

Enterococcus faecalis KT11'in Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi ve Bakteriyosin
Üretimi Üzerine Çalışmalar

Hilal Seval Abanoz

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2014

Determination of Probiotic Potential of *Enterococcus faecalis* KT11 and Studies on Its
Bacteriocin Production

Hilal Seval Abanoz

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2014

Enterococcus faecalis KT11'in Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi ve Bakteriyosin
Üretimi Üzerine Çalışmalar

Hilal Seval Abanoz

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Ocak 2014

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hilal Seval ABANOZ'un YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Enterococcus faecalis* KT11’in Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi ve Bakteriyosin Üretimi Üzerine Çalışmalar” 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 : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye : Prof. Dr. Semra İLHAN

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

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

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada *E. faecalis* KT11'in ürettiği bakteriyosinin kısmi karakterizasyonu yapılmış ve üretim için optimum koşullar belirlenmiştir. *E. faecalis* KT11'den elde edilen kültür süpernatanların pH'ı 6,5 ayarlanmış ve katalaz enzimi ile muamele edilmiştir, bu işlemler sonrasında aktivitesinde bir değişiklik olmamıştır. Daha sonra süpernatanlar bazı proteolitik enzimlerle (Tripsin, Pepsin, α -Kimotripsin, Proteaz, Proteinaz K) muamele edilmiş ve pepsin dışındaki tüm proteolitik enzimler, süpernatanların antimikrobiyal aktivitesini yitirmesine neden olmuştur. Bakteriyosinin yüksek sıcaklığa (121 °C'de 30 dk) oldukça dirençli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyosinin aktivitesi, pH'sı 2-11 olan ortamlarda değişmeden kalmıştır. Triton-X, Tween 80, üre, EDTA ve SDS gibi deterjanlar ve kloroform, propanol, metanol, etanol, hekzan, eter ve aseton gibi organik çözücülerle muamele sonrasında da aktivitesi değişmemiştir. Liyofilize süpernatandaki, amonyum sülfat çöktürmesi sonrasındaki ve diyalizattaki protein miktarı sırasıyla 328,7, 507,4 ve 498,8 $\mu\text{g/ml}$ dir. Bakteriyosinin molekül ağırlığı 3,5-6,5 kDa arasındadır. Diyalizatın HPLC profili belirlenmiş ve 18, 20, 22, 26, 28 ve 30. dakikalarda toplanan fraksiyonlar antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *E. faecalis* KT11'in bakteriyosin üretmesi için optimum koşullar; 40 °C (aerobik), pH=6, %4 inokulum ve 18 saattir. Ayrıca *E. faecalis* KT11 hücreleri, pH 2 ve 3' te; %0,3, %0,5 ve %1 safra tuzları varlığında; pH'ı 3 ve 4 olan yapay mide sıvısında (3 mg/ml pepsin, 5 mg/ml NaCl) canlı kalabilmiştir. Buna ek olarak, *E. faecalis* KT11 kültür süpernatanlarının ve liyofilize süpernatanın oldukça yüksek bir antioksidan etkiye (DPPH inhibisyonu= %94-96) sahip olduğu da belirlenmiştir. Bu veriler *E. faecalis* KT11'in probiyotik olarak kullanım potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: bakteriyosin, probiyotik, laktik asit bakterileri, *Enterococcus faecalis*

SUMMARY

In this study, partial characterization of bacteriocin produced by *E. faecalis* KT11 was done and optimum conditions for bacteriocin production were determined. The pH of culture supernatants were adjusted to 6,5 and treated with catalase enzyme, after these treatments their activity did not change. When supernatants were treated with some proteolytic enzymes (trypsin, pepsin, α -chymotrypsin, protease, Proteinase K), all enzymes except pepsin led to the loss of antimicrobial activity of supernatants. Bacteriocin was very heat stable (121 °C for 30 min). Activity of the bacteriocin did not change in the pH=2-11. Detergents such as Triton-X, Tween 80, urea, EDTA and SDS, and organic solvents such as chloroform, propanol, methanol, ethanol, hexane, ether, and acetone did not change the activity of the supernatants. Protein content of lyophilized supernatant, ammonium sulphate precipitate and dialysate were 328,7, 507,4 and 498,8 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Molecular size of bacteriocin was between 3,5-6,5 kDa. HPLC fractions collected at 18, 20, 22, 26, 28 and 30 minutes showed antimicrobial activity. Optimum conditions were determined as; 40 °C (aerobic), pH=6, 4% inoculum and 18 hours, for the bacteriocin production by *E. faecalis* KT11. *E. faecalis* KT11 cells survived in pH 2 and 3; 0,3%, 0,5% and 1% bile salt; artificial gastric fluid at pH 3 and 4 (3 mg/ml pepsin, 5 mg/ml NaCl). In addition, it was determined that *E. faecalis* KT11 culture supernatants and lyophilized supernatant possess high antioxidant effect (inhibition of DPPH %=94-96). These data indicated that *E. faecalis* KT11 also has potential to be used as a probiotic.

Key words: bacteriocin, probiotics lactic acid bacteria, *Enterococcus faecalis*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın hazırlanması ve yürütülmesinde bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU'na teşekkür ederim.

Gıda laboratuvarında geçirdiğim süreç boyunca her an yanımda olan ve bana destek olan sayın Yrd. Doç. Dr. Sevil PİLATİN'e teşekkür ederim. Çalışmalarımın saflaştırma aşamalarını gerçekleştirebilmem için bana laboratuvarının kapılarını açan sayın Yrd. Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yürüdüğüm bu uzun ve zor yolda hem çalışmalarımda bana yardımcı olan hem de en sıkıntılı zamanlarımda bana destek çıkıp bu yolda yürümemi kolaylaştıran değerli arkadaşlarım Bilal DOĞAN, Cem ÖZKAN, Ayşe Betül KARADUMAN ve Bilge BORAN'a teşekkür ederim.

Üniversite hayatım boyunca sürekli benim yanımda duran hiç usanmadan beni destekleyen yeri geldiğinde bilmediği halde laboratuvara gelip benimle birlikte çalışan Ozan ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Tüm okul hayatım boyunca sabırla ve sevgiyle desteklerini esirgemeyen, bana her zaman güvenen annem Semiha ABANOZ, babam Halil ABANOZ ve kardeşim Gökay Canberk ABANOZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
SİMGELER DİZİNİ.....	xxii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	3
2.1.1. Kullanım alanları.....	6
2.1.2. Probiyotik özellikleri.....	9
2.2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	13
2.2.1. Grup I (Lantibiyotikler).....	13
2.2.2. Grup II.....	14
2.2.3. Grup III.....	15
2.2.4. Grup IV.....	15
2.2.5. Bakteriyosinlerin sentezlenmeleri ve etki mekanizmaları.....	16

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3. MATERYAL VE METOD.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Çalışmada kullanılan LAB.....	19
3.1.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında indikatör olarak kullanılan bakteriler.....	19
3.1.3. Kullanılan besiyerleri.....	21
3.1.4. Kullanılan boyalar ve çözeltiler.....	27
3.1.5. Kullanılan antibiyotikler.....	32
3.2. Metod.....	33
3.2.1. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etki spektrumlarının belirlenmesi.....	33
3.2.1.1. Agar sandviç yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	33
3.2.1.2. Agar kuyu yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	33
3.2.2. Virulans faktörlerinin belirlenmesi.....	34
3.2.2.1. DNAz testi.....	34
3.2.2.2. Hemoliz testi.....	34
3.2.2.3. Jelatinaz testi.....	35
3.2.2.4. Koagülaz testi.....	35
3.2.3. Süpernatantların protein miktarlarının belirlenmesi.....	35

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.2.4. LAB izolatının (2 nolu izolat) fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması.....	36
3.2.4.1. Fizyolojik testler.....	36
3.2.4.1.1. Farklı sıcaklıklarda büyüme.....	36
3.2.4.1.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında büyüme.....	36
3.2.4.1.3. 60 °C’de canlı kalabilme yeteneği.....	36
3.2.4.1.4. pH 4,4’te büyüme.....	37
3.2.4.1.5. pH 9,6’da büyüme.....	37
3.2.4.1.6. Hareketlilik testi.....	37
3.2.4.2. Biyokimyasal testler.....	37
3.2.4.2.1. EPS üretimi.....	38
3.2.4.2.2. %0,01 lik TTC’de büyüme.....	38
3.2.4.2.3. Arjininden amonyak oluşumu.....	38
3.2.4.2.4. %0,04 Telluritte büyüme.....	38
3.2.4.2.5. CO ₂ üretimi.....	39
3.2.4.2.6. Nişasta hidrolizi.....	39
3.2.4.2.7. Metilen mavili sütte büyüme.....	39
3.2.4.2.8. Litmus milk’te büyüme.....	39
3.2.4.2.9. Kazein hidrolizi.....	40
3.2.4.2.10. Sorbitol fermentasyonu.....	40
3.2.4.2.11. Voges – Proskauer (VP) testi.....	40
3.2.4.3. LAB izolatının Biolog Microbial ID sistemi ile tanımlanması...40	

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.4.4. Moleküler yöntemler.....	41
3.2.4.4.1. DNA izolasyonu.....	41
3.2.4.4.2. Gerçek zamanlı PCR (Q-PCR).....	42
3.2.4.4.3. Dizi analizi ve filogenetik analiz.....	43
3.2.5. Bakteriyosinin karakterizasyonu.....	44
3.2.5.1. Çeşitli proteolitik enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi.....	44
3.2.5.2. Bakteriyosinin farklı sıcaklık derecelerindeki stabilitesi.....	45
3.2.5.3. Bakteriyosinin farklı pH'lardaki stabilitesi.....	45
3.2.5.4. Bazı organik çözücülerin ve deterjanların bakteriyosin stabilitesi üzerine etkisi.....	45
3.2.5.4.1. Organik çözücülerin bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi.....	45
3.2.5.4.2. Deterjanların bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi..	46
3.2.5.5. Liyofilize edilmiş bakteriyosin için uygun depolama sıcaklığı ve süresi.....	46
3.2.5.6. Bakteriyosin üreticisi için uygun saklama koşulu.....	46
3.2.5.7. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması.....	47
3.2.5.7.1. Amonyum sülfat ile protein çöktürmesi.....	47
3.2.5.7.2. Diyaliz.....	48
3.2.5.7.3. Bakteriyosinin elektroforetik profilinin belirlenmesi...48	48

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.5.7.4. Bakteriyosinin HPLC profilinin belirlenmesi.....	49
3.2.6. Bakteriyosin üretimi için optimum koşulların belirlenmesi.....	50
3.2.6.1. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	50
3.2.6.2. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	50
3.2.6.3. Optimum sürenin belirlenmesi.....	51
3.2.6.4. Optimum inokulum yoğunluğunun belirlenmesi.....	51
3.2.6.5. Anerobik koşullarda bakteriyosin üretme yeteneğinin belirlenmesi.....	51
3.2.7. Optimum koşulda üretilen bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi.....	51
3.2.8. <i>E. faecalis</i> KT11'in bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi.....	52
3.2.8.1. Asidik pH'ya direncinin belirlenmesi.....	52
3.2.8.2. Safra tuzuna direncinin belirlenmesi.....	52
3.2.8.3. Yapay mide sıvısına direncinin belirlenmesi.....	53
3.2.8.4. Antibiyotiklere duyarlılığın belirlenmesi.....	53
3.2.9. <i>E. faecalis</i> KT11'e ait süpernatanın antioksidan aktivitesi.....	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	55
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Ön Tanısı ve Seçimi.....	55
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Etki Spektrumlarının Belirlenmesi.....	55
4.2.1. Agar sandviç yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi....	55

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

4.2.2. Agar kuyu yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	57
4.3. Virulans Faktörlerinin Belirlenmesi.....	58
4.4. Süpernatantların Protein Miktarlarının Belirlenmesi.....	58
4.5. LAB izolatının (2 nolu izolat) Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması.....	58
4.5.1. Fizyolojik testler.....	58
4.5.2. Biyokimyasal testler.....	60
4.5.3. LAB izolatının Biolog Microbial ID sistemi ile tanımlanması.....	61
4.5.4. LAB izolatının moleküler yöntemler ile tanımlanması.....	62
4.5.4.1. Gerçek zamanlı PCR (Q-PCR) sonuçları.....	62
4.5.4.2. Dizi analizi sonuçları.....	64
4.6. <i>Enterococcus faecalis</i> 'den Elde Edilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu...65	
4.6.1. Çeşitli proteolitik enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi...65	
4.6.2. Bakteriyosinin farklı sıcaklık derecelerindeki stabilitesi.....	66
4.6.3. Bakteriyosinin farklı pH'lardaki stabilitesi.....	67
4.6.4. Bazı organik çözücülerin ve deterjanların bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi.....	69
4.6.4.1. Organik çözücülerin bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi.69	
4.6.4.2. Deterjanların bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi.....	69
4.6.5. Liyofilize edilmiş bakteriyosin için uygun depolama sıcaklığı ve süresi.....	70

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.6.6. Bakteriyosin üreticisi <i>E. faecalis</i> KT11 için uygun saklama koşulları.....	71
4.6.7. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması.....	71
4.6.7.1. Bakteriyosinin elektroforetik profilinin belirlenmesi.....	75
4.6.7.2. Bakteriyosinin HPLC profilinin belirlenmesi.....	76
4.7. Bakteriyosin Üretimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	77
4.7.1. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	78
4.7.2. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	78
4.7.3. Optimum sürenin belirlenmesi.....	79
4.7.4. Optimum inokulum yoğunluğunun belirlenmesi.....	81
4.7.5. Anaerobik koşullarda bakteriyosin üretme yeteneğinin belirlenmesi.....	82
4.7.6. Optimum koşulda üretilmiş bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesinin yeniden değerlendirilmesi.....	83
4.8. <i>E. faecalis</i> KT11'in Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	85
4.8.1. Asidik pH'ya direncinin belirlenmesi.....	85
4.8.2. Safra tuzuna direncinin belirlenmesi.....	85
4.8.3. Yapay mide sıvısına direncinin belirlenmesi.....	86
4.8.4. Antibiyotiklere duyarlılığının belirlenmesi.....	87
4.9. <i>E. faecalis</i> KT11'e Ait Süpernatanın Antioksidan Aktivitesi.....	88

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
5.1. Laktik Asit Bakterilerinin Ön tanısı, Seçimi ve Çalışmanın Akışı.....	90
5.1.1. Antimikrobiyal etki spektrumunun agar sandviç yöntemi ile belirlenmesi.....	91
5.1.2. Antimikrobiyal etki spektrumunun agar kuyu yöntemi ile belirlenmesi.....	92
5.2. Virulans Faktörlerinin Belirlenmesi.....	92
5.3. Süpernatantların Protein Miktarlarının Belirlenmesi.....	93
5.4. LAB İzolatının (2 nolu izolat) Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması.....	93
5.5. <i>Enterococcus faecalis</i> 'den Elde Edilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu...94	
5.5.1. Çeşitli proteolitik enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi...95	
5.5.2. Bakteriyosinin farklı sıcaklık derecelerindeki stabilitesi.....96	
5.5.3. Bakteriyosinin farklı pH'lardaki stabilitesi.....97	
5.5.4. Bazı organik çözücülerin ve deterjanların bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi.....97	
5.5.5. Liyofilize edilmiş bakteriyosin için uygun depolama sıcaklığı ve süresi.....99	
5.5.6. Bakteriyosin üreticisi <i>E. faecalis</i> KT11 için uygun saklama koşulu.....99	
5.5.7. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması.....100	

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
5.5.7.1. Bakteriyosinin elektroforetik profilinin belirlenmesi.....	101
5.5.7.2. Bakteriyosinin HPLC profilinin belirlenmesi.....	102
5.6. Bakteriyosin Üretimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	103
5.7. <i>E. faecalis</i> KT11'in Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	105
5.8. <i>E. faecalis</i> KT11'e Ait Süpernatanın Antioksidan Aktivitesi.....	108
KAYNAKLAR.....	110

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.12. <i>S.aureus</i> test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite.....	80
Şekil 4.13. <i>P.aeruginosa</i> test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite.....	80
Şekil 4.14. <i>M. luteus</i> test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite.....	81
Şekil 4.15. Aerobik ve anaerobik koşullarda geliştirilen <i>E. faecalis</i> KT11'den elde edilen süpernatanın ve liyofilize edilmiş süpernatanın antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar.....	8
Çizelge 2.2. Geleceğin bakteriyosin ile ilgili araştırma konuları.....	9
Çizelge 2.3. Ticari olarak satılan bazı probiyotikler.....	9
Çizelge 2.4. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler.....	12
Çizelge 3.1. Test Bakterileri.....	20
Çizelge 3.2. Biolog Microbial ID sistemine ait kitte bulunan testler.....	41
Çizelge 3.3. Isı döngüsü programı.....	43
Çizelge 3.4. Ultra low molecular weight marker.....	49
Çizelge 4.1. LAB izolatlarının agar sandviç yöntemiyle çeşitli test bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.....	56
Çizelge 4.2. LAB izolatlarının agar kuyu yöntemi ile çeşitli test bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite.....	57
Çizelge 4.3. LAB izolatının tanımlanmasında uygulanan fizyolojik testler.....	59
Çizelge 4.4. İzolatların tanımlanmasında uygulanan biyokimyasal testler.....	61
Çizelge 4.5. Biolog Microbial ID Test Sisteminden alınan LAB izolatına ait sonuçlar.....	62
Çizelge 4.6. Biyoinformatik analiz sonuçları.....	65
Çizelge 4.7. Proteolitik enzim uygulamasının <i>E. faecalis</i> KT11'den elde edilen kültür süpernatantının aktivitesi üzerine etkisi.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.8. Farklı ısıl işlemlerin <i>E. faecalis</i> KT11'den elde edilen kültür süpernatantının aktivitesi üzerine etkisi.....	67
Çizelge 4.9. <i>E. faecalis</i> KT11'den elde edilen kültür süpernatantının farklı pH'lardaki antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	68
Çizelge 4.10. <i>E. faecalis</i> KT11'den elde edilen bakteriyosinin, çeşitli organik çözücüler ile 25°C/60' muameleden sonraki antimikrobiyal aktivitesi.....	69
Çizelge 4.11. <i>E. faecalis</i> KT11'den elde edilen bakteriyosinin, çeşitli deterjanlarla 37°C/180' muameleden sonraki antimikrobiyal aktivitesi.....	70
Çizelge 4.12. Depolama sıcaklığı ve süresinin <i>E. faecalis</i> KT11'in ürettiği bakteriyosinin aktivitesine etkisi.....	70
Çizelge 4.13. Liyofilize edildikten sonra, farklı sıcaklıklarda farklı sürelerde depolanan <i>E. faecalis</i> KT11'den elde edilen süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları.....	71
Çizelge 4.14. Konsantre edilmiş süpernatantların aktivitelerinin karşılaştırılması.....	72
Çizelge 4.15. <i>E. faecalis</i> KT11'in ürettiği bakteriyosinin kısmi saflaştırılması.....	75
Çizelge 4.16. İnokulum yoğunluğunun <i>E. faecalis</i> KT11'in bakteriyosin üretimi üzerine etkisi.....	82
Çizelge 4.17. Anaerobik koşullarda geliştirilen <i>E. faecalis</i> KT11'in ürettiği bakteriyosinin aktivitesi.....	82
Çizelge 4.18. Optimum koşullarda üretilen bakteriyosinin test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.19. <i>E. faecalis</i> KT11'in mide pH'sında canlılığı.....	85
Çizelge 4.20. <i>E. faecalis</i> KT11'in farklı konsantrasyonlardaki safra tuzuna dayanıklılığı.....	86
Çizelge 4.21. <i>E. faecalis</i> KT11'in yapay mide sıvısına direnci.....	86
Çizelge 4.22. <i>E. faecalis</i> KT11'in antibiyotiklere duyarlılığı.....	87

SİMGELER DİZİNİ

AU	Aktivite (Arbitrary Unit)
BHT	Butillenmiş Hidroksi Toluen
DNA	Deoksiribonukleik Asit
DNAz	Deoxiribonuclease
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
FAO/WHO	Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
kDa	Kilo Dalton
LAB	Laktik Asit Bakterisi
mbar	Milibar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
N	Normal

SİMGELER DİZİNİ (Devam)

nm	Nanometre
RNA	Ribonukleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TCA	Triklor Asetik Asit
TEMED	Tetrametil Etilen Diamin
V	Volt
VP	Voges Proskauer

1. GİRİŞ

Toksik ve diğer istenmeyen yan etkiler olmaksızın hedef gıda patojenlerine karşı gıda güvenliğinin sağlanmasında, laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen antimikrobiyal peptidlerin (bakteriyosinler) kullanımı konusu giderek artan bir önem kazanmaktadır (Cleveland et al., 2001). Ancak bakteriyosinlerin gıda koruma amaçlı kullanımı dışında farklı alanlardaki kullanım olanakları da araştırılmaktadır. Sık ve yanlış antibiyotik kullanımı sonucunda, insan ve hayvanlarda hastalık meydana getiren patojenlerin direnç kazanması, giderek artan bir sorun haline gelmiştir. Multi resistant patojen bakterilerin artışı, insan ve hayvan enfeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavisinde alternatif antimikrobiyal ajanların kullanımı konusundaki çalışmaları başlatmıştır. Bu amaçla bir çok bilim adamı bakteriyosinlerin tıbbi ve kişisel bakım ürünlerinde kullanım olanakları konusunda çalışmalar yapmaktadır (Dicks et al., 2011).

Bakteriyosinler Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tarafından üretilen, genellikle dar spektrumlu antimikrobiyal protein ya da peptidlerdir. Bakteriyosinlerin ribozomal olarak sentezlenmesi antibiyotiklerin ise çoklu enzim kompleksleri ile sekonder metabolit olarak sentezlenmesi onları ayıran en önemli özelliktir. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler bir çok nedenle daha fazla ilgi çekmektedir (Nes et al., 2007) çünkü;

- fermente gıda ve yem üretiminde kullanılan ticari öneme sahip ve insan kullanımı için genel olarak güvenli kabul edilen (GRAS) bir çok LAB (örneğin; laktokoklar, laktobasiller ve pediokoklar) tarafından üretilmektedir,
- ökaryotik hücrelere toksik değildirler,
- antimikrobiyal spektrumları, Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlere göre daha geniştir.
- bazı bakteriyosinler, gıda patojenleri de dahil olmak üzere, tek bir hedef patojene yönelik aktivite göstermektedirler.

Ayrıca, LAB probiyotik olarak büyük bir endüstriyel öneme sahiptir. Probiyotikler “yeterli sayıda tüketildiklerinde konağın sağlığına olumlu etkileri bulunan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2002). “Fonksiyonel gıdalar” denilen ve insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu bilimsel

çalışmalarla ortaya konmuş gıda ve yemlerin üretiminde kullanılabilirler (FAO/WHO, 2002; Parvez et al., 2006; Diez-Gonzalez, 2007).

Yukarıda verilen genel bilgiler ışığında bu çalışmada Bölüm 3'te belirtildiği gibi, klasik biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler yöntemlerle tanımlanan *Enterococcus faecalis* KT 11'in ürettiği bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi çeşitli gıda kaynaklı ve klinik patojenlerden oluşan Gram pozitif ve Gram negatif test bakterilerine karşı denenmiştir. Ayrıca, bakteriyosinin kısmi karakterizasyonu yapılmış ve bakteriyosin üretimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Buna ek olarak *E. faecalis* KT11'in bazı probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular Bölüm 4'te verilmiştir. Elde edilen veriler Bölüm 5'te benzer çalışmalar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, basil ve kok şeklinde, katalaz negatif, aerotolerant, aside dayanıklı nitratı indirgemeyen, karbonhidratları ve yüksek alkollerini fermente ederek başlıca son ürün olarak laktik asit üreten doğal bir gruptur. LAB grubu içinde yer alan cinsler *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Weisella*, *Vagococcus* ve *Aerococcus*'dur (Bilgin, 2008; Dinçer ve ark., 2010; Axelsson, 1993; Stiles et al., 1997). Ayrıca *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* cinsi üyeleri fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (De Vuyst and Leroy, 2001).

LAB su ve toprakta hemen hemen hiç bulunmazlar, doğal ortamları süt ve süt ürünleri, fermente gıdalar, taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvan bağırsak mukoza içerikleridir (Doğan, 2009).

LAB içinde yer alan önemli cinslerden birisi *Enterococcus*'tur. Enterokoklar, Avrupa ve ülkemizde çeşitli geleneksel fermente gıdaların üretiminde önemli rolleri olduğu gibi probiyotik olarak da başarıyla kullanılmaktadırlar. Ancak bu yararlı etkilerinin yanı sıra zararlı etkileri de bulunmaktadır. Bazı LAB gıdalarda bozulma etmeni oldukları gibi, bazı enterokok suşları özellikle antibiyotiğe (metisilin, vankomisin) dayanıklı olan suşlar, insan ve hayvanlar için patojendirler (Franz et al., 2003; Kayser, 2003; Ogier and Serror, 2008). *Enterococcus* cinsinin üyeleri, Gram pozitif, katalaz negatif, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunan fakültatif anaerob koklardır. Bunlar kemoorganotrofikler ve homofermentatif laktik asit fermentasyonu ile heksozlardan L-laktik asit oluştururlar. *Enterococcus* cinsi içinde şu ana kadar tanımlanmış 32 tür bulunmaktadır. Bunlardan *E. faecalis* ve *E. faecium* en önemli iki tür olup insanların gastrointestinal sisteminin doğal florasında bulunmaktadırlar (Karakaş, 2005). Tipik enterokoklar olan *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* ve *E. mundtii*, 10 ve 45 °C'de, %6,5 NaCl, %40 safra varlığında ve pH 9,6'da gelişebilmeleri ile streptokok ve laktokoklar gibi diğer Gram (+) ve katalaz negatif homofermentatif koklardan kolaylıkla ayrılabilirler (Bilgin, 2008). Çeşitli

gıdalarda doğal olarak bulunan ve başlangıç kültür (starter kültür) olarak kullanılan birçok LAB'nin, gıdayı bozucu mikroorganizmalar veya gıda kaynaklı patojenleri içeren bir grup mikroorganizmaya karşı antagonistik aktivite gösterdiği de bilinmektedir (Andersson, 1989; Schillinger and Lucke, 1989; Davidson and Hoover, 1993). LAB'nin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu antagonistik aktivite farklı mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalar:

1. LAB'nin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu; laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler üretilmekte ve ortamın pH'sı düşmektedir. Gıdalarda bulunan birçok mikroorganizma, bu üretilen organik asitlere karşı hassastır ve sonuçta LAB'nin düşürdüğü pH'yı da tolere edememektedirler (Okereke and Montville, 1991).
2. LAB tarafından aerobik gelişme esnasında üretilen hidrojen peroksit (H_2O_2), birçok mikroorganizma üzerinde inhibitör etki gösterebilmektedir (Okereke and Montville, 1991).
3. LAB tarafından üretilen ve "bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitler" olarak isimlendirilen antimikrobiyal karakterli proteinler, özellikle üretici bakteriye yakın ilişkili bakteriler üzerinde bakteriyosidal aktivite göstermektedirler (Klaenhammer 1988).
4. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen, diasetil, alkol ve CO_2 gibi metabolitler de, bazı mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki gösterebilmektedir (Daeschel, 1989; Vandenberg 1993).

