
| Etil alkol (% 95) | 10 ml |
| Distile su | 100 ml |

Safranin alkol içerisinde çözüldükten sonra distile su ilave edilmiştir (Temiz, 2000).

3.1.4.3. Kristal violet

| | |
|-------------------|-------|
| Kristal Violet | 2,0 g |
| Etil alkol (% 95) | 20 ml |
| Amonyum Oksalat | 0,2 g |
| Distile su | 20 ml |

Kristal violet 10 ml etil alkol içerisinde çözüldükten sonra üzerine 20 ml su içerisinde çözülmüş olan amonyum oksalat eklenmiştir. Karışım filtreden geçirilerek kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

3.1.4.4. Malaşit yeşili

| | |
|----------------|--------|
| Malaşit yeşili | 5,0 g |
| Distile su | 100 ml |

Malaşit yeşili 100 ml distile suda çözdürülmüştür (Temiz, 2000).

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

3.1.5.1. Fizyolojik tuzlu su (FTS)

| | |
|---------------|---------|
| Sodyum klorür | 8,5 g |
| Distile su | 1000 ml |

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

3.1.5.2. Sodyum fosfat tamponu

| | |
|---------------|--------|
| Sodyum fosfat | 0,7 g |
| Distile su | 100 ml |

Sodyum fosfat (NaH_2PO_4) distile su içerisine çözüldükten sonra pH 6' a ayarlanmıştır. Tampon çözelti +4 °C' de buzdolabı koşullarında saklanmıştır (Zhu ve ark., 2000).

3.1.5.3. Fosfat tamponu

| | |
|---|---------|
| KH_2PO_4 | 13.6 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 26.8 g |
| Distile su | 1000 ml |

KH_2PO_4 ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ayrı ayrı 1000 ml suda çözüldükten sonra uygun miktarlarda her iki çözeltiden alınarak pH ayarlanması yapılmıştır (Temiz, 2000).

3.1.5.4. 1 M NaCl çözeltisi

| | |
|------------|---------|
| NaCl | 58,44 g |
| Distile su | 1000 ml |

NaCl distile suda çözünerek kullanılmıştır (Temiz, 2000).

3.1.5.5. 1N H₂SO₄ çözeltisi

Sülfürik asit 1,67 ml

Saf su 100 ml

Saf sülfürik asit saf suya ilave edilerek 1N çözelti hazırlanmıştır.

3.1.5.6. Amonyum molibdat çözeltisi

Amonyum molibdat 0,12 g

Distile su 100 ml

Amonyum molibdat tartılıp 100 ml saf su içinde çözülerek çözelti hazırlanmıştır.

3.1.5.7. Potasyum iyodür çözeltisi

Potasyum iyodür 16,6 g

Distile su 100 ml

Potasyum iyodür (KI) saf su içerisinde çözülerek çözelti hazırlanmıştır.

3.1.5.8. 1M NaOH çözeltisi

NaOH 40,0 g

Distile su 960 ml

NaOH distile su içerisinde çözülerek çözelti hazırlanmıştır.

3.1.5.9. 1M Sitrik asit çözeltisi

C₆H₈O₇ 21 g

Saf su 1000 g

Saf C₆H₈O₇ saf suya ilave edilerek 1N çözelti hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

Çalışma aşamaları şöyle özetlenebilmektedir; bakteri izolasyonu, morfolojik olarak LAB olanların belirlenmesi, API Strep 20 ve API CHL 50 test kitleriyle tür tayini yapılması, LAB' lerinin antimikrobiyal etki spektrum disk difüzyon ve agar-sandviç yöntemleriyle belirlenmiştir. Proteolitik enzimlerin bakteriyosin benzeri madde aktivitesine üzerine etkisi, hidrojen peroksit (H₂O₂) üretme yetenekleri, LAB' nin bakteriyosin benzeri madde üretimlerine etki eden faktörler (inkübasyon sıcaklığının etkisi, pH değerinin etkisi, inkübasyon süresi) belirlenmiştir. Bakteriyosin benzeri maddeler üreten LAB kültürlerinin peroksidaz enzimiyle muamelesi ve bakteriyosin benzeri madde üreticisi olan LAB kültürlerinin, kendi kültürlerine karşı antagonistik etkisinin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Buna ek olarak, alkali-asit hidrolizi ile bakteriyosin benzeri madde ekstraksiyonu ve bakteriyosin benzeri maddeleri konsantre etme çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1. Süt ve süt ürünlerinin homojenizasyonu ve dilüsyon yapımı

Gıda örnekleri aseptik koşullarda 10 g tartılıp 90 ml FTS' ye aktarılmış Waring blenderda 1 dakika hızlı, 1 dk yavaş devirde karıştırılarak homojenize edilmiştir (1/10 luk dilüsyon). Bu homojenattan 1 ml alınarak 9 ml FTS içeren tüplere aktarılmış, bu şekilde 10⁻⁶ ya kadar desimal dilüsyonları hazırlanmıştır.

3.2.2. LAB nin izolasyonu

Gıda örneklerindeki LAB nin izolasyonunda MRS, M17 ve Nutrient agar (NA) kullanılmıştır. Bölüm 3.2.1.' de hazırlanan dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak MRS agar M17 agar ve NA içeren plaklara 2' şer paralelli olacak şekilde aktarılmış ve drigalski spatülü kullanılarak yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 °C' de aerobik ve anaerobik (% 0.5 CO₂) koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her plaktan LAB için tipik kolonilerin varlığı gözlenmiştir (beyaz renkli, oval, yuvarlak veya mekik şeklinde, 5 mm' den küçük koloniler). LAB için tipik koloniler bulunduran

ve 30-300 arasında koloni içeren petrilere ayrılmıştır. Ayrılan bu petrilere Bölüm 3.2.3.' de anlatılan, "Agar-sandviç yöntemi" (Mayr-Harting et. al., 1972) için kullanılmıştır.

3.2.3. Agar-sandviç yöntemi ile antimikrobiyal etkili LAB nin izolasyonu

Laktik asit test bakterileri için % 0,8 agarlı MRS, diğer test bakterileri için ise % 0,8 agarlı BHI besiyerleri eritilip 45-50 °C' lik su banyosunda bekletilerek sıvı olarak kalması sağlanmıştır. Bölüm 3.1.2.' de belirtilen test bakterilerinin 24 saatlik sıvı kültürlerinin optik yoğunluğu, spektrofotometrede 560 nm'de belirlenmiş ve gerekirse FTS ile seyreltilerek yoğunluğu 0,5' e ayarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanmış kültürlerin 10⁻² inci dilüsyonları kullanılmıştır. Bu yoğunluğu ayarlanmış test kültürlerinden, yarı katı esiyerlerine 0,5 ml eklenmiş ve karıştırılarak donmasına izin vermeden 3. 2. 2. 'de izole edilen ve 30-300 arasında koloni bulunan plakların yüzeyine ikinci kat olarak dökülmüştür. Besiyeri katılaştıktan sonra petrilere test bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarında 35 °C' de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, ikinci kattaki besiyerinde inhibisyon zonu oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

Üzerinde 3 mm ve daha büyük inhibisyon zonu bulunan LAB kolonileri (birinci kattaki) öze yardımıyla buldukları yerden çıkarılmış ve MRS sıvı besiyerine ekilmiş, 24 saat 30 °C' de inkübe edilmiştir. Saf koloniler elde etmek amacıyla, MRS sıvı kültürlerinden öze ile alınarak, MRS agar plaklarına çizgi ekimleri yapılmış ve 24 saat 30 °C' de inkübe edilmiştir.

MRS agarda gelişen tek bir koloni seçilerek, LAB izolatlarının saflığı ve Gram boyanma özellikleri (Bölüm 3.2.3.1) ve morfolojileri, Gram boyama ile kontrol edilmiştir. Saf, Gram pozitif ve sporsuz (spor boyama bölüm 3.2.3.2 ' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.) olduğu belirlenen izolatlara katalaz testi (Bölüm 3.2.3.2) uygulanmıştır. Ayrıca LAB izolatları sporulasyon ortamına ekilmiş inkübasyondan sonra, bir miktar büyüme alınarak spor boyamaları yapılmış ve spor oluşturmadıkları teyit edilmiştir.

Gram pozitif, sporsuz ve katalaz negatif izolatlar, muhtemel LAB olarak değerlendirilmiş ve MRS yatık agarlarına ekilerek stok kültürleri yapılmış ve diğer

testler için 4 °C' de saklanmıştır. Bölüm 3.1.3.12' de belirtildiği gibi gliserollü sıvı besiyerinde stoklanarak -80 °C' de saklanmıştır.

3.2.3.1. Gram boyama

LAB izolatlarının MRS agarda geliştirilmiş 18-24 saatlik genç kültürleri, Gram boyama işlemine tabi tutulmuştur. Kültürden, öze yardımıyla yaklaşık bir toplu iğne başı kadar alınarak, lam üzerine konulmuş bir damla distile su içerisinde yüzeye yayılmıştır. Lam havada kuruduktan sonra örneklerin üzerine metanol damlatılarak fikse edilmiştir. Metanol kuruduktan sonra preparat ilk önce kristal violet ile boyanarak 1 dakika beklenmiş ve bekletildikten sonra distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra iyot-lugol çözeltisi ile boyanarak 1 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkanmıştır. Metanolle (% 95) 10 saniye muamele edilmiş ve distile su ile yıkanmıştır. Son olarak preparatlar safraninle 30 saniye bekletilmiştir. Distile suyla yıkandıktan sonra mikroskopun 100' lük objektifinde incelenmiştir. Mavi-mor renkli koloniler Gram pozitif, kırmızı-pembe renkli koloniler ise Gram negatif olarak kabul edilmiştir (Temiz, 2000, Tamer ve ark., 1989).

3.2.3.2. Spor boyama

MRS agar ve sporulasyon ortamında geliştirilen izolatlardan preparat hazırlandıktan sonra kurutulmuş ve metanolle fiksasyon işlemi yapılmıştır. Lam üzerine malaşit yeşili (% 5) dökülmüş ve alttan ısıtılarak 5 dakika boyanmıştır. Distile suyla lamlar yıkandıktan sonra safraninle 30 saniye boyanmış ve distile suyla yıkanmıştır. Malaşit yeşili boyasını alanlar endospor pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000).

3.2.3.3. Katalaz testi

LAB izolatları sıvı besiyerinde geliştikten sonra katı besiyerine inoküle edilmiş ve aerobik veya anaerobik koşullarda 24 saat aktive edilmiştir. Bu aktif kültürler üzerine % 3 hidrojen peroksit damlatılarak gaz kabarcıkları çıkıp çıkmadığı

gözlenmiştir. Gaz kabarcığı görülen kültürler için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen kültürler için ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

3.2.4. LAB izolatlarının API test kitleriyle tanımlanması

Bakteriyosin benzeri madde oluşturan LAB izolatlarının tür tayinleri API test sistemi ile yapılmıştır. LAB izolatlarının çeşitli karbonhidrat kaynaklarını kullanım kabiliyetlerini belirlemek amacıyla API Strep 20 ve API CHL 50 (bioMerieux, France) test kitleri kullanılmıştır.

API CHL 50 kitlerinde tanımlaması yapılacak olan LAB, MRS agarda 24 saat süreyle tek koloni düşecek şekilde aktive edilmiştir. Katı besi ortamında geliştirilmiş olan kültürler öze yardımıyla 2 ml' lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır. 2 ml' lik API süspansiyon ortamında maksimum yoğunluk elde edildikten sonra, 5 ml' lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda bioMerieux McFarland 2 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra 2 ml' lik API süspansiyon ortamından bioMerieux Mc Farland 2 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarının iki katı alınmıştır ve 10 ml API CHL 50 ortamına aktarılarak ortama homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyon kitlerde ki kuyucuklara karatılmıştır. Kuyucukların doldurulması işlemi gerçekleştirildikten sonra, yüzeyleri mineral yağ ile kaplanmış ve kapakları kapatılan kitler optimum gelişme sıcaklıklarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinde 24 ve 48. saatler sonunda kuyucuklarda meydana gelen renk değişimleri göz önünde bulundurularak sonuçlar değerlendirilmiştir. API CHL 50 testinde bulunanlar şöyledir: gliserol, eritritol, D-arabinoz, L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, adonitol, inositol, galaktoz, glukoz, fruktoz, mannoz, sorboz, rhamnoz, dulsitol, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, melibioz, sukroz, trehaloz, inulin, melezitose, rafinoz, nişasta, glikojen, ksilitol, gentiobiose, D-turanoz, D-lyxose, D-tagatoz, eskulin, α -metil-D-mannosid α -metil-glukozid, N-asetil-glukozamin, amigidalin, arbutin, D-arabitol, L-arabitol, glukonat, 2-keto-glukonat, 5-keto glukonat, mannitol, sorbitol, D-fukoz, L-fukoz, b-metil-D-ksilosid.

API strep 20 kitinde tanımlanması yapılacak olan izolatlar üredikleri agar ortamında 24 saat süreyle tek koloni düşecek şekilde aktiveleştirilmiştir. Katı besi ortamında geliştirmiş olan kültürler öze yardımıyla 2 ml' lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır. 2 ml' lik API süspansiyon ortamında maksimum yoğunluk elde edildikten sonra ortam sıvısında 5 ml' lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda bioMerieux Mc Farland 2 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra 2 ml' lik API süspansiyon ortamından bioMerieux Mc Farland 4 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarının iki katı alınmıştır ve 10 ml API 20 Strep ortamına aktararak ortama homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyon kitler deki kuyucuklara aktarılmıştır. Kuyucukların doldurulması işlemi gerçekleştirildikten sonra, yüzeyleri mineral yağ ile kaplanmış ve kapakları kapatılan kitler optimum gelişme sıcaklıklarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinde üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerekli reaktifler damlatıldıktan sonra oluşan renk değişimlerine göre değerlendirilmiştir. Tanımlanma çalışmasında izolat kuyucuklarda bulunan karbon kaynağını tanımlanmaya çalışan izolat kullandığında mevcut indikatör nedeniyle renk değişimi meydana gelmektedir. Başlangıçta koyu mavi renkte olan kuyucuklar rengi sarıya dönenler pozitif, değişim gözlenmeyenler negatif olarak değerlendirilmiştir. API 20 Step testinde bulunanlar şöyledir: sodyum prüvat, hippürik asit, esculin, piroglutamikasitbetanastilamid, α -gaktosidaz, alkalın fosfataz, lösın amino peptidaz, ajinin dihidrolaz, D-riboz, Larabinoz, D-mannitol, D-sorbitol, D-laktoz, L-arabinoz, D-mannitol, D-sorbitol, D-laktoz, D-trehaloz, inülin, D-rafinoz, nişasta, glikojen.