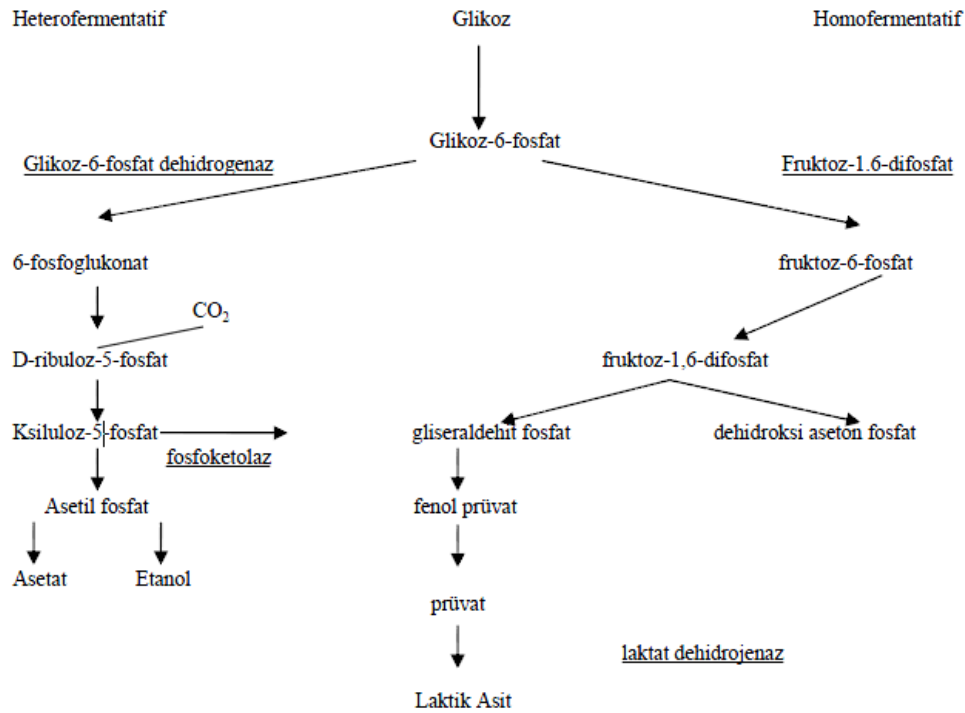
LAB, glikoz fermentasyonunda iki farklı yol izlemektedir. Bu metabolizmalar Şekil 2.1'de belirtilen "Embden-Meyerhof" glikolitik yolu ve heksoz monofosfat fosfotoketolaz reaksiyonlarının kombinasyonudur. LAB glikozu fermente etme özelliklerine göre iki ana gruba ayrılmakta ve laktik asit üretimi bakımından homolaktik (yalnız laktik asit üreten) ve heterolaktik (karbondioksit, laktat, asetat, bazen de etanol üreten) olarak tanımlanmaktadır. Homofermentatif LAB, şekerleri fruktozdifosfat yolu ile fermente ederek %90 laktik asit üretmektedir. Heterofermentatif LAB ise fruktoz

difosfat yolunun önemli enzimlerinden olan aldolaz ve triozfosfat izomeraza sahip olmadıklarından dolayı glikozun yıkımı için pentozfosfat yolunu kullanmakta olup, laktik asit yanında farklı ürünler de oluşturabilmektedir (Toy, 2010).

Homofermantatif LAB glikozu; Fruktoz di Fosfat yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu %95–100 oranında laktik asit üretirler (Drinan et al., 1976).



Heterofermantatif LAB ise glikozu; pentozfosfat yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu %50 laktik asit üretirken, bunun yanında yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (Toy, 2010).



Şekil 2.1. LAB Karbonhidrat Mekanizması (Köseoğlu, 2007)

2.1.1. Kullanım alanları

LAB, tabiatta yaygın oluşları, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeniyle gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadırlar (Çon ve Gökalp, 2000). LAB organik asit, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, reuterin, antifungal peptitler ve bakteriyosinler gibi çok çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretebilme kapasitesine sahiptir. Bakteriyosinler, gıda güvenliğinde, klinikte, veteriner tıpta, bitki hastalıklarının kontrolünde ve antitümör araştırmalarında kullanılmaktadır. Özellikle son 15 yıldır gıda koruyucusu olarak kullanım açısından ilgi odağı olmuştur (Dinçer ve ark., 2009). Tüm dünyada yaygın olarak tüketilen fermente et ürünleri ve farklı sebzelerden üretilen turşular laktik asit fermentasyonu ile hazırlanmakta ve muhafaza edilmektedir (Anderson, 1989; Mayra-Makinen, 1993).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak oldukça faydalı özellikler sergileyebildiğini açıkça gözler önüne sermiştir. Gıdalara koyucu olarak bakteriyosin ilavesi ile;

- (i) Gıdaların raf ömrü uzatılabilmekte,
- (ii) Saklama koşulları altındaki sıcaklıklarda ekstra koruma sağlanmakta,
- (iii) Gıda kökenli patojenlerin besin zinciri ile dağılım riski azaltılabilmekte,
- (iv) Gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmalar nedeni ile yaşanan ekonomik kayıplar en aza indirgenmekte,
- (v) Kimyasal koruyucuların kullanımları azaltılabilmekte,
- (vi) Koruma için daha az prosesin uygulanması sebebi ile ürünün organoleptik özellikleri ve besinsel değeri de daha iyi korunabilmektedir (Thomas and Wimpenny, 1996).

Konserve gıdalarda *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin ve sporlarının gelişimini engellemek için nisin kullanılmaktadır. Bu sayede gıdanın bozulmasına neden olacak

organizmaların gelişimi engellendiğinden proses sırasında uygulanan ısı işlem derecesi de düşürülebilmektedir. Bu durum üretim maliyetinin düşmesini sağlayacaktır (Twomey et al., 2002). Gıda koruyucusu olarak kullanılan bazı bakteriyosinler ve uygulandığı gıdalar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Laktisin 3147 üretici suşları, Cottage peynirinin ve doğal yoğurtların korunmasında *L. monocytogenes* ve *B. cereus* suşlarına karşı kullanılmaktadır (Morgan et al., 2000). Laktisin 3147 üreticisi kültürler, Cheddar peynirlerinde starter kültür özelliği taşımayan LAB’nin gelişimini tamamen inhibe etme yeteneklerinden dolayı peynir kalitesinin standardizasyonuna yardımcı olmaktadır (Ryan et al., 1996; Fenelon et. al., 1999). *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* ve *Enterococcus faecium* bakterilerinin çeşitli suşlarının destek kültür olarak Cheddar peynirinde kullanımında olumlu sonuçlar elde edilmiş, bu mikroorganizmaların ilavesi proteoliz ve lipolizi arttırarak gelişimini hızlandırmıştır (Gardiner et al., 1999). Starter kültür özelliği taşımayan LAB; bazen kalsiyum laktat kristallerinin oluşumuna, aroma bileşiklerinin ve ürünün fiziki yapısının bozulmasına sebep olur (McAuliffe et al., 1999).

Bazı lantibiyotiklerin etki mekanizmalarının kesin olarak belirlenmesi ve yeni tanımlanan bir mekanizma ile çoklu-ilaç dirençliliğine sahip patojenlere karşı aktiviteye sahip olmaları, tedavi amacıyla kullanımlarına olanak sağlamaktadır. Örneğin iki peptitli laktisin 3147; *S. aureus* (metisilin dirençli *S. aureus*’da dahil), enterokoklar (VRE dahil), streptokoklar (*S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus mutans*), *Clostridium botulinum* ve *Propionibacterium acnes* gibi bakteri türlerine karşı in vitro etkinliğe sahiptir. Bu nedenle bakteriyosinler, gıdaların korunmasında kullanımının yanı sıra mastitis enfeksiyonlarının önlenmesinde de büyük öneme sahiptir (Sit and Vederas, 2008).

Çizelge 2.1. Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar (Biler, 2009)

Bakteriyosin	Uygulanan Gıda
Nisin A	Yeniden şekillendirilen et ürünleri
Nisin A	Ricotta peynirinde <i>L. monocytogenes</i> 'in kontrolü için kullanılmıştır.
Pediocin AcH	Pediocin AcH sentezleyen <i>Lb. plantarum</i> WHE92, olgunlaşmanın başlangıcında Munstar peynirinin yüzeyine spreyleneştir.
Enterocin 4	Enterocin sentezleyen <i>E. faecalis</i> INIA4, Manchego peyniri üretiminde kullanılmıştır.
Leucocin A	<i>Leuconostoc gelidium</i> UAL 187 vakum paketlenmiş sığır etinde bozulma kontrolü için kullanılmıştır.
Enterocin	Jambon, domuz eti, tavuk eti ve sosiste bozulma faktörlerini kontrol için kullanılmıştır.
Pediocin	Şarap ve fırıncılık ürünlerinde kullanım potansiyeli araştırılmış ve belirlenmiştir.

Bakteriyosinlerin kullanımını sınırlayan bazı faktörler de bulunmaktadır. Bu faktörler; dar aktivite spektrumu, kendiliğinden bakteriyojenikliğin kaybı, proteolitik enzimlerle inaktivasyon, gıda ortamlarına kültürün zayıf adaptasyonu, düşük üretim seviyesi ve bakteriyosine dayanıklı bakterilerin ortaya çıkmasıdır (Seçkin ve Baladura, 2010).

Bakteriyosin konusunda edinilmiş geniş bilgiye rağmen gıda güvenliğinde bakteriyosinlerin antimikrobiyal potansiyelinden yararlanmak için birbirinden farklı araştırma konuları vardır (Çizelge 2.2). Biyokoruyucuların kullanımını kapsayan araştırma konuları; direnç mekanizması, yeni veya geliştirilmiş antimikrobiyaller ve güvenlik olarak gruplandırılabilir.

Çizelge 2.2. Geleceğin bakteriyosin ile ilgili araştırma konuları (Whichard et al., 2003)

Araştırma Konuları	
Direnç Mekanizması	Bağışıklık transferi, Çapraz direnç, Bakteriyosin reseptörleri
Yeni Antimikrobiyaller	Protein Mühendisliği
Güvenlik	Kompleks ekosistemlerde (fermente gıdalarda) etkileri ve toksisitesi

2.1.2. Probiyotik özellikleri

Probiyotikler, intestinal sistemin mikrobiyal dengesini düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan, canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır. Günümüzde probiyotik tanımı, insan ve hayvan sağlığını destekleyen (güçlendiren) ve gıda, yem ya da gıda katkı maddelerine ilave edilen mikrobiyal preparatların tümünü kapsamaktadır. En yaygın olarak kullanılan probiyotikler *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleridir. Bazı maya ve küf türleri de probiyotik ürünlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Uymaz, 2009). FAO/WHO (2002) tarafından belirlenen kritere göre, antibiyotik direnç genlerini taşıyıp aktarabilen ve intestinal sistemde mukozal yapıya zarar veren suşlar probiyotik olarak kullanılamaz.

Çizelge 2.3. Ticari olarak satılan bazı probiyotikler (Kıran, 2006)

Ürün Adı	Mikroorganizma	Kategori	Ülke
VITAGEN	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Fermente içecek	Malezya
LEVENIN	<i>Enterococcus faecalis</i>	Süt tozu	Japonya
BIO-GRADE	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Fermente süt	Avustralya
LCI	<i>Lactobacillus casei</i>	Yoğurt	Türkiye
VENTRUX	<i>Streptococcus faecium</i>	Kapsul	İsveç

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların faydaları bilinmesine rağmen bazı aranan özellikler vardır. Bunlar:

- Güvenilir olmalıdır ve olumsuz yan etkiye sebep olmamalıdır.
- Antimikrobiyal madde üretmelidir.
- Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli ve kolonize olabilmelidir.
- Patojenik bakterilere antagonistik etki yapmalıdır.
- Stabil olmalıdır. Düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olmalıdır.
- Antibiyotiklere karşı dirençli olmalıdır.
- Üretim ve depolama sırasında canlı kalmalı ve aktivitesini korumalıdır (Gültekin, 2004; Başığit, 2004).

Probiyotik bakteriler, sayı ve hacim avantajları ile bağırsak ve ürogenital sistem epitelyum hücrelerinde, patojenlerin girmesini zorlaştırırlar. Patojenlerin üremek için gereksinim duydukları besin maddelerini tüketerek, üremelerini inhibe ederler. Bağırsak enzim aktivitesine etki ederler. Probiyotik bakterilerin, sindirim sistemi tedavilerinde çeşitli beslenme ve düzenleyici etkileri bulunmaktadır. Laktaz, maltaz, sükröz aktivitesini arttırlar, vitamin ve minerallerin emilimini kolaylaştırırlar. İmmün sistem üzerine olumlu etkileri vardır (Gillor et al, 2008; Gültekin, 2004; Sağdıç ve ark., 2004).

Probiyotik olan LAB tıbbi alanda da kullanılmaktadır. Bunlar bağırsakta B vitaminlerini, β - galaktozidazı ve antimikrobiyal bileşikleri salgıladıklarından çok yönlü etkiye sahiptirler. β - galaktozidaz enzimi, sütteki laktozu metabolize edemeyen (laktoz-intolerant) insanların laktoz sindirimini olanaklı kılar (Altuntaş ve Ayhan, 2010). Probiyotik LAB'nin sağlık üzerine bazı faydalı etkileri aşağıda verilmiştir.

- Yüksek kolesterol seviyesini azaltılması
- Laktoz intoleransının hafifletilmesi
- Bağırsak florası üzerine olumlu etki
- İntestinal sistem enfeksiyonlarının engellenmesi
- İmmün sistemin güçlenmesi
- İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması
- Kolon kanseri riskinin azaltılması
- Ürogenital enfeksiyonlar
- *Helicobacter pylori* enfeksiyonu
- Ağır metallerin ve mikotoksinlerin giderilmesi (Tok ve Aslım, 2007).

Enterococcus faecium türleri çiftliklerde hayvanların gelişiminde ve hastalıkların önlenmesinde ve hayvan yemi üretiminde probiyotik olarak kullanılmaktadır (Devriese et al., 1995; Çakır ve ark., 2002). Ticari olarak satılan bazı probiyotikler Çizelge 2.3'te verilmiştir. Hayvan yetiştiriciliğinde bu bakterilerin probiyotik olarak kullanılması hem hastalıklara karşı direncin, hem de hayvanların gelişiminin artırılmasında pozitif sonuçlar vermektedir. Ayrıca ürettikleri ve diğer bakterilerin gelişmesini inhibe eden bileşikleri sayesinde, intestinal kas tabakasında hızla çoğalarak patojenik bakterilere karşı ilk savunma tabakasını oluşturmaktadırlar (Yaman ve Esendal, 2004). *Enterococcus faecium*, hayvan beslenmesinde antibiyotiklerin kullanılmasına alternatif olarak gösterilmektedir (Hammes and Hertel, 2001). Probiyotik olarak kullanılan bakterilerden bazıları Çizelge 2.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler (Yılsay ve Kurdal, 2000; Göktepe ve ark., 2006; Yiğit'ten (2009).

Lactobacillus türleri	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> ,
Bifidobacterium türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
Enterococcus türleri	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>
Bacillus türleri	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilis</i> <i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus coagulans</i>
Pediococcus türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentoseceus</i>
Streptococcus türleri	<i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i>
Bacteriodes türleri	<i>Bacteriodes capillus</i> <i>Bacteriodes juis</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i> <i>Bacteriodes amylophilus</i>
Leuconostoc türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

2.2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Farklı bakteriler arasında antagonistik ilişki ilk kez Pasteur ve Joubert (1877) tarafından belirlenmiş ve bakteriyosin tanımı ilk kez Jacob ve ark. (1953) tarafından yapılmıştır. Bakteriyosinler kısaca antimikrobiyel aktivite gösteren peptit veya protein yapısındaki bileşenlerdir. Başka bir ifadeyle bakteriyosin çoğunlukla LAB tarafından sentezlenen küçük molekül ağırlıklı peptitlerdir (Cotter et al., 2005; Seçkin ve Baladura, 2010).

Bakteriyosinlerin genel özellikleri, ribozomal olarak sentezlenen protein yapısındaki bileşikler olmaları ve özellikle yakın akraba türlere karşı antimikrobiyal aktivite göstermeleridir. Bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilen birincil metabolitlerdir. Her bakteriyosinin kendi dirençlilik proteini vardır. Bakteriyosinler biyokimyasal özellikleri, molekül ağırlıkları, etki spektrumları, etki mekanizmaları ve genetik dayanakları bakımından heterojen büyük bir sınıf oluştururlar (Chen and Hoover, 2003; Gillor et al., 2008; Asutay, 2007).

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, aminoasit dizilimleri, etki mekanizmaları, biyolojik aktiviteleri, ısı toleransları, modifiye aminoasit varlıkları ve salgı mekanizmaları göz önünde bulundurularak sınıflandırılır. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler dört farklı grup altında sınıflandırılmıştır (Klaenhammer, 1993; Akkoç ve ark., 2009; Ghamat, 2010).

2.2.1. Grup I (Lantibiyotikler)

Isı stabil, küçük (< 5 kDa), birden fazla halka yapısı içeren ve membran üzerine aktivite gösteren peptitlerdir Cintas et al., 2001; Gillor et al., 2005; Jeevaratnam et al., 2005; de Vuyst and Leroy, 2007; Todorov, 2009). Nisin bu gruptaki en çok çalışılmış bakteriyosindir ve pek çok patojen ve gıda bozulmalarına neden olan bakterilere karşı aktiftir (Deraz, 2005).

Lantibiyotikler, kimyasal yapılarına ve antimikrobiyal aktivitelerine göre Tip A ve Tip B olarak ikiye ayrılmaktadır. Yapılarında bilinen aminoasitlerin yanı sıra

lanthionine ve methyllanthionine içermektedirler. Pozitif yüklü Tip A lanbiyotikler, lineer ve düzgün olmayan şekillidirler. Tip A lantibiyotikler, bakteri membranında porlar oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Ortalama büyüklükleri 21-38 aminoasittir. Biyokimyasal ve genetik düzeyde en iyi tanımlanmış olan “nisin” bir tip A bakteriyosindir. Tip B lantibiyotikler ise küçük globüler yapıda negatif yüklü veya yüksüz peptidlerdir. Tip A lantibiyotiklerden oldukça küçüktür, büyüklükleri 19 aminoasiti aşmamaktadır. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Tip B üyesi olan bakteriyosinlerden bazıları mersasidin, sinnamisin’dir (Guder et al., 2000; Chen and Hoover, 2003; Gillor et al., 2005; Dinçer ve ark., 2009; Akkoç ve ark., 2009).

2.2.2. Grup II

Bu grupta yer alan bakteriyosinler 10 kDa’dan küçük molekül ağırlığına sahip, 30-60 aminoasit içeren, ısı stabil, lantiyonin, β -metillantiyonin, dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi modifiye olmuş aminoasit kalıntıları içermeyen peptidlerden oluşmaktadır. Bu bakteriyosinler grup IIa, grup IIb ve grup IIc olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır.

Grup IIa en büyük gruptur ve bu grubun üyeleri korunmuş bir amino terminal dizi (-Tyr-Gly-Asn-Gly- Val-Xaa-Cys) içermeleri nedeniyle diğerlerinden ayrılmaktadır. Tıpkı Tip A lantibiyotiklerde olduğu gibi, bu bakteriyosinler de sitoplazmik membranda por oluşturarak etki gösterirler. Grup IIa’ya ait bakteriyosinler, *Listeria* türlerine karşı aktivite gösteren bakteriyosinlerdir. Pediosin PA-1 (AcH), leukosin A, sakasin A, sakasin P ve enterosin A, IIa alt grubu üyesi bakteriyosinlerdir (Tuncer, 2005; Vuyst and Leroy, 2007; Akkoç ve ark., 2009).

Grup IIb üyesi bakteriyosinler, iki peptidlidirler. Bu bakteriyosinler hedef hücre zarında por yapısı oluştururlar ve tam aktivite gösterebilmek için iki peptide de ihtiyaç duymaktadırlar. Bu peptidler tek olduğunda zayıf aktivite gösterirken, iki peptid bir arada olduklarında sinerjetik etkileşim sonucu oldukça aktif moleküller haline

gelmektedirler. Laktokoksin G, laktokoksin F ve laktasin F, Iib alt grubu üyesi bakteriyosinlerdir (Tuncer, 2005; Köseoğlu, 2007).

Bir diğer alt grup ise salgı sinyallerine bağlı olarak üretilen peptitler olan grup Iic bakteriyosinlerdir (Guder et al., 2000; Akkoç ve ark., 2009)

2.2.3. Grup III

Yüksek molekül ağırlığına sahip ve ısıya dayanıksız proteinlerden oluşan bu grup bakteriyolizinler olarak da adlandırılırlar. Bu grupta yer alan bakteriyosinlerin büyük bir kısmı *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından sentezlenmektedir. Helvetisin J, laktisin A, laktisin B, helvetisin V-1829 ve enterolislin A bu grubun en bilinen üyelerindedir. Grup III üyesi bakteriyosinlerin çoğu ısıya duyarlı proteinler olmasına rağmen, helvetisin J gibi ısı stabil bazı bakteriyosinler de bulunmaktadır (Klaenhammer, 1993; Ennahar et al., 2000; Trotter et al., 2004).

2.2.4. Grup IV

Bu grupta sınıflandırılan bakteriyosinler, polipeptit yapısı dışında lipoprotein veya glikoprotein gibi ilave bazı yapılar içeren kompleks bakteriyosinlerdir. Plantarasin S, laktosin 27, leukonosin S ve lakstrepsin bu gruba dahil bazı bakteriyosinlerdir (Klaenhammer, 1993; Nes et al., 1996; Ennahar et al., 2000; Nes and Holo, 2000; Akkoç ve ark., 2009).

Bakteriyosin aktivitesinin protein dışı yan gruplardan da kaynaklanabileceğine işaret eden sınırlı sayıda literatür vardır. Ancak, yan grupların bakteriyosin aktivitesi hiçbir araştırmada kesin olarak tanımlanamamıştır (Oscariz and Pisabarro, 2001; Madera et al., 2003).

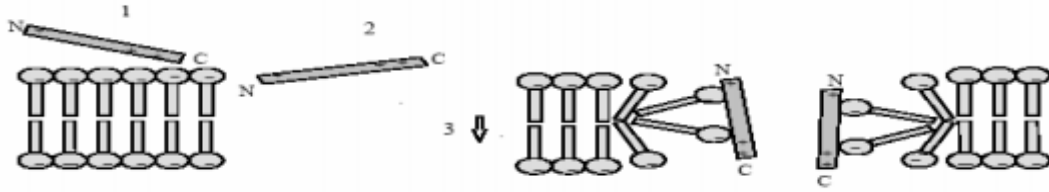
2.2.5. Bakteriyosinlerin sentezlenmeleri ve etki mekanizmaları

Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenmektedir. Bakteriyosinlerin üretim mekanizmaları, aminoasit dizilişleri, etki mekanizmaları, üretici genlerin RNA dizilişleri belirlenmiş ve genel olarak birçok ortak özelliklere sahip oldukları saptanmıştır. Genel olarak bakteriyosinlerin üretimlerindeki temel prosesler aynıdır. Polipeptit dizisi tarafından kodlandıktan sonra öncü protein olarak ayrılıp bir moleküler sinyalizasyona uğrayıp, çeşitli modifikasyonların ardından sistein sayısına göre son şeklini kazanmaktadır ve hücre dışına salgılanmaktadır (Kurt ve Zorba, 2005).

LAB'nin bakteriyosin üretiminden sorumlu genleri konjugatif transpozonlar ya da plazmidler gibi transfer edilebilen elementler ile ilişkilidir. Bakteriyosinler N terminal öncü peptide sahip inaktif pre-peptit halinde sentezlenirler. Öncü peptidin üretici hücrede inaktif formda kalması, taşıyıcılar ile etkileşimini sağlamak ve modifikasyon sistemleri tarafından tanınmasında rol oynamaktadır. Peptit genellikle taşıma sistemleri ve nadiren hücrenin salgı sistemleri ile hücre dışına taşınır. Öncü dizisi bulunmayan çok az sayıda bakteriyosin tanımlanmıştır. Bakteriyosinlerin yapısal genleri ve direnç genlerinin çoğunlukla aynı operonda ya da birbirine yakın operonlarda kodlu olduğu bilinmektedir (Nes et al., 1996; Diep and Nes, 2002; Xie et al., 2004).

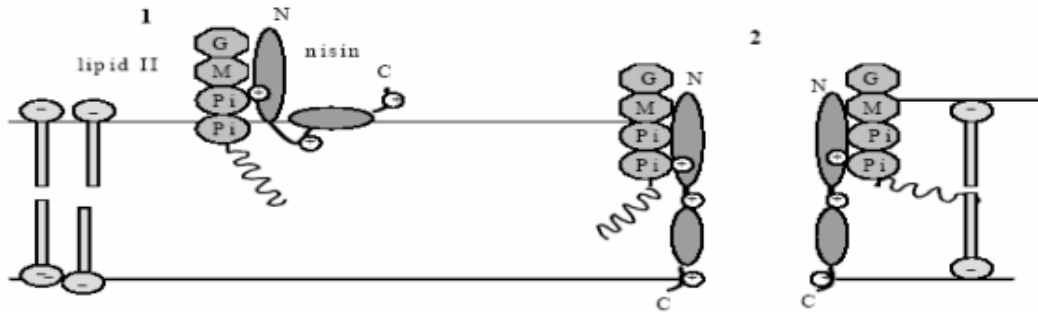
Bakteriyosinlerin üretiminin gerçekleşebilmesi için dört farklı gene ihtiyaç vardır. Bunlar; öncü peptiti kodlayan bir yapısal gen, immünite geni, ABC taşıyıcısını kodlayan gen ve bakteriyosinin hücre dışına taşınması için gereken proteini kodlayan genidir.

Bakteriyosinlerin bakterisidal etkisi, hedef hücrelerin sitoplazmik membranlarında meydana gelmekte ve bu etki iki şekilde gerçekleşmektedir (Montville et al., 1995). Wedge-modeli; bakteriyosinlerin pozitif yüklü N ve C uçları, membranlarda bulunan negatif yüklü fosfolipidlerle birleşerek, membran fonksiyonlarını por Şekil 2.2'de görüldüğü gibi oluşturarak bozar (Üstündağ ve Özdoğan, 2011).



Şekil 2.2. Bakteriyosinin fosfolipidlere bağlanarak por oluşturması (Hampikyan ve Çolak, 2007).

Barrel-Stack olarak adlandırılan diğer bir etki mekanizması ise; hücre duvarı sentezinin ön maddesi olan Lipid II molekülüne bakteriyosinler bağlanarak Lipid II molekülünün peptidoglikan zincirine bağlanmasını önleyerek hücre duvarı sentezini durdurur (Şekil 2.3) (Üstündağ ve Özdoğan, 2011).