API CHL 50 ve API 20 Strep test kitlerinden elde edilen pozitif ve negatif olarak değerlendirilen sonuçlar, üretici firma tarafından sağlanan veri tabanına girilerek, tür tayinleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Bakteriyosin benzeri madde üreten LAB' nin antimikrobiyal spektrumunun belirlenmesi

Tür tayinleri yapılmış LAB nin ve antimikrobiyal aktiviteleri, disk difüzyonu ve agar-sandviç yöntemiyle belirlenmiştir.

3.2.5.1. Disk difüzyon yöntemi

MRS sıvı besiyerinde, optimum gelişme koşullarında aktifleştirilmiş olan LAB izolatları, 1:9 oranında MRS, M17 ve Nutrient Broth (NB) sıvı besiyerlerine inoküle edilip, optimum sıcaklıkta (30- 35 °C) 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon işleminden sonra bakteri kültürü 5500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı toplanmıştır. Supernatantların pH değerleri 3,42 – 6,11 arasında değiştiği belirlenmiştir. Santrifüj sonrası supernatantların pH 5.5-6.0 arasına (1 M sitrik asit ve 1 M NaOH) ayarlanmıştır. Toplanan supernatant, 0,45 µm gözenek çaplı membran filtre ile (Millipore) sterilize edilmiştir (Toksoy ve ark., 1999). Sonrasında supernatant üçe ayrılıp kontrol grubu yani hiçbir işlem görmemiş (N), 60 °C de 20 dakika (60) ve 121 °C' de 15 (O) dakika ısı işleme maruz bırakılmıştır. 3 farklı şekilde hazırlanan supernatantlar 5 mm çaplı disklerle (Whatman No 42) emdirilmiştir (0,01 ml).

Test bakterilerinin yoğunlukları Mc Farland 0,5 yoğunluğuna ayarlanmış, bunlardan FTS ile 10^{-2} lik dilüsyonlar (yaklaşık 10^6 hücre/ml) hazırlanmıştır. Test bakterisi kültürlerinden 0,1' er ml alınarak, yayma yöntemiyle MRS (LAB bakterileri için) veya BHI (diğer test bakterileri için) agarlara ekim yapılmıştır. Supernatant emdirilen diskler, test bakterisi ekili MRS ve BHI agarlar plaklarına yerleştirildikten sonra 4 °C' de 1 saat inkübe edilmiştir. Agar plakları, test bakterilerinin optimum gelişme sıcaklıklarında 35 °C' de, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, disklerin etrafında inhibisyon zonu olup olmadığı gözlenmiştir. İnhibisyon zonlarının çapları (mm) ölçülmüştür.

Denemeler iki tekrarlı yapılmış, sonuçlar inhibisyon zonlarının ortalamaları alınarak verilmiştir.

3.2.5.2. Agar-sandviç yöntemi

Bakteriyosin benzeri madde üretiminin belirlenmesinde 2. yöntem olarak agar-sandviç yöntemi kullanılmıştır.

MRS agarda, optimum gelişme koşullarında aktiveleştirilmiş olan LAB izolatlarından, steril kürdan yardımıyla MRS agara nokta ekim yapılmıştır. LAB nin gelişimi için, 30 °C' de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Test bakterileri (Bölüm 3.2.4.1' deki gibi hazırlanan), 4.5 ml yumuşak agarlı (% 0,8 agar içeren) MRS (laktik asit bakteriler) veya BHI (diğer bakteriler) içeren tüplere 0.5 ml konmuş ve iyice karıştırıldıktan sonra, 24 saat inkübasyon sonrası gelişen LAB nin bulunduğu petrilerin yüzeyine yavaşça dökülmüştür. Bu petriler 35 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda oluşan 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları ölçülmüştür. Denemeler iki tekrarlı yapılmış, sonuçlar inhibisyon zonlarının ortalamaları alınarak verilmiştir.

3.2.6. Proteolitik enzimlerin bakteriyosin benzeri madde aktivitesine üzerine etkisi

Bakteriyosinler protein yapısında maddelerdir. LAB izolatlarımızın test bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite protein yapısında bir maddeden kaynaklanıyorsa, bu durumda proteolitik enzimlerle inaktive olmalıdır. Bu hipotezden yola çıkılarak bu aşamada, LAB izolatları proteolitik enzimlerle muamele edilerek, test bakterilerine karşı tekrar denenmiştir.

Enzimlerin bakteriyosin-benzeri madde aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek için pepsin (Merck), tripsin (Merck) enzimleri kullanılmıştır.

Enzimler 4 mM (pH 7) fosfat tamponu ile konsantrasyonu 400 µg/ml olacak şekilde çözündürülmüş ve filtreden (0,45 µm por çaplı) geçirilerek steril edilmiştir (Bhunja et al., 1988). Enzimler, MRS agara nokta ekim yapılarak geliştirilen LAB kolonilerinin üzerine pipet yardımıyla damlatılmıştır. Kontrol grubu olarak, enzimlerle muamele edilmemiş olan koloniler kullanılmıştır. Koloniler enzimlerle 37 °C' de 1 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında test mikroorganizması içeren yumuşak agarlı MRS (laktik asit bakteriler için) veya BHI (diğer bakteriler için)

kültürleri, enzimle muamele edilen kolonilerin yüzeyini kaplayacak şekilde dikkatlice dökülmüştür. Petriler 35 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Omer, et al., 2006).

Diğer bir kontrol grubunda pepsin ve tripsin enzimleriyle muamele edilen LAB izolatlarından öze ile örnek alınmış ve bunlar yeni bir MRS agara ekilerek 30 °C’ de 24-48 saat inkübe edilmiş, tipik koloni gelişimi gözlenmiştir. LAB hücrelerinin enzim uygulamasından etkilenişleri bu kontrol grubuyla kontrol edilmiştir.

Denemeler iki tekrarlı yapılmış, sonuçlar inhibisyon zonlarının ortalamaları alınarak verilmiştir.

3. 2. 7. LAB nin hidrojen peroksit (H₂O₂) üretme yetenekleri

Suşlar 5 ml’ lik MRS broth ortamında 48 saat süre inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin üzerine 5 ml saf su eklenmiş ve kültürler 5000 rpm’ de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üstte oluşan berrak sıvı 0,45 µm por çaplı selüloz nitrat filtreden geçirilerek süzölmüştür. Elde edilen filtratın 4 ml’si ayrılarak üzerine sırayla 0,5 ml sitrik asit, 0,5 ml amonyum molibdat, 0,5 ml potasyum iyodür çözeltileri eklenmiştir. Örnekler iyice karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 350 nm dalga boyunda okunarak optik yoğunlukları belirlenmiştir. Elde edilen optik yoğunluk değerleri; Microsoft Office’ in Excel programında önceden hazırlanmış standart eğriye göre, µl/ml cinsinden hesaplanmıştır.

Hidrojen peroksit testinde kullanılan standart eğri için; %30 ’luk saf H₂O₂ ile 0,01 µl/ml hacimde stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden 1/10 oranında seyreltmeler yapılmış ve farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Suşlar için uygulanan santrifüj sonrası işlemler bu çözeltilere de uygulanarak eğri oluşturulmuştur.

3. 2. 8. LAB' nin bakteriyosin benzeri madde üretimlerine etki eden faktörler

3.2.8.1. İnkübasyon sıcaklığının etkisi

Bakteriyosin-benzeri madde üretiminde sıcaklık etkisini belirlemek için, LAB izolatları MRS agar plakları üzerine nokta şeklinde ekilmiş ve 25, 30, 35 ve 42 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, test mikroorganizmalarını içeren % 0,8 agar içeren MRS (LAB'leri için) veya BHI (diğer bakteriler) kültürleri, MRS plakları üzerine dökülmüştür. Bu plaklar 35 °C' de aerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, inhibisyon zonu varlığı gözlemlendiğinde, bu zonların çapı ölçülmüştür (Marshall, 1992).

3.2.8.2. pH değerinin etkisi

MRS agarın pH'ı 1 M NaOH veya 10 mM fosforik asit kullanılarak 3,5, 4,5, 5,5 ve 6,5 ayarlanmıştır. LAB nokta ekim yöntemiyle, farklı pH'larda MRS içeren plakların yüzeyine ekilmiştir (Hugas, 1998). İnkübasyon sonrasında test mikroorganizmaları içeren % 0,8 agarlı MRS (laktik asit bakteriler) veya BHI (diğer bakteriler) kültürleri, MRS plaklarının üzerine dökülmüştür. Bu petripler 35 °C' de aerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan zonların çapı ölçülmüştür.

3.2.8.3. İnkübasyon süresi

Bakteriyosin-benzeri madde üretimi için optimum sürenin belirlenmesi amacıyla LAB izolatları MRS broth a (pH 6,5) ekilmiştir. İnkübasyonun (30 °C de) 0, 6, 12, 24 ve 48 saatlerinde örnek alınmıştır (Marillingappa and Kadirvelu, 2004). Alınan örnekler MRS agar plaklarının üzerine 15 µl damlatılmıştır. Damlaların agar plaklarına tamamen diffüze olması için beklenmiştir. Yoğunluğu Mc Farland 0,5' e ayarlanan test bakteri kültürlerinin 10^{-2} lik dilüsyonlarından, % 0,8 agar içeren BHI ve MRS agarlara ekilmiştir. Test bakterilerini içeren yarı katı BHI ve MRS kültürleri, MRS plakları üzerine dökülmüştür. Bu petripler 35 °C' de aerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan zonların çapı ölçülmüştür.

3.2.9. Alkali-Asit hidrolizi

Bakteriyosinlerin, üretici hücreye adsorbe oldukları çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir.

Literatürde, bakteriyosinleri hücre duvarından ayırmak için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bizim çalışmamız için en uygun yöntem seçilerek, aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir. Bakteriyosinlerin hücre duvarına tutunmaları ortam pH' ı ile oldukça ilişkilidir, yüksek pH değerlerinde tutunmanın daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bunun için ortamın; pH değeri yükseltilecek kültür ortamına salınmış olabilecek bakteriyosini bağlama, daha sonra pH 2-2,5' e düşürerek hücreden serbestleştirme şeklinde iki aşamadan oluşan yöntem seçilmiştir (Skaugen et al., 1997).

24 saatlik genç LAB kültürlerinden, 300 ml MRS brotha % 0,1 oranında ekilmiştir. 30 °C' de 18-24 saat inkübe edilen kültür 8500 rpm'de 20 dk santrifüjü yapılmıştır. Supernatant kısmı ve pellet kısmı ayrıldıktan sonra pelet kısmı pH 6,5 sodyum fosfat tamponundan 1:5 hacimde eklenip santrifüj edilerek yıkanmıştır. Kalan pellet, pH' ı fosforik asitle (%5 lik) 2' ye ayarlanmış olan 1 M NaCl (20 ml) ile yeniden süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 4 °C' de 1-1,5 saat çalkalanmıştır.

Hücre süspansiyonu tekrar santrifüjlenmiş, hücreler toplanıp steril deionize suyla (dH₂O) yıkanmış ve tekrar süspansiyon edilmiş orijinal kültür hacminin 10 katı kadar dH₂O eklenmiştir. Elde edilen süspansiyon sıvı steril disklerle emdirilerek, üzerinde Mc Farland 0.5 yoğunluğundan 10⁻¹ e dilüe edilmiş test bakterileri ekilmiş BHI (LAB bakterileri dışındaki test bakterileri için) ve MRS (LAB bakterileri için) plaklarına yerleştirilmiştir. Disk yerleştirilen agar plakları 35 °C' de 24 saat inkübe edildikten sonra zon oluşumu gözlenenler kaydedilmiştir.

3.2.10. Bakteriyosin benzeri maddeyi konsantre etme çalışmaları

Disk diffüzyon yöntemiyle (Bölüm 3.2.5.1.' de) antimikrobiyal etkisi belirlenen izolatlardan en iyi etki gözlenenler seçildikten sonra bakteriyosin benzeri madde sentezlediği belirlenen 24 saatlik taze kültürler sıvı besiyerlerine (300 ml besiyerine, % 0,10 kültür) inoküle edilmiş (30- 35 °C) 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon işleminden sonra bakteri kültürü 5500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı toplanmıştır. Supernatantların pH' ı 5,5-6,0 arasına (1 mM $C_6H_8O_7$ ve 1 M NaOH) ayarlanmıştır. Toplanan supernatant, 0,45 μ m gözenek çaplı membran filtre (Millipore) ile sterilize edilmiştir. Supernatantlar 1,5 ml' lik konsantratör tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 1725 rpm değerinde çevirim yapan, 5 ml' lik tüpteki 1 ml örnek için kurutma süresi 0,44 ml/min olan Konsanratöre (Labconco, Centri Vap Benchtop) yerleştirilmiştir. Tüplerdeki supernatantların suyu konsantratörde 3 gün boyunca tutularak uzaklaştırılması ve konsantre olması sağlanmıştır. Konsantre edilen örneklerin 1ml steril saf su eklendikten sonra pH' ı 6' ya (1M NaOH) ayarlanmıştır. Elde edilen çözelti 5 mm çaplı disklerle (Whatman No 42) emdirilmiştir (0.01 ml).

Test bakterilerinin yoğunlukları Mc Farland 0,5 yoğunluğuna ayarlanmış, bunlardan FTS ile 10^{-2} ' lik dilüsyonlar (yaklaşık 10^6 hücre/ml) hazırlanmıştır. Test bakterisi kültürlerinden 0,1' er ml alınarak, yayma yöntemiyle MRS (LAB bakterileri için) veya BHI (diğer test bakterileri için) agarlara ekim yapılmıştır. Çözelti emdirilen diskler, test bakterisi ekili MRS ve BHI agarlar plaklarına yerleştirildikten sonra 4 °C' de 1 saat inkübe edilmiştir. Agar plakları, test bakterilerinin optimum gelişme sıcaklıklarında 35 °C' de, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, disklerin etrafında inhibisyon zonu olup olmadığı gözlenmiştir. İnhibisyon zonlarının çapları (mm) ölçülmüştür.