Şekil 2.3. Bakteriyosinlerin Lipid II molekülüne bağlanarak por oluşturması (1; Nisin ilk aşamada lipid II'nin karbonhidrat parçasına dıştan yönelimli olarak bağlanır. N-terminal bölgesi bağlanma için gereklidir. 2; C-terminal kısmı ise membranı geçerek por yapısını tamamlar.) (Hampikyan ve Çolak, 2007)

E. faecium ST311LD tarafından üretilen bakteriyosinin bazı Gram-pozitif (*E. faecalis*, *Lactobacillus casei* ve *Streptococcus pneumoniae*) ve Gram-negatif bakterilere

(*E. coli* ve *P. aeruginosa*) karşı inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır (Todorov and Dicks, 2005).

E. faecalis A-48-32 ve *E. faecium* S-32-81 tarafından üretilen enterosin AS-48 (Ananou et al., 2005), *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97 (Garcia et al., 2004), *E. casseliflavus* IM 416K1 ve *E. faecalis* IM 388C tarafından üretilen enterosinlerin (Sabia et al., 2004) gıda kaynaklı bir patojen olan *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etkileri farklı çalışmalarda belirlenmiştir.

E. faecalis suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin genellikle enterokok türlerine karşı etkili olduğu, *E. faecium* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin ise, *Propionibacterium* spp., *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* ve *Cl. tyrobutyricum*'u kapsayan geniş inhibitör aktivite spektrumuna sahip olduğu görülmüştür (Toit et al., 2000). *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin *Bacillus macroides*, *B. coagulans* ve *B. maroccanus*'un gelişimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Garcia et al., 2004).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan LAB

Bu çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ve bakteriyosin üretme yeteneği açısından test edilmiş kok formunda 4 adet LAB kullanılmıştır. Bu dört bakteri Gram pozitif, katalaz negatif, sporsuz ve anaerobik koşullarda gelişebilen bakterilerdir. Bu özellikleri nedeniyle muhtemel LAB olarak tanımlanmışlardır.

3.1.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında indikatör olarak kullanılan bakteriler

Çalışmada bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla Çizelge 3.1’de kullanılan Gram pozitif ve Gram negatif test bakterilerinin isimleri ve katalog numaraları veya temin edildiği kaynaklar verilmiştir.

Çizelge 3.1. Test Bakterileri

Bakteriler	Suş numaraları
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Listeria monocytogenes</i>	LMG 13305
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 2783
<i>Micrococcus luteus</i>	NRRL B 1018
<i>Enterococcus faecalis</i>	NRRL 29212
<i>Escherichia coli</i> O157	ATCC 35150
<i>Escherichia coli</i>	LMG 8223
<i>Bacillus cereus</i>	LMG 8221
<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL NRS 744
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Serratia marcescens</i>	NRRL B 2544
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Streptococcus faecalis</i>	NRRL B 14617
Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Klinik izolat, ESOGÜ
Vankomisin dirençli <i>Enterococcus</i> (VRE)	Klinik izolat, ESOGÜ
Metisilin dirençli <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Anadolu Üniversitesi
Metisilin ve vankomisin dirençli <i>Staphylococcus warneri</i>	Anadolu Üniversitesi
Metisilin ve vankomisin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>	Anadolu Üniversitesi
Metisilin ve vankomisin dirençli <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Anadolu Üniversitesi
Metisilin ve vankomisin dirençli <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Anadolu Üniversitesi
Vankomisin dirençli <i>Staphylococcus hominis</i>	Anadolu Üniversitesi
<i>Lactobacillus pentosus</i>	NRRL B 227
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	NRRL B 633
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	NRRL B 634
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	NRRL B 1118
<i>Lactobacillus fermentum</i>	NRRL B 1840
<i>Weisella viridescens</i>	NRRL B 1951
<i>Enterococcus faecium</i>	NRRL B 2354
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NRRL B 4495
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B 4496

3.1.3. Kullanılan besiyerleri

3.1.3.1. Arjinin dihidrolaz besiyeri

Pepton	1,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Fenol red	0,01 g
DL-arjinin HCl	10,0 g
Agar	3,0 g
Distile su	1000,0 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözülüp pH'sı 7,2 olarak ayarlandıktan sonra otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edilip kullanılmıştır. Besiyeri otoklavlandıktan sonra tüplere dağıtılıp tüpler dik olacak şekilde dondurulmuştur.

3.1.3.2. Deoksiribonükleaz (DNaz) agar

Tryptose	20,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Deoksiribonükleik asit	2,0 g
Agar	15,0 g
Distile su	1000,0 ml

Otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edilip kullanılmıştır.

3.1.3.3. Gliserol içeren stok kültür besiyeri

1 litre MRS broth içerisine 200 ml gliserol eklenerek otoklavda 1,1 atmosfer basınçta, 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Aseptik koşullarda steril ependorf tüplerine 1 ml aktarılmıştır.

3.1.3.4. Jelatin agar

Pepton	5,0	g
Agar	15,0	g
Jelatin	4,0	g
Distile Su	1000	ml

Otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edilip kullanılmıştır.

3.1.3.5. Kanlı agar (50 ml/L koyun kanı içeren)

Nutrient broth	20,0	g
Sodyum klorür	5,0	g
Agar	15,0	g

Besiyeri içeriği distile su içinde eritilip ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika steril edilmiştir ve pH 6,8±0,2'ye ayarlanmıştır. Otoklavdan sonra besiyeri 45-50 °C'ye soğutulmuştur, %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilerek karıştırılmıştır. Steril petrilere 15 ml dökülmüştür.

3.1.3.6. Litmus milk

Skim milk	100,0 g
Litmus	0,075 g
Distile su	1000,0 ml

Otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edilip kullanılmıştır.

3.1.3.7. MRS agar (Merck)

D(+) Glukoz	20,0 g
Et ekstraktı	10,0 g
Pepton	10,0 g
Maya ekstraktı	4,0 g
Tween 80	1,0 g
Sodyum asetat	5,0 g
Di-Amonyum hidrojen sitrat	2,0 g
Di Potasyum hidrojen fosfat	2,0 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Mangan sülfat	0,04 g
Agar-agar	14,0 g
Distile su	1000,0 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözdürülüp, otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir, pH'sı $5,7 \pm 0,2$ olarak ayarlanmıştır. Steril edilen

besiyeri 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

3.1.3.8. MRS broth (Merck)

D(+) Glukoz	20,0 g
Et ekstraktı	10,0 g
Pepton	10,0 g
Maya ekstraktı	4,0 g
Tween 80	1,0 g
Sodyum asetat	5,0 g
Di-Amonyum hidrojen sitrat	2,0 g
Di Potasyum hidrojen fosfat	2,0 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Mangan sülfat	0,04 g
Distile su	1000,0 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözdürülmüş 5'er ml küçük tüplere aktarılıp otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra kullanılmıştır, pH'sı $5,7 \pm 0,2$ ayarlanmıştır.

3.1.3.9. NaCl içeren MRS broth

İçeriği belirtilmiş MRS broth besiyeri içeriğine % 4, 6,5 ve 18 oranında NaCl ilave edilip otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.1.3.10. Nişastalı Nutrient agar

Pepton	5,0 g
Et ekstraktı	3,0 g
Nişasta	10,0 g
Agar-agar	12,0 g
Distile su	1000,0 ml

Besiyeri bileşenleri distile suda çözülmüş ve 121 °C’de 15 dk otoklavlanmıştır.

3.1.3.11. Nutrient agar (Merck)

Pepton	5,0 g
Et ekstraktı	3,0 g
Agar-agar	12,0 g
Distile su	1000,0 ml

Besiyeri bileşenleri distile suda ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

3.1.3.12. Nutrient broth (Merck)

Pepton	5,0 g
Et ekstraktı	3,0 g
Distile su	1000,0 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözdürölüp 5'er ml küçük tüplere aktarılıp otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.3.13. Safra tuzu içeren MRS broth

İçeriği belirtilen MRS brotha %0,3, %0,5 ve %1 oranında safra tuzu ilave edilerek 5'er ml tüplere dağıtılmıştır. Otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.3.14. Skim milk içeren Nutrient agar

İçeriği verilmiş Nutrient agara %10 oranında skim milk ilave edilmiştir. Otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra petrilere 15 ml dökülmüştür.

3.1.3.15. Sorbitol içeren MRS broth

İçeriği belirtilen MRS brotha %1 oranında sorbitol eklenmiştir ve 0,018 g/L fenol red ilave edilmiştir. pH 7,4'e ayarlandıktan sonra tüplere 5 ml dağıtılmıştır. Otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.3.16. Sukrozlu MRS agar

MRS agar besiyeri içeriği aynen hazırlanır ancak glukoz yerine 20,0 g sukroz eklenip ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121° C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra petrilere 15 ml dökülmüştür.

3.1.3.17. %0,01'lik TTC içeren MRS agar

MRS agar besiyeri içeriği hazırlanmış ve içerisine %0,01 oranında TTC ilave edilmiş ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra petrilere 15 ml dökülmüştür.

3.1.3.18. %0,04 Tellurite içeren MRS agar

MRS agar besiyeri içeriği hazırlanmış ve içerisine %0,04 oranında tellurite ilave edilmiş ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra petrilere 15 ml dökülmüştür.

3.1.3.19. Yapay mide sıvısı

NaCl	0,5 g
Pepsin	0,3 g
Distile su	100,0 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözülerek pH'sı HCl ile ayarlandıktan sonra filtreden geçirilip sterilize edilerek kullanılmıştır (Vinderola and Reinheimer, 2003).

3.1.4. Kullanılan boyalar ve çözeltiler

3.1.4.1. Askorbik asit çözeltisi

5 mg askorbik asiti 10 ml distile suda çözülmüştür. Elde edilen çözeltiden 750 µl alınıp 10 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.4.2. Bradford Reaktifi

Ticari Bradford reaktifi (B6916, SIGMA) kullanılmıştır.

3.1.4.3. Butillenmiş hidroksi toluen (BHT) çözeltisi

5 mg BHT'yi 10 ml %95'lik metanolde çözülmüştür. Elde edilen çözeltiden 750 µl alınıp ve 10 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.4.4. DPPH çözeltisi

5 mg DPPH 100 ml %95'lik metanolde çözülmüştür. DPPH çözeltisi her çalışmada taze olarak hazırlanmalıdır. DPPH'in saklanması durumunda absorbansında değişiklikler meydana gelmesi nedeniyle tercih edilmez.

3.1.4.5. Fizyolojik tuzlu su (FTS)

Sodyum klorür	8,5	g
Distile su	1000	ml

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır.

3.1.4.6. Kristal viyole

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

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

3.1.4.7. Lugol

İyot	5,0	g
Potasyum iyodür	10,0	g
Distile su	100,0	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).

3.1.4.8. Potasyum Fosfat tamponu

KH_2PO_4	13,60	g
K_2HPO_4	22,82	g
Distile su	100,00	ml

KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 ayrı ayrı 100 ml suda çözdürülmüştür. Bu iki çözeltilerden de uygun miktarlarda alınarak karıştırılmıştır ve pH 6'ya ayarlanmıştır.

3.1.4.9. Safranin

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

Safranin alkol içerisinde çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır (Temiz, 2000).

3.1.4.10. Sodyum fosfat tamponu

Sodyum fosfat 0,7 g

Distile su 100 ,0 ml

Sodyum fosfat distile su içerisine çözüldükten sonra pH 6'ya ayarlanmıştır.

3.1.4.11. 1M NaOH çözeltisi

NaOH 40,0 g

Distile su 1000,0ml

Sodyum hidroksit bir miktar distile suda çözdürülüp 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.4.12. α – Naftol çözeltisi

Çözelti 5,0 g α – naftolün 100,0 ml %95'lik etil alkolde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.4.13. % 40'lık KOH çözeltisi

Potasyum hidroksit 40,0 g

Distile su 100,0 ml

Çözelti, 40 g potasyum hidroksit bir miktar distile suda çözdürüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.1.4.14. Tris-Tricine Jel

Solüsyonlar	Yürütme Jeli	Yükleme Jeli
%40'lık Akrilamid	2000,0 µl	161,5 µl
Jel Tamponu	2000,0 µl	384,6 µl
%70'lik Gliserol	800,0 µl	-
H ₂ O	1240,0 µl	1030,0 µl
%10 APS	26,6 µl	12,3 µl
TEMED	2,64 µl	1,23 µl

Yürütme jeli hazırlanıp dökülmüş ve donması beklenmiştir, üzerine yükleme jeli hazırlanıp dökülmüştür (Shagger and Von Jagow, 1987).

3.1.4.15. Tricine yükleme tamponu

4X Tris.Cl/SDS

Tris base (final 0,5M) 6,05 g tartılıp 40 ml distile suda çözüldükten sonra çözeltinin pH'sı 6,8'e ayarlanmış ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözeltiye 0,4 g SDS ilave edilip 1 gece 4 °C'de bekletilmiştir.

2X Tricine örnek tamponu

4X Tris.Cl/SDS; 2 ml, gliserol; 2,4 ml, SDS; 0,8 g, coomassie blue; 2 mg karıştırılmıştır ve çözelti distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.5. Kullanılan antibiyotik diskleri

Chloramphenicol (OXOID)	30 µg
Gentamicin (OXOID)	10 µg
Amoxycillin (OXOID)	25 µg
Penicilin G (OXOID)	10 U
Streptomycin (BIOANALYSE)	10 µg
Bacitracin (BIOANALYSE)	0,04 u
Optochin (BIOANALYSE)	5 µg
Polymixin B (BIOANALYSE)	300 µg
Novabiocin (BD BBL™ Sensi - Disc™)	30 µg
Erythromycin (BBL™ Sensi - Disc™)	15 µg
Lincomycin (BD BBL™ Sensi - Disc™)	2 µg
Vancomycin (BD BBL™ Sensi - Disc™)	30 µg
Methicillin (FLUKA)	10 µg

3.2. METOD

3.2.1. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etki spektrumlarının belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde agar sandviç ve agar kuyu yöntemleri kullanılmıştır (Asutay, 2007).

3.2.1.1. Agar sandviç yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde agar sandviç yöntemi kullanılmıştır (Mayr-Harting et al., 1972). Steril koşullarda hazırlanan MRS agar 9 cm'lik petrilere 15 ml olarak dökülmüştür. Laktik asit bakterilerinin 24 saatlik taze kültürleri petrilere 5 µl ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İndikatör olarak kullanılacak bakterilerin aktifleştirilmiş kültürlerinin optik yoğunluğu McFarland 1'e (Merck, Germany) göre ayarlanıp 7 ml'lik %0,8'lik nutrient agara ilave edilmiştir ve vorteks ile karıştırılıp laktik asit bakterilerinin gelişiminin gözlemlendiği MRS agar petrilere üzerine dökülmüştür. Sonradan eklenen besiyeri katıldıktan sonra, petrilere buzdolabında +4 °C' de 1 saat bekletilmiştir. Bu petrilere indikatör test bakterilerinin optimum büyüme sıcaklıklarına uygun sıcaklıklardaki etüvlere konulup 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm) ölçülmüştür.

3.2.1.2. Agar kuyu yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

LAB MRS brothta 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra büyümenin gerçekleştiği besi ortamı 5000 rpm de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant ayrılmıştır. LAB'nin ürettiği bakteriyosinin antimikrobiyal spektrumunu belirlemek için kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Sifour et al., 2012).

Steril koşullarda hazırlanan nutrient agar 9 cm'lik petrilere 10 ml dökülmüştür. İndikatör olarak kullanılacak bakterilerin gecelik kültürlerinin optik yoğunluğu

McFarland 1'e göre ayarlanarak 7 ml'lik %0,8'lik nutrient agar tüplerine 200 µl eklenip vorteks yardımıyla karıştırılarak nutrient agar bulunan petrilere dökülmüştür. Bu işlemden sonra +4 °C'de 1 saat boyunca bekletilen petrilere 10 mm çapında kuyucuk açılmıştır. Bu kuyucuklar süpernatant ile (95 µl) doldurulmuş ve süpernatantın agara difüze olabilmesi için petrilere +4 °C'de 2 saat bekletildikten sonra 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür.

LAB geliştikleri ortamda bakteriyosin üretiminin yanı sıra inhibitör özellikle bazı organik asitler ve H₂O₂ gibi metabolitler üretebilirler. İndikatör test bakterilerinin gelişiminin, organik asit üretiminden kaynaklanan düşük ortam pH'ı ya da H₂O₂ gibi metabolitler tarafından engellenmediğini belirlemek amacıyla LAB izolatlarından elde edilen süpernatantların pH'sı 6,5'e ayarlanmıştır. Daha sonra süpernatant içinde bulunması olası H₂O₂'in giderimi için ortama 1 mg/ml lik katalaz enzim çözeltisi ilave edilerek 37 °C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu şekilde ön işlemden geçirilen süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.2. Virulans faktörlerinin belirlenmesi

3.2.2.1. DNaz testi

LAB izolatlarının saf kültüründen bir koloni Deoksiribonükleaz (DNaz) agar besiyerine ekilmiştir ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petrinin üzeri 1N HCl ile kaplanmıştır. Koloniler çevresinde şeffaf zon varlığında, deoksiribonükleaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark, 1989).

3.2.2.2. Hemoliz testi

LAB izolatlarının saf kültürleri 50 ml/L koyun kanı içeren kanlı agar besiyerine inoküle edilmiştir ve uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilmiştir. Gelişen koloniler çevresinde eritrositlerin lizisini ifade eden şeffaf bir zon oluşumu aranmıştır. Koloni

çevresinde yeşilimsi renk oluşması, eritrositlerin kısmi hidrolizini (α -hemoliz), şeffaf zon oluşumu ise tam hidrolizi (β -hemoliz) işaret etmektedir. Eğer izolat hemolizine sahip değilse, eritrositleri parçalayamayacaktır ve bu durum da γ -hemoliz olarak ifade edilmiştir (Tamer ve ark, 1989).

3.2.2.3. Jelatinaz testi

LAB izolatları, iğne öze ile jelatin agar içeren tüplerin yüzeyine batırılarak ekilmiş 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 4 °C'de bekletilmiştir. İnkübasyonun 24. saatinden itibaren her gün kontrol edilmiştir. İnokülasyon çizgisi boyunca sıvılaşmanın görülmesi jelatin hidrolizinin varlığı olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark, 1989).

3.2.2.4. Koagülaz testi

İncelenecek LAB kültürleri lamda tavşan plazması (Merck, Germany) ile muamele edilip plazmada koagülasyon aranmıştır. İncelenecek bakteri kolonisi, lam üzerinde iki ayrı yerde süspanse edildikten sonra bir tanesi üzerine 1 damla izotonik tuzlu su diğereine plazma ilave edilmiştir. Karşılaştırmalı olarak göz ve mikroskopla aglütinasyon aranmıştır. Beş saniye içerisinde koagülasyon oluşumu pozitif reaksiyonu göstermiştir. 2 dakika içerisinde oluşmamış ise test sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. Süpernatanların protein miktarlarının belirlenmesi

Süpernatanların protein miktarları Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. 100 μ l bradford çözültisi üzerine 20 μ l süpernatan eklenerek karıştırılmıştır. 10 dakika karanlıkta bekletildikten sonra Thermo Nanodrop spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür ve protein miktarı belirlenmiştir.

3.2.4. LAB izolatının (2 nolu izolat) fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması

LAB izolatının klasik yöntemlerle tanımlanması amacıyla bazı fizyolojik ve biyokimyasal testler yapılmıştır. Moleküler tanımlama ile de izolatın kimliği doğrulanmıştır.

3.2.4.1. Fizyolojik testler

Farklı sıcaklıklarda ve farklı tuz konsantrasyonlarında büyüme, 60 °C’de canlı kalabilme, pH 4,4 ve 9,6’da büyüme ve hareketlilik gibi fizyolojik testler yapılmıştır.

3.2.4.1.1. Farklı sıcaklıklarda büyüme

İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişme yeteneklerinin belirlenmesi için, 24 saatlik aktif LAB kültürleri MRS broth tüplerine %2 oranında ekilmiş ve 4, 15, 45 ve 50 °C’de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerde üreme olup olmadığı gözlenmiştir.

3.2.4.1.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında büyüme

Bu çalışma izolatların farklı tuz konsantrasyonlarında büyüme yeteneklerinin belirlenmesi için yapılmıştır. %4, %6,5 ve %18 oranında NaCl içeren MRS brotlara aktif LAB kültürü (%2) ekilmiştir. 37 °C’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon sonunda büyüme olup olmadığı gözlenmiştir (Elçioğlu, 2010).

3.2.4.1.3. 60 °C’ de canlı kalabilme yeteneği

Taze kültür MRS broth tüplerine ekilmiştir ve 60 °C’ye ayarlanmış su banyosunda bekletilmiştir. Sırasıyla 15, 30 ve 60. dakikalarda örnek alınıp MRS agar

petrilere 5'er µl damlatılarak 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üreme varsa sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Manero and Blanch, 1999).

3.2.4.1.4. pH 4,4'te büyüme

MRS broth besiyeri hazırlanarak pH'sı 4,4'e ayarlanmıştır. Besiyeri 5'er ml küçük tüplere dağıtılmıştır. Taze LAB kültürü bu besiyerine ekilmiş ve 24-72 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerde gelişme olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.4.1.5. pH 9,6'da büyüme

MRS broth besiyeri hazırlanarak pH'sı 9,6'ya ayarlanmıştır. Besiyeri 5'er ml küçük tüplere dağıtılmıştır. Taze LAB kültürü bu besiyerine ekilmiş ve 24-72 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerde gelişme olmuşsa sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Başyigit, 2004).

3.2.4.1.6. Hareketlilik testi

MRS brothta aktiflenen gecelik kültür %0,8 MRS agar içeren tüplere iğne öze ile batırılarak ekim yapılmıştır ve 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda inokülasyon hattının yanlarına doğru yayılmış, bulanıklık şeklinde büyüme görülen tüpler pozitif, inokülasyon hattının yanlarına yayılmamış ancak büyüme görülen tüpler negatif olarak değerlendirilmiştir (Asutay, 2007; Bilgin, 2008).

3.2.4.2. Biyokimyasal Testler

EPS üretimi, %0,01'lik TTC' de büyüme, arjininden amonyak oluşumu, %0,04 telluritte büyüme, CO₂ üretimi, nişasta hidrolizi, metilen mavili sütte büyüme, litmus

milkte büyüme, kazein hidrolizi, sorbitol fermentasyonu, Voges – Proskauer (VP) testleri uygulanmıştır.

3.2.4.2.1. EPS üretimi

Ekzopolisakkarit üretiminin olup olmadığını gözlemleyebilmek için MRS agar hazırlanırken glukoz yerine sukroz kullanılmıştır. Besiyeri plaklara dökülmüş ve 5 µl aktif LAB kültürleri ekilmiştir. 37 °C’de 72 saat inkübasyondan sonra ekzopolisakkarit üretiminin varlığı mukoid koloni oluşumu ile belirlenmiştir (Kıran, 2006).

3.2.4.2.2. %0,01’lik TTC’ de büyüme

Otoklavlanan besiyeri petrilere dökülmüş ve petrilere 5 µl aktif kültürlerden ekim yapılmıştır. 37 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra büyüme pembe koloniler şeklinde gözlemlenirse sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Manero and Blanch, 1999).

3.2.4.2.3. Arjininden amonyak oluşumu

24 saatlik aktif kültürler iğne özeye besiyerine daldırılarak ekim yapılmıştır ve 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mor renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Mor renk amonyak oluşumunu, sarı renk ise asit oluşumunu göstermektedir (Harrigan, 1998).

3.2.4.2.4. %0,04 Telluritte büyüme

MRS agara %0,04 oranında tellurite eklenmiştir. Besiyeri plaklarına 5 µl aktif kültür inokule edilmiştir (inkübasyon süresi 37 °C’de 24 saat). Sonucun pozitif değerlendirilebilmesi için büyümenin siyah koloniler şeklinde gözlenmesi gerekmektedir (Manero and Blanch, 1999).

3.2.4.2.5. CO₂ üretimi

MRS brothta aktifleştirilen LAB kültürleri, içinde durham tüpü bulunan 5 ml'lik MRS broth tüplerine 0,1'er ml ekilmiştir. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra gaz çıkışı olup olmadığı gözlenmiştir. Durham tüpünde gaz kabarcığı oluşturan izolatlar heterofermentatif, kabarcık oluşturmeyen izolatlar ise homofermentatif olarak belirlenmiştir (Çon ve Gökalp, 2000).

3.2.4.2.6. Nişasta hidrolizi

Aktifleştirilmiş LAB kültürleri, petrilere dökülmüş nişastalı Nutrient agar üzerine 5'er µl ekilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra büyümüş koloni üzerine lugol damlatılarak renk değişimi olup olmadığı gözlenmiştir. Koloni çevresi mavi renge boyanmışsa, bakteri nişastayı hidrolize edememiş, koloni çevresi boyanmamışsa nişasta hidrolize uğramış olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.2.7. Metilen mavili sütte büyüme

Metilen mavili süt tüplere dağıtılıp aktif kültürlerden (%2) ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası mavi rengin beyaza dönüşümü ve pıhtı oluşumu belirlenerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Başyiğit, 2004).

3.2.4.2.8. Litmus milk' te büyüme

Hazırlanan besiyeri tüplere 5'er ml dağıtılarak 121 °C'de 5 dakika otoklavlanmıştır. Tüplere 100 µl LAB kültürlerinden ekim yapılmıştır. 37 °C'de 1-14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca her gün renk değişimi ve çökelme olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.4.2.9. Kazein hidrolizi

Nutrient agara %10 oranında skim milk eklenerek hazırlanan besiyeri otoklavlandıktan sonra petrilere dökülmüştür (Harrigan, 1998). Petrilere 24 saatlik aktif LAB kültürleri 5 µl ekilmiştir. 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir ve koloni çevresinde şeffaf zon oluşumuna bakılmıştır.

3.2.4.2.10. Sorbitol fermentasyonu

Tüplere dağıtılan besiyerine %2 oranında kültür inoküle edilmiştir (37 °C’de 24 saat). Besiyeri renginin sarıya dönüşümü pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Manero and Blanch, 1999).

3.2.4.2.11. Voges – Proskauer (VP) testi

Pekçok bakteri, basit bir şeker olan glikozu parçalayarak nötral bir ürün olan asetoin (asetil metil karbinol) oluşturur. Asetoin, potasyum hidroksit (KOH) varlığında oksitlenerek diasetil meydana getirir. Bu ürün ise alfa naftol ile reaksiyona girdiğinde kırmızı renk oluşturur. Aktifleştirilmiş taze kültürler MR-VP broth (Merck) tüplerine ekilmiş 37 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üzerine, 1ml %40’ lık KOH, daha sonra 3ml %5’ lik α -naftol çözeltileri ilave edilmiştir. Besiyeri çalkalandıktan sonra 10-15 dakika içinde kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu göstermiştir. (Asutay, 2007).