Bir başka bakteriyosin benzeri madde konsantrasyon çalışmasında, disk diffüzyon yöntemiyle (Bölüm 3.2.5.1.' de) antimikrobiyal etkisi belirlenen 1 nolu izolatin 24 saatlik taze kültürüyle çalışılmıştır. 1 nolu izolat bakteriyosin/ bakteriyosin benzeri madde belirlenmesinde önceden etkili olduğu gözlenen sıvı besiyerlerine (300 ml NB besiyerine, 1:9 oranında) inoküle edildikten sonra 35 °C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra bakteri kültürü 5500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı toplanmıştır. Santrifüj sonrası supernatantların pH 5,5-6,0 arasına (0.1 mM $C_6H_8O_7$ ve 1 M NaOH) ayarlanmıştır. Toplanan supernatant, 0,45 μ m gözenek çaplı membran filtre ile (Millipore) sterilize edilmiştir. Supernatant buz uçurma sıcaklığı -60 °C olan Liyofilizatörde (Christ, Alpha 1-4) 48 saat kurutulmuştur. Konsantre edilen örneklere 1 ml steril steril su eklendikten sonra pH' ı 6' ya (1M NaCl) ayarlanmıştır (Moreno, et al., 2000). Elde edilen çözelti 5 mm çaplı

disklere (Whatman No 42) emdirilmiştir (0,01 ml). Diğer konsantre etme yönteminde olduğu gibi, test bakterileri bulunan agar plaklarına çözelti emdirilmiş diskler yerleştirildikten sonra 35 °C’ de, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, disklerin etrafında inhibisyon zonu olup olmadığı gözlenmiştir. İnhibisyon zonlarının çapları (mm) ölçülmüştür.

3.2.11.Bakteriyosin benzeri madde üreten LAB kültürlerinin peroksidaz enzimiyle muamelesi

Bu çalışmada, antimikrobiyal etkileri belirlenen LAB izolatlarının peroksidaz enzimiyle muamelesi sonucu etkilerinin devam edip etmediği belirlenmiştir. LAB izolatları MRS brotha ekilerek 30 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası MRS agar plaklarına damla (10 µl) ekim yapılmış, 30 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. Peroxidase horseradish RZ3.0 kullanılarak, peroksidaz enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti için Peroxidase horseradish RZ3.0’dan 0.003 g/ml tartım yapılmış 1000 µl steril saf suda çözülmüş ve filitreden geçirilerek steril edilmiştir. Steril enzim çözeltisinden 10 µl alınarak 990 µl steril saf suda daha sonra 100 µl alınarak 900 µl saf suda dilüe edilmiştir. 24 saatlik LAB kültürlerinin kontrol grubu hiçbir işlem görmezken, diğer gruplara dilüe edilmiş enzim çözeltisi (10 µl) damlatılmış ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Yoğunluğu Mc Farland 0.5’ e ayarlanan test bakteri kültürlerinin 10⁻² lik dilüsyonlarından, % 0.8 agar içeren BHI ve MRS agarlara ekilmiştir. Test bakterilerini içeren yarı katı BHI ve MRS kültürleri, peroksidaz enzimi ile muamele edilmiş ve edilmemiş LAB kültürlerini içeren MRS plakları üzerine dökülmüştür. Bu petriyer 35 °C’ de aerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan zonların çapı ölçülmüştür.

3.2.12.Bakteriyosin benzeri madde üreticisi olan LAB kültürlerinin kendi kültürlerine karşı antagonistik etkisinin belirlenmesi

24 saatlik taze LAB izolatları MRS plaklara nokta (10 µl) ekim yapılmıştır. Kontrol grubu hiçbir işlem görmemiş, diğer bir gruba peroksidaz çözeltisi (Bölüm 3.2.10) damlatılmıştır (10 µl).

Yoğunluğu 10^8 CFU/ml'e ayarlanan LAB kültürleri 10^{-2} lik dilüsyonlarından, % 0,8 agar içeren MRS agarlara ekilmiştir. LAB kültürleri kendi kültürlerinin nokta ekim yapılan agar plakları üzerine dökülmüştür. Bu petripler 35 °C' de aerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan inhibasyon zonların çapı ölçülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. LAB nin izolasyonu ve tanımlanması

Çorum yöresinden gelen 8 tulum peyniri, 3 kefir, 1 pastörize ve 1 mandıra çiğ süt örneği bakteriyosin üreten bakterilerin izolasyonu amacıyla incelenmiştir. Bu tarama sonucunda, peynir ve kefir örneklerinden antimikrobiyal aktiviteye sahip izolatlar elde edilmiştir. En az bir test bakterisine karşı antimikrobiyal etki gösteren (inhibisyon zonu oluşturan) 34 izolat, MRS broth besiyerine aktarılarak saf kültürleri hazırlanmıştır. Pastörize süt ve mandıra sütünden elde edilen izolatların hiçbiri antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Saf kültürleri hazırlanan izolatlar ilk olarak genel mikrobiyolojik analizlere alınmıştır. Analizler sonucunda izole edilen bakterilerin, Gram pozitif, tek, ikili ve kısa zincirler halinde kok, basil ve kokobasil şeklinde ve sporsuz olduğu gözlenmiştir. Bakterilerin katalaz negatif olduğu ve endospor oluşturma özelliğine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Bu özellikleri tespit edilen muhtemel LAB leri API strep 20 ve API 50 CHL testleriyle tür bazında tanımlamaları yapılmıştır. LAB leri API strep 20 ve API 50 CHL testlerinin sonuçları üretici firmanın belirttiği inkübasyon süreleri sonunda oluşan renk değişimleri gözlenerek yapılmıştır. Renk değişimleri üretici firmanın veri tabanına girilerek tür tanımlamaları yapılmıştır. Bu veri tabanına göre izole edilen LAB nin dahil oldukları belirlenebilen türler Çizelge 4.1’de verilmiştir. API test sisteminde yapılan tanımlamaya göre bakteriyosin benzeri madde üreten LAB izolatlarından;

| | |
|----------|--|
| 9 izolat | <i>Lb. plantarum</i> , |
| 5 izolat | <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , |
| 5 izolat | <i>Lb. brevis</i> , |
| 2 izolat | <i>E. faecium</i> , |
| 3 izolat | <i>E. durans</i> , |
| 2 izolat | <i>Lb. pentosus</i> , |
| 1 izolat | <i>S. thermophilus</i> , |
| 1 izolat | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , |
| 1 izolat | <i>Lb. rhamnosus</i> |

olarak tanımlanmış, 5 izolat API test kitleriyle tanımlanamamıştır.

Çizelge 4. 1. İzole edilen LAB nin, API Strep 20 ve API CHL 50 test kiti tanımlamaları.

| İzolat No | İzole Edildikleri Kaynaklar | Hücre Morfolojisi | Gram Boyama | Katalaz | Spor Oluşumu | API (tür tayini sonucu) |
|-----------|-----------------------------|-------------------|-------------|---------|--------------|--|
| 1 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 2 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 3 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus pentosus</i> |
| 4 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> |
| 5 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| 6 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus pentosus</i> |
| 7 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> |
| 8 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 9 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> |
| 10 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| 11 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| 12 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| 13 | Peynir | Kok | + | - | - | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| 14 | Peynir | Kok | + | - | - | <i>Enterococcus faecium</i> |
| 15 | Peynir | Kok | + | - | - | <i>Enterococcus faecium</i> |
| 16 | Peynir | Kok | + | - | - | <i>Enterococcus durans</i> |
| 17 | Peynir | Kok | + | - | - | Tanımsız |
| 18 | Peynir | Basil | + | - | - | Tanımsız |
| 19 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 20 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| 21 | Peynir | Kok | + | - | - | <i>Enterococcus durans</i> |
| 22 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 23 | Peynir | Kok | + | - | - | <i>Enterococcus durans</i> |
| 24 | Kefir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> |
| 25 | Kefir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> |
| 26 | Kefir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 27 | Kefir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus plantarum</i> |

Çizelge 4. 1. İzole edilen LAB nin, API Strep 20 ve API CHL 50 test kiti tanımlamaları (devamı).

| İzolat No | İzole Edildikleri Kaynaklar | Hücre Morfolojisi | Gram Boyama | Katalaz | Spor Oluşumu | API (tür tayini sonucu) |
|-----------|-----------------------------|-------------------|-------------|---------|--------------|--------------------------------------|
| 28 | Kefir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 29 | Peynir | Basil | + | - | - | Tanımsız |
| 30 | Peynir | Kok | + | - | - | <i>Lactococcus lactis ssp.lactis</i> |
| 31 | Peynir | Basil | + | - | - | Tanımsız |
| 32 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 33 | Peynir | Basil | + | - | - | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> |
| 34 | Peynir | Basil | + | - | - | Tanımsız |

4.2. Bakteriyosin benzeri madde üreten LAB nin belirlenmesi

LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerini test etmede, en uygun test yöntemini belirlemek için iki yöntem kullanılmış (disk difüzyon ve agar-sandviç yöntemi), bu yöntemlerden elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği karşılaştırılmıştır.

4.2.1. Disk difüzyon yöntemi

Antimikrobiyal aktivite testi için, disk difüzyon ve agar-sandviç yöntemleri olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Çeşitli patojen ve LAB ile yapılan antimikrobiyal aktivite denemelerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 ve 4.3' de verilmiştir. Sonuçlar en az 3 tekrarlı çalışmaların ortalaması olarak, mm cinsinden verilmiştir.

Yapılan tarama çalışmalarında, agardan agara nokta ekimi şeklinde yapılan sandviç yönteminin ve sıvı besiyerinde yapılan disk difüzyon yönteminin kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Disk difüzyon yönteminde yapılan tarama çalışmasında 34 izolattan 27' sinin en az bir test bakterisine karşı antimikrobiyal etki

gösterdiği gözlenmiştir. 6 mm çaplı disklerle yapılan bu çalışmalarda en fazla 9,7 mm ve en az 7 mm zon oluşumu gözlenmiştir. Isıl işlem uygulanan supernatantların, özellikle 121 °C' deki 15 dakikalık ısıl işleminin antimikrobiyal etkisinin arttırdığı gözlenmiştir. Benzer bulgular yöresel tereyağı ve turşudan izole edilen LAB nin bakteriyosin üretimlerinin değerlendirildiği bir çalışmada da rapor edilmiş (Jamuna and Jeevaratnam, 2004), bu durumun LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin ısıya dayanıklı olduğu ve yüksek ısı uygulamalarından sonraki rejenerasyon sürecinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İzolatların % 25' inin antimikrobiyal etkisi otoklavlanma işleminden etkilenmezken, % 72,6 bu işlemde etkilenmiştir. Bazı izolatlardan (% 52,2) elde edilen supernatantların aktivitesinin otoklavlanma işleminden sonra arttığı belirlenmiştir. Ancak 60 °C' de 20 dakika yapılan ısıl işlem uygulaması supernatantların % 97,7' sinde aktivite kaybına neden olmuştur. Bunun nedeni ısıl işlem uygulama süresinin uzamasının bakteriyosin aktivitesinde azalmaya neden olduğu şeklinde açıklanmıştır (Ogunbanwo, et al., 2003).

Bu yöntem, antimikrobiyal etki spektrumu en geniş LAB türü *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* olarak belirlenmiştir. En duyarlı test şuşları ise *Lactobacillus paracasei*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* olarak belirlenmiştir.

Etkili olduğu test bakterisi sayısının çokluğu ve meydana getirdikleri inhibisyon zonlarının büyüklüğü açısından ele alındığında, MRS sıvı besiyerinin LAB izolatlarının antimikrobiyal madde üretimini arttırdığı düşünülmektedir. Tüm izolatlarla yapılan disk difüzyon çalışmasında, en az bir test bakterisine karşı antimikrobiyal etki gösteren LAB izolatlarına ait sonuçlar Çizelge 4.2 ve 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. LAB izolatlarının çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemiyle belirlenmesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

| İzolat No/ Sıvı Besiyeri | <i>Escherichia coli</i> O157 | | | <i>Escherichia coli</i> | | | <i>Bacillus cereus</i> | | | <i>Salmonella</i> sp. | | | <i>Listeria monocytogenes</i> | | | <i>Enterococcus faecium</i> | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Bacillus subtilis</i> | | |
|--------------------------|------------------------------|-----|----|-------------------------|---|----|------------------------|---|----|-----------------------|-----|----|-------------------------------|---|----|-----------------------------|-----|----|------------------------------|---|----|--------------------------|---|----|
| | N | O | 60 | N | O | 60 | N | O | 60 | N | O | 60 | N | O | 60 | N | O | 60 | N | O | 60 | N | O | 60 |
| 1 (NB) | 8 | 8 | - | 8 | 7 | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 (NB) | 8 | 8 | 7 | 9 | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 (NB) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 | - |
| 4 (MRS) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | 9 | 8 | - | - | - | - |
| 5 (MRS) | - | - | - | - | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 (M17) | 7 | 7 | 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7.6 | - | - | - | - | - |
| 5 (NB) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | 8.7 | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 (MRS) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | 8.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 (M17) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 9 | 9.7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 (NB) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 (MRS) | 7.3 | 7.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7.6 | - | - | - | - | - |
| 7 (M17) | - | 7.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 (M17) | - | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 (NB) | - | 7.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

(N: kontrol grubu, O: 121 °C' de 15 dakika ısıtıl işlem uygulanan grup, 60: 60 °C' de 15 dakika ısıtıl işlem uygulanan grup)

Çizelge 4.2. LAB izolatlarının çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemiyle belirlenmesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir) (devamı).

| | <i>Escherichia coli</i> O157 | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Salmonella</i> sp. | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
|--------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| İzolat No/ Sıvı Besiyeri | N O 60 | N O 60 | N O 60 | N O 60 | N O 60 | N O 60 | N O 60 | N O 60 |
| 9 (M17) | - 7.8 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 10 (MRS) | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - 7.3 - | - - - |
| 11 (MRS) | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - 7.5 - | - - - | - - - |
| 12 (NB) | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - 7.1 - | - - - | - - - |
| 13 (NB) | - 7.2 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 17 (M17) | - - - | - 7.6 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 20 (M17) | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - 7.3 - |
| 21 (MRS) | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - 7.6 - |
| 22 (MRS) | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - 7.7 - |
| 23 (MRS) | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - 7.5 - |
| 24 (MRS) | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - 7.5 - |
| 25 (MRS) | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - 7 - |

(N: kontrol grubu, O: 121 °C' de 15 dakika ısıtma işlemi uygulanan grup, 60: 60 °C' de 15 dakika ısıtma işlemi uygulanan grup)

Çizelge 4.3. LAB izolatların çeşitli standart LAB suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin disk difüzyonu yöntemiyle belirlenmesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

| | <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Lactobacillus paracasei</i> | <i>Lactobacillus casei</i> | <i>Lactobacillus paramesenteroides</i> | <i>Streptococcus lactis</i> | <i>Lactobacillus buchmeri</i> | <i>Lactobacillus curvatus</i> | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> |
|-----------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| İzolat No | N 0 60 | N 0 60 | N 0 60 | N 0 60 | N 0 60 | N 0 60 | N 0 60 | N 0 60 | N 0 60 |
| 3 (NB) | - - - | - - - | 8.6 8- | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 5 (M17) | - - - | - - - | - - - | 9 9 8.6 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 5 (NB) | - - - | - - - | - 7 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 6 (M17) | - - - | - - - | 8.6 9 8 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 6 (NB) | - - - | 8.5 8 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 7 (MRS) | - - - | - - - | 8 7 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 7 (M17) | - - - | - - - | 7 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 7 (NB) | - - - | - - - | 8 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 8 (NB) | - - - | - - - | 7 7 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 10 (MRS) | - - - | - - - | - - - | 8 8 7 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 13 (NB) | - - - | - - - | - - - | 8 8 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 14 (NB) | - - - | - - - | - - - | 8 7 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 15 (MRS) | - - - | 7 7 7 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 17 (M17) | - - - | - - - | 7 7 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 20 (NB) | - - - | - - - | 8 7 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 22 (MRS) | - - - | - - - | 8 7 - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |

(N: kontrol grubu, O: 121 °C' de 15 dakika ısıl işlem uygulanan grup, 60: 60 °C' de 15 dakika ısıl işlem uygulanan grup)

Disk difüzyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasında (Çizelge 4. 2.) tüm izolatlar M17, MRS ve Nutrient broth besiyerlerinde denenmiştir. Tüm izolatların üç besiyeri için kontrol grubu (N) ısıtılma tabii tutulmamış filtreye steril supernatant, filtrasyon sonrası 60 °C' de 20 dakika ısıtılma muamele grubu (60), 121 °C' de 15 dakika ısıtılma muamele grubu (O) çalışılmıştır. Disk difüzyon yönteminde inhibisyon zonu 7-10 mm arasında değişmekte olduğu belirlenmiştir.

4.2.2. Agar-sandviç yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Agar-sandviç yöntemiyle yapılan tarama çalışmasında, 19 izolatın en az bir test bakterisine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. En az iki tekrarlı yapılan antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan iki yöntem karşılaştırıldığında, agar-sandviç yönteminin tekrarlarından elde edilen inhibisyon zon çaplarının birbiriyle daha uyumlu olduğu gözlenmiştir. Disk difüzyonu ile yapılan çalışmanın ilkinde, bir bakteriye geniş bir inhibisyon zonu olduğu belirlenirken, aynı çalışmanın tekrarında oldukça dar inhibisyon zonu elde edildiği durumlarla karşılaşılmıştır. Yani LAB izolatları, test bakterileriyle direkt kontak halindeyken daha geniş zon çaplarıyla inhibisyon sağlamaktadır. Bu nedenle çalışmanın diğer aşamalarında, agar-sandviç yönteminin kullanılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir.

Tüm izolatlar agar-sandviç yöntemiyle tüm test bakterilerine karşı denenmiştir. En az bir test bakterisine karşı antimikrobiyal etkili olan izolatların sonuçları Çizelge 4. 4 ve 4. 5' de verilmiştir. Agar-sandviç yönteminde LAB izolatlarının 8 tanesi, *Escherichia coli* O157 test bakterisinin gelişimini 5 mm ve 21 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe etmiş, bu nedenle en duyarlı test bakterisi olarak değerlendirilmiştir. En dirençli test bakterileri ise, *Acinetobacter baumannii* ve Vancomycin-dirençli *Enterococcus* (VRE) olmuştur. 26, 31, 32, 33 ve 34 izolatlarının MRSA' ya 12,7 mm ve 22,3 mm arasında değişen zon çaplarıyla oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 18, 19, 26, 28, 29, 32, 33 ve 34 izolatları 5 mm ve 20,6 mm arasında *E. coli* O157, 26, 28 ve 31 izolatları 8 mm ve 18,6 mm arasında *L. monocytogenes* ve 9, 18, 32, 33 ve 34 izolatları *B. cereus* gibi oldukça önemli gıda kaynaklı patojenlerin gelişimini inhibe etmiştir.

Hem disk difüzyon yönteminde hemde agar-sandviç yönteminde yapılan tüm denemelerde VRE, *Acinetobacter baumannii* bakterilerine karşı antimikrobiyal etki gösteren izolat bulunmamıştır. Bu yöntemde, antimikrobiyal etki spektrumu en geniş LAB izolatları 26, 32, 33, ve 34 dür.

Çizelge 4.4. İzolatların agar-sandviç yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

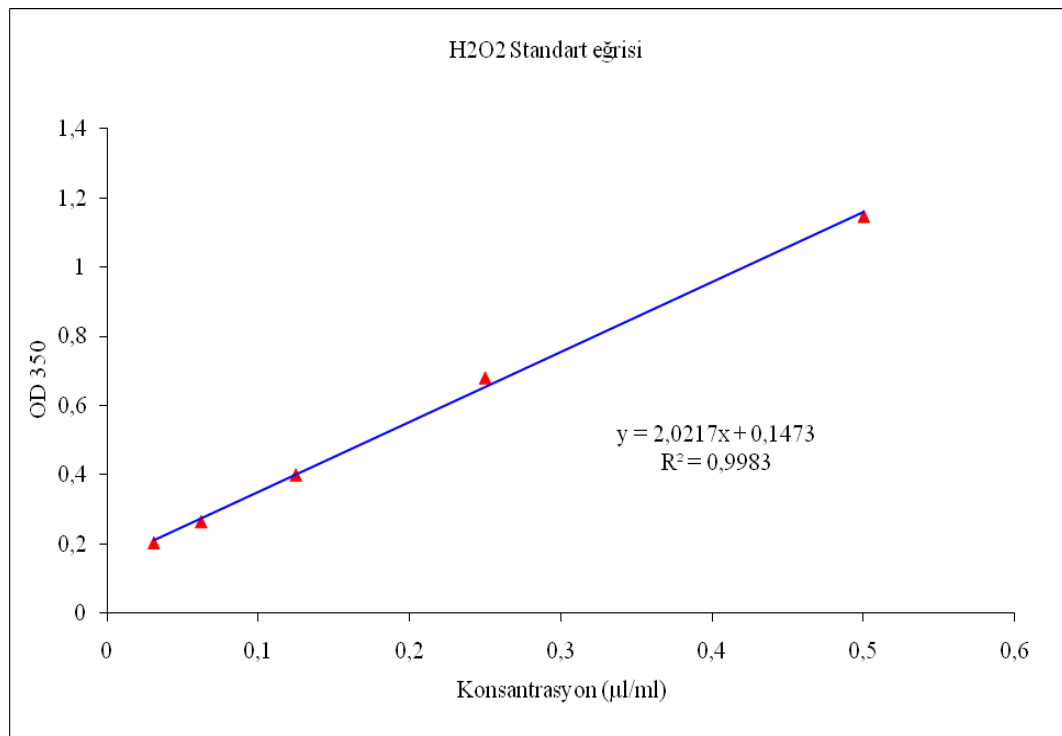
| İzolat No | <i>Escherichia coli</i> O157 | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | VRE | MRSA | <i>Acinetobacter baumannii</i> | <i>Salmonella</i> sp. |
|-----------|------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|-----|------|--------------------------------|-----------------------|
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 |
| 9 | - | - | 13.6 | - | - | - | - | - | - | - | 12 |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 15.3 |
| 18 | 6 | 5.3 | 5.6 | - | - | - | - | - | - | - | 5.3 |
| 19 | 5 | 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | 5.6 |
| 26 | 10 | - | - | 18.6 | 11.6 | 11.3 | 28.3 | - | 16.3 | - | - |
| 28 | 8 | - | - | 8 | - | - | - | - | - | - | - |
| 29 | 11.5 | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - | - | - |
| 31 | - | - | - | 14.2 | 12.3 | - | - | - | 12.7 | - | 10.2 |
| 32 | 20.6 | 13 | 20 | - | - | - | 14.6 | - | 14 | - | - |
| 33 | 21 | 7.6 | 17.6 | - | - | - | 18 | - | 22.3 | - | - |
| 34 | 20 | 9.5 | 19.6 | - | 7.6 | - | 12.3 | - | 13.3 | - | - |

Çizelge 4.5. İzolatların agar-sandviç yöntemiyle LAB'e karşı antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

| İzolat No | <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | <i>Streptococcus lactis</i> | <i>Lactobacillus paracasei</i> | <i>Lactobacillus casei</i> | <i>Lactobacillus paramesenteroides</i> | <i>Lactobacillus buchneri</i> | <i>Lactobacillus curvatus</i> | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
|-----------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 3 | - | - | 10.6 | - | 11.3 | 7.6 | 11 | - | 10.3 |
| 4 | - | - | - | - | 9 | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | 11.3 | - | 12 | 6.6 | - |
| 10 | 18 | - | 8 | - | - | 15 | 11.3 | 14.3 | 11.3 |
| 12 | - | - | - | - | 11 | - | - | - | - |
| 13 | 9.3 | - | 6.6 | - | 11.3 | 11.3 | 14.6 | 10 | - |
| 19 | - | - | - | - | - | 7 | - | - | - |
| 20 | - | - | - | - | - | - | 10.3 | 10.3 | - |
| 21 | - | 5 | - | - | - | - | - | - | - |
| 26 | 19 | 13.3 | 18 | 19 | 16.3 | 11.6 | 12 | - | 15.6 |
| 29 | - | - | 6 | - | 7 | - | - | - | - |
| 30 | 8 | 9.6 | 10 | 14.6 | 8.3 | - | 12.3 | - | - |
| 31 | - | 10.6 | 14.3 | 19.3 | 17.3 | - | - | - | - |
| 32 | 16 | 21 | 19.5 | 22 | 18.5 | - | 20 | - | 19 |
| 33 | 14.3 | 19 | 18.3 | 19 | 20 | - | 19.6 | - | 19.6 |
| 34 | 12 | 19 | 19.6 | 21.3 | 20.6 | - | 18.6 | - | 20.6 |

4.5. Hidrojen peroksit (H₂O₂) üretiminin belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H₂O₂) üretiminin belirlenmesi için önceden hazırlanan standart eğriye göre $\mu\text{l/ml}$ cinsinden hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 4.1). Spektrofotometrede 350 nm dalga boyunda okunarak optik yoğunluk değerleri Çizelge 4.6' da verilmiştir. Çizelgede görülen 0,5' den yüksek değerler, 10^{-1} oranında seyreltme yapılarak okunmuş ve hesaplamalarda seyreltme oranıyla çarpılmıştır.



Şekil 4.1.Hidrojen peroksit (H₂O₂) üretimi standart eğrisi ($\mu\text{l/ml}$)

Tüm LAB izolatlarının 0,011 ve 2,9 $\mu\text{l/ml}$ arasında H₂O₂ ürettiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. LAB' nin MRS besiyerinde ürettikleri H₂O₂ miktarları (µl/ml).

| İzolat No | H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (µl/ml) | İzolat No | H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (µl/ml) |
|-----------|--|-----------|--|
| 1 | 0.91 | 18 | 0.96 |
| 2 | 1.15 | 19 | 0.87 |
| 3 | 1.16 | 20 | 1.01 |
| 4 | 1.21 | 21 | 1.1 |
| 5 | 0.5 | 22 | 0.011 |
| 6 | 1.32 | 23 | 0.99 |
| 7 | 1.51 | 24 | 2,12 |
| 8 | 2.3 | 25 | 0.59 |
| 9 | 0.32 | 26 | 1.12 |
| 10 | 0.5 | 27 | 0.45 |
| 11 | 2.9 | 28 | 0.49 |
| 12 | 1.08 | 29 | 0.45 |
| 13 | 0.99 | 30 | 1.21 |
| 14 | 1.07 | 31 | 1.8 |
| 15 | 1.31 | 32 | 1.23 |
| 16 | 1.07 | 33 | 0.38 |
| 17 | 0.91 | 34 | 0.39 |

4. 6. Bakteriyosin benzeri maddelerin proteolitik enzimler ile muamelesi

Bu çalışmada, agar-sandivç yöntemiyle en az bir test bakterisine antimikrobiyal etkili olan LAB' nin proteolitik enzimlerle muamelesinden sonra antimikrobiyal aktiviteleri tekrar test edilmiştir. İzolatların % 98,1' inin tripsin ve pepsinle muamele edildikten sonra, antimikrobiyal etkisini yitirdiği belirlenmiştir. Çizelge 4.7 ve 4.8' de, proteolitik enzim muamelesinden sonra etkisi devam eden izolatların etkisinin büyük ölçüde azaldığı gözlenmektedir.