3.2.4.3. LAB izolatının Biolog Microbial ID sistemi ile tanımlanması

Biolog tanımlama sisteminin kitleri ile belirlenen 94 adet biyokimyasal özellik Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Biolog Microbial ID sistemine ait kitte bulunan testler

GEN III MicroPlate™

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-Raffinose	B2 α-D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β-Methyl-D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	B7 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α-D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 β-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Arabitol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-PO4	D7 D-Fructose-6-PO4	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troleandomycin	D11 Rifamycin SV	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyroglytamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Niaproof 4
F1 Pectin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Gluconic Acid	F5 D-Glucuronic Acid	F6 Glucuronamide	F7 Mucic Acid	F8 Quinic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium Violet	F12 Tetrazolium Blue
G1 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α-Keto-Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo-Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ-Amino-Butyric Acid	H3 α-Hydroxy-Butyric Acid	H4 β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	H5 α-Keto-Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

3.2.4.4. Moleküler yöntemler

İleriki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen LAB izolatının moleküler düzeyde tanımlanmasında “Bioeksen Medikal ve Biyoteknolojik Araştırma Sistemleri”’nden hizmet alımı yapılmıştır. Firma tarafından kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir.

3.2.4.4.1. DNA izolasyonu

DNA İzolasyonu için Biospeedy DNA İzolasyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki gibidir.

1. Bir mikrofüt tüpüne 600 µl Parçalama Tamponu (%2 CTAB - hexadecyltrimethylammonium bromide, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4

M NaCl) eklenmiş, daha sonra katı besi yerinden alınan yaklaşık 200 mg bakteri kolonisi tamponun içine bırakılmıştır.

2. Numunenin homojenizatörde 2 dakika, 6000 rpm'de homojenizasyonundan sonra 95°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
3. Tüp 14000 RPM'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen üst sıvı yeni bir tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen üst sıvı hacmi kadar isopropanol, üst sıvı hacminin 2 katı kadar Bağlama Tamponu (6,75M Guanidinium thiocyanate, 15mM Tris-Cl pH 8,0) eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır.
4. Karışım DNA Kolonu'na eklenmiş, 14000 RPM de 1 dakika santrifüj edildikten sonra alt sıvı atılmıştır.
5. Kolona 500 µl İnhibitör Eleme Tamponu (5 M thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6, %40 EtOH) eklenmiş, 14000 RPM de 1 dakika santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır.
6. Kolona 500 µl Yıkama Tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5; 80% v/v Ethanol) eklenmiş, 14000 RPM de 1 dakika santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Bu adım iki defa daha tekrarlanmıştır.
7. Kolun 14000 RPM de 1 dakika boş santrifüj edildikten sonra steril yeni bir mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiş, 100 µl Çözücü Tampon eklenmiş, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 14000 RPM de 1 dakika santrifüj edilmiş ve DNA izolatu elde edilmiştir.
8. Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

3.2.4.4.2. Gerçek zamanlı PCR (Q-PCR)

Q-PCR için Biospeedy Bakteriyel Çeşitlilik Çalışma Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit bakteri 16S rRNA'sının, *Escherichia coli* numaralandırmasıyla 8-1522 bazları arasını hedefleyen 5'-AGAGTTTGATC(CA)TGGCTCAG-3' ve geri 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' primerlerini içermektedir. Bütün reaksiyonlarda Roche Light Cycler Nano (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Reaksiyon 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0,1U Fast Start Taq DNA

Polimeraz, 1x EvaGreen, 5 ng/ μ l kalıp DNA ve her bir primerden 0,5 μ M içermektedir. Cihazda, primer çiftine özgü optimizasyonu sağlanmış Çizelge 3.3.'de verilen ısı döngüsü programı uygulanmıştır. Q-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 55°C - 95°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Q-PCR dataları Roche LightCycler NanoSoftware 1.0'da analiz edilmiştir.

Çizelge 3.3. Isı döngüsü programı

Tespit Formatı		Reaksiyon Hacmi		
SYBR Green		20 μ l		
Programlar				
Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Modu		
Ön-İnkübasyon	1			
Çoğalma	35	Sayım		
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi		
Soğuma	1			
Sıcaklık Hedefleri				
Hedef (°C)	Okuma Modu	Bekletme (hh:mm:ss)	Hız (°C/s)	Okuma (°C başına)
<i>Ön İnkübasyon</i>				
95		00:10:00	4,8	–
<i>Çoğalma</i>				
95		00:00:20	4,8	–
53		00:00:20	2,5	–
72	Tek	00:00:25	4,8	–
<i>Erime Eğrisi</i>				
95		00:00:05	–	–
65		00:01:00	–	–
98	Sürekli	–	1	10
<i>Soğuma</i>				
40	Tek	00:00:10	2,5	–

3.2.4.4.3. Dizi analizi ve filogenetik analiz

Dizi analizi için Bioeksen firmasından hizmet alınmıştır. Elde edilen bakteriyel ampliconların dizi analizleri Sanger yöntemiyle, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) belirlenmiştir. Dizi analizi hem ileri, hem de geri primerler kullanılarak, çift yönlü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen diziler 4peaks yazılımı (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>) ile analiz edilmiştir. Dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak belirlenmiştir. DNA data bankasındaki mevcut dizilere %97 ve

üzeri benzerlik gösteren diziler, benzer dizilime sahip organizma ile aynı tür olarak kabul edilmiştir. %70-97 arasında benzerlik gösteren türler ise, hem morfolojik özellikleri hem de 16S rRNA'larının en çok benzediği organizma göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. Bilinen bakteri türlerine 70%'den az benzerlik gösteren türler sınıflandırılmamış olarak listelenmiştir. DNA data bankasında mevcut dizilere %100'den daha az benzerlik gösteren diziler DNA data bankasına eklenmiştir.

3.2.5. Bakteriyosinin karakterizasyonu

Bakteriyosinin üretim özelliklerinin belirlenmesi için bakteriyosin aktivitesi üzerine; pH, ısı işlem, enzim uygulaması, organik çözücüler, deterjanlar ile muamele, depolama ömrü ve sürenin etkisi incelenmiştir.

3.2.5.1. Çeşitli proteolitik enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Proteinase K, α -kimotripsin, proteaz, pepsin (0,05 M Na₂HPO₄, pH:7) ve tripsin (0,05 M Na₂HPO₄, pH:7) enzimleri kullanılmıştır. Bu enzimlerin sodyum fosfat tamponunda (0,05 M Na₂HPO₄, pH:6) 1 mg/ml'lik çözeltileri hazırlanmıştır (Xiraphi, et al., 2008). Her biri filtre ile steril edilen enzim çözeltilerinden 25 μ l alınıp 250 μ l süpernatant ile karıştırılmıştır ve 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir (Abo-Amer and Shobrak, 2012). 2 saatlik inkübasyondan sonra enzim ile işlem görmüş süpernatantların antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyu yöntemi ile test edilmiştir. Kontrol olarak içerisinde enzim bulunan sodyum fosfat tamponu ve enzimler ile işlem görmemiş süpernatantlar kullanılmıştır. Sonuçlar % olarak hesaplanmıştır.

$$\% = A * 100/K$$

$$\text{Kontrol zon çapı (K)} = \%100$$

$$\text{İşlem görmüş zon çapı} = A$$

3.2.5.2. Bakteriyosinin farklı sıcaklık derecelerindeki stabilitesi

Süpernatantlar su banyosunda 60, 80 ve 100°C'de 30 ve 60 dakika, otoklavda 121 °C'de 15 ve 30 dakika boyunca ısıtılma tabii tutulmuştur. Kontrol grubu olarak ısıtılma görmemiş süpernatantlar kullanılmıştır. Isıtılma işleminin etkisini belirleyebilmek için agar kuyu yöntemiyle süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir (Köseoğlu, 2007; Urgas et al., 2012).

3.2.5.3. Bakteriyosinin farklı pH'lardaki stabilitesi

LAB izolatu MRS brotta 24 saat geliştirilip süpernatantı ayrılmıştır. Süpernatantların pH'sı sırasıyla 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11 olarak ayarlanmış, +4 °C'de 0, 6, 12, 18 ve 24 saat bekletilmiştir. Belirtilen saatlerde alınan örnekler nötrale edilerek agar kuyu yöntemi uygulanmış ve 37 °C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek aktivitesi belirlenmiştir. Kontrol olarak ise alınan örnekler nötrale edilmeden agar kuyu yöntemi uygulanmıştır (Köseoğlu, 2007).

3.2.5.4. Bazı organik çözücülerin ve deterjanların bakteriyosin stabilitesi üzerine etkisi

Bu çalışmada bakteriyosinin organik çözücüler ve deterjanlarla muamele edilmesinden sonra aktivitesini koruyup korumadığı araştırılmıştır.

3.2.5.4.1. Organik çözücülerin bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi

Bazı organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler; kloroform (%10), propanol (%10), metanol (%10), etil alkol (%10), aseton (%10), hekzan (%25) ve etil eter (%25) çözeltileridir. Bu çalışmada kontrol olarak, organik çözücü ile muamele edilmeyen süpernatantlar ve aynı konsantrasyondaki organik çözücüler kullanılmıştır. Bu çözeltilerden, 5 ml süpernatantın içerisine %10 oranında eklenmiştir ve 25°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra agar kuyu yöntemi kullanılarak örneklerin antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır (Asutay, 2007).

3.2.5.4.2. Deterjanların bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi

Bazı deterjanların bakteriyosin üzerine etkisinin belirlenmesi için, triton X-100, tween 80, sodyum dodesil sülfat (SDS), üre ve EDTA' nın %10'luk çözeltileri kullanılmıştır. Süpernatana bu çözeltilerden %1 oranında ilave edilerek 37 °C'de 5 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra ise işlem görmüş süpernatanın antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Kontrol olarak aynı konsantrasyondaki deterjanlar ile muamele edilmeyen süpernatana kullanılmıştır (Ivanova et al., 2000).

3.2.5.5. Liyofilize edilmiş bakteriyosin için uygun depolama sıcaklığı ve süresi

Uygun koşullarda hazırlanan süpernatana liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi -76 °C'de 0,0010 mbar basınç altında gerçekleştirilmiştir. Liyofilize örnekler +4, +25, -20 ve -80 °C'de 3 ay boyunca saklanmıştır. Aktivitenin korunup korunmadığını belirlemek amacıyla bu örneklerin antimikrobiyal aktiviteleri, 0, 7, 15, 30, 60 ve 90. günlerde örnek alınarak agar kuyu yöntemi uygulanmış ve inhibisyon zon çapları ölçülmüştür (Yıldırım and Johnson, 1998).

3.2.5.6. Bakteriyosin üreticisi için uygun saklama koşulu

Bakteriyosin üreticisi olan LAB izolatının saf kültürü sıvı MRS besiyerinde uygun koşullarda büyütülmüştür ve liyofilize edilerek +25, -20 ve -80 °C'de 3 ay boyunca saklanmıştır. 0, 7, 15, 30, 60 ve 90. günlerde liyofilize kültürler alınmış ve sıvı MRS besiyerinde aktifleştirildikten sonra süpernatana ayrılmıştır. Bu süpernatana test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu yöntemi ile belirlenmiştir (Asutay, 2007).

3.2.5.7. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması

Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması aşamasında ilk olarak elde edilen süpernantan vakum ile kurutulmuş ve liyofilize edilerek konsantre edilmiştir. Hazırlanan süpernantan (250 ml) tüplere 2'şer ml doldurularak konsantratörde 4 gün boyunca kurutulmuştur. Vakumla kurutulan süpernantan, protein miktarı $5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ olacak şekilde distile su ile çözülmüş ve agar kuyu yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Liyofilizasyon işlemi için 250 ml süpernantan hazırlanmıştır. Hazırlanan süpernantan 5'er ml cam kavanozlara doldurulmuş ve bir gece $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra kavanozlar liyofilizatöre yerleştirilmiş ve iki gün boyunca $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de kurutulmuştur. Liyofilize edilen süpernantan protein miktarı $5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ olacak şekilde distile su ile çözülmüş ve agar kuyu yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.5.7.1. Amonyum sülfat ile protein çöktürmesi

Bakteriyosin üreticisi olan izolat MRS brotha (250 ml) %4 inokulum yoğunluğunda olacak şekilde ekim yapılarak $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnbasyondan sonra MRS broth kültürü 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek kültür üst sıvısı ayrılmıştır. Amonyum sülfat ile çöktürme işlemi, süpernantanın son konsantrasyonu %40, %60 ve %80 olmak üzere, 3 aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Süpernantana son konsantrasyon %40 olacak şekilde miktarı hesaplanan amonyum sülfat 30 dakika süresince az az eklenmiştir ve 1 gece boyunca $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 100 rpm de bekletilmiştir. Daha sonra, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca 10000 (rpm) devirde santrifüj edilerek çöken katı faz ile üst kısım ayrılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen üst sıvı için aynı işlemler %60 ve %80'lik çöktürme için tekrarlanmıştır. Çökelti 3 ml 0,1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 6) çözülmüş ve eppendorf tüplere alınmıştır (Pingitore et al., 2007).

3.2.5.7.2. Diyaliz

Diyaliz için rejenere selüloz membran yapıda 3,500 MWCO SnakeSkin Dialysis Tubing 68035 diyaliz bandı kullanılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen 3 ml çözelti diyaliz membranına doldurulmuş, potasyum fosfat tamponunda (0,1 M), + 4 °C'de 1 gece diyalize bırakılmıştır. Diyaliz süresince tampon bir kez değiştirilmiştir. Diyaliz işlemi bittiğinde diyalizat (5,5 ml) diyaliz bandından alınıp tüplere aktarılmış ve elektroforetik profilinin belirlenmesi için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5.7.3. Bakteriyosinin elektroforetik profilinin belirlenmesi

Çöktürme ve diyaliz işlemlerinden sonra elde ettiğimiz kısmen saflaştırdığımız bakteriyosinin molekül ağırlığının belirlenmesi için SDS-PAGE kullanılmıştır. Yürütme için %16'lık Tris-Tricine jel hazırlanmıştır. Diyalizatın protein miktarı, Bradford yöntemi kullanılarak 595 nm'de spektrofotometrik (Thermo Scientific Nanodrop 2000) olarak ölçülmüştür. Protein miktarı belirlendikten sonra jele yüklenecek madde miktarı 5 µg olarak hesaplanmıştır. Elektroforez tankına anot ve katot tamponları koyulmuştur. Diyalizat, Tricine yükleme tamponunda çözülerek molekül ağırlığı belirlenecek olanlar 100 °C'de 3 dakika boyunca denatüre edilmiş, antimikrobiyal aktivitesi bakılacak örnek ise denatüre edilmeden jele yüklenmiştir ve marker (Sigma, M35461) ile birlikte yürütme işlemine başlanmıştır. Marker'ın bileşimi Çizelge 3.4'te verilmiştir. Yükleme jeli için 80 V, yürütme jeli için 120 V elektrik akımı uygulanmıştır (Shagger et al., 1987).

Yürütme işleminden sonra antimikrobiyal aktivitesine bakılacak jel kesilip boyamaya tabi tutulmadan SDS'yi uzaklaştırmak için %1'lik Tween 80 ile 3 kez 40'ar dakika yıkanmıştır (Yamamoto, 2003). Jel en son saf su ile birkaç kez yıkandıktan sonra 10 ml'lik Nutrient agar plağına yerleştirilmiştir. Üzerine indikatör bakteri içeren %0,8'lik Nutrient agar dökülerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Molekül ağırlığının belirleneceği jel ise derişimleri birbirinden farklı 3 değişik Commassie brilliant blue ile 15'er dakika boyanmıştır.

Çizelge 3.4. Ultra low molecular weight marker (Sigma (M.W. 1,060–26,600,Peptide and Protein Mixture in M3546).

Peptit/Protein	Moleküler Ağırlık (Da)
Triosephosphate Isomerase from rabbit muscle	26,600
Myoglobin from horse heart	17,000
a-Lactalbumin from bovine milk	14,200
Aprotinin from bovine lung	6,500
Insulin Chain B, oxidized, bovine	3,496
Bradykinin	1,060

3.2.5.7.4. Bakteriyosinin HPLC profilinin belirlenmesi

Bakteriyosinin saflaştırılmasında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Bu çalışma için C18 ters faz analitik protein peptid kolonu tercih edilmiştir. Çalışmalarda hareketli fazın akış hızı 1 dakikada 1 ml olacak şekilde ayarlanmış ve 60 dakika süresince 230 nm dalga boyunda absorbans izlenerek ayırım gerçekleştirilmiştir (Batista et al., 2007; Corzo et al., 2001). Hareketli faz olarak A ve B olarak adlandırılan iki farklı bileşimdeki çözeltiler kullanılmış ve ayırım sırasında hareketli faz lineer gradient olarak uygulanmıştır (Çaliskan et al., 2012). Çalışmada 60 dakika süresince, 0-100 %B tampon çözeltisi olacak şekilde gradient faz uygulanmıştır.

Fraksiyonlar 2 dakikalık aralıklar ile ependorf tüplere toplanarak kurutulup -20 °C'de saklanmıştır. Tüm fraksiyonların agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Steril koşullarda hazırlanan Nutrient agar petrilere 15 ml dökülmüştür. Petrilere test bakterisi olarak kullanılacak olan *S. aureus* kültürü 100 µl ekilerek dragalski spatülü ile yayılmıştır. 20 µl steril saf su ile çözülen fraksiyonlar 2 paralel olacak şekilde petrilere 5'er µl damlatılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.6. Bakteriyosin üretimi için optimum koşulların belirlenmesi

Bakteriyosini en verimli şekilde üretebilmek için sıcaklık, pH, inkübasyon süresi ve inokulum yoğunluğu gibi parametrelerin optimize edilmesi üzerine çalışılmıştır. Optimizasyon çalışmalarının antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan aktivite değerlendirme arbitraty unit (AU/ml) olarak yapılmıştır. Arbitraty unit belirlemede, önce *E. faecalis* KT11 suşunun süpernatanından 1/2-1/64 lük seri dilüsyonlar hazırlanmış, her bir dilüsyondan 95 µl alınarak aktiviteleri, agar kuyu yöntemi ile seçilen test bakterilerine karşı denenmiştir. Bakteriyosin aktivitesi (AU/ml) aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır (Köseoğlu, 2007).

$$\text{Bakteriyosin aktivitesi (AU/ml)} = 1000 * V^{-1} * D^{-1}$$

- D: inkübasyon süresi sonunda indikatör bakterinin gelişiminin engellendiği en yüksek dilüsyon oranı.
- V: petrillerdeki kuyucuklara koyulan süpernatan miktarı

3.2.6.1. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

E. faecalis KT11'in bakteriyosin üretimini sağladığı en uygun sıcaklık koşulunun belirlenmesi için izolat 25, 30, 35, 37, 40 ve 45 °C'de büyütülmüştür (Rajaram, 2010). Elde edilen süpernatanların seri dilüsyonları hazırlanmış ve antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır. Sonuçlar AU/ml cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.6.2. Optimum pH'nın belirlenmesi

E. faecalis KT11'in bakteriyosin üretiminin en iyi olduğu pH'nın belirlenebilmesi için laktik asit bakterisi başlangıç pH'ları 4, 5, 5,5, 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanan MRS brotlarda geliştirilmiştir (Leroy and Vuyst, 2001). Süpernatanların

seri dilüsyonları hazırlanarak aktivitesine bakılmıştır ve aktivite AU/ml cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.6.3. Optimum sürenin belirlenmesi

E. faecalis KT11'in bakteriyosin üretimi için en uygun süreyi belirlemek amacıyla; inkübasyon sırasında 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ve 24. saatlerde örnekler alınıp süpernatantların aktivitesine (AU/ml) bakılmıştır.

3.2.6.4. Optimum inokulum yoğunluğunun belirlenmesi

E. faecalis KT11 izolatının inokulum yoğunluğunun bakteriyosin üretimine etkisini saptamak için; MRS sıvı besiyerine %0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 4, 6, 8 ve 10 oranlarındaki bakteri kültürü inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi bittikten sonra süpernatantlar elde edilmiş ve bakteriyosin aktivitesine bakılmıştır (Asutay, 2007).

3.2.6.5. Anerobik koşullarda bakteriyosin üretme yeteneğinin belirlenmesi

Laktik asit bakterileri hem aerobik hem de anaerobik koşullarda gelişebildikleri için aerotolerant anaerob bakterilerdir. *E. faecalis* KT11 MRS besiyerine ekilerek (%5 CO₂) anaerobik inkübatörde 37 °C'de 24 saat geliştirilmiştir. Kültürün süpernatantı ayrılarak AU/ml cinsinden antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır.

3.2.7. Optimum koşulda üretilen bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi

Çalışmanın bu aşamasında, optimum koşullar sağlandıktan sonra, *E. faecalis* KT11'den elde edilen süpernatantın antimikrobiyal aktivitesinde bir değişim olup olmadığı belirlenmiştir. Bunun için, optimum koşullarda üretilen bakteriyosinin

antimikrobiyal aktivitesi Çizelge 3.1' de sunulan test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi, agar kuyu yöntemi ile yeniden denenmiştir.

3.2.8. *E. faecalis* KT11'in bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

E. faecalis KT11'in probiyotik potansiyelinin belirlenebilmesi amacıyla asidik pH'ya, safra tuzuna ve yapay mide sıvısına direncinin belirlenmesi, ayrıca antibiyotiklere duyarlılığın belirlenmesi gibi çalışmalar yapılmıştır.

3.2.8.1. Asidik pH'ya direncinin belirlenmesi

E. faecalis KT11'in asidik pH'ya karşı dirençli olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmış bir testtir. pH'sı 1, 2 ve 3'e ayarlanan MRS brotlara aktif kültürden ekim yapılmıştır ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu MRS brotlardan 2, 4 ve 6. saatlerde örnek alınarak MRS plaklarına ekim yapılmıştır ve bu plaklar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plaklarda büyüme olup olmadığına bakılarak *E. faecalis* KT11'in hangi pH'da ne kadar süre ile canlı kalabildiği belirlenmiştir.

3.2.8.2. Safra tuzuna direncinin belirlenmesi

%0,3 , %0,5 ve %1 oranında safra tuzu (Oxoid) içeren MRS broth besiyerine tazelenmiş *E. faecalis* KT11 kültüründen %4 oranından ekim yapılmıştır (Başyigit, 2004). 37 °C'de 6 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 6 saatin sonunda safra tuzuyla muamele edilmiş kültürden örnek alınıp MRS plaklarına 5 µl ekim yapılmıştır ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra büyüme var ise sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.8.3. Yapay mide sıvısına direncinin belirlenmesi

Yapay mide sıvısı hazırlandıktan sonra, derişik HCl ile pH'ları sırasıyla 2, 3 ve 4'e ayarlanmıştır. *E. faecalis* KT11 kültüründen pH'ları ayarlanan yapay mide sıvısına eklenerek 37 °C' de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Birer saat arayla (1, 2, 3 ve 4. saatlerde) 5 er µl örnek alınarak MRS agar plaklarına ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plaklarda üreme olup olmadığı denetlenmiştir (Vinderola and Reinheimer, 2003).

3.2.8.4. Antibiyotiklere duyarlılığın belirlenmesi

E. faecalis KT11'in bazı terapötik antibiyotiklere karşı direncinin belirlenmesinde chloramphenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), erythromycin (15 µg), streptomycin (10 mcg), amoxycillin (25 µg), novabiocin (30 µg), bacitracin (0,04 u), lincomycin (2 µg), methicillin (10 µg), penicilin G (10 u), optochin (µg), polymixin B (300 µg), vancomycin (30 µg) gibi antibiyotiklerin hazır diskleri kullanılmıştır. *E. faecalis* KT11 MRS brothta aktifleştirilmiş, yoğunluğu Mc Farland 1 tüpüne göre ayarlanmış, bu kültürden MRS plaklarına 0,1 ml yayma yöntemiyle ekilmiş ve antibiyotik diskleri plaklara yerleştirilmiştir. Petriyer 37 °C' de 24 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra ihibisyon zonları ölçülerek, sonuçlar değerlendirilmiştir (Yalanca, 2009; Uymaz, 2009).

3.2.9. *E. faecalis* KT11'e ait süpernatanın antioksidan aktivitesi

E. faecalis KT11'den elde edilen süpernatanın antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde DPPH Radikal Süpürücü Aktivite yöntemi kullanılmıştır. *E. faecalis* KT11 aerobik ve anaerobik koşullarda geliştirildikten sonra elde edilen süpernatanın antioksidan aktivitesine bakılmıştır. DPPH Radikal Süpürücü yönteminde süpernatanın üzerine taze olarak hazırlanan DPPH çözeltisi eklenmiştir ve oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda spektrofotometrede 517 nm de absorbans ölçümü yapılmıştır. DPPH antioksidan aktivite sonuçları

aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Hartwig et al., 2012, Ozgen et al., 2006). Pozitif kontrol olarak askorbik asit ve BHT kullanılmıştır.

$$\% \text{ DPPH} = (a-b) / a * 100$$

(a: DPPH absorbansı, b: örneğin absorbansı)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Ön Tanısı ve Seçimi

LAB Gram pozitif, katalaz negatif ve sporsuz bakterilerdir. Daha önceki bir çalışma kapsamında Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarında izole edilen ve belirtilen testleri yapıldıktan sonra, tipik özellikleri taşıyan bu izolatlar muhtemel LAB olarak kabul edilmiştir. LAB izolatları arasından inhibisyon zonları en büyük ve etki spektrumu en geniş olan 4 izolat seçilmiş ve bu izolatlar Gıda Mikrobiyolojisi kültür koleksiyonuna kayıt edilmiştir. Dört izolat da kok formunda, katalaz negatif ve sporsuz bakterilerdir, bunlar aşağıda sonuçları verilen çalışmalarda kullanılmıştır.

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Etki Spektrumlarının Belirlenmesi

Seçilen 4 izolatın farklı Gram pozitif ve negatif test bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisi önce agar sandviç yöntemi daha sonra ise agar kuyu yöntemi ile belirlenmiştir.

4.2.1. Agar sandviç yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Agar sandviç yöntemi ile yapılan çalışma sonunda seçilen 4 LAB izolatının çeşitli test bakterilerine gösterdiği antimikrobiyal aktivite Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi, seçilen 4 izolat Gram pozitif test bakterilerine karşı daha fazla antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Çizelge 4.1. LAB izolatlarının agar sandviç yöntemiyle çeşitli test bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite

Test Bakterileri	İnhibisyon Zon Çapları (mm)			
	İzolat 1	İzolat 2	İzolat 3	İzolat 4
<i>E. faecalis</i>	19,0±0,7	19,0±0,4	20,0±0,7	20,0±0,7
<i>E. coli</i>	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	17,0±0,4	13,0±0,0	17,0±0,4	13,0±0,7
<i>P. aeruginosa</i>	18,0±0,7	18,0±1,0	16,0±0,4	18,0±0,4
<i>B. subtilis</i>	18,0±0,7	18,0±0,0	19,0±0,7	17,0±0,7
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-
<i>M. luteus</i>	17,0±0,0	20,0±0,7	18,0±0,7	16,0±0,4
MRSA	18,0±0,0	21,0±0,7	20,0±0,7	13,0±0,7
VRE	19,0±0,7	17,0±0,0	18,0±1,0	-
<i>S. aureus</i>	19,0±0,7	21,0±0,0	19,0±0,7	18,0±0,7
<i>Lb. pentosus</i>	20,0±0,6	12,0±0,0	18,0±0,8	-
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	-	-	-	-
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	18,0±0,8	13,0±0,7	18,0±1,0	-
<i>Leuconostoc mes.</i> ssp. <i>mes.</i>	15,0±1,0	15,0±0,6	13,0±1,1	-
<i>Lb. fermentum</i>	19,0±0,6	-	14,0±0,4	-
<i>W. viridescens</i>	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>	19,0±0,8	13,0±1,0	19,0±0,8	-
<i>Lb. acidophilus</i>	15,0±0,5	15,0±0,6	15,0±0,9	-
<i>Lb. plantarum</i>	19,0±0,0	13,0±0,5	19,0±1,0	-

-: İnhibisyon yok

4.2.2. Agar kuyu yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

LAB izolatlarının MRS broth kültürlerinden elde edilen süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu yöntemiyle test edilmiş ve test sonunda belirlenen inhibisyon zon çapları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Antimikrobiyal etkinin düşük ortam pH’sından H₂O₂ üretiminden kaynaklanmadığını göstermek amacıyla LAB izolatlarından elde edilen süpernatantların

pH'ı 6,5'e ayarlanmış ve katalaz enzimi (1 mg/ml) ile muamele edilmiş ve daha sonra antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Sonuç olarak işlem görmüş ve işlem görmemiş süpernatantların aktivitesi arasında fark olmamıştır.