Enzim muamelesine maruz kalmayan kontrol gruplarında (K) ise antimikrobiyal etkinin devam ettiği belirlenmiştir. Enzimlerle muamele edildikten sonra MRS agar plakalarına ekilen LAB' nin 24-48 saat içinde normal koloni gelişimi gösterdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4. 7. Proteolitik enzim muamelesi sonrası LAB izolatlarının çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

| | <i>Escherichia coli</i> O157 | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus cereus</i> | VRE | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | MRSA | <i>Salmonella</i> sp. |
|-----------|---------------------------------|-------------------------|------------------------|-------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------|-----------------------|
| İzolat No | K T P | K T P | K T P | K T P | K T P | K T P | K T P | K T P | K T P | K T P |
| 5 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 6 - - |
| 9 | - - - | - - - | 12 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 10 - - |
| 10 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 15 - - |
| 18 | 6 - - | 5 - - | 6 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 5 - - |
| 19 | 5 - - | 5 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 6 - - |
| 26 | - - - | - - - | - - - | - - - | 21 - - | 11 - - | 12 - - | 12 - - | 15 - - | - - - |
| 28 | 10 - - | - - - | - - - | - - - | 7 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 29 | 10 - - | 8 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 30 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 10 - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 31 | - - - | - - - | - - - | - - - | 13 - - | 11 - - | - - - | - - - | 14 - - | 8 - - |
| 32 | 21 - - | 14 - - | 23 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 15 - - | 14 - - | - - - |
| 33 | 23 - - | 7 - - | 15 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 10 - - | 18 - - | - - - |
| 34 | 16 - - | - - - | 20 - - | - - - | - - - | 13 - - | - - - | 11 - - | 12 - - | - - - |

(K: kontrol grubu, T: tripsin enzimiyle muamele edilen grup, P: pepsin enzimiyle muamele edilen grup)

Çizelge 4. 8. Proteolitik enzim muamelesi sonrası LAB izolatlarının, standart LAB suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

| | <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | <i>Streptococcus lactis</i> | <i>Lactobacillus paracasei</i> | <i>Lactobacillus casei</i> | <i>Lactobacillus paramesenteroides</i> | <i>Lactobacillus buchneri</i> | <i>Lactobacillus curvatus</i> | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
|-----------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| İzolat No | KTP | KTP | KTP | KTP | KTP | KTP | KTP | KTP | KTP |
| 3 | - - - | - - - | 9 - - | - - - | 12 - - | 7 - - | 12 - - | - - - | 9 - - |
| 4 | - - - | - - - | - - - | - - - | 11 - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 9 | - - - | - - - | - - - | - - - | 11 - - | - - - | 15 - - | 5 - - | - - - |
| 10 | 17 - - | - - - | 6 - - | - - - | - - - | 18 - - | 11 - - | 14 - - | 9 - - |
| 11 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 12 | - - - | - - - | - - - | - - - | 12 - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 13 | 10 - - | - - - | 5 - - | - - - | 12 - - | 13 - - | 12 - - | 12 - - | - - - |
| 19 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 6 - - | - - - | - - - | - - - |
| 20 | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | 9 - - | 8 - - | - - - |
| 26 | 23 - - | 13 - - | 23 - - | 18 - - | 32 - - | 11 - - | 24 - - | - - - | 15 - - |
| 28 | - - - | - - - | - - - | 7 - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 29 | - - - | - - - | 5 - - | - - - | 7 - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 30 | 12 5 6 | 9 - - | 9 - - | 16 4 - | 8 - - | - - - | 11 - - | - - - | - - - |
| 31 | - - - | 10 - - | 16 - - | 17 - - | 20 - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| 32 | 24 - - | 21 - - | 22 - - | 22 - - | 13 - - | - - - | 17 - - | - - - | 15 - - |
| 33 | 14 - - | 19 - - | 25 - - | 16 - - | 18 - - | - - - | 18 - - | - - - | 19 - - |
| 34 | 12 - - | 14 - - | 18 - - | 22 - - | 20 - - | - - - | 16 - - | - - - | 21 - - |

(K: kontrol grubu, T: tripsin enzimiyle muamele edilen grup, P: pepsin enzimiyle muamele edilen grup)

4.7. İnkübasyon sıcaklığının bakteriyosin benzeri madde üretimine etkisi

LAB izolatlarının farklı gelişme sıcaklıklarında geliştirilmesi sonrasında elde edilen zon çapları Çizelge 4.9 ve 4.10' da verilmiştir. Tablodan gözlemlendiği gibi 25 ve 42 °C' de geliştirilen LAB izolatlarının meydana getirdiği zon çapları daralırken, aynı izolatlar 30 veya 35 °C' de geliştirildiğinde meydana getirdikleri zon çapları genişlemiştir. 30 °C' de yapılan çalışmalarda 35 °C' ye göre % 8- 29 arasında inhibasyon zonlarının daha büyük olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4. 9. Bakteriyosin benzeri madde üretimine sıcaklık etkisinin çeşitli patojenler üzerinde denenmesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

| Salmonella sp. | MRSA | <i>B. subtilis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli O157</i> | Test strainleri |
|----------------|----------------|--------------------|------------------|--------------------|-------------------------|------------------|----------------|---------------------|-----------------|
| 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | izolat No |
| 6 7 7 4 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 5 |
| 5 12 14 9 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 10 14 15 6 | - - - - | - - - - | 9 |
| 8 13 15 10 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 10 |
| 5 5 6 4 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 4 5 5 - | - 6 5 3 | - 6 6 4 | 18 |
| - 5 - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 4 5 5 3 | - 4 4 - | 19 |
| - - - - | - 18 21 14 | 25 36 35 37 | 7 10 12 6 | 5 12 15 4 | 5 12 14 15 | - - - - | 10 10 12 - | - - - - | 26 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 5 9 9 - | - - - - | - - - - | - 8 8 5 | 28 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - 8 10 3 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 29 |
| - - - - | - - - - | 25 36 35 37 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 30 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - 7 9 - | 3 21 19 4 | - - - - | - - - - | - - - - | 31 |
| - - - - | 9 12 14 - | - 12 14 - | - - - - | - - - - | - - - - | 11 16 19 12 | - 13 11 - | - 19 19 8 | 32 |
| - - - - | 25 30 36 16 | 32 21 21 28 | - - - - | - - - - | - - - - | 15 20 19 9 | - 5 6 - | - 21 18 9 | 33 |
| - - - - | 8 12 14 4 | 5 9 13 9 | - - - - | 6 10 10 3 | - - - - | 14 18 21 10 | - - - - | 4 22 20 10 | 34 |

Çizelge 4. 10. Bakteriyosin benzeri madde üretimine sıcaklık etkisinin çeşitli standart LAB strainleri üzerinde denemesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

| <i>Lb. plantarum</i> | <i>Lb. rhamnosus</i> | <i>Lb. curvatus</i> | <i>Lb. buchneri</i> | <i>Lb. paramesent eroides</i> | <i>Lb. casei</i> | <i>Lb. paracasei</i> | <i>Streptococcus lactis</i> | <i>Lb. bulgaricus</i> | Test strainleri |
|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------|
| 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | 25 30 35 42 °C | İzolat No |
| - 10 8 - | - - - - | - 11 10 7 | - 7 5 - | - 10 11 - | - - - - | - 12 10 6 | - - - - | - - - - | 3 |
| - - - - | - 7 5 - | 7 11 9 - | - - - - | 5 11 14 6 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 9 |
| - - 9 5 | 8 16 14 6 | - - 10 | - 12 14 6 | - 6 8 5 | - - - - | - 8 9 - | - - - - | 8 17 17 11 | 10 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 8 11 12 6 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 12 |
| - - - - | - 8 8 4 | 6 19 16 11 | - 9 13 4 | 4 10 11 4 | - - - - | - 8 8 - | - - - - | - 9 9 5 | 13 |
| - - - - | - - - - | - - - - | 3 7 6 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 19 |
| - - - - | - 11 9 - | - 10 8 - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 20 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - 3 5 - | - - - - | 21 |
| 8 13 11 6 | - - - - | 6 11 9 - | 5 12 12 6 | 5 7 10 - | - 19 16 9 | 7 13 15 8 | 7 13 16 7 | 10 16 17 5 | 26 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - 6 8 6 | - - - - | - 6 7 4 | - - - - | - - - - | 29 |
| - - - - | - - - - | 6 16 15 12 | - - - - | - 7 9 - | 8 13 12 7 | 9 12 14 4 | 6 11 14 4 | - - - - | 30 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 6 14 17 8 | 6 21 19 11 | - 13 14 10 | 6 10 12 7 | - - - - | 31 |
| 7 20 17 9 | - - - - | - - - - | - - - - | 10 16 20 12 | 12 22 18 6 | 8 18 19 12 | 10 19 21 | 9 15 16 7 | 32 |
| 9 21 16 5 | - - - - | 4 21 19 - | - - - - | 8 19 22 9 | - 19 14 10 | - 15 18 8 | 11 20 20 8 | 8 15 17 10 | 33 |
| 8 19 19 12 | - - - - | 8 20 20 10 | - - - - | 5 21 17 11 | 8 20 16 9 | - 19 16 10 | 9 21 23 11 | 4 10 12 5 | 34 |

4. 8. Besiyeri başlangıç pH değerinin bakteriyosin benzeri madde üretimine etkisi

Farklı pH değerlerine sahip katı besiyerlerinde geliştirilen LAB nin meydana getirdikleri inhibisyon zonları Çizelge 4.11. 'de verilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda, başlangıç pH değeri 3,5 olan besiyerlerinde bakteriyosin-benzeri madde üretiminde azalma gözlenirken, pH 5,5 ve 6,5 da en yüksek düzeye ulaşmıştır. pH 5,5 ile pH 6,5 arasında, 4 mm' ye varan inhibisyon zon çapı farkı belirlenmiştir. En büyük inhibisyon zon çapları pH 6,5' de geliştirilen kültürlerle yapılan denemelerden elde edilmiştir.

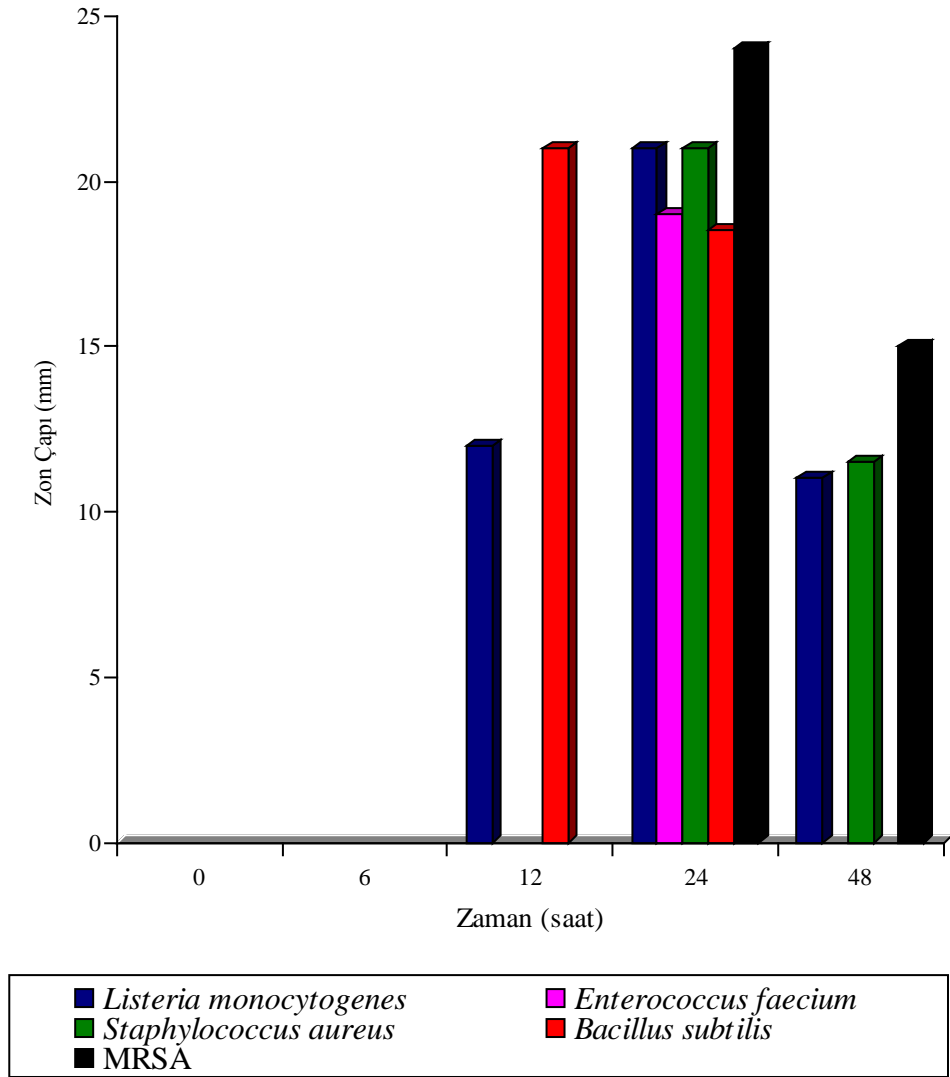
Çizelge 4. 11. Bakteriyosin benzeri madde üretimine pH değeri etkisinin çeşitli patojenler üzerinde denenmesi (inhibasyon zon çapı mm cinsinden verilmiştir).

| Salmonella sp. | MRSA | <i>B. subtilis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> O157 | Test straini |
|----------------|-------------|--------------------|------------------|--------------------|-------------------------|------------------|----------------|---------------------|--------------|
| 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 | İzolasyon No |
| - 7 7 7 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 5 |
| 9 12 11 14 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 9 12 14 | - - - - | - - - - | 9 |
| - 12 16 18 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 10 |
| - 5 5 6 | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 4 5 6 | 4 5 5 | 5 6 6 | 18 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 5 5 6 | 3 7 9 9 | 19 |
| - - - - | 18 21 14 | 25 36 35 37 | 7 10 12 6 | 5 12 15 4 | 5 12 14 15 | - - - - | 10 10 12 | - - - - | 26 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 5 9 9 | - - - - | - - - - | 8 8 5 | 28 |
| - - - - | - - - - | - - - - | - - - - | 8 10 13 | - 11 19 21 | - - - - | 3 7 9 11 | - - - - | 29 |
| - - - - | - - - - | - - - 25 | - - - - | - - - - | 5 8 10 | - - - - | - - - - | - - - - | 30 |
| - 5 10 12 | - 8 11 12 | - - - - | - - - - | 6 9 9 | 10 11 11 | - - - - | - - - - | - - - - | 31 |
| - - - - | 9 12 14 | - 12 14 | - - - - | - - - - | - - - - | 11 16 19 12 | - 13 11 | - 19 19 8 | 32 |
| - - - - | 5 10 18 21 | 8 15 15 19 | - - - - | - - - - | - - - - | 4 14 16 20 | - 5 5 5 | 4 18 20 21 | 33 |
| - - - - | 13 17 15 17 | - 7 10 11 | - - - - | - 8 12 11 | - - - - | 6 13 17 19 | - - - - | 5 16 19 20 | 34 |