Çizelge 4.2. LAB izolatlarının agar kuyu yöntemi ile çeşitli test bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite

Test Bakterileri	İnhibisyon Zon Çapları (mm)			
	İzolat 1	İzolat 2	İzolat 3	İzolat 4
<i>E. faecalis</i>	-	16,0±0,0	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	13,0±0,0
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	14,0±0,0	15,0±0,0	13,0±0,3	16,0±0,7
<i>P. aeruginosa</i>	-	14,0±0,0	-	12,0±0,0
<i>B. subtilis</i>	15,0±0,0	-	11,0±0,7	13,0±0,0
<i>B. cereus</i>	15,0±0,6	-	16,0±0,0	17,0±0,0
<i>M. luteus</i>	-	16,0±0,3	15,0±0,0	14,0±0,5
MRSA	-	14,0±0,3	-	13,0±0,0
VRE	24,0±0,7	15,0±0,3	23,0±0,7	23,0±0,3
<i>S. aureus</i>	-	16,0±0,7	-	13,0±0,3
<i>Lb. pentosus</i>	14,00±0,3	-	14,0±0,0	-
<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	-	-	-	-
<i>Lc. lactis ssp.cremoris</i>	14,0±0,2	-	14,0±0,5	-
<i>Leuconostoc mes.ssp.mes.</i>	-	15,0±0,0	-	-
<i>Lb. fermentum</i>	14,0±0,0	-	14,0±0,3	-
<i>W. viridescens</i>	14,0±0,5	-	14,0±1,0	-
<i>E. faecium</i>	14,0±0,7	-	13,0±0,0	-
<i>Lb. acidophilus</i>	13,0±0,7	14,0±1,0	12,0±0,0	-
<i>Lb. plantarum</i>	14,0±0,2	-	13,0±0,7	-

-: İnhibisyon yok.

4.3. Virulans Faktörlerinin Belirlenmesi

Agar sandviç ve agar kuyu yöntemleriyle antimikrobiyal aktiviteleri test edilen 4 LAB izolatının çeşitli virulans faktörlerini taşıyıp taşımadıkları araştırılmış ve hemoliz, jelatinaz, DNAz ve koagulaz testlerinin sonuçları negatif olarak belirlenmiştir.

4.4. Süpernatantların Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Bakteriyosinler protein yapısındaki maddelerdir. Bu nedenle 4 izolata ait süpernatantlardaki protein miktarına bakılmıştır. Süpernatantlardaki protein miktarı Nanodrop ile belirlenmiş ve protein miktarı açısından en yüksek oran 2 nolu izolattan (78,213 µg/ml) elde edilmiştir. Çalışmanın bu aşamasından sonra Gram negatif test bakterilerine karşı aktif olan ve protein miktarı yüksek olan 2 nolu izolat ile çalışmalara devam edilmiştir.

4.5. LAB izolatının (2 nolu izolat) Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

LAB izolatının tanımlanması amacıyla bazı fizyolojik ve biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılmıştır.

4.5.1. Fizyolojik testler

LAB izolatının tanımlanması aşamasına bazı fizyolojik testler uygulanarak başlanmıştır. Yapılan testlerde izolatın 4 °C, 15 °C, ve 45 °C'de gelişebildiği, 50 °C'de ise gelişemediği gözlenmiştir. 60 °C'de 1 saat bekletilen LAB kültürünün 15 ve 30. dakikalarda canlı kalabildiği ancak 60. dakikada hücrelerin canlılığını yitirdiği belirlenmiştir. pH 4,4'te büyüme olmadığı, pH 9,6'da ise gelişebildiği belirlenmiştir. Hücrelerin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimleri incelendiğinde %4 ve %6,5 NaCl varlığında büyüyebildiği fakat %18 NaCl varlığında gelişemediği belirlenmiştir. Yapılan hareketlilik testinde ise sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3).

Genel olarak Enterokokların %6,5 tuz içeren ortamda ve pH 9,6'da gelişebildiği bilinmektedir. 10 ve 45 °C'de büyürler ve 60 °C'ye 30 dakika dayanabilmektedirler (Manero and Blanch, 1999). Streptokoklar ise 45 °C'de büyürler ancak 10 °C'de büyümmezler, ısıya duyarlıdırlar ve 60 °C'de ölürler (Köseoğlu, 2007). Laktokokların optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C'dir, 10 °C'nin altında ve 45 °C'nin üstünde gelişememe özellikleri ile hem Streptokoklardan hem de Enterokoklardan ayrılırlar (Ghamat, 2010). Bu kriterler Enterokokları, diğer gruplardan ayırt eder.

Bu testler Manero ve Blanch'ın (1999) identifikasyon anahtarı ile karşılaştırılarak 2 nolu LAB izolatının *Enterococcus* sp. olabileceği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.3. LAB izolatının tanımlanmasında uygulanan fizyolojik testler

Testler	2 nolu LAB İzolatı
4 °C'de Büyüme	+
15 °C'de Büyüme	+
45 °C'de Büyüme	+
50 °C'de Büyüme	-
60 °C 15' Canlı kalma	+
60 °C 30' Canlı kalma	+
60 °C 60' Canlı kalma	+
pH 4,4'te Büyüme	-
pH 9,6'da Büyüme	+
%4 NaCl	+
%6,5 NaCl	+
%18 NaCl	-
Hareketlilik	-

+: Büyüme var, -: Büyüme yok.

4.5.2. Biyokimyasal testler

LAB izolatının cins seviyesinde tanımlanabilmesi için uygulanan fizyolojik testlerin yanı sıra biyokimyasal testler de yapılmıştır. İzolatın ekzopolisakkarit ürettiği ve VP testinin pozitif olduğu belirlenmiştir. %0,01'lik TTC'de büyümediği, glikozdan gaz oluşturmadağı ve nişastayı parçalayamadığı belirlenmiştir. %0,1 ve %0,3 metilen mavisi içeren sütte LAB izolatının gelişebildiği belirlenmiştir. LAB izolatının arjininden amonyak ürettiği, %0,04 tellurite'te büyüebildiği, kazeini hidrolize edebildiği ve sorbitolu fermente edebildiği belirlenmiştir. Litmus katılmış sütte gelişen bakteri; gelişirken laktozu fermente etmiş ve sütle laktozun fermentasyonu sonucu asit oluşturmuş, litmusun rengi pembeye dönüşmüş ve aynı zamanda sütün pıhtılaşmasına neden olmuştur (Çizelge 4.4). Enterokokların Streptokoklardan farklı olarak %40 safta tuzunda, tellürite ve %0,1 metilen mavili sütte geliştiği bilinmektedir (Bergey, 1994; Manero and Blanch, 1999). Enterokokların kazeini hidrolize edebildiği fakat Streptokokların kazein hidrolizini gerçekleştiremediği bilinmektedir. LAB izolatının EPS üretimi, kazein hidrolizi ve laktozu fermente etmesi gibi özellikleri ile Laktokoklarla benzerlik gösterdiği fakat pH 9,6'daki büyüme ile Laktokoklardan farklı olduğu belirlenmiştir (Tuncer, 2005).

Yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları Bergey'in Belirleyici Bakteriyoloji Klavuzu ile karşılaştırıldığında elimizdeki LAB izolatının *Enterococcus* sp. olabileceği onaylanmıştır.

Çizelge 4.4. İzolatların tanımlanmasında uygulanan biyokimyasal testler

Testler	LAB İzolatı
CO ₂ Üretimi	-
EPS üretimi	+
%0,01 TTC'de büyüme	-
Arjininden NH ₃ üretimi	+
%0,04 Tellurite'de büyüme	+
%0,1 Metilen mavili sütte büyüme	+
%0,3 Metilen mavili sütte büyüme	+
Litmus indirgenmesi	+
Litmus milk'te asit oluşumu	+
Litmus'ta laktoz fermente etme	+
Kazein hidrolizi	+
Sorbitol fermentasyonu	+
Nişasta Hidrolizi	-
VP Testi	+

+: Büyüme var, -: Büyüme yok.

4.5.3. LAB izolatının Biolog Microbial ID sistemi ile tanımlanması

2 nolu izolatın tür tayinini yapabilmek amacıyla biyokimyasal testlere ek olarak Biolog test sistemi (GEN III OmniLog ID System, USA) kullanılmıştır. Bu test sonuçları Çizelge 4.5. de verilmiştir. Test sonuçları değerlendirildiğinde LAB izolatının *Enterococcus faecalis* (0,226), *Enterococcus gallinarum* (0,109) ve *Enterococcus haemoperoxidus* (0,055) türleri ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Biolog Microbial ID Test Sisteminden alınan LAB izolatına ait sonuçlar

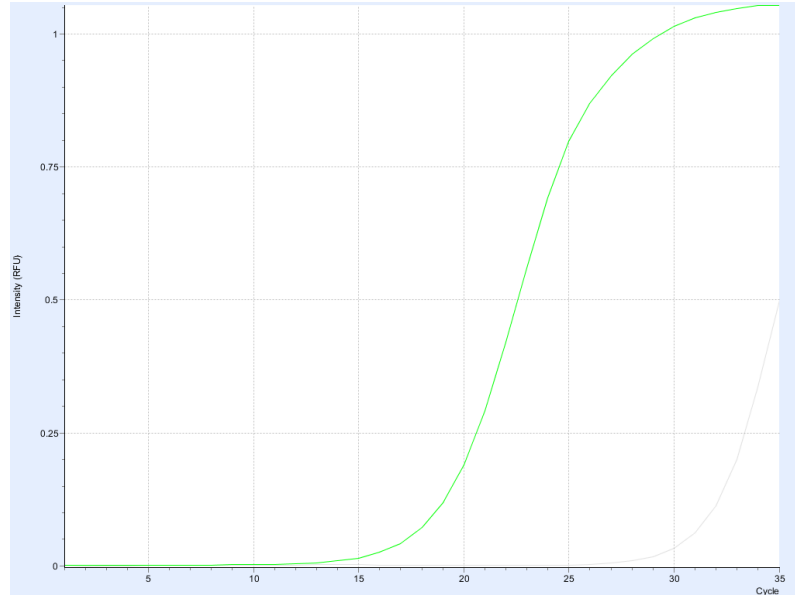
Well Color Values												
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	169	< 253	{ 197	< 228	{ 181	+x 222	{ 205	< 226	- { 180	< 250	< 252	{ 203
B	{ 171	< 223	{ 182	< 213	< 216	{ 195	< 243	< 239	164	< 248	< 247	< 239
C	148	+ { 191	< 255	< 231	< 215	{ 192	{ 188	{ 181	< 227	< 242	91	< 242
D	{ 175	+ { 184	{ 175	{ 186	< 264	< 246	< 245	{ 185	{ 185	98	< 243	- 89
E	125	156	166	{ 173	{ 189	{ 190	146	{ 189	{ 185	89	{ 222	67
F	{ 183	166	159	< 233	{ 178	163	{ 179	166	{ 172	113	< 365	- 95
G	94	{ 211	{ 172	157	< 268	{ 177	{ 183	< 254	< 260	< 247	{ 180	< 252
H	< 215	- 168	161	{ 180	< 237	< 226	{ 211	- < 215	{ 186	< 242	< 248	< 255

Anahtar: <x: pozitif, x: negatif, <x-: yalancı pozitif, x+: yalancı negatif, {x: sınırda

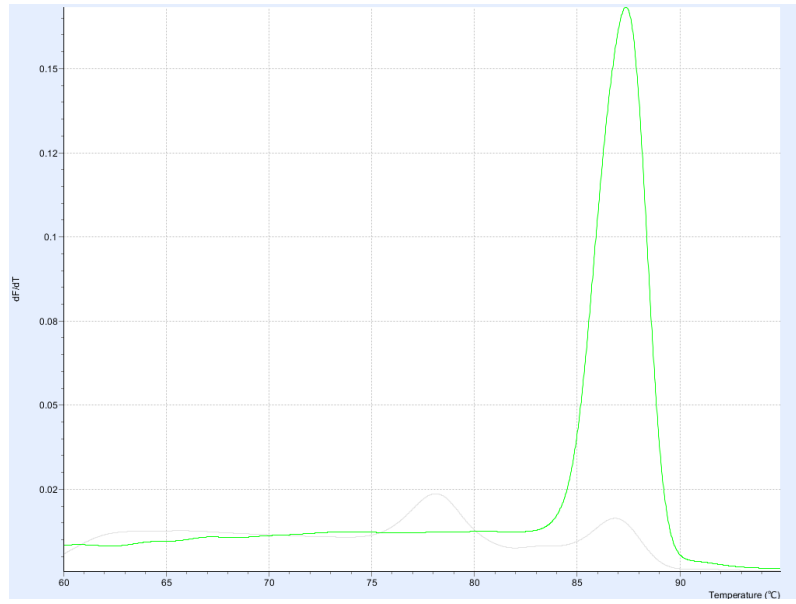
4.5.4. LAB izolatının moleküler yöntemler ile tanımlanması

4.5.4.1. Gerçek zamanlı PCR (Q-PCR) sonuçları

Q-PCR sonucunda elde edilen çoğalma ve erime eğrileri Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi, Q-PCR'da DNA'ların logaritmik çoğalmaya başladığı döngü sayısı (Eşik Döngü Sayısı CT) 20'nin altındadır. Bu durum DNA çoğalma reaksiyonunun verimli gerçekleştiğini göstermektedir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi, erime eğrisi analizi sonucunda tek bir pik elde edilmiştir. Bu durum PCR sonucunda tek bir ürün elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.1. Amplifikasyon Eğrisi



Şekil 4.2. Erime Eğrisi

4.4.5.2. Dizi analizi sonuçları

16 İleri Okuma:

TGCCTAATACATGCAAGTCCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTC
AATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACC
CATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTT
TATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGAT
GGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC
GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAA
AGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAA
CTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACG
GTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGTTTCTTAAGTC

16 Geri Okuma:

TCGACTTCCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGT
TACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAG
CGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACCTGAGAGA
AGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCC
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC
ATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACT
AAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCC
CCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGT
AAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG
GCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACC

Elde edilen biyoinformatik analiz sonuçları Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Numune Adı	Ham datada değerlendirilen kısım	16S rRNA'da eşleşen bazların pozisyon numaraları	DNA Databank No	Organizma	Gen	Benzerlik
LAB İleri Okuma	13-586	5-578	EF213036.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	16S ribozomal RNA	573/573 (100%)
LAB Geri Okuma	20-616	1472-878	KF06026.11			595/595 (100%)

Yapılan tanımlama testlerinin sonunda LAB izolatımızın *Enterococcus faecalis* olduğu belirlenmiştir.

4.6. *Enterococcus faecalis*'den Elde Edilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu

E. faecalis KT11'den elde edilen bakteriyosinin karakterizasyonu ve çeşitli koşullardaki stabilitesini belirlemede kullandığımız testlerde, indikatör test bakterisi olarak *S. aureus*, *M. luteus* ve *P. aeruginosa* türleri kullanılmıştır. Bu türler, denediğimiz bakteriyosine karşı daha yüksek bir duyarlılık göstermeleri nedeniyle devam eden çalışmalarda indikatör test bakterileri olarak seçilmiştir.

4.6.1. Çeşitli proteolitik enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Proteolitik enzimlerle muamele edilen bakteriyosinin pepsine karşı dayanıklı olduğu ancak tripsin, α - kimotripsin, proteaz ve proteinaz K ya karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Bu sonuçlar antimikrobiyal etkiden sorumlu maddenin protein yapısında olduğunu onaylamaktadır.

Çizelge 4.7. Proteolitik enzim uygulamasının *E. faecalis* KT11'den elde edilen kültür süpernatantının aktivitesi üzerine etkisi

Enzimler	İnhibisyon Zon Çapları (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>
Süpernatant (Kontrol)	15,0±0,0	18,0±0,6	15,0±0,8
Tripsin + Süpernatant	-	-	14,0±0,6
Tripsin + Tampon	-	-	-
Pepsin + Süpernatant	13,0±0,3	12,0±0,8	14,0±1,0
Pepsin + Tampon	-	-	-
α- Kimotripsin + Süpernatant	-	-	16,0±2,0
α- Kimotripsin + Tampon	-	-	-
Proteaz + Süpernatant	-	-	18,0±1,1
Proteaz + Tampon	-	-	-
Proteinaz K + Süpernatant	-	-	16,0±0,8
Proteinaz K + Tampon	-	-	-

-: İnhibisyon yok.

4.6.2. Bakteriyosinin farklı sıcaklık derecelerindeki stabilitesi

E. faecalis KT11'den elde edilen bakteriyosin farklı sıcaklıklarda bekletilmiş ve agar kuyu yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar antimikrobiyal aktiviteden sorumlu maddenin yüksek sıcaklıklarda bile stabilitesini koruduğunu göstermektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Farklı ısı işlemlerin *E. faecalis* KT11'den elde edilen kültür süpernatantının aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		Zon Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)
Kontrol		18,0±0,7	19,0±1,0	18,0±0,0
60	30	16,5±0,4	22,0±0,6	22,0±0,25
	60	16,0±0,5	22,0±0,6	21,0±0,25
80	30	16,5±0,6	19,0±0,0	21,0±0,6
	60	16,5±0,6	20,5±0,6	21,0±0,0
100	30	16,5±0,4	17,5±0,7	21,0±0,5
	60	16,0±0,0	18,0±0,6	21,0±0,5
121	15	16,5±0,5	21,5±0,6	21,0±0,25
	30	16,2±0,3	21,0±0,25	21,0±0,0

4.6.3. Bakteriyosinin farklı pH'lardaki stabilitesi

Süpernatantların farklı pH'lardaki stabilitesi pH 2 ile 11 arasında çalışılmıştır. *S. aureus*'a karşı aktivitesi çalışıldığında aktivitenin stabil kaldığı belirlenmiştir. *P. aeruginosa*'ya karşı deneme yapıldığında pH 7'ye kadar karşı aktivitenin stabilitesini koruduğu ancak pH 7'den sonra aktivitenin kaybolduğu gözlenmiştir. *M. luteus*'a karşı aktivitesi çalışıldığında ise pH 4'e kadar aktivitenin stabil kaldığı ancak pH 4'ten sonra aktivitenin kaybolduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *E. faecalis* KT11'den elde edilen kültür süpernatanın farklı pH'lardaki antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Test Bakterisi	Kontrol*	Süre (Saat)	pH 2		pH 3		pH 4		pH 5		pH 6		pH 7		pH 8		pH 9		pH 10		pH 11	
			K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N
<i>S. aureus</i>	17	0	25,0± 0,7	17,0± 0,0	26,0 ±0,8	18,0± 0,7	17,0± 0,0	17,0± 0,4	17,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,3	16,0± 0,0	16,0± 0,0	17,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,4	16,0± 0,0	16,0± 0,7	15,0± 0,0	16,0± 0,0	15,0± 0,0	16,0± 0,0
		6	29,0± 0,0	17,0± 0,0	25,0± 0,0	17,0± 0,0	18,0± 0,0	17,0± 0,0	17,0± 0,0	16,0± 0,0	17,0± 0,7	16,0± 0,4	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	15,0± 0,0	16,0± 0,0	14,0± 0,0	16,0± 0,0
		12	26,0± 0,0	17,0± 0,0	25,0± 0,7	17,0± 0,0	18,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	15,0± 0,0	16,0± 0,4	14,0± 0,0	15,0± 0,0	14,0± 0,7	15,0± 0,4
		18	26,8± 0,4	17,0± 0,0	25,0± 0,0	17,0± 0,0	19,0± 0,0	17,0± 0,4	16,0± 0,0	17,0± 0,7	16,0± 0,0	16,0± 0,0	15,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,7	16,0± 0,0	15,0± 0,0	16,0± 0,0	14,0± 0,0	16,0± 0,0	14,0± 0,0	16,0± 0,0
		24	25,0± 0,7	17,0± 0,7	26,0± 0,0	17,0± 0,3	18,0± 0,4	17,0± 0,0	17,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	16,0± 0,0	15,0± 0,0	16,0± 0,0	15,0± 0,0	16,0± 0,0	14,0± 0,0	16,0± 0,0
<i>M. luteus</i>	19	0	>44	-	>44	28,0± 0,0	>44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		6	>44	-	>44	28,0± 0,0	>44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		12	>44	-	>44	20,0± 0,0	>44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		18	>44	26,0 ±0,7	>44	20,0± 0,7	>44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24	>44	26,0± 0,7	>44	21,0± 0,7	>44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	16	0	28,0± 1,4	16,0± 0,3	28,0± 0,7	19,0± 0,7	29,0± 0,7	17,0± 0,0	18,0± 0,7	17,0± 0,7	17,0± 0,3	16,0± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		6	30,0± 0,0	16,0± 0,0	29,0± 0	17,0± 0,0	26,0± 0,0	18,0± 0,7	17,0± 0,7	16,0± 0,0	16,0± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		12	27,0± 0,0	17,0± 0,5	27,0± 0,7	18,0± 0,0	23,0± 0,0	17,0± 0,4	17,0± 0,0	16,0± 0,3	17,0± 0,7	16,0± 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		18	29,0± 0,0	22,0± 0,0	26,0± 0,0	20,0± 0,7	24,0± 0,0	18,0± 0,0	18,0± 0,7	17,0± 0,0	16,0± 0,4	16,0± 0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24	28,0± 0,7	22,0± 0,0	26,0± 0,0	19,0± 0,0	23,0± 0,0	15,0± 0,0	17,0± 0,0	16,0± 0,7	16,0± 0,0	16,0± 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: İnhibisyon yok, K: nötrale edilmeyen, N: nötrale edilen, *: İşlem görmemiş süpernatın.

4.6.4. Bazı organik çözücülerin ve deterjanların bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi

Bu çalışmada organik çözücülerin ve deterjanların bakteriyosine etkisi belirlenmiştir.

4.6.4.1. Organik çözücülerin bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi

Çeşitli organik çözücülerle muamele edilen bakteriyosinin aktivitesinin büyük ölçüde koruduğu, propanol ile işlem gören bakteriyosinin aktivitesini tamamen koruduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *E. faecalis* KT11'den elde edilen bakteriyosinin, çeşitli organik çözücülerle 25 °C/60' muameleden sonraki antimikrobiyal aktivitesi (%).

Organik çözücüler (25 °C' de 60 dk)	Antimikrobiyal Aktivite (%)		
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Kontrol	100	100	100
Kloroform	92	86	95
Propanol	100	0	100
Metanol	87	0	90
Etanol	87	86	95
Hekzan	90	0	84
Eter	100	81	79
Aseton	92	86	95

4.6.4.2. Deterjanların bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi

Deterjanlar ile 37 °C'de 180 dakika muamele gören bakteriyosinin aktivitesine bakılmıştır ve etkinin büyük ölçüde korunduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. *E. faecalis* KT11'den elde edilen bakteriyosinin, çeşitli deterjanlarla 37 °C/180' muameleden sonraki antimikrobiyal aktivitesi (%).

Deterjanlar (37 °C' de 180 dk)	Antimikrobiyal Aktivite (%)		
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Kontrol	100	100	100
Triton-X	100	82	100
Tween 80	100	76	100
Üre	100	76	100
EDTA	100	88	100
SDS	100	100	100

4.6.5. Liyofilize edilmiş bakteriyosin için uygun depolama sıcaklığı ve süresi

Bakteriyosinin gelecekteki potansiyel kullanım olanakları değerlendirildiğinde, büyük ölçeklerde üretilmesi, uygun şekilde konsantre edilmesi ve uzun süre aktivitesini yitirmeden saklanması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden yapılan çalışmada liyofilize edilmiş süpernatant farklı sıcaklıklarda ve sürelerde muhafaza edilerek antimikrobiyal aktivitesi ölçülmüştür. Oda sıcaklığında aktivitede bir azalma söz konusu olsa da +4 °C, -20 °C ve -80 °C'de aktivitesini tamamen koruduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. Depolama sıcaklığı ve süresinin *E. faecalis* KT11'in ürettiği bakteriyosinin aktivitesine etkisi

Depolama süresi (Gün)	İnhibisyon zonları (mm)							
	<i>S. aureus</i>				<i>M. luteus</i>			
	+25°C	+4°C	-20°C	-80°C	+25°C	+4°C	-20°C	-80°C
0	23,0±0,0	23,0±0,0	23,0±0,6	23,0±0,0	25,0±0,6	25,0±1,0	25,0±0,0	25,0±0,0
7	23,0±0,0	23,0±0,0	23,0±0,0	24,0±0,6	29,0±0,6	30,0±2,0	31,0±1,5	34,0±0,0
15	22,0±0,6	23,0±0,0	24,0±0,5	24,0±0,0	27,0±1,5	26,0,0±1,3	25,0±1,5	26,0±0,5
30	21,0±0,6	23,0±0,0	23,0±0,6	23,0±0,5	30,0±1,0	43,0±0,6	32,0±0,6	>44
60	19,0±0,5	22,0±0,6	22,0±0,5	21,0±0,0	25,0±0,6	39,0±1,0	35,0±0,0	38,0±0,5
90	18,0±1,0	21,0±0,0	21,0±0,6	21,0±0,6	28,0±1,5	37,0±1,5	34,0±0,6	31,0±0,0

4.6.6. Bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* KT11 için uygun saklama koşulu

Bakteriyosinin gelecekteki potansiyel kullanım olanakları değerlendirildiğinde, büyük ölçeklerde üretilmesi gerekliliği yukarıda belirtilmişti. Ancak, bakteriyosini üreten kültürün bu aktivitesini yitirmeden saklanabilmesi, endüstriyel amaçlı üretimlerde kullanımında önemli bir kriter olacaktır. Bakteriyosin üreticisi olarak kullandığımız *E. faecalis* KT11'in saklama koşullarından etkilenerek ürettiği bakteriyosinin aktivitesinde bir değişikliğe sebep olup olmadığını araştırmak için bakteri kültürü liyofilize edilerek farklı sıcaklıklarda saklanmıştır. Bu kültür farklı zaman aralıklarıyla geliştirilip bakteriyosin üretmesi sağlanarak mikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Çalışmanın sonunda bakteriyosinin aktivitesinde bir kayıp olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Liyofilize edildikten sonra, farklı sıcaklıklarda farklı sürelerde depolanan *E. faecalis* KT11'den elde edilen süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları.