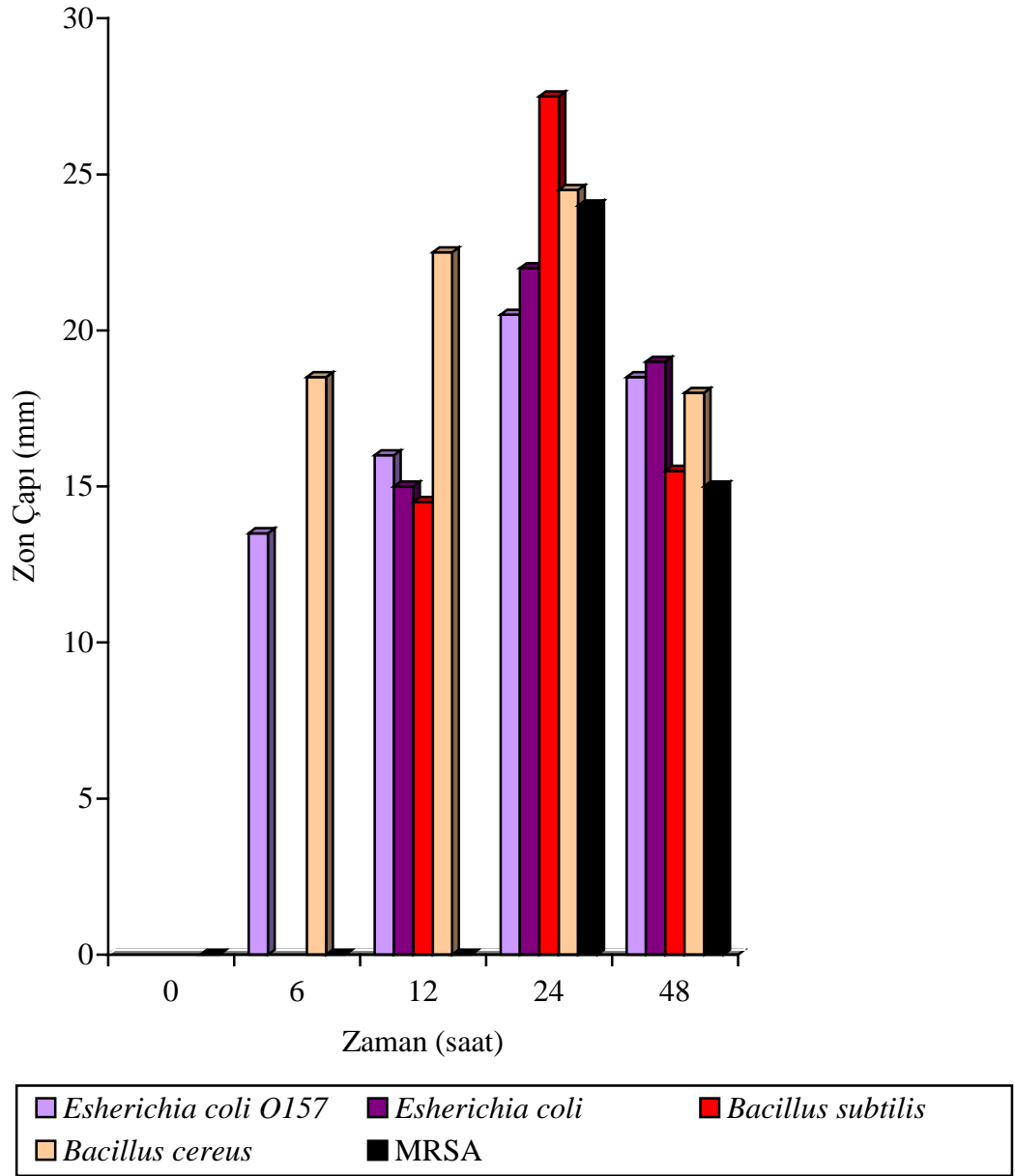
Çizelgede pH değerleri 3,5 (1), 4,5 (2), 5,5 (3), 6,5 (4) olarak verilmiştir.

4.9. Bakteriyosin benzeri madde üretimi için optimum inkübasyon sürenin belirlenmesi

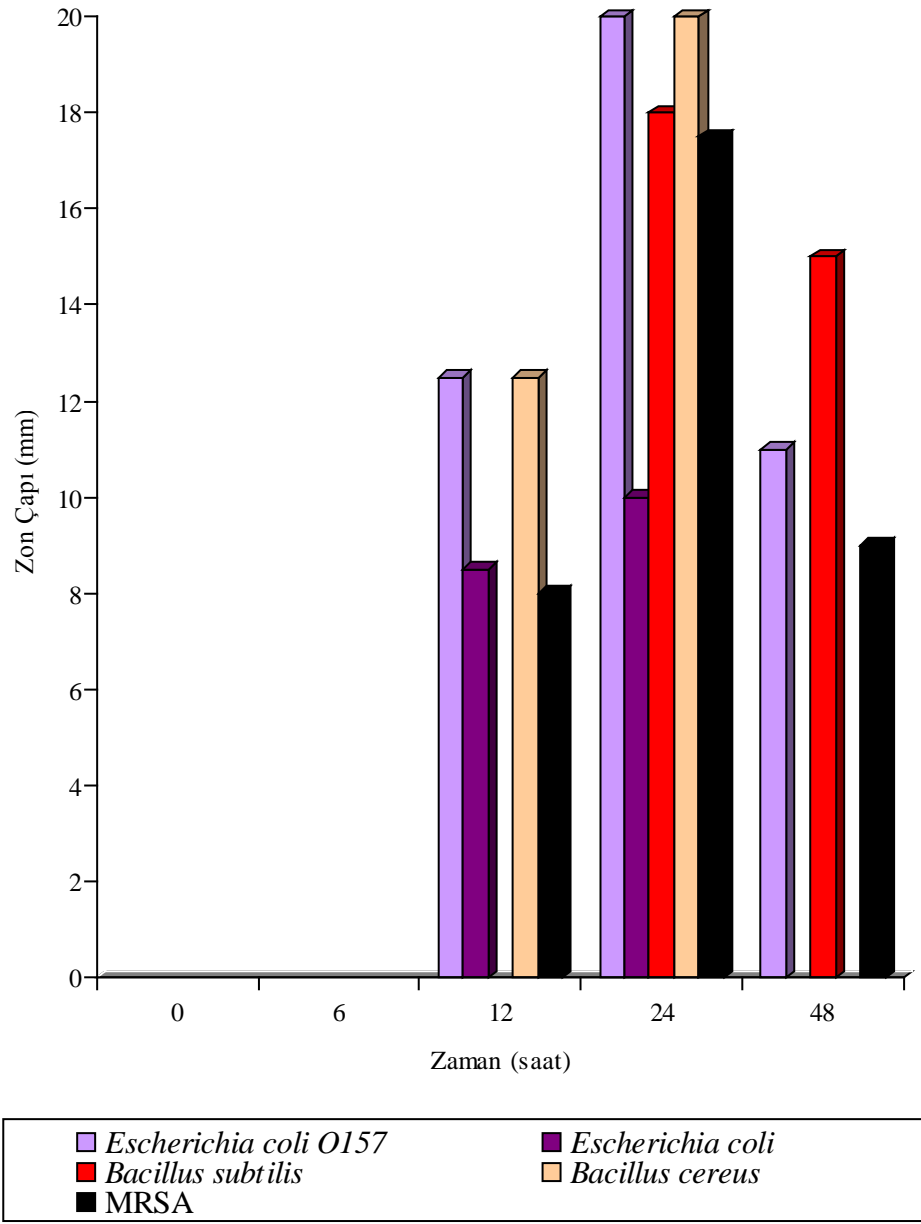
Bu çalışmada seçilen bazı izolatların, bakteriyosin benzeri madde üretimlerinin en yoğun olduğu zaman dilimi belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5). Patojen test bakterilerine en etkili LAB izolatları seçilerek, denemeler bunlar üzerinde yapılmıştır. Çalışma sonucunda bakteriyosin-benzeri madde üretiminin inkübasyonun 6 veya 12. saatinde başlamış, 24. saatte en yüksek düzeye ulaşmıştır. 48. saatte bakteriyosin benzeri üretiminde azalma gözlenmiştir. Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8' de farklı zamanlarda en az iki tekrardan elde edilen inhibasyon zon çaplarının ortalamaları mm cinsinden verilmiştir.



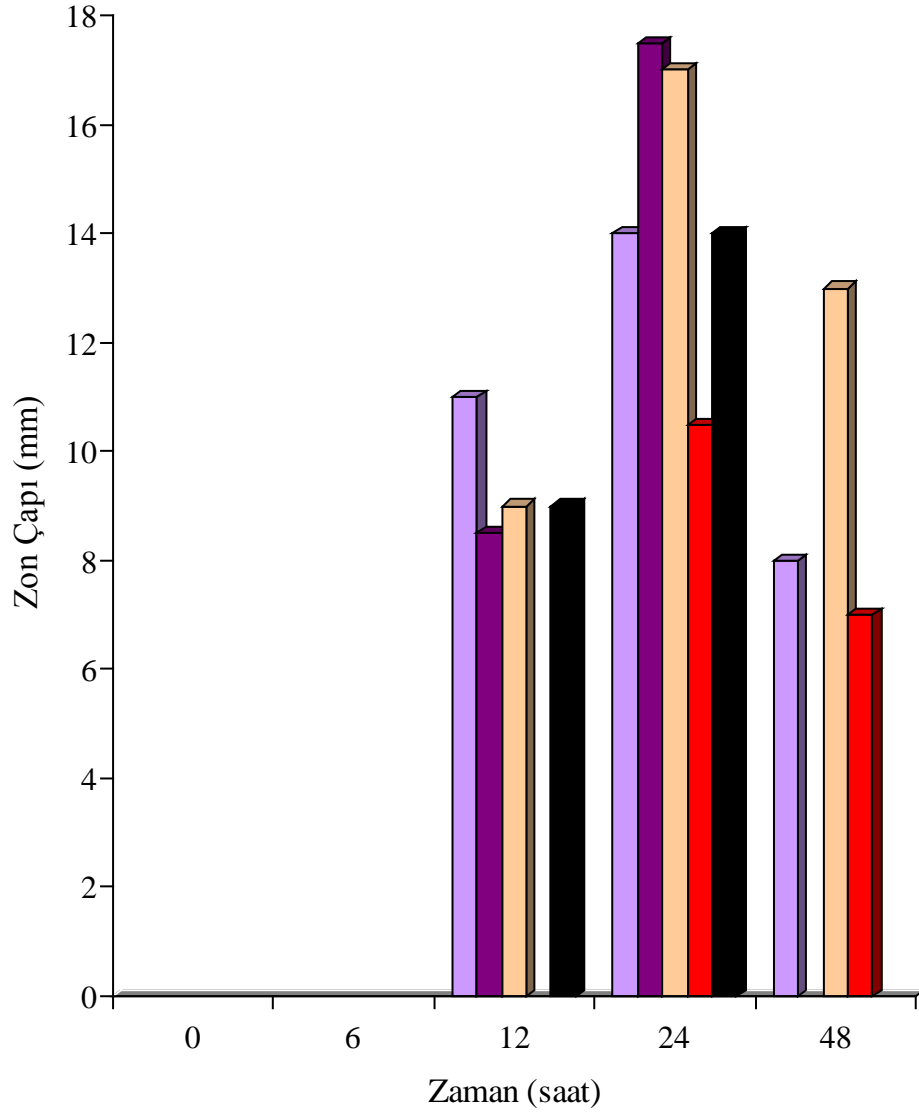
Şekil 4.2. Farklı inkübasyon sürelerinde 26 nolu izolatin (*Lactobacillus plantarum*) bakteriyosin benzeri madde üretimi.



Şekil 4.3. Farklı inkübasyon sürelerinde 32 nolu izolatın (*Lactobacillus plantarum*) bakteriyosin benzeri madde üretimi.



Şekil 4.4. Farklı inkübasyon sürelerinde 33 nolu izolatın (*Lactobacillus rhamnosus*) bakteriyosin-benzeri madde üretimi.



Şekil 4.5. Farklı inkübasyon sürelerinde 34 nolu izolatın bakteriyosin benzeri madde üretimi.



Şekil 4. 6. *Bacillus subtilis*' e karşı 26 (2y), 33 (*Lactobacillus rhamnosus*,14y) ve 34 (15y) nolu izolatların 12. saatte oluşturdukları zonlar



Şekil 4. 7. *Bacillus subtilis*' e karşı 32 (13y) nolu izolatın 24. saatte oluşturdukları zonlar



Şekil 4. 8. MRSA'ya karşı 32 (13y) nolu izolatın 24. saatte oluşturdukları zonlar

4.10. Bakteriyosin benzeri maddelerin ekstraksiyonu ve konsantre etme çalışmaları

4.10. 1. Alkali-Asit hidrolizi

Bu çalışma için, bakteriyosin benzeri madde ürettiği belirlenmiş izolatlardan, test bakterilerine antimikrobiyal etki spektrumunu geniş olduğu belirlenen 30 ve 33 nolu izolatlar seçilmiştir. Tüm test bakterileriyle yapılan bu çalışmada, sadece pozitif sonuçların 3 paralelli ortalamaları Çizelge 4. 12' de verilmiştir. Bu yöntem, üretici hücreye adsorbe olduğu düşünülen bakteriyosin benzeri maddenin ekstraksiyonu amacıyla uygulanmıştır. Ancak elde edilen sonuçlar bu yöntemin, bakteriyosin benzeri maddeyi ekstre etmede başarısız olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.12' de görüldüğü gibi, ekstraksiyon sonrası inhibisyon zonlarında bir artış değil, azalma gözlenmiştir.