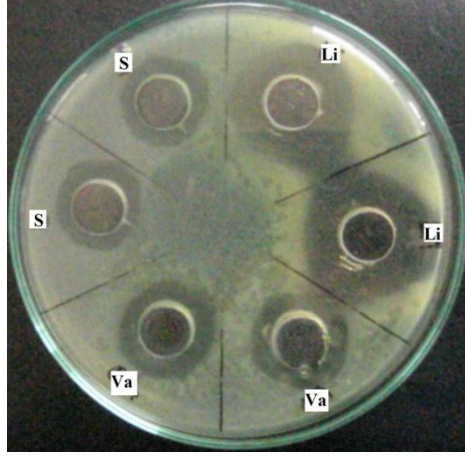
<i>E. faecalis</i> KT11' in Liyofilizasyondan sonraki bekleme süresi (Gün)	İnhibisyon zonları (mm)					
	<i>S. aureus</i>			<i>M. luteus</i>		
	+4 °C	-20 °C	-80 °C	+4 °C	-20 °C	-80 °C
0	18,0±0,0	18,0±0,0	18,0±0,0	24,0±0,3	24,0±0,6	24,0±0,0
7	18,0±0,5	18,0±0,0	18,0±0,0	25,0±0,0	24,0±0,0	25,0±1,3
15	18,0±1,8	18,0±0,6	18,0±1,0	24,0±0,3	24,0±0,5	24,0±1,0
30	18,0±0,0	17,0±1,0	17,0±0,0	24,0±0,5	23,0±1,0	23,0±0,0
60	17,0±0,0	16,0±0,0	16,0±0,6	23,0±0,0	23,0±0,0	23,0±0,6
90	17,0±0,0	16,0±0,0	16,0±0,0	23,0±0,0	22,0±0,0	22,0±1,5

4.6.7. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması

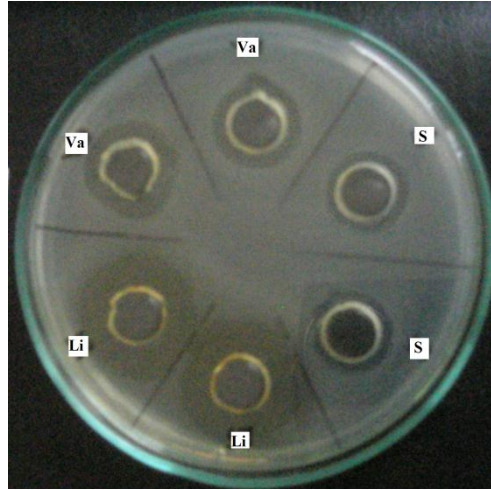
Bakteriyosini kısmi olarak saflaştırmak ve karakterize edebilmek amacıyla süpernatant iki şekilde konsantre edilmiş ve protein miktarları süpernatant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca vakum altında kurutulan ve liyofilize edilen süpernatantların antimikrobiyal aktiviteleri kontrolle karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.14). Test bakterisi olarak *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *M. luteus* kullanılmıştır. Liyofilize süpernatantın aktivitesinin vakumlanmış olana göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4. 14. Konsantre edilmiş süpernatantların aktivitelerinin karşılaştırılması

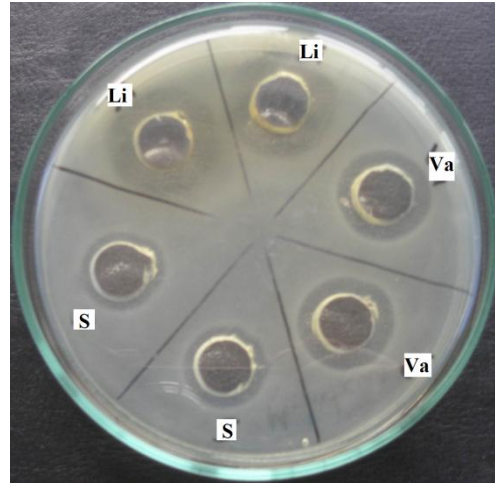
	Antimikrobiyal aktivite mm (5µg/kuyu)			Protein Miktarı (µg/ml)
	<i>S.aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Süpernatant	16	16	20	73,7
Liyofilize süpernatant	25	24	28	301,8
Vakumla kurutulmuş süpernatant	19	21	20	337,4



Şekil 4.3. *P.aeruginosa* test bakterisine karşı konsantre edilmiş süpernatanların aktiviteleri (S: süpernatan, Li: liyofilize edilmiş süpernatan, Va: vakum ile kurutulmuş süpernatan)



Şekil 4.4. *S. aureus* test bakterisine karşı konsantre edilmiş süpernatantların aktiviteleri (S: süpernatan, Li: liyofilize edilmiş süpernatan, Va: vakum ile kurutulmuş süpernatan)



Şekil 4.5. *M. luteus* test bakterisine karşı konsantre edilmiş süpernatanın aktiviteyi (S: süpernatant, Li: liyoofilize edilmiş süpernatant, Va: vakum ile kurutulmuş süpernatant)

Ham bakteriyosinin kısmi saflaştırılması amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.15. *E. faecalis* KT11’in ürettiği bakteriyosinin süpernatandan kısmi saflaştırılması

Saflaştırma basamakları	Hacim (ml)	Aktivite ¹ (AU/ml)	Toplam aktivite ² (AU)	Protein ³ (mg/ml)	Total protein ⁴ (mg/ml)	Spesifik Aktivite ⁵ (AU/mg)	Saflaştırma katsayısı ⁶	Geri kazanım ⁷ (%)
Konsantre Süpernatant	50,0	178,0	8900,0	0,3286	16,4325	541,6	1,0	100,0
Amonyum sülfat Çöktürmesi	3,0	711,0	2133,0	0,5074	1,5222	1401,2	2,5871	23,966
Diyalizat	5,5	711,0	3910,5	0,4988	2,7434	1425,4	1,0172	43,938

¹ AU/ml=1000 * V⁻¹ * D⁻¹

² Aktivite (AU/ml) * toplam hacim (ml)

³ Bradford metoduyla belirlenen protein miktarı (mg/ml)

⁴ Bradford metoduyla belirlenen protein miktarı (mg/ml) * toplam hacim (ml)

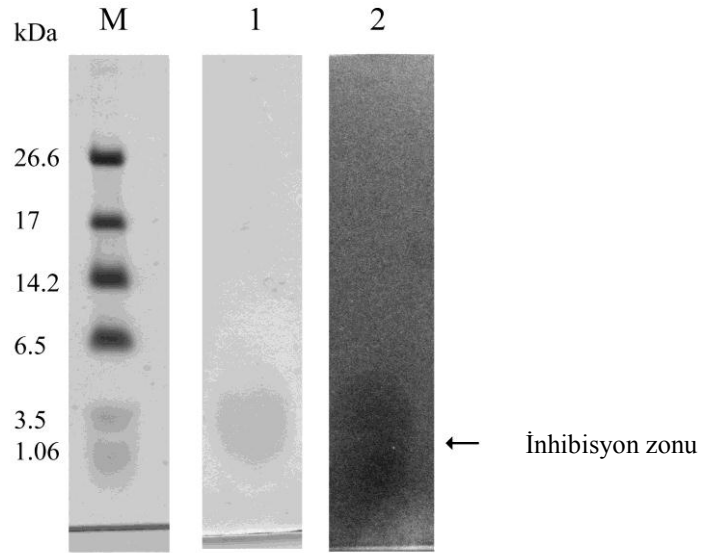
⁵ Bir saflaştırma basamağındaki aktivite (AU/ml) / aynı basamağındaki protein miktarı (mg/ml).

⁶ Bir saflaştırma basamağındaki spesifik aktivite (AU/mg) /ham proteinin spesifik aktivitesi (AU/mg)

⁷ Bir saflaştırma basamağındaki toplam aktivite (AU) * 100 / ham proteinin toplam aktivitesi (AU)

4.6.7.1. Bakteriyosinin elektroforetik profilinin belirlenmesi

Konsantre edilmiş süpernatant amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve diyaliz edilmiştir. Elde edilen diyalizat SDS-PAGE de yürütülmüştür, görülen bantlar marker (Sigma M3546) ile karşılaştırılmıştır. Aynı jel aktivite tayini için de kullanılmıştır. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, antimikrobiyal aktiviteden sorumlu proteinin 3,5-6,5 kDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir.



M: Marker

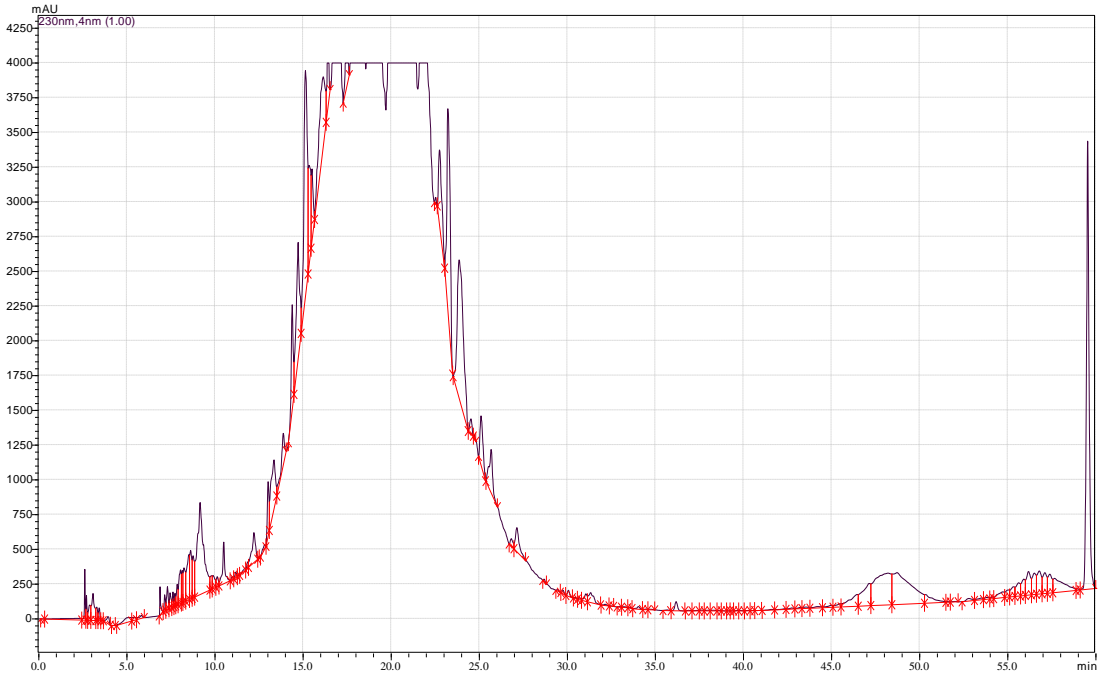
1. Diyalizatın jeldeki görüntüsü.

2. Jelde yürütülmüş diyalizatın *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi

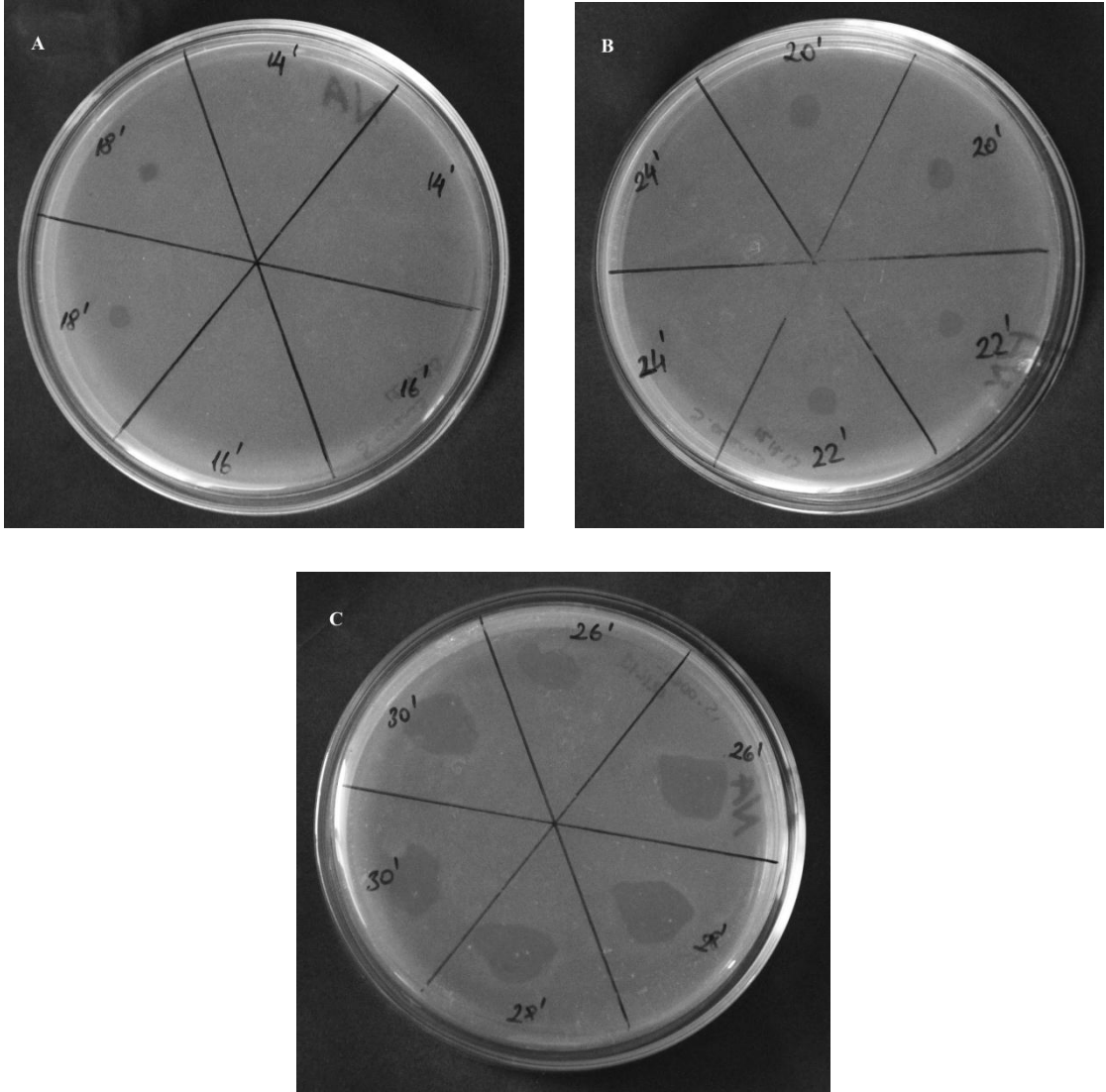
Şekil 4.6. Bakteriyosinin elektroforetik profilinin ve elde edilen bandın *S. aureus*'a karşı aktivitesinin belirlenmesi

4.6.7.2. Bakteriyosinin HPLC profilinin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olan bileşeni/bileşenleri belirleyebilmek için, diyalizatın HPLC profili belirlenmiştir (Şekil 4.2). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) için C18 ters faz analitik protein peptid kolonu tercih edilmiştir. Çalışmalarda hareketli fazın akış hızı 1 dakikada 1 ml olacak şekilde ayarlanmış ve 60 dakika süresince 230nm dalga boyunda absorbans izlenerek ayırım gerçekleştirilmiştir. İkişer dakikalık aralıklarla toplanan fraksiyonların her birinin antimikrobiyal aktivitesi seçilen test bakterisi ile denenmiştir. 18, 20, 22, 26, 28 ve 30. dakikalarda toplanan fraksiyonlarının antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 24. dakikada alınan fraksiyonda aktivite tespit edilememiştir. Daha sonra yapılacak çalışmalarla bu proteinlerin tanımlanması amaçlanmaktadır.



Şekil 4.7. HPLC Kromatogramı



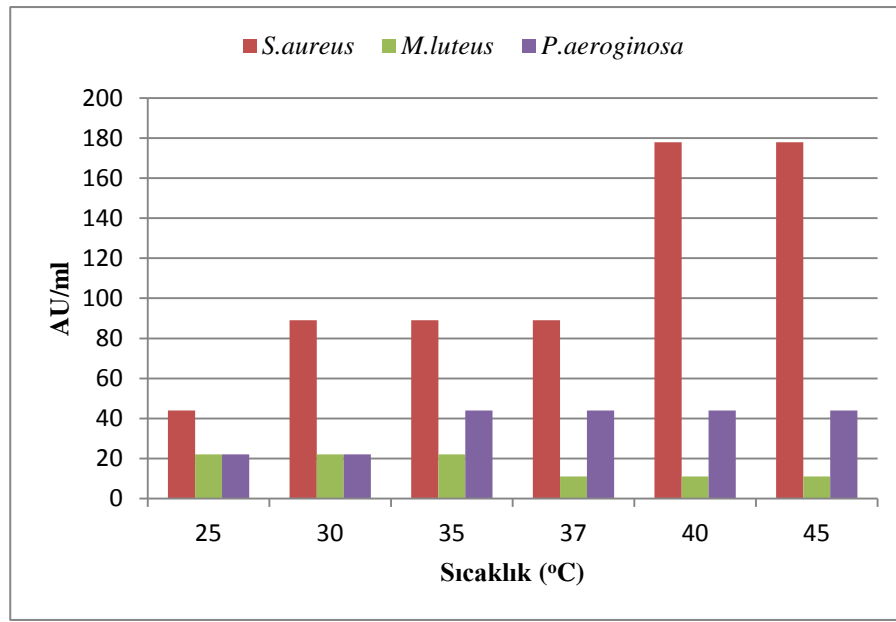
Şekil 4.8. HPLC ile toplanan fraksiyonların *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi (A: 18. dakika fraksiyonu, B: 20., 22. ve 24. dakika fraksiyonu, C: 26., 28. ve 30. dakika fraksiyonu)

4.7. Bakteriyosin Üretimi için Optimum Koşulların Belirlenmesi

E. faecalis KT11'in bakteriyosin üretiminin optimize edilmesi için sıcaklık, pH, süre ve inokulum yoğunluğu parametreleri çalışılmıştır. Sonuçlar AU/ml cinsinden belirlenmiştir.

4.7.1. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

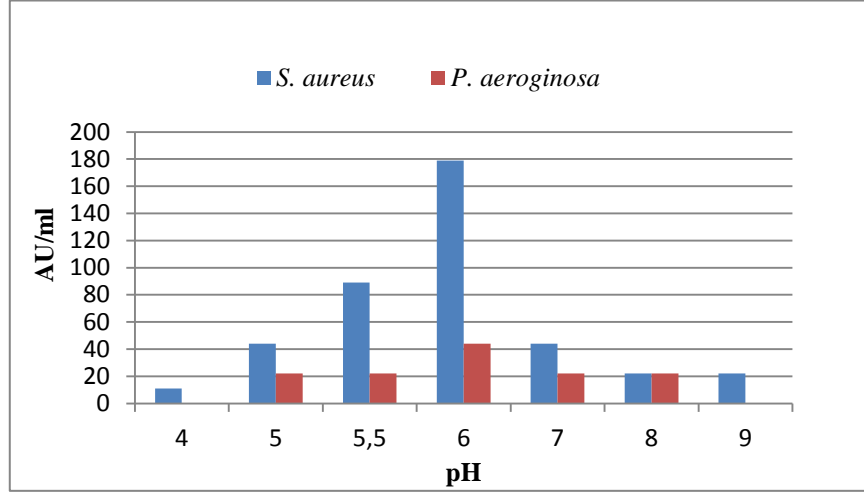
E. faecalis KT11 bakteriyosin üretimi için farklı inkübasyon sıcaklıklarında geliştirilerek test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır. Bakteriyosin aktivitesinin en iyi olduğu gelişme sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. İnkübasyon sıcaklığının *E. faecalis* KT11'in bakteriyosin üretimi üzerine etkisi

4.7. 2. Optimum pH'nın belirlenmesi

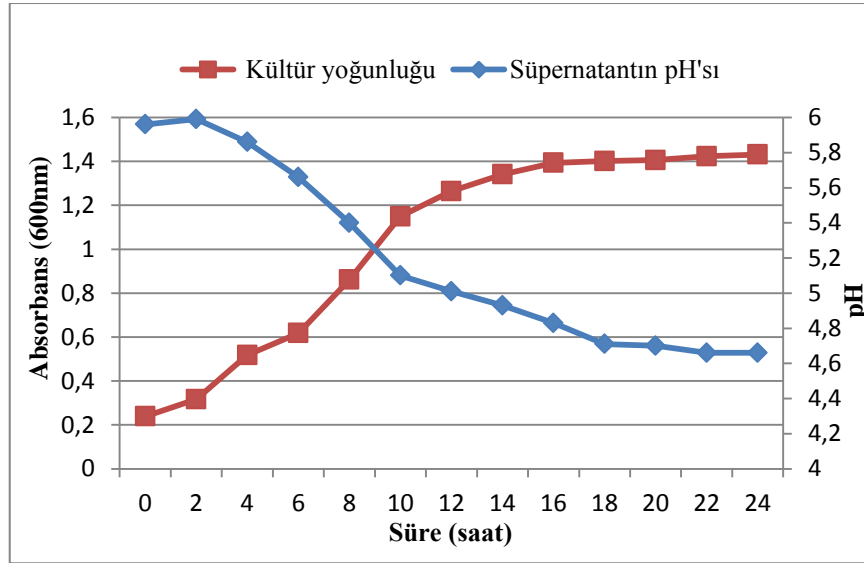
Farklı başlangıç pH'larında geliştirilen *E. faecalis* KT11'in bakteriyosin üretimini en verimli gerçekleştirdiği pH değeri 6 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).



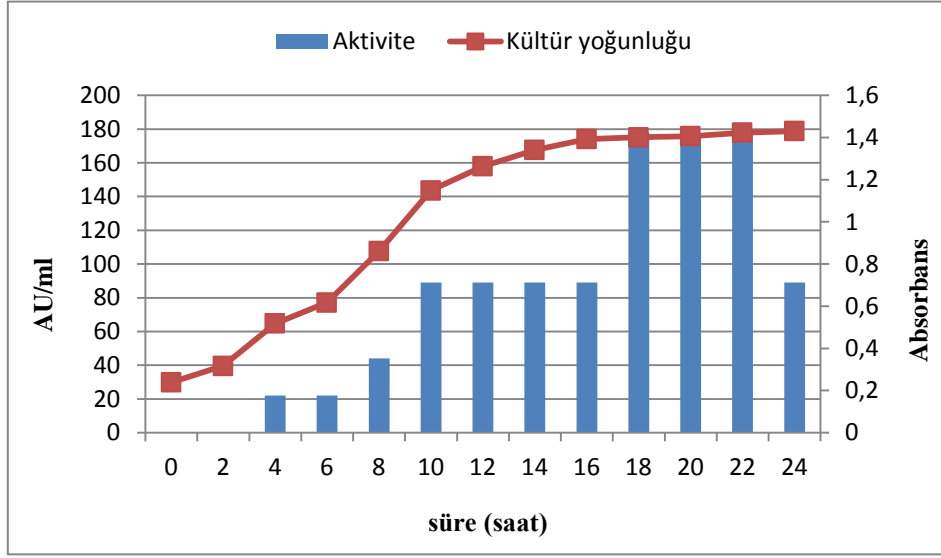
Şekil 4.10. Başlangıç pH'sının *E. faecalis* KT11'in bakteriyosin üretimi üzerine etkisi

4.7.3. Optimum sürenin belirlenmesi

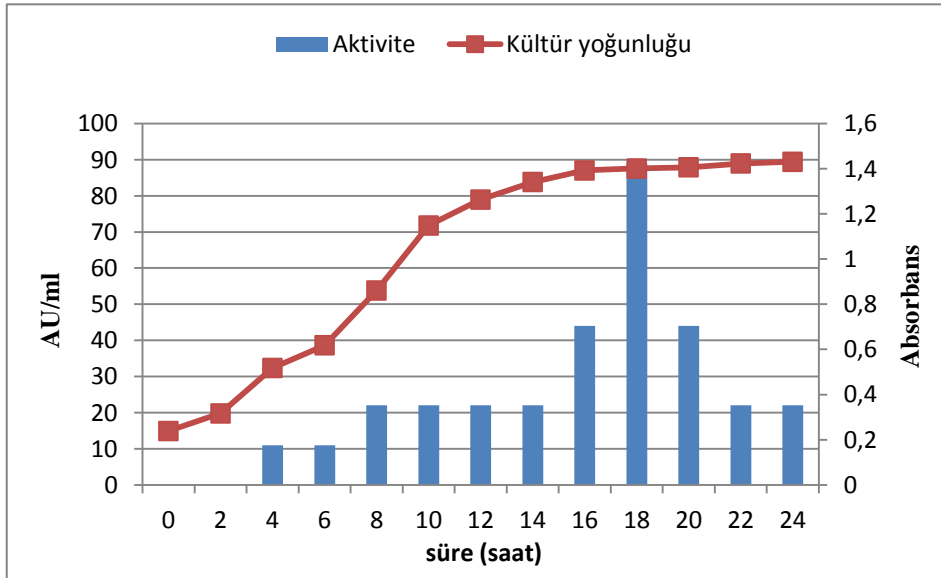
E. faecalis KT11 bakteriyosin üretimi esnasında 2 saat aralıklarla *S. aureus* (Şekil 4.6), *P. aeruginosa* (Şekil 4.11) ve *M. luteus*'a (Şekil 4.12) karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Bakteriyosin üretiminde en verimli olduğu zaman 18. saat olarak belirlenmiştir.



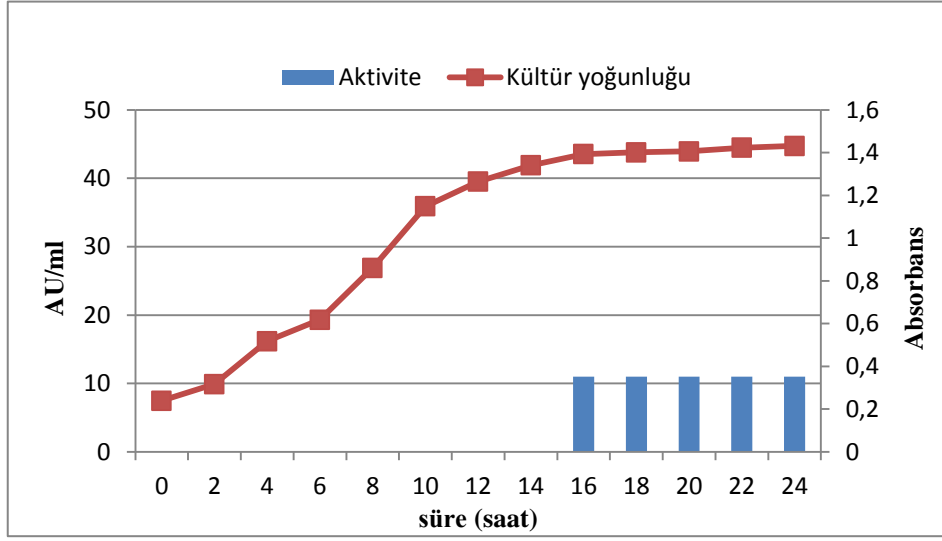
Şekil 4.11. *E. faecalis* KT11'in gelişme süresi boyunca kültür yoğunluğu ile süpernatanın pH'sının karşılaştırılması.



Şekil 4.12. *S. aureus* test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite



Şekil 4.13. *P. aeruginosa* test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite



Şekil 4.14. *M. luteus* test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite

4.7.4. Optimum inokulum yoğunluğunun belirlenmesi

Bakteriyosin üretimi için ekim yapılacak en uygun inokulum yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada %4'lük ekim sonucu elde edilen süpernatanın *S. aureus* ve *P.aeruginosa*'ya karşı aktivitesinin en iyi olduğu belirlenmiştir ancak *M. luteus*'a karşı aktivite değişmemiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. İnokulum yoğunluğunun *E. faecalis* KT11'in bakteriyosin üretimi üzerine etkisi

İnokulum Yoğunluğu (%)	Bakteriyosin Aktivitesi (AU/ml)		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>
0,05	89	0	0
0,1	89	0	11
0,5	89	0	11
1	89	0	11
1,5	89	0	11
2	89	22	11
2,5	89	22	11
4	356	44	11
6	178	44	11
8	178	44	11
10	178	44	11

4.7.5. Anaerobik koşullarda bakteriyosin üretme yeteneğinin belirlenmesi

Bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* KT11 anaerobik koşullarda geliştirilip süpernatanı ayrılmış ve aerobik koşullarda elde edilen süpernatanın aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Aerobik koşullarda üretilen bakteriyosinin aktivitesi anaerobik koşullara oranla daha yüksektir.

Çizelge 4.17. Anaerobik koşullarda geliştirilen *E. faecalis* KT11'in ürettiği bakteriyosinin aktivitesi

Test Bakterileri	Bakteriyosin Aktivitesi (AU/ml)	
	Anaerobik	Aerobik
<i>S. aureus</i>	89	178
<i>P. aeruginosa</i>	22	44
<i>M. luteus</i>	11	11

4.7.6. Optimum koşulda üretilmiş bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesinin yeniden değerlendirilmesi

Bakteriyosin üretimi için koşullar optimize edildikten sonra, dirençli farklı bazı suşlar da denemeye dahil edilerek, tüm test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite tekrar belirlenmiştir. *B. subtilis* ve *W. viridescens*'e karşı aktivitesi yokken optimizasyon sonunda aktivite gözlenmiştir. MRSA, VRE, *Leu. mes. ssp. mes.* ve *Lb. acidophilus* test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Test bakterilerinin arasına yeni eklenen Gram negatif bakterilere karşı da antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. Ayrıca metisilin dirençli *S. epidermidis*, metisilin ve vankomisin dirençli *S. warneri*'ye karşı oldukça iyi aktivite göstermiştir.

Çizelge 4.18. Optimum koşullarda üretilen bakteriyosinin test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi

Test Bakterileri	İnhibisyon Zon Çapı (mm)
<i>E. faecalis</i>	16,0±1,0
<i>E. coli</i>	-
<i>E. coli</i> O157:H7	-
<i>L. monocytogenes</i>	-
<i>B. subtilis</i>	15,0±0,5
<i>B. cereus</i>	-
Metisiline dirençli <i>Staphylococcus</i> sp. (MRSA)	15,0±0,8
Vankomisine dirençli <i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	17,0±0,6
<i>K.pneumoniae</i>	14,0±0,5
<i>S. marcescens</i>	18,0±0,8
<i>E. aerogenes</i>	15,0±0,5
<i>S. faecalis</i>	16,0±0,3
<i>S. epidermidis</i> (Metisiline dirençli)	20,0±0,5
<i>S.warneri</i> (Metisilin ve Vankomisine dirençli)	20,0±0,8
<i>S.aureus</i> (Metisilin ve Vankomisine dirençli)	-
<i>S.haemolyticus</i> (Metisilin ve Vankomisine dirençli)	-
<i>S. epidermidis</i> (Metisilin ve Vankomisine dirençli)	-
<i>S. hominis</i> (Vankomisine dirençli)	-
<i>Lb. pentosus</i>	-
<i>Lactococcus lactis</i> ssp.lactis	-
<i>Lactococcus lactis</i> ssp.cremoris	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> .ssp. mesenteroides.	19,0±0,6
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-
<i>Weisella viridescens</i>	14,0±0,8
<i>Enterococcus faecium</i>	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	16,0±0,5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-

4.8. *E. faecalis* KT11'in Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

E. faecalis KT11'in probiyotik özelliklerinin belirlenebilmesi için asidik pH'ya direnç, yapay mide sıvısına direnç, safra tuzuna direnç ve antibiyotiklere duyarlılık testleri yapılmıştır.

4.8.1. Asidik pH'ya direncinin belirlenmesi

Bu çalışma *E. faecalis* KT11'in asidik mide pH'sında canlılığını koruyup korumadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. pH 1'de 2. saatte hücreler canlı kalmış ancak 4. ve 6. saatlerde canlılıklarını yitirmiştir. pH 2 ve pH 3'te hücreler 6 saat boyunca canlılığını koruyabilmiştir.

Çizelge 4.19. *E. faecalis* KT11'in mide pH'sında canlılığı

pH	Süre (saat)	<i>E. faecalis</i> KT11
1	2	+
	4	-
	6	-
2	2	++
	4	+
	6	-
3	2	++
	4	+
	6	+
Kontrol (MRS broth kültürü)		++

+: az büyüme, ++: normal büyüme, -: büyüme yok.

4.8.2. Safra tuzuna direncinin belirlenmesi

MRS besiyerine farklı konsantrasyonlarda safra tuzu ilave edilip *E. faecalis* KT11'in canlılığı kontrol edilmiştir. %0,3, %0,5 ve %1 safra tuzu içeren ortamda 6 saat boyunca hücrelerin canlılığını koruduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.20. *E. faecalis* KT11'in farklı konsantrasyonlardaki safra tuzuna dayanıklılığı

% Safra Tuzu	<i>E. faecalis</i> KT11
0,3	+
0,5	+
1,0	+
Kontrol (MRS broth kültürü)	+

+: büyüme var, -: büyüme yok.

4.8.3. Yapay mide sıvısına direncinin belirlenmesi

Mide pH'sı oldukça asidiktir ancak tokluk anında 4'e kadar yükselbilmektedir. *E. faecalis* KT11 hazırlanan yapay mide sıvısında pH 2'de gelişmemiş, pH 3 ve 4'te büyüebildiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.21. *E. faecalis* KT11'in yapay mide sıvısına direnci

pH	Süre (saat)	<i>E. faecalis</i> KT11
2	1	-
	2	-
	3	-
	4	-
3	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
4	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
Kontrol (MRS broth kültürü)		+

+: büyüme var, -: büyüme yok.

4.8.4. Antibiyotiklere duyarlılığının belirlenmesi

Laktik asit bakterileri doğada çok yaygın bir şekilde bulunurlar. Fermente gıdalarda koruyucu kültür, starter kültür veya probiyotik kültür olarak kullanılmaktadır. Gıdalardan starter kültür olarak kullanılacak laktik asit bakterilerine ait türlerin antibiyotik dirençliliği ve virulans özellikleri açısından güvenilirliği test edilmelidir.

Bu amaçla *E. faecalis* KT11'in bazı antibiyotiklere olan duyarlılığının belirlenmesi için disk difüzyon yöntemiyle çalışılmıştır. *E. faecalis* KT11 suşunun chloramphenicol, erythromycin, penicilin G, amoxycillin, novabiocin, vancomycin ve methicillin karşı duyarlı, optochin, polymixin B, bacitracin, streptomycin, lincomycin ve gentamicine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.22. *E. faecalis* KT11'in antibiyotiklere duyarlılığı

Antibiyotikler	İnhibisyon Zonu (mm)
Chloramphenicol	29,0 ± 1,0
Erythromycin	27,0 ± 0,0
Penicilin G	26,0 ± 0,7
Amoxycillin	22,0 ± 0,7
Novabiocin	12,0 ± 0,5
Methicillin	10,0 ± 0,0
Optochin	-
Polymixin B	-
Bacitracin	-
Streptomycin	-
Lincomycin	-
Gentamicin	-
Vancomycin	-

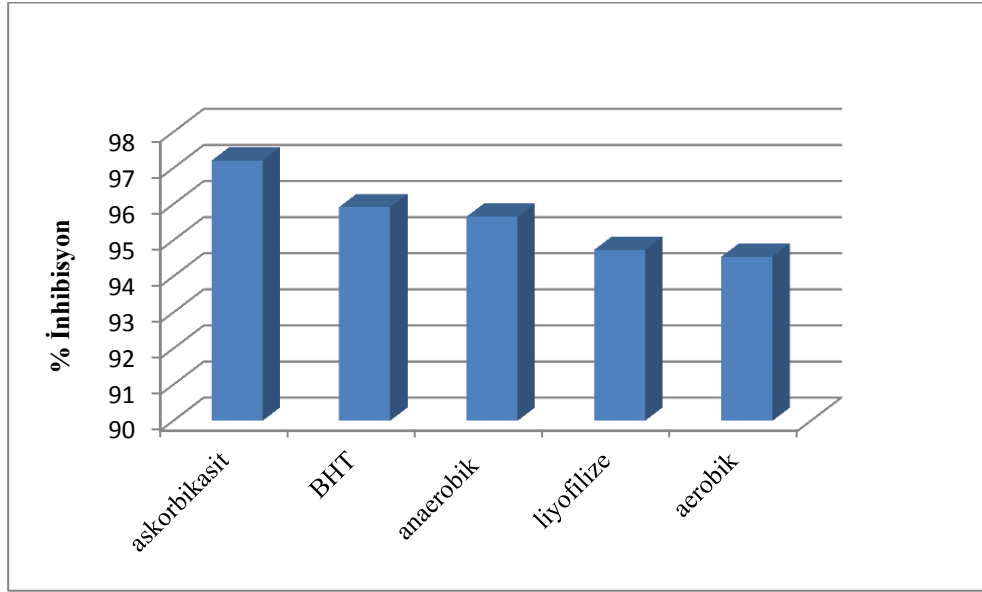
-: İnhibisyon yok.

4.9. *E. faecalis* KT11'e ait süpernatanın antioksidan aktivitesi

Fermantasyon, gıdaların uzun süre muhafaza edilmesinde kullanılan en eski yöntemlerden birisi olup, gıdaların fermantasyonla koruma geleneği binlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Fermantasyon, gıdalarda patojenik flora ve bozulmanın gelişiminin önlenmesinde koruyucu etkiye sahiptir. Ayrıca fermantasyon boyunca oluşan diasetil, asetaldehit gibi istenen aromatik bileşenlerin miktarı kaliteyi etkilemekte, vitaminler, antioksidanlar, biyoaktif peptitlerin oluşumu da sağlığı pozitif yönde etkilemektedir (Toy, 2010).

İnsan metabolizmasında vücudun oksijen kullanımındaki normal işlemler sırasında bazı etmenlerin teşviki ile serbest radikal oluşmaktadır. Serbest radikaller; DNA, protein, karbonhidrat ve lipidlerde zarara yol açmaktadır. Dolayısıyla, hücre membranının hem yapısını hem de fonksiyonlarını bozarak, birçok dejeneratif hastalıklara neden olmaktadır. Antioksidan maddeler, aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır.

Çalışmamızda serbest radikal olarak DPPH kullanılmıştır. DPPH, serbest radikaldır ve koyu mor renge sahiptir. Üzerine DPPH ilave edilen örnekte bulunan antioksidan aktivite gösteren maddeler serbest radikali yakalayarak indirgenme reaksiyonu göstermiş ve örneğin rengini gidermiştir. Formülü Bölüm 3.2.9. da belirtilen % Radikal süpürücü aktivite hesaplandığında en iyi antioksidan aktiviteye sahip örneğin anaerobik koşullarda geliştirilen *E. faecalis* KT11'den elde edilen süpernatana ait olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada askorbik asit ve BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.15. Aerobik ve anaerobik koşullarda geliştirilen *E. faecalis* KT11'den elde edilen süpernatanın ve liyofilize edilmiş süpernatanın antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Laktik Asit Bakterilerinin Ön Tanısı, Seçimi ve Çalışmanın Akışı

Çalışmaya Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonuna kayıtlı kok formundaki 4 adet izolat ile başlanmıştır. Bu 4 LAB'nin bazı Gram pozitif ve negatif test bakterilerine karşı antagonistik etkilerinin olduğu önceki bir tarama çalışması sonucunda belirlenmiştir. Bu çalışmada ise, bu dört LAB'nin antimikrobiyal etki spektrumu daha detaylı olarak incelenmiş, bu inceleme sonunda aşağıda belirtilen kriterler gözetilerek;

- ✓ antimikrobiyal etki spektrumlarının genişliği, özellikle patojenlere karşı etkileri
- ✓ inhibisyon zon çaplarının büyüklüğü
- ✓ kültür süpernatanlarındaki protein miktarı

aralarından sadece bir izolat seçilmiş ve çalışmaların devamında kullanılmıştır. Seçilen bu izolat, klasik biyokimyasal ve fizyolojik testler uygulanarak tür seviyesinde tanımlanmıştır. Buna ek olarak izolatın genotipik tür tanımlaması da yapılmış ve *Enterococcus faecalis* olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* KT11'in kültür süpernatanının antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu madde/maddelerin kısmi saflaştırılması ve tanımlanmasını amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Sonuçta antimikrobiyal aktiviteden sorumlu madde/maddelerin protein yapısında olduğu belirlenmiş ve bu nedenle "bakteriyosin" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bakteriyosin üretimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Bakteriyosin üreticisi LAB'lerinin probiyotik ve fermentasyonla yapılan üretimlerde starter olarak kullanımı oldukça ilgi çeken bir konu olduğu için *E. faecalis* KT11'in bazı probiyotik nitelikleri de belirlenmiştir. Son olarak da ham bakteriyosin preparatının (liyofilize edilmiş süpernatan) ve bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* KT11 için uygun saklama koşulları belirlenmiştir.

Enterokokal bakteriyosin olan enterosinlerin *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *S. aureus* gibi gıda kaynaklı olan patojenlere karşı aktivitesi yaygın olarak araştırılmıştır (Vanbelkum and Stiles, 2000). Bununla birlikte bazı enterosinlerin Gram negatif bakterilerin büyümesini inhibe edici geniş bir aktivite spektrumu olduğu da belirlenmiştir (Line et al., 2008). *E. faecalis* KT11'in ürettiği bakteriyosinin de Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* CD1'in ürettiği bakteriyosinin Gram pozitif olan *B. subtilis*, *Bacillus pumilus* ve *Listeria* sp. ayrıca Gram negatif *P. aeruginosa* ve *E. coli*'nin büyümesini inhibe ettiğini belirlenmiştir (Sarika et al., 2011). Leroy ve Vuyst (2001), peynirden izole ettikleri ve *E. faecium* RZS C5 olarak tanımladıkları izolattan elde ettikleri bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine araştırmalar yapmışlardır.

Marekova ve ark. (2003) yaptığı bir çalışmada *E. faecium* EK13 suşunun *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *Streptococcus bovis*'a etkili olduğunu belirlemişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda LAB izolasyonu için sucuk ve pastırma gibi geleneksel et ürünleri (Yalanca, 2009), fermente süt ürünleri, zeytinyağı, dışkı örnekleri (Sifour et al., 2012), süzme peynir (Huang et al., 2013), boza (Ivanova et al., 2000; Koral, 2011) gibi gıda kaynakları kullanılmıştır.

Rajaram ve ark. (2010) yaptığı çalışmada izole ettikleri LAB'nin *Lactobacillus lactis* olduğunu ve bu izolatin bakteriyosininin antimikrobiyal etki spektrumunu belirlemişler ayrıca bu suş için kültür koşullarının optimizasyonu ve ürettiği bakteriyosini saflaştırma çalışmaları yapmışlardır. Drosinos ve ark. (2006), kurutulmuş sucuktan izole ettikleri ve yapılan tanımlama testleri ile *Leuconostoc mesenteroides* E131 olduğunu belirledikleri laktik asit bakterisinin ürettiği antimikrobiyal madde üzerine çalışmalar yapmışlardır.

5.1.1. Antimikrobiyal etki spektrumunun agar sandviç yöntemi ile belirlenmesi

Bu yöntemde LAB Çizelge 3.1 de belirtilen test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. LAB'lerinin patojenlere ve yine kendisi gibi LAB olan türlere karşı antimikrobiyal aktivitesinin olması (Çizelge 4.1), özellikle

MRSA ve VRE gibi antibiyotik dirençli suşlara etkili olması izolatlar tarafından üretilen bakteriyosinlerin etki spektrumunun genişliğini göstermektedir.

5.1.2. Antimikrobiyal etki spektrumunun agar kuyu yöntemi ile belirlenmesi

Agar kuyu yönteminde Çizelge 3.1 de belirtilen test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite denenmiştir. Bu çalışmada 4 LAB'den elde edilen kültür süpernatanlarının pH'sı 6,5'e ayarlanmış ve katalaz enzimiyle muamele edilmiştir. Böylece antimikrobiyal etkinin düşük pH'ya da H₂O₂ den kaynaklanmadığı gösterilmiştir. Burada agar sandviç yönteminden farklı olarak bazı test bakterilerine karşı görülen inhibisyon zonlarında kayıplar olmuş ayrıca bazı inhibisyon çaplarında küçülmeler belirlenmiştir. Bunun sebebi olarak; agar sandviç yönteminde LAB kültürü inkübasyon anında ürettiği bakteriyosinin test bakterisine direk olarak etki etmesi, agar kuyu yönteminde ise LAB tarafından üretilen bakteriyosini içeren süpernatanın agara difüze olmasını zorlaştıran bir uygulama olması bu duruma gerekçe gösterilebilir. Ancak bu duruma rağmen agar kuyu yöntemi bakteriyosinin aktivitesini doğrulamaktadır.

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler genellikle Gram pozitif bakteriler üzerine antimikrobiyal etkiye sahiptir. Ancak son yıllarda Gram negatif bakteriler üzerine de inhibitör etkiye sahip bazı bakteriyosinler tespit edilmiştir. Bu bakteriyosinlerden laktisin NK24'nın *E. coli* ve *P. aeruginosa* (Lee and Paik, 2001), laktis B14'ün *E. coli* (Ivanova et al., 2000), bakteriyosin HV219'un *E. coli*, *Proteus vulgaris* ve *P. aeruginosa*'a (Todorov et al., 2006) karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

5.2. Virulans Faktörlerinin Belirlenmesi

Gerek bakteriyosin üreticilerinin gerekse probiyotik olarak olarak kullanılacak LAB'nin patojenik olmaması gerekmektedir. LAB'inde bakteriyosin üretiminin genellikle plazmidler tarafından kodlandığı tespit edilmiştir. Enterokokların sahip

olduğu virulans faktörlerindeki artış, plazmid alımının kolaylığı yüzünden enfeksiyon geni taşıyan genetik elemanlarını alması olasılığının yüksek olmasındandır. Bu nedenle yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğuna direnç gösterebilmektedirler (El-Gendy et al., 2012). Bu yüzden kullandığımız 4 LAB'nin virulans faktörlerini taşıyıp taşımadıkları belirlenmiştir. İnsanlarda çoğunlukla β hemolitik (tam hemoliz) bakteriler enfeksiyona sebep olmaktadır. Hemolitik aktivitenin bulunmaması süt ürünlerinde kullanılacak bakteriyosin üreten başlangıç kültürleri için bir seçim kriteridir (Martin et al., 2006). Yapılan jelatinaz, DNaz, koagulaz ve hemoliz testlerinin sonuçları negatiftir, bu nedenle bakteriyosin üretiminde kullandığımız dört izolatın da virulans faktörlerini barındırmadığı sonucuna varılmıştır.

5.3. Süpernatantların Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Bradford yöntemi ile dört LAB izolatının süpernatantlarının içerdiği protein miktarları Nanodropta ölçülmüştür. 2 nolu LAB izolatından elde edilen süpernatant 78,213 μ g/ml lik protein içeriği ile en yüksek protein oranına sahip süpernatant olarak belirlenmiştir. Diğer izolatların süpernatantlarındaki protein miktarının daha az olması, etki spektrumları, verdikleri inhibisyon zon çapları ve Gram negatif test bakterilerine karşı aktif olması nedeniyle 2 nolu LAB izolatı ile çalışmalara devam edilmiştir.

5.4. LAB izolatının (2 nolu izolat) Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

Enterokokların genel olarak 10 °C'de ve 45 °C'de, %6,5 NaCl'de, %40 safra tuzunda, %0,1 metilen mavisi içeren sütte ve pH 9,6'da gelişebildikleri kabul edilmekle birlikte moleküller çalışmalara dayalı genotipik tanıdan farklı özelliklere sahip suşların da *Enterococcus* cinsi içinde yer aldığı belirlenmiştir (Manero and Blanch, 1999).

LAB izolatını cins seviyesinde tanımlayabilmek için fiziksel ve biyokimyasal bazı testler yapılmıştır. İlk olarak gelişebildikleri sıcaklıklar belirlenmiştir. İzolatın 4, 15 ve 45 °C'de büyüebildiği saptanmıştır. LAB izolatının 60 °C'de 30. dakikaya kadar

canlılıklarını koruyabildikleri belirlenmiştir. Streptokokların 60 °C’de canlılıklarını koruyamadıkları bilinmektedir (Köseoğlu, 2007). Bu sonuçlar doğrultusunda izolatın Streptokok olmadığı kanısına varılmıştır. %6,5 oranında tuz varlığında ve pH 9,6’da gelişebildiği gözlenmiştir ve bu enterokokların en belirgin özelliklerindedir. pH 9,6’da büyüebilmesi ile Laktotoklardan ayırt edilmektedir. EPS üretimi, VP aktivitesi, %0,04 tellurite’te gelişebilme, sorbitol fermentasyonu, arjininden amonyak oluşumu, kazein hidrolizi testleri, pozitif olarak belirlenmiş, TTC’de büyüme ve nişasta hidrolizi testlerinin negatif olduğu saptanmıştır. Litmus katılmış sütte gelişen bakteri; gelişirken laktozu fermente etmiş ve sütle laktozun fermentasyonu sonucu asit oluşturmuş, litmusun rengi pembeye dönüşmüş ve aynı zamanda süütün pıhtılaşmasına neden olmuştur. İzolatın %0,01 ve %0,03’lük metilen mavili sütte geliştiği belirlenmiştir.

Bu testlerin sonuçları Manero ve Blanch’ın (1999) identifikasyon anahtarına göre değerlendirildikten sonra izolatımızın büyük ihtimalle Enterokok olduğu belirlenmiştir. Bu testlere ek olarak Biolog test sistemi kullanılmıştır. İzolatımızın *Enterococcus faecalis* (0,226), *Enterococcus gallinarum* (0,109) ve *Enterococcus haemoperoxidus* (0,055) türleri ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak tür düzeyinde kesin bir tanımlama için moleküler yöntemler kullanılmıştır.

Gerçek zamanlı PCR ile bakterinin DNA dizi analizi yapılmış, sonuçlar NCBI BLAST DNA data bankası ile karşılaştırılmıştır ve data bankasında kayıtlı *Enterococcus faecalis* suşu ile %100 benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

5.5. *Enterococcus faecalis*’den Elde Edilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu

E. faecalis KT11’den elde edilen bakteriyosinin karakterizasyonu aşamasında bakteriyosin aktivitesinin çeşitli proteolitik enzimler, farklı sıcaklık ve pH’lar, deterjan ve organik çözücüler ile değişimi incelenmiştir.

5.5.1. Çeşitli proteolitik enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

E. faecalis KT11'den elde edilen bakteriyosinin protein yapısında olduğunun belirlenmesi açısından yapılan bu çalışmada süpernatant Pepsin, Tripsin, α -Kimotripsin, Proteaz ve Proteinaz K gibi proteolitik enzimlerle işlem görmüştür. Kontrol olarak enzim katılmayan süpernatant kullanılmıştır ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Başka bir kontrol grubu olarak ise enzim + tampon çözeltisi kullanılmıştır ve bu gruplarda aktivite olmadığı belirlenmiştir. Bu şekilde aktivite belirlenen örneklerde aktivitenin tampon ya da enzimden kaynaklanmadığı gösterilmiştir.

Farklı proteolitik enzimlerin *E. faecalis* KT11 tarafından üretilen bakteriyosin üzerindeki etkisi incelendiğinde pepsin dışındaki proteolitik enzimlerin bakteriyosin aktivitesinin kaybolmasına neden olmuştur. Pepsin enzimiyle inkübasyonun sonucunda ise bakteriyosinin aktivitesinde belirli bir oranda azalma gözlemlense de aktivitenin devam ettiği belirlenmiştir. Proteinaz K, α -kimotripsin, tripsin ve proteaz enzimleriyle inkübasyondan sonra etkinin kaybolması antimikrobiyal maddenin protein/peptid yapısında olduğunu işaret etmiştir. Ayrıca gıda maddeleri ile birlikte midede sindirilebileceğini de göstermektedir. Bakteriyosinin pepsin enzimine karşı dayanıklı olması *E. faecalis* KT11'in probiyotik niteliklerinin de araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Enterosinlerin proteolitik enzimlerden bir veya birden fazlasına duyarlı olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Herranz et al., 2001). Yapılan bir çalışmada *E. faecium* N15 tarafından üretilen bakteriyosinin kimotripsin, proteinaz K, tripsin ve pepsin gibi proteazlarla amilaza karşı duyarlı, lipaz enzimine dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Losteinkit et al., 2001). Chobert ve ark. (2006) *Enterococcus durans*'dan izole edilen bakteriyosinin tripsin ve pepsine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. *E. faecium*'un ürettiği bakteriyosinin aktivitesi proteinaz K (1mg/ml) ile işlem gördüğünde kaybolmuş fakat lipaz ve lizozim uygulamasından sonra aktivitenin devam ettiği belirlenmiştir (Unakal et al., 2012).

Enterosin üreticileri dışında başka LAB ile ilgili bu konuda oldukça fazla çalışma vardır. Tuncer ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışmada *L. lactis* suşunun ürettiği bakteriyosinin proteinaz K uygulaması ile tamamen, kimotripsin ve amilaz uygulaması

ile kısmen aktivite kaybına uğradığı belirlenmiştir. *L. salivarius* AA13 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin katalaz, lizozim, α -amilaz enzimleriyle muamelesi sonucunda aktivitesinin kaybolmadığı, papain, pepsin, proteinaz K ve tripsin uygulamasında aktivitenin tamamen yok olduğu gözlenmiştir (Abo-Amer and Shobrak, 2012). Bakteriyosin JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ ve JW15BZ (*Lb. plantarum* ve *L. fermentum*) tripsin, pronaz, proteinaz K, pepsin ve papaine duyarlı olduğu bildirilmiştir (Todorov et al., 2006a).