Çizelge 4.12. Bakteriyosin benzeri maddenin ekstraksiyonu sonrasında elde edilen inhibisyon zonları

| | <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | <i>Lactobacillus buchneri</i> | <i>Streptococcus lactis</i> | <i>Esheriachia coli</i> O157 | <i>Lactobacillus paramesenteroides.</i> |
|---|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---|
| <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (30) Ekstraksiyon öncesi | 8 | - | 9.6 | - | 8,3 |
| <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (30) Ekstraksiyon sonrası | 7 | 7.3 | - | 7 | 9 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (33) Ekstraksiyon öncesi | 14.3 | - | 19 | 21 | 20 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (33) Ekstraksiyon sonrası | 7 | 7 | - | 7 | 8.3 |

4.10.2.Bakteriyosin-benzeri maddeleri konsantre etme çalışması

İki farklı yöntem ile yapılan konsantre supernatantların antimikrobiyal aktiviteleri, tüm standart test bakterilerine karşı denenmiştir. Ancak hiçbir konsantre ürün antimikrobiyal etkili olmamıştır.

4.10.3.Bakteriyosin benzeri maddeler üreten LAB kültürlerinin peroksidaz enzimiyle muamele edilmesi

LAB izolatlarının çeşitli hasas test bakterilerine karşı gösterdiği inhibitör etkinin H₂O₂' den kaynaklanmadığını gösterebilmek için, LAB izolatları peroksidaz enzimi ile muamele edilmiştir. Bu işlem için, çeşitli patojen test bakterilerine karşı antimikrobiyal

etki spektrumunu en geniş olan LAB izolatları seçilmiştir (18, 19, 26, 32, 34 nolu izolatlar). Peroksidaz uygulamasından sonra inhibisyon zon çaplarında önemli bir değişim görülmemiştir (Çizelge 4.13)

Çizelge 4.13. Bakteriyosin benzeri maddeler üreten LAB kültürlerinin peroksidaz enzimiyle muamelesi edilmesi sonrasında meydana gelen inhibisyon zonları

| İzolat no | <i>E. coli</i> O157 | <i>E. coli</i> | <i>B. cereus</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>S. aureus</i> | MRSA | <i>Salmonella</i> sp. | <i>Lb. casei</i> |
|---------------|---------------------|----------------|------------------|-------------------------|--------------------|------------------|------|-----------------------|------------------|
| 18 Kontrol | 8 | 8 | 14 | 15 | - | - | - | 13 | - |
| 18 Peroksidaz | 7 | 8 | 15 | 12 | - | - | - | 16 | - |
| 19 Kontrol | 10 | 9 | 20 | - | - | - | - | 14 | - |
| 19 Peroksidaz | 11 | 7 | 22 | - | - | - | - | 15 | - |
| 26 Kontrol | - | - | - | - | 11 | 9 | 10 | - | 21 |
| 26 Peroksidaz | - | - | - | 17 | 9 | 7 | 9 | - | 19 |
| 32 Kontrol | 24 | 12 | - | 15 | - | - | 13 | - | 18 |
| 32 Peroksidaz | 27 | 14 | - | - | - | - | 14 | - | 19 |
| 34 Kontrol | 17 | - | - | - | 11 | - | 16 | - | 24 |
| 34 Peroksidaz | 19 | - | - | - | 10 | - | 15 | - | 21 |

4.10.4. Bakteriyosin benzeri madde üreticisi olan LAB kültürlerinin kendi kültürlerine karşı antagonistik etkisinin belirlenmesi

LAB' nin kendi ürettikleri bakteriyosinlere dirençli oldukları bilinmektedir (George, 1962). Bu nedenle LAB izolatlarımızın kendi ürettikleri bakteriyosin-benzeri maddelere dirençli olup olmadıkları, yine agar sandviç yöntemiyle denenmiştir. Bunun için bakteriyosin-benzeri madde üreten ve antibakteriyal spektrumu en geniş olan LAB izolatları (18, 19, 26, 32, 34) kendisine karşı denenmiştir. Bakteriyosin benzeri madde üreticisi olan LAB izolatlarının tümünün, kendi ürettikleri antagonistik maddeye karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada süt, peynir ve kefirde izole edilen LAB nin, çeşitli test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiş ve cins/tür seviyesinde tanımlamaları yapılmıştır. Disk difüzyonu ve agar-sandviç yöntemleri kullanılarak, 34 LAB izolatının test bakterilerinden en az birine karşı antimikrobiyal etkili bakteriyosin-benzeri madde üretme yetenekleri olduğu belirlenmiştir. Bakteriyosin-benzeri madde üreten LAB izolatlarının 29'u tulum peyniri (1-23 ve 29-34 nolu örnekler), 5'i kefir (24-28 nolu örnekler) örneklerinden izole edilmiştir. Kefir örneklerinden izole edilen izolatlar *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (2 izolat) ve *Lactobacillus plantarum* (3 izolat) olarak tanımlanmıştır. Peynir örneklerinden ise; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Streptococcus thermophilus* türleri izole edilmiştir. Beş izolat ise kullandığımız yöntemler ile tanımlanamamıştır.

Bakteriyosinlerin etki spektrumlarının sınırlı olması nedeniyle gıdalardaki etkileri de sınırlı kalabilmektedir. Özellikle Gram negatif mikroorganizmalara karşı daha az etki göstermektedirler. Dolayısıyla Gram negatif olan patojen mikroorganizmaların varlığı nedeniyle tek başına bakteriyosinin gıda güvenliğini sağlayamayacağı düşünülmektedir (Calderon-Miranda et. al., 1999). Disk difüzyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmamızda, LAB nin 23'ü (1-23 nolu örnekler) *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus casei* gibi Gram pozitif test bakterilerine inhibitör etkili olduğu kadar, *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* ve *Salmonella* sp. gibi Gram negatiflere de inhibitör etki göstermiştir.

MRS sıvı besiyerinin, bakteriyosin benzeri madde üretimi için en uygun besiyeri olduğu belirlenmiştir. İzolatların ürettikleri antimikrobiyal maddenin, 121°C' de 15 dakika yapılan ısıtma işlem sonrasında antimikrobiyal etkisini genellikle yitirmediği, hatta bazı izolatlarda etkisini arttırdığı belirlenmiştir. Bu bulgu, bakteriyosin benzeri maddenin ısıtma işlem sonrası rejenerasyon yeteneği olduğu düşündürmektedir. *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus acidophilus* bakterilerinden elde edilen

bakteriyosinle yapılmış benzer bir çalışmada 50, 75, 100 °C'de 60 dakika ısı işlem gören bakteriyosinin etkisinin stabil kaldığı belirlenmiştir (Saba et. al., 2010).

Agar-sandviç yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada 19 LAB izolatı *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* sp., MRSA, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus buchneri*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus paramesenteroides*, *Lactobacillus bulgaricus casei* gibi test bakterilerinin en az birine karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca indikatör LAB leri, kendi dışında LAB türlerinin ürettiği inhibitör maddelerin çoğuna karşı hassas olmuştur. Özellikle *Lactobacillus plantarum*, bakteriyosin benzeri maddelere en hassas LAB türü olmuştur. LAB' nin ürettiği bakteriyosinler özellikle kendilerine çok yakın türlere antimikrobiyal etki gösterirler. Bu bulgu, LAB izolatlarımızın bakteriyosin üreticileri olduğunu düşündürmektedir.

LAB izolatlarımızın ürettiği bakteriyosin benzeri maddelere en dirençli bakteriler; VRE ve *Acinetobacter baumannii* dir.

Antimikrobiyal etki spektrumu en geniş bakteriyosin benzeri madde üreticisi LAB leri ise: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* dur.

Disk difüzyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal aktivite denemelerinden elde edilen inhibisyon zon çaplarının küçük olması ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması nedeniyle, çalışmanın devamındaki diğer denemeler (bakteriyosin benzeri madde üzerine proteolitik enzimlerin etkisi, bakteriyosin benzeri madde üretiminde; optimum süre, gelişme pH'sı ve gelişme sıcaklığı gibi) agar-sandviç yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Protein yapısındaki bakteriyosinlerin, proteolitik enzim muamelesi sonrası, antimikrobiyal aktivitelerini stabil tutamadıkları ve kaybettikleri belirlenmiştir (Ogunbanwo et. al., 2003). Bizim çalışmamızda da bakteriyosin benzeri madde üreticisi

LAB izolatları, tripsin ve pepsin enzimleri muamele edildikten sonra, antimikrobiyal etkilerini yitirmiştir (30 nolu izolat hariç). Bu durum, test bakterilerinin gelişimini inhibe eden maddenin protein yapısında inhibitörler olduğunu göstermiştir. Denemelere dahil edilen, enzimle hiç muamele edilmeyen kontrol grubunda ise aktivite değişmeden kalmıştır. Agar-sandviç yönteminde LAB izolatları proteazlarla direkt olarak muamele edildiğinden, bu uygulamadan sonra, LAB' nin canlılıklarını yitirip yitirmedikleri de diğer bir kontrol grubu oluşturularak belirlenmiştir. Enzim ile muamele edilmiş LAB hücreleri, taze bir besiyerine pasajlanmış, inkübasyon sonrası tipik koloni oluşumu göstermiştir.

LAB' nin antimikrobiyal etkileri sadece ürettikleri bakteriyosinlerden kaynaklanmaz. Aynı zamanda, antimikrobiyal aktiviteli bir madde olan hidrojen peroksit de (H_2O_2) üretebilirler (Zhennai, 2000). Bu nedenle, bakteriyosin benzeri madde üreticisi LAB kültürleri, peroksidaz enzimi muamele edildikten sonra, agar-sandviç yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri yeniden denenmiştir. Test sonunda, LAB' nin antimikrobiyal etkilerinin, peroksidaz enzimiyle muameleden sonra da devam etmiştir. Bundan çıkarılacak sonuç ise, antimikrobiyal aktivitenin H_2O_2 den kaynaklanmadığıdır. LAB izolatlarının (18, 19, 26, 32, 34) kendi ürettikleri bakteriyosin benzeri maddelere de dirençli olmaları, metabolitlerin bakteriyosin olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Çalışmamızda, bakteriyosin benzeri madde üretimine sıcaklık etkisi 25, 30, 35 ve 42 °C' de belirlenmiştir. Bu sıcaklıkların seçilme nedeni ise izolasyon sırasında denenen sıcaklıklar olmasıdır. Yapılan denemelerde, bakteriyosin benzeri madde üretimi için optimum sıcaklığın 30 °C olduğu belirlenmiştir. 35 °C' deki üretimin 30 °C' ye oranla daha düşük olduğu gözlenirken, 25 ve 42 °C' lerde üretimin belirgin bir şekilde azaldığı, bazı izolatlarda ise hiç üretilmediği belirlenmiştir. LAB nin supernatanyla yapılan bazı benzer çalışmalarda, bakteriyosin üretimi için 25, 30, 35, 40 ve 45 °C' de inkübasyon yapılmış ancak 35 °C-45 °C arasında, LAB hücre yoğunluğunun % 25 oranında düştüğü belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, LAB için belirledikleri optimum üreme sıcaklığında, bakteriyosin veriminin maksimuma ulaştığı rapor edilmiştir (Kabuki et. al., 2006, Omar et. al., 2006).

Bakteriyosin üretimini etkileyen etmenlerden diğeri de ortamın pH değeridir. Bazı çalışmalarda, pH 2,0-10,0 arasında bakteriyosin üretiminin devam ettiği fakat pH 12,0' da antagonistik etkinin azaldığı gözlenmiştir. Maksimum bakteriyosin üretiminin pH 6,5' te gözlendiği, fakat LAB' nin nötr ve asit pH ortamlarına uyum sağlayabildiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda, katı besiyerinin pH' sı 3,5' e ayarlandığında bakteriyosin benzeri madde üretiminin azaldığı, pH 5,5-6,5' da ise üretimin oldukça arttığı gözlenmiştir. Nisin' le yapılan bir çalışmada pH 3,0' de üretim gözlenmezken pH 6,5' da en yüksek seviyede üretim sağlanmıştır. Aynı şekilde sakasin A'yla yapılan çalışmada pH 5,5' ta en yüksek seviyede üretim gözlenirken pH 2,0' de %75' e kadar düşmüştür (Yang, et. al., 1994). Fermente gıdalarda ortam pH' sının stabilitesini sağlamakta LAB' lerinin oldukça önemli olduğu belirlenmiştir (Ponce et al., 2007, Vignolo et. al., 1995).

Çalışmamızda, bakteriyosin benzeri madde üretiminin inkübasyonun 6. saatinden itibaren başladığı gözlenmiştir. Inkübasyonun 24. saatinde en yüksek düzeye ulaşmış, 48. saatte ise azalma gözlenmiştir. Bakteriyosin üretiminin kinetik büyümeyle olan ilişkisini belirlemek amacıyla, optimum üreme koşullarında *Enterococcus faecium*, inkübasyonun *Lactobacillus lactis*, *Enterococcus hirae* ve *Enterococcus canis* ile yapılan bir çalışmada, 2. ve 5. saatlerinden itibaren bakteriyosin üretiminin başladığı belirlenmiştir. Ancak, üretim inkübasyonun 9. saatinden başlayarak 24. saate kadar arttığı gözlenmiştir (Ponce et al., 2007). Benzer sonuçlar, balıktan izole edilen LAB izolatlarıyla yapılan diğer bir çalışmadan da alınmıştır. Ancak bu çalışmada, bakteriyosin üretimi artışının 72. saate kadar devam ettiği bildirilmiştir (Campos et al., 2008).

Disklere emdirilen supernatantların meydana getirdikleri inhibisyon zonları çok küçük olmuş, bu durumun bakteriyosin benzeri madde konsantrasyonunun düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, supernatantlardaki bakteriyosin benzeri maddeleri konsantre edilebilmek için iki yöntem denenmiştir. Bu işlem, aynı zamanda inhibitör maddenin çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi için de gerekmektedir. Ancak hem konsantratör hem de liyofilizatörde

yapılan işlem sonrası elde edilen ürünlerden aktivite elde edilememiştir. Bu bulgu, filtrasyon işlemiyle yapılan sterilizasyonda kullanılan filtrenin, bakteriyosin benzeri maddeleri tutmuş olabileceğini düşündürmektedir.

Bakteriyosin üretme yeteneğinde olan 34 LAB belirlenmiş ancak bunlardan özellikle *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* ve 34 nolu izolat en geniş antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahip türlerdir.