5.5.2. Bakteriyosinin farklı sıcaklık derecelerindeki stabilitesi

E. faecalis KT11 tarafından üretilen bakteriyosin 60, 80 ve 100 °C sıcaklığa 30 ve 60 dakika maruz kaldığında, 121 °C’de ise 30 dakika uygulanan ısıtma işlemler sonucunda aktivitesini korumaktadır. Yüksek ısıtma işlemine direnç (121 °C/30dk) bakteriyosinin ikincil yapılar barındırmadığını yani glikoprotein veya lipoprotein yapıda olmadığını göstergesidir (Akkoç ve ark., 2009). Isıl stabilite göstermesi bu bakteriyosinin Grup II üyesi bir bakteriyosin olduğunu doğrulamaktadır (Tuncer, 2005; Akkoç ve ark., 2009).

100 °C’de 60 dk’lık ısıtma işlemine dayanıklı bir bakteriyosin olan enterosin N15 121 °C’de 15 dk yapılan otoklavlama işleminden sonra aktivitesini tamamen kaybettiği (Losteinkit et al., 2001), enterosin USC-46 ve USC-51’in ise 100 °C’de 60 dk ve 121 °C’de 15 dk uygulanan ısıtma işlemine dayanıklı olduğu kaydedilmiştir (Campos et al., 2006). *E. faecium*’un ürettiği enterosin 60, 80, 90 °C’de 30 dakika muameleden sonra aktivitesini sürdürdüğü, ancak 121 °C’de 15 dakikada aktivitesini yitirdiği bildirilmiştir (Unakal et al., 2012).

Elde ettiğimiz bulgular bugüne dek yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırılmış ve benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda test ettiğimiz yüksek ısıya dayanıklı olan antimikrobiyal etkili proteinin bir çeşit enterosin olabileceği düşünülmektedir, ancak tam saflaştırma ve aminoasit dizi analizleri sonucunda proteinin yapısı konusunda kesin bir bilgi verilebilir.

5.5.3. Bakteriyosinin farklı pH'lardaki stabilitesi

Bakteriyosinler yüksek ısıya tabi tutulduklarında aktivitesi stabil kaldığı gibi geniş pH aralığında da stabil kalma yeteneğine sahiptir. *E. faecalis* KT11'in sentezlediği bakteriyosinin pH 2-11 arasında 24 saat boyunca stabil kaldığı belirlenmiştir. Bazı aktivitelerin pH'ya bağlı olarak yüksek olduğu görülmüş olsa dahi nötralize edilmiş süpernatantların inhibisyonuna bakıldığında aktivitenin pH'dan kaynaklanmadığı belirlenmiştir. Aktivitelerin yüzde olarak hesaplandığı çalışmada zamana bağlı aktivitede değişiklikler gözlenirse de, 24. saatin sonunda da aktivitenin bütün pH'larda devam ettiği belirlenmiştir.

Enterosinin antimikrobiyal aktivitesinde, ısıya ve alkali uygulamasına karşı yüksek bir direnç vardır. *E. faecalis*'in ürettiği bakteriyosinin aktivitesi, nisinin aktivitesinin hızla kayb olduğu pH 11'de bile stabil olmaktadır (Rollema et al., 1995). Unakal ve ark. (2012) *E. faecium*'dan elde ettikleri süpernatantı pH 4-10'da 1 saat inkübe ettikten sonra aktivitenin stabil kaldığını belirlemişlerdir. Mozzarella peynirinden izole edilen *E. faecium* 130'un ürettiği bakteriyosinin pH stabilitesi incelendiğinde (pH 2, 4, 7, 10) test bakterisi olan *L. monocytogenes*'e karşı aktivitede değişiklikler olmasına rağmen stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Tulini et al., 2011).

5.5.4. Bazı organik çözücülerin ve deterjanların bakteriyosinin stabilitesi üzerine etkisi

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğu bir veya daha fazla proteolitik enzime karşı duyarlı, ısıya işleme, geniş pH aralığına, özellikle asidik pH değerlerine, organik çözücülere ve deterjanlara karşı dayanıklıdır (Ray, 1992).

Çalışmamızda propanol ile inkübe edilen bakteriyosinin aktivitesini tamamen koruduğu, kloroform, metanol, etanol, aseton, hekzan ve eter ile muamele sonucunda ise aktivitede az da olsa azalma gözlenmektedir. Sonuç olarak organik çözücülerle muamele edilen bakteriyosinin aktivitesini büyük ölçüde koruduğu belirlenmiştir. Bakteriyosinin organik çözücülerden etkilenmemesi inhibitör aktivitesinden sorumlu

olan bölgede karbonhidrat ya da lipit türevli bileşenlerin olmadığı anlamına gelmektedir (Dündar, 2006).

Birçok araştırmacı tarafından da LAB'nin ürettiği bakteriyosinlerin organik çözücülere karşı dayanıklı olduğu bulunmuştur (Asutay, 2007). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* tarafından üretilen bakteriyosin kloroform, kloroform-metanol ve kloroform-isopropanol uygulamasından sonra aktivitesini kaybetmemiştir fakat metanol, hekzan, petrolyum-eter, dietileter, n-propanol ve toluen ile muamele edildiğinde aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Dündar, 2006).

Anyonik deterjanlar proteinlerin doğal yapılarındaki hidrofobik merkezle kompleks oluşturarak proteinin açılmasına ve üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Deterjan uygulaması ile bakteriyosin aktivitesinde bir kayıp meydana gelmesi, bakteriyosinin kısmi denatürasyonu ya da aktivitesi üzerinde stabilizasyon etkisi olan diğer moleküllerle birlikteliğinin bozulmasından kaynaklanmaktadır (Ivanova et al., 2000). SDS, tritone X-100, EDTA, üre ve tween 80 *E. faecalis* KT11'in ürettiği bakteriyosin ile inkübasyonu sonucu herhangi bir aktivite kaybı görülmemiştir. Bu da bakteriyosinin protein yapısında bozulmaların olmadığını dolayısıyla bu deterjanların aktiviteye bir etkisinin bulunmadığını göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada üretilen bakteriyosinin bazı deterjanlar ile muamelesi sonucu aktivitelerindeki değişiklikler belirlenmiştir. SDS, tween 80, tritone X-100 uygulamasından sonra aktivitede kayıp olsa da etki devam etmiştir. Ancak EDTA ve üre ile inkübe edilen bakteriyosin aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Rajaram et al., 2010). Benzer sonuçlar Ivanova ve ark. (2000) tarafından da gözlenmiştir. Bilgin (2008) yaptığı çalışmada, *Enterococcus faecium* tarafından üretilen inhibitör maddenin papain, tripsin, ve pankreatine karşı duyarlı ancak pepsin, katalaz, amilaz ve lipaz enzimlerine, organik çözücülere, deterjanlara, β -merkaptotanol ve EDTA'ya karşı dayanıklı olduğunu bulmuştur.

5.5.5. Liyofilize edilmiş bakteriyosin için uygun depolama sıcaklığı ve süresi

E. faecalis KT11'in ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine depolama sıcaklığı ve süresinin etkisini belirlemek için liyofilize edilmiş örnekler dört farklı sıcaklıkta 90 gün boyunca saklanmıştır. Deneyden elde edilen sonuçlara göre 4°C, -20°C ve -80°C'de saklanan liyofilize bakteriyosinin 90 gün boyunca aktivitesinin koruduğu ancak 25°C'de saklanan örneğin aktivitesinin tamamen kaybolmasa da azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirilecek olursa, bakteriyosinin kimyasal koruyuculara alternatif gıda koruyucusu olarak ve ürünün raf ömrünü iyileştirmek açısından kullanımı mümkündür. Test edilen bakteriyosinin gıda koruma amaçlı kullanımı söz konusu olduğunda belirli koşullarda aktivitesini yitirmeden en az 3 ay kadar depolanabileceği gösterilmiştir.

L. lactis tür ve suşları tarafından üretilen nisin, laktokoksin R ve laktokoksin MMT24 (Ray, 1992; Yildirim and Johnson, 1998; Ghrairi et al., 2005) ve enterokoklar tarafından üretilen enterosin A ve B'nin (Herranz et al., 2001) liyofilizasyon işleminden etkilenmediği ve düşük derecelerde depolama koşullarında (-20 ve -80°C) aktivitesini 6 ay boyunca muhafaza ettiği belirtilmektedir. Marekova ve ark. (2003) yaptığı bir çalışmada *E. faecium* EK13'ün ürettiği bakteriyosinin 4 ve -20°C'de 1 hafta, 1 ay ve 1 yıl süreyle saklayıp aktivitesindeki değişiklikliği gözlemlemişlerdir, sonuç olarak uzun süreli depolamalarda aktivitenin stabilitesini koruduğunu söylemişlerdir. Bilgin (2008) yaptığı bir çalışmada *Enterococcus faecium* tarafından üretilen enterosin HZ'nin -80°C'de 3 ay depolama sürecinde aktivitesini koruduğunu belirlemiştir.

5.5.6. Bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* KT11 için uygun saklama koşulu

Süt ürünlerinde başlangıç kültürü kullanımı 19. Yüzyıl sonlarında başlamış ve 1890 yılında starter endüstrisi kurulmuştur (Aslım ve ark., 2000). Başlangıç kültürü olarak kullanılacak suşun üretim tesislerine iletilmesi sırasındaki güçlükler liyofilizasyon (dondurularak kurutma) işlemi ile çözüme ulaşmıştır.

Liyofilizasyon işlemi sonunda kültürün canlılık ve aktivitesi üzerine bakterinin cinsi, türü, suşu, yoğunluğu, üretme ortamı, kültürde kalan nem miktarı, depolama

koşulları (süre, sıcaklık, ışık) ve liyofilize kültürün çözülmesi gibi faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. Yaptığımız bu çalışmada bakteriyosin üreticisi olan *E. faecalis* KT11'in liyofilizasyon işleminden hangi derecede etkilendiği ve bakteriyosin üretme yeteneğinde kayıp olup olmadığı belirlenmiştir. Bunun için belli koşullarda (-80, -20, +4 °C'de, 90 gün) depolanan liyofilize kültürlerden belli aralıklarla alınıp aktiflenmiş ve kültür süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitesini koruyup korumadığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara bakılarak *E. faecalis* KT11'in liyofilizasyon işleminden olumsuz etkilenmediği belirlenmiştir. Yine ürettiği bakteriyosinin aktivitesi deneyerek antimikrobiyal aktivitede bir kayıp olmadığı da doğrulanmıştır.

5.5.7. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması

Bakteriyosinin elektroforetik profili ve HPLC profilinin belirlenmesinde kullanılacak örnek liyofilize edilerek ve vakumla kurutulularak konsantre edilmiş aynı ayrıca protein miktarları ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenerek kontrol süpernatant ile karşılaştırılmıştır. Liyofilize ve vakumla kurutulmuş süpernatantların kontrol süpernatanta göre içerdiği protein miktarlarının daha fazla olduğu belirlenmiştir, bununla doğru orantılı olarak bakteriyosinin aktivitesi de daha fazladır. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre liyofilize süpernatantın aktivitesi vakumla kurutulmuş süpernatandan daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bakteriyosinin kısmi olarak saflaştırılması aşamasında liyofilize edilmiş süpernatantla çalışmalara devam edilmiştir. Konsantre süpernatant sırasıyla %40, %60 ve %80 oranında amonyum sülfat ile doyurulmuş ve diyaliz edilerek proteinlere bağlanan tuz uzaklaştırılmıştır.

Domuz dışkılarından izole edilen *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosinin elektroforez profilinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak %80 amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve bir gece boyunca molekül ağırlığı 1000 Da olan proteinlerin geçebileceği diyaliz membranında diyalize bırakılmıştır (Toit et al., 2000).

E. faecalis S37 izolatından elde edilen süpernatant üç seferde son konsantrasyon %80 olacak şekilde amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutulmuştur. Çöktürme sonunda

elde edilen tuza bağlanmış proteinler ters faz HPLC kolonuna yüklenmek üzere +4 °C’de 12 saat diyalize bırakılmıştır (Belguesmia et al., 2010).

Streptococcus thermophilus suşundan elde edilen süpernatantın %80 oranında amonyum sülfat çöktürmesi ile konsantre edilmiş ve tubuler selüloz membranda 24 saat bekletilerek diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonrası örnek iyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılmıştır (Aslam et al., 2011).

Lactobacillus lactis izolatından elde edilen süpernatantın %80 çöktürme sonrası 1 gece boyunca diyalize bırakılmıştır. Diyalizat DEAE Selüloz A-50 kolon (20mm diameter X 60 mm long)’a yüklenerek iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Elde edilen proteinin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile belirlenmiştir (Rajaram et al., 2010).

5.5.7.1. Bakteriyosinin elektroforetik profilinin belirlenmesi

Bakteriyosin içeren süpernatana yapılan amonyum sülfat çöktürmesi ve devamında uygulanan diyaliz işlemi ile konsantre edilen proteinlerin molekül ağırlığının belirlenmesi için SDS-PAGE kullanılmıştır. Tricine jel hazırlanarak protein bu jele yüklenmiş ve marker ile birlikte yürütülmüştür. Jeldeki proteinin antimikrobiyal aktivitesi *S. aureus* test bakterisine karşı denenmiştir.

Yürütülen jeldeki protein bandı ile aktivitenin gözlemlendiği bant aynı yerdedir bu sebeple *E. faecalis* KT11’in ürettiği antimikrobiyal etkili maddenin protein yapısında olduğu ve bakteriyosin olarak adlandırılabilceği onaylanmıştır. Marker ile karşılaştırıldığında ise antimikrobiyal aktiviteye sahip proteinin molekül ağırlığının 3,5 ile 6,5 kDa aralığında olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* KT11’in ürettiği bakteriyosinin SDS-PAGE elektroforezde yürütülmesi ile tek bant oluştuğu gözlemlenmiştir.

E. faecalis RJ-11 suşundan elde edilen süpernatandan elde edilen konsantre protein çözeltisi tricine SDS poliakrilamid jel elektroforezine yüklenerek yürütülmüş ve jel Coomassiae brilliant blue ile boyandıktan sonra antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için tween 80 ile yıkanmıştır. Boyanan jel marker ile karşılaştırılarak antimikrobiyal

aktiviteye sahip proteinin molekül ağırlığı 3,5 ile 5,6 kDa olarak belirlenmiştir (Yamamoto, 2003). *Enterococcus faecalis* BFE 1071 suşu tarafından üretilen bakteriyosin (enterosin 1071), enterosin 1071A ve enterosin 1071B olarak adlandırılan iki peptitten oluşmaktadır. Bu peptitler sırasıyla; 4.285 kDa ve 3.899 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Sırasıyla 39 ve 34 aminoasit içermektedirler (Balla et al., 2000). Tulini ve ark. (2011) *E. faecium* 130'un ürettiği bakteriyosin ekstraktını SDS-PAGE'de yürütmüşler ve 3,5 kDa ile 14,3 kDa molekül ağırlığı arasında iki adet protein bandı gözlemlemişlerdir. Jelin antimikrobiyal aktivite testleri yapıldığında, aktivitenin molekül ağırlığı 6,5kDa ile 3,5 kDa arasında kalan bantta olduğunu belirlemişlerdir.

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* Bn1'in ürettiği thuricin Bn1'in SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 3 kDa olarak belirlenmiştir (Urgas et al., 2012). *Streptococcus thermophilus*'un ürettiği bakteriyosinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 2,7 kDa olarak tespit edilmiştir (Aslam et al., 2011).

5.5.7.2. Bakteriyosinin HPLC profilinin belirlenmesi

Çalışma için hazırlanan ham protein (diyalizat) HPLC'ye yüklenmiş ve ters faz sistemi kullanılarak ayırmlar gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda 230 nm dalga boyunda izlenerek 60 dakika süresince, 0-100 %B tampon çözeltisi olacak şekilde gradient faz uygulanmıştır. Bu aşamada yürüyüşten elde edilen fraksiyonların her iki dakikası farklı eppendorf tüplere alınarak toplamda 30 farklı fraksiyon elde edilmiş ve *S. aureus* test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir.

18, 20, 22, 26, 28 ve 30. dakikada alınan fraksiyonlarda aktivite tespit edilmiştir. Bu çalışmayla aktivitenin bakteriyosinden kaynaklandığı bir kez daha doğrulanmıştır. İleride yapılacak bir çalışma olarak aktivitenin gözlendiği fraksiyonlar aynı koşullarda daha iyi bir saflaştırma için HPLC ye yüklenebilir bu doğrultuda protein tanımlanabilir.

Huang ve ark. (2013) *E. faecalis* suşunun ürettiği enterocin RM6 ham ekstaktını C18 ters faz kolonda yürüterek 35 dakika boyunca dakikada 1,5 ml akış hızıyla 0-100 %A tampon çözeltisi olacak şekilde gradient faz uygulamıştır. Bu yürüyüşü spektrofotometrik olarak 280 nm dalga boyunda izlemişlerdir. Aktivitenin bulunduğu

fraksiyon 31. dakikada gelmiş ve yaptığımız çalışmadan farklı olarak saf bir pik elde edilmiştir. *E. faecalis* KT11'den elde ettiğimiz bakteriyosin ekstraktı aynı pik üzerinde dalgalanmalar şeklinde birbirini takip eden dakikalarda gelmiştir ve bu bölgenin daha sık zaman aralığı uygulanarak tekrar yürütülmesi saf bir pik elde etmemizi sağlayabilir.

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* Bn1 bakterisinin ürettiği thurucin Bn1 bakteriyosini 280±4 nm dalga boyunda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Fraksiyonların agar kuyu yöntemiyle test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir (Urgas et al., 2012).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* B14 ün ürettiği bakteriyosin ters faz Pico-Tag C18 kolon (3,9mm x 15 cm) kullanılarak HPLC ile saflaştırılmıştır, yürüyüş 254 nm dalga boyunda izlenmiştir. Ayrıca saflaştırılan proteinin 49 aminoasitten oluştuğu ve molekül ağırlığının 6,2 kDa olduğu belirlenmiştir (Ivanova et al., 2000).

5.6. Bakteriyosin Üretimi için Optimum Koşulların Belirlenmesi

Bakteriyosin üretimi ortam bileşenleri ve kültür şartları gibi faktörlerden etkilenmektedir. Genelde optimum gelişme için gerekli şartlara yakın değerlerde bakteriyosin üretimi artmaktadır. Bu yüzden, üretimi artırmak için, çevresel şartların optimize edilmesi oldukça önemlidir. Bu yüzden *E. faecalis* KT11'in ürettiği bakteriyosinin üretim koşullarının optimizasyonu çalışmasında; sıcaklık, pH, süre, inokulum yoğunluğu, anaerobik koşulda üreme gibi farklı parametreler denenmiştir. Bakteriyosin üretimi için gerekli koşullar her üretici organizma için değişebilmektedir.

E. faecalis KT11'in bakteriyosin üretimini en verimli şekilde gerçekleştirdiği inkübasyon sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiştir. Elde edilen bakteriyosinin üç değişik test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitesi AU/ml cinsinden belirtilmiştir. *S. aureus*'a karşı aktivitesi 178 AU/ml, *P. aeruginosa*'ya karşı aktivitesi 89 AU/ml, *M. luteus*'a karşı aktivite 11 AU/ml dir. Yaptığımız çalışmaya benzer başka çalışmalar; *E. faecium* GM-1'in en verimli aktivitesinin 176,2 AU/ml olarak belirlendiği büyüme sıcaklığı 40 °C (Kang and Lee, 2005), *E. mundtii*'nin bakteriyosin üretiminin en iyi olduğu sıcaklık 45°C (Settani et al., 2008) olarak tespit edilmiştir. Mozzarella

peynirinden izole edilen *E. faecium* 130 suşu farklı sıcaklıklarda geliştirildiğinde ürettiği bakteriyosinin *L. monocytogenes*'i en iyi inhibe ettiği sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir (Tulini et al., 2011).

Bakteriyosin üretimi için en uygun başlangıç pH'sı 6 olarak belirlenmiştir. Bakteriyosinin aynı test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi AU/ml cinsinden belirtilmiştir. *S.aureus*'a karşı aktivitesi 178 AU/ml, *P. aeruginosa*'ya karşı aktivitesi 44 AU/ml, *M.luteus*'a karşı kontrol grubunda aktivite olmasına rağmen başlangıç pH'ları değiştirildiğinde AU/ml cinsinden aktivitesi belirlenememiştir. *E. faecium* GM-1 nin en iyi geliştiği pH 6,0-6,5 olarak belirlenmiş aktivitesi 171,8 AU/ml olarak hesaplanmıştır (Kang and Lee, 2005), *E. faecalis* BFE 1229 suşunun pH 6'da aktivitesi maksimum düzeyde 1600 AU/ml olarak bulunmuştur (Toit et al., 2000). *E. faecium*'un bakteriyosin üretimini en iyi gerçekleştirdiği pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışmada (pH 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10) pH 5'te üretilen bakteriyosinin aktivitesi 200 AU/ml, diğer pH lardaki aktivite ise 300 AU/ml olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada başlangıç pH'larının bakteriyosin üretimi açısından bir önemi olmadığı belirtilmiştir (Moshood and TengkuHaziyaamin, 2012).

Optimum üretim süresinin belirlenmesi çalışmasında bakteriyosin aktivitesinin en iyi olduğu zamanın 18. saat olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında bakteriyosinin aktivitesi *S. aureus*'a karşı 178 AU/ml, *P. aeruginosa*'ya karşı 89AU/ml, *M. luteus*'a karşı 11 AU/ml olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda 18. saat sonunda süpernatanın son pH'ları ölçülmüş ve kültür yoğunluğu da spektrofotometrik olarak belirlenerek birbiriyle karşılaştırılmıştır. Alınan verilere göre en verimli üretimin gerçekleştiği 18. saatte elde edilen süpernatanın son pH'sı 4,71 ve kültürün optik yoğunluğu ise 1,401 olarak belirlenmiştir. *E. faecium* tarafından üretilen enterosin HZ üretiminin, 8-12. saatlerde maksimum düzeyde olduğu, optimum pH'nın ise 6,5-7,0 olduğu belirlenmiştir (Bilgin, 2008). *E. faecium* MRS brothta 37°C'de geliştirildiğinde zamana bağlı olarak ürettiği bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi izlenmiştir, 2.saatte alınan örneğin aktivitesi 100 AU/ml iken 8. saatin sonunda aktivite 12800 AU/ml ye ulaşmıştır (Tulini et al., 2011).

İnokulum miktarının bakteriyosin üretimi ve aktivitesi üzerine etkisini ortaya koymak için değişik düzeylerde (%0,05-10) üretici bakteri MRS besiyerine ilave edilip bakteriyosin üretiminin maksimum olduğu 40°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. İnokulum miktarı %4 düzeyinde kullanıldığında bakteriyosin üretiminin maksimum düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* KT11 anaerobik koşullarda geliştirilerek süpernatanın antimikrobiyal aktivitesi *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *M. luteus* test bakterilerine karşı denenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.17 de belirtildiği gibi AU/ml cinsinden belirlenmiştir ve aerobik koşullarda elde edilen süpernatanın aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda aerobik koşullarda gerçekleştirilen üretimin daha verimli olduğu belirlenmiştir.

Bakteriyosin üretiminin en verimli olduğu parametreler belirlendikten sonra tüm test bakterilerine ve bunlara sonradan ilave ettiğimiz yeni Gram negatif bakterilere ve antibiyotik dirençli bakterilere karşı optimum koşullarda üretilen bakteriyosinin aktivitesi çalışılmıştır. *B. subtilis* ve *W. viridescens* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermeyen bakteriyosinin, koşullar optimize edildikten sonra bu bakterilere karşı etkili olduğu görülmüştür. Yeni eklenen Gram negatif bakterilere ve metisilin dirençli *S. epidermidis*, metisilin ve vankomisin dirençli *S.warneri*’ye karşı oldukça iyi aktivite gösterdiği, MRSA, VRE, *Leu. mes. ssp. mes.* ve *Lb. acidophilus* bakterilerine karşı ise etkinin arttığı belirlenmiştir.

Gelişim sıcaklığı ile bakteriyosin üretiminin ilişkili olduğu bakteriyosinlere örnek olarak, laktosin A, enterosin 1146, laktosin S, amilovorin 1471, nisin Z ve mezenterosin verilebilir (Todorov and Dicks, 2005).

5.7. *E. faecalis* KT11’in bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

LAB’lerinin probiyotik olarak kullanılabilmesi için gastrointestinal sistemde zorlu koşullarda hayatta kalmak zorundadırlar. Mide ve ince bağırsakta etkili olabilmeleri için midede pH 1 ile 3 arasında ve ince bağırsakta %0,3’lük safra tuzuna karşı direnç göstermeleri gerekmektedir. Düşük pH’ya ve safra tuzunun yüksek

konsantrasyonlarına direnç özelliği probiyotik bakterilerinin seçiminde en önemli kriterdir (Havenaar et al., 1992)

E. faecalis KT11'in asidik koşullara olan dayanıklılığı test edilmiştir ve pH 1'de 2 saatin sonunda canlılığını koruduğu fakat 4 ve 6. saatlerde canlılığını yitirdiği gözlenmiştir. Bakteri kültürünün pH 2'de 4 saat ve pH 3'te ise 6 saate kadar canlılığını koruduğu belirlenmiştir.

Üretici kültürün midede canlı kalabilmesi için sadece asidik ortama dirençli olması yetmez. Midede salgılandığında inaktif halde olsa da mide öz suyunda aktif hale gelen pepsin enzimine de dirençli olmalıdır. Bu amaçla *E. faecalis* KT11, pH'sı 2, 3 ve 4 olan farklı yapay mide sıvısıyla 4 saat boyunca muamele edilmiştir. Kültürün pH'sı 2 olan yapay mide sıvısına dayanıklı olmadığı tespit edilmiştir ancak pH'sı 3 ve 4 olan yapay mide sıvısına dirençli olduğu belirlenmiştir. Pepsin enziminin en aktif olduğu pH 2'dir, pH nötrale yaklaştıkça pepsinin aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Campos and Sancho, 2003). Bu sebeple asidik pH'ya direnç çalışmasında *E. faecalis* KT11 canlılığını koruyabilse de pepsin enzimi varlığında yapay mide sıvısında canlı kalamamıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda bakterinin mide koşullarında canlı kalabildiği belirlenmiş ve bu durum probiyotik olarak kullanım potansiyeli olduğunu göstermiştir, ancak gerçek mide öz suyundaki dayanıklılığı da incelenmelidir. Bu çalışmaya benzer olarak *E. faecium* OZ-E25 suşunun midenin yüksek asitli ortamından geçerek bağırsaklara ulaşabilme yeteneğini belirlemek amacıyla mide sıvısı koşullarına benzer bir ortam oluşturulmaya çalışılmıştır, pH 3'te 3. saatin sonunda %77,84 ve pH 3-pepsin denemesinde 3. saatin sonunda %65,87'lik canlılık oranını koruduğu belirlenmiştir (Yürümez, 2011). Yapılan bir çalışmada mide öz suyuna benzer bir ortam hazırlanarak 24 adet probiyotik bakterinin bu koşula direnci incelenmiş, pH 3'te 3 saat sonunda *L. casei* ve *L. rhamnosus*'un 2,7-5,9 logaritmik birim azaldığını belirlenmiştir (Vinderola and Reinheimer, 2003).

Laktik asit bakterilerinin bağırsağa ulaşması için geçen 90 dakikalık sürede canlı kalması probiyotik olarak seçimleri açısından yeterli olmaktadır (Chang et al., 2001). Sindirim sisteminin