LAB' nin ürettiği bakteriyosin benzeri maddeler Gram pozitif bakterilere daha etkili olmuştur. LAB izolatlarımızın ürettiği bakteriyosin benzeri maddeler *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., gibi gıda kaynaklı patojenlerin ve MRSA'nın gelişimini oldukça etkili bir biçimde engellemiştir. LAB' lerinden, aynı örneklerden izole edilenler, birbirlerine karşı antimikrobiyal etkili değildir. Bu nedenle bunlar aynı preparatta uygun kombinasyonlarda bir araya getirilerek, peynir yapımında starter kültür olarak kullanılabilir. Çeşitli fermente süt ürünlerinin yapımında "challenge testler" yapılarak, fermentasyon sırasında çeşitli patojenlerin gelişimini ne derece etkilediğinin belirlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda bakteriyosin benzeri maddenin, üretici hücreye adsorbe olması bu nedenle maddenin ortama transfer olamayışı ve konsantre etme konusundaki uygulamalarımızın başarısız olması, onun, endüstriyel özelliklerini (sıcaklık direnci, optimum ortam pH, aw, yapısal kararlılığı, LAB nin ürettiği diğer kompleks fermentasyon ürünlerinin ortam sıvısından uzaklaştırılarak saflaştırılmasının pratik olmaması, etkili konsantrasyonunun ayarlanması vb.) belirlememiz aşamasında engel oluşturmuştur. Bu aynı zamanda endüstriyel üretimi açısından da bir olumsuzluktur. Ancak, protein yapısının aydınlatılmasıyla, optimum üretim koşullarının dizaynı veya daha uygun ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı ile bu sorunun çözülebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda LAB' nin inhibitör etkisinin protein yapısındaki bir maddeden kaynaklandığı ve peroksidaz enzimiyle aktivitesinin bozulmadan kaldığı belirlenmiştir.

Buna ek olarak, LAB izolatlarımız kendi ürettikleri bakteriyosin benzeri maddelere de dirençli olmuştur. Bu bulgular, antimikrobiyal etkili maddelerin bakteriyosin olabileceğini gösteren önemli kanıtlardır.

Bu çalışmanın devamı olarak bu ürünün saflaştırılması ve yapısının aydınlatılması amacıyla, uygun ekstraksiyon ve konsantrasyon yöntemleri geliştirilebilir. Ancak bundan sonra sıcaklık direnci, optimum ortam pH, yapısal kararlık, LAB nin ürettiği diğer kompleks fermentasyon ürünlerinin sıvı ortamdan uzaklaştırılarak bakteriyosinin saflaştırılmasının, etkili konsantrasyon miktarının ayarlanması özelliklerinin belirlenmesiyle mümkün olacaktır. Elde edilecek sonuçlar, maddenin gıda koruma amaçlı bir preparat olarak kullanımını belirleyecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aasen, I., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L. and Storro, I. 2000, Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687, Applied Microbiology and Biotechnology 53, 265-271.
- Asutay D., 2007, Yöresel bir gıdadan izole edilen bakteriyosin üreten bakterinin teşhisi ve bakteriyosin karakterizasyonu, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 95-89.
- Axelsson, L. T. 1998, Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects, eds. Salminen, S., Wright, A., Marcel Decker, Inc. New York, Basel, Hong Kong, 1- 72.
- Axelsson, L.T., 1993, Lactic acid bacteria: classification and physiology. In “ Lactic Acid Bacteria”, eds: Salmina, S., Wright, A.V., Marcel Dekker Inc., USA. Journal of Food Microbiology, 1-63.
- Banwart, G.J. 1981, Basic Food Microbiology. AVI Publishing Company. Westport Connecticut. 268 p.
- Barefoot, S.S. and Nettles, C.G., 1993, Antibiosis revisited. Bacteriocins produced by dairy starter cultures. Journal Dairy Science, 76, 2366-79.
- Bauer, R. and Dicks, L.M.T., 2005, Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. International Journal of Food Microbiology, 101, 201-16.
- Bhunja, A., Johnson, M.C. and Ray, B. 1988, Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology, 2, 319-322.
- Brötz H. and Sahl H.G. 2000, New insights into the mechanism of action of lantibiotics—diverse biological effects by binding to the same molecular target. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 714-719.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Bruno, M.E.C. and Montville, T.J. 1993, Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 3003-3010.
- Calderon-Miranda, M.L., Barbosa Canovas G.V. and Swanson B. G., 1999, Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin, *Journal of Food Microbiology*, 51, 7-17.
- Camilla O., Per Ronge, Per Eugen K. and Jon Nissen-Meyer, 2010, Structure analysis of the two-peptide bacteriocin lactococcin G by introducing D-amino acid residues, Department of Molecular Biosciences, University of Oslo, PO Box 1041 Blindern, 0316 Oslo, Norway, 156, 1883-1889.
- Campos, C.A., Rodriguez, O., Mata, P.C., Prado, M. and Velazquez, J.B. 2008, Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (Psetta Maxima), *Food Research International*, 7, 432-441.
- Chen, H. and Hoover D.G. 2003, Bacteriocins and Their Food Application, *Compre. Review Food Science Food Safety*, 100 p.
- Chingh, C.I., Choi, H.J., Park, H., Kim, S.B., Kook, M.C., Kim, T.S., Hwang, J.K., Pyun, Y. R. 2002, Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *Journal of Biotechnology*, 95, 225-35.
- Cleveland, J., Montville., J.T., Nes, F.I. and Chikidas, L.M. 2001, Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Microbiology*, 71, 1- 20.
- Coventry, M.J., Gordon, J.B., Wilcock, A., Harmark, K., Davidson, B.E., Hickey, M.W., Hillier, A.J. and Wan, J. 1997. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 248-258.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Daeschel, M.A., 1989, Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, *Food Technology*, 4, 503-513.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H. and Dicks L.M.T., 2005, Characterization of a 3 944 Dalton bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 419- 425.
- De Martinis E.C.P., Alves V.F. and Franco B.D.G.M., 2002, Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat product. *Food Reviews International*, 191-208.
- De Vuyst L., Avonts L. and Makras L. 2004, Probiotics, Prebiotics and Gut Health; in Remacle C, Reusens B (eds)., *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*. Cambridge, Woodhead Publishing, 416-482.
- De Vuyst, L. and Leroy, F. 2007, Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol. Microbiol. Biotechnol.*,13, 9-199.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006, Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Journal International Dairy*, 1058-1071.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M. and Metaxopoulos, J. 2006, Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc Mesenteroides* E131, *Meat Science*. 74, 690-696.
- Eckner, K. F. 1992, Bacteriocins and Food Applications. *Dairy Food Environment Sanitation*, 204-209.
- Ennahar, S., Sashihara, T. and Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2000, Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85-106.
- Erinç, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. 2006, Lantibiyotikler. Gıda Mühendisleri Odası Kongresi. Kongre bildiri kitapçığı. Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Garneau, S., Martin and N. I., Vederas, J.C. 2002, Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84, 557-592.
- Geisen, R., Lucke, K.K., Krockel and L. 1992, Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch*, 72, 874-898.
- George, I., 1962, Bacteriocins and bacteriocins-like substances. *The Journal of Bacteriology Bacteriological Reviews*, 108-116.
- Guerra, N.P., Rua, M.L. and Pastrana, L. 2001, Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 267-281.
- Hauben, K.J.A., Wuytack, E.Y., Sonntjens, C. C. F. and Michiels, C. W. 1996, High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *Journal of Food Protection*, 59, 350-355.
- Hayaloglu A.A. ve Erginkaya Z. 2001, Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 23, Bizim Büro Basımevi, Ankara, 26 s.
- Howard, B.J., Keiser, J.F., Smith, T.F., Weissfeld, A.S. and Tilton, R.C. 1993, *Clinical and Pathogenic Microbiology*. 2nd Edition. A.C.V. Mosby. Imprint Of Mosby-Year Book Inc. St. Louis., 383-423.
- Hugas, M., 1998, Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products., *Meat Science* 49, 139-150.
- Ishizaki, A., Ennahar, S., Sonomoto, K. 1999, Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Biological Engineering*, 87, 705-716.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray B. 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59, 169-200.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Jamuna M. and Jeevaratnam K., 2004, Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50 (2), 79-80.
- Kabuki, T., Oenishi, H., Watanabe, M., Steo, Y. and Nakajima, H, 2006, Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277, *The Journal of General Applied Microbiology*, 102, 699-705.
- Kaiser, D., Jack, R.W. and Jung, G., 1998, Lantibiotics and microcins: novel post translational modifications of polypeptides. *Pure and Applied Chemistry*, 70, 154-160.
- Klaenhammer, T.R., 1993, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-86.
- Kleerebezem, M. and Mierau, I. 2005, 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 705-717.
- Koponen, O. 2004, Studies of producer self-protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*, Doctoral Dissertation, Institute of Biotech., Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, 69 p.
- Lee, N.K. and Paik, H.D. 2001, Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Journal of Food Microbiology*, 17-24.
- Leer, R.J., Van Der Vossen, J.M.B.M., Van Giezen, M., van Noort, J.M., and Pouwels, P. H. 1995, Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal Microbiology*, 114, 1629-1635.
- Leroy F. and De Vuyst L., 2004, Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 64-78.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Leroy, F. and De Vuyst, L., 2002, Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 158-164.
- Lewus, C.B. and Montville, T.J., 1991, Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 13, 145- 150.
- Liu, W., Hansen and J.N., 1990, Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, 551-558.
- Marillingappa, J. and Kadirvelu J., 2004, Isolation and characterization of lactobacilli from traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins, *The Journal of General Applied Microbiology*, 50, 79-90.
- Marshall R.T., 1992, *Standart Methods for The Examination of Dairy Products*, 16th ed., APHA, Washington, 532-539.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., Berkley, R.W. 1972, *Methods for Studying Bacteriocins*, in 'Methods In Microbiology', J.R. Norris And N.W. Ribbons (Eds.), 315- 442.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., and Hill, C. 2001, Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 285-308.
- Miller K., Schamber R., Osmanagaoglu O. and Ray B. 1998, Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1997-2005.
- Montville, T. J. and Winskowski, K. 1997, Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In "Food microbiology: Fundamentals and Frontiers", M. P. Doyle, L.R. Beuchat & T. J. Montville (Eds.) ASM, Washington D.C., 557, 577 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Moreno, I., Lerayer, A.L.S., Baldini, V.L.S., Leita, M.F.F. 2000, Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Microbiology* 31, 183-191.
- Mumcu, Z.N. 1997, Kefirden İzole edilen bazı laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve plazmit DNA'larının incelenmesi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 112 s.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., and Holo, H. 1996, Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 113-128.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A. A., 2003, Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1, *Journal of Biotechnology*, 8, 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. *Journal of Food Microbiology*, 88, 81-89.
- Okereke, A. and Montville, T.J., 1991, Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria, *Journal of Food Protection*, 54, 349-353.
- Omar, N. B., Abriouel H., Lucas R., Martinez-Canamero, M., Guyot, J., P. and Galvez, A., 2006, Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel frual Burkina Faso, *International Journal of Food Microbiology*, 112, 44-50.
- Onda, T., Yanagida, F., Tsuji, M., Shinohara, T., Yokotsuka, K. 2003, Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus sp.* strain GM005, isolated from miso-paste., *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2),153-159.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- O'sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002, Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593-604.
- Papagianni, M. 2003, Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications, *Biotechnology Advances*, 21, 465-499.
- Ponce, A.G., Moreira, M.R., Valle, C.E. and Roura S.I., 2007, Preliminary characterization of bacteriocin-like substance from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables, *Journal of Food Science and Technology*, 41, 432-441.
- Riley M.A. 1998, Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 32, 255-278.
- Riley M.A. and Chavan, 2007, *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, Springer Verlag, Inc., 150 p.
- Saba R., Syed K.N. and Shahida H. 2010, Bacteriocins produced by *L. fermentum* and *L. acidophilus* can inhibit cephalosporin resistant *E. coli.*, *Braz. Journal of Microbiology*, 41, 643-648.
- Savadogo, A., Ouattara C. A.T., Bassole, I.H.N. and Traore, S.A. 2006, Bacteriocins and lactic acid bacteria, *African Journal of Biotechnology*, 678-683.
- Schved, F., Henis, Y., Juven, B.J. 1994, Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 311-314.
- Skaugen, M., Abildgaard, C.I.M., and Nes, I. F. 1997, Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin, *Molecular and General Genetics*, 253, 269-274.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Steffen, T., 2005, Natural dairy safety in dairy world. Food protection symposium Sao Polia, Brazil.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, W. H., 1997, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1-29.
- Stiles, M.E., 1996, Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leewenhoek 70, 331-345.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976, Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Journal of Bacteriology Reviews, 59, 722-756.
- Takala, T.M. 2005, Nisin Immunity And Food Grade Trasformation In Lactic Acid Bacteria. Academic Dissertation In Microbiology (Ph.D), University of Helsinki. Finland, 61 p.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E. Karaboz, İ., Bursalioğlu, M. ve Oğultekin R. 1989, 3. Ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvarı Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, 240s.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. III. Baskı. Hatipoğlu Yayınevi. Ankara.
- Toksoy, A., Beyatlı, Y. ve Aslım, B., 1999, Sucuk ve sosislerden izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşlarının bazı metabolit ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Tr. J Veterinary and Animal Sci., 23, 533-540.
- Twomey D. , Ross R.P., Ryan M. and Meany B., Hill C., 2002, Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and application. Antonie van Leewenhoek, 82, 165-185.
- Van Kraaij, C., de Vos, W.M., Siezen, R. J. and Kuipers, O. P. 1999, Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. Natural Product Reports, 16, 575-587.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Vignolo, G., Kairuz, M., Ruiz H., A. and Oliver, G., 1995, Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705, Journal of Applied Bacteriology, 78, 5-10.
- Wood B.J.B. and Holzapfel W. H. 1995, The Genera of lactic acid bacteria. London, Blackie Academic and Professional, 93-97.
- Yang, R. and Ray, B. 1994, Factors Influencing Production of Bacteriocins by Lactic Acid, Yayınevi. Ankara, 274-281.
- Yıldırım Z. ve Yıldırım M., 2000, Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Tebliği Kitabı,16, 247-253.
- Zhennai, Y. 2000, Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation, University of Helsinki, 120 p.
- Zhu, W.M., Liu, W. ve Wu, D.Q. 2000, Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri*, KT7, Journal of Applied Microbiology, 61, 877-886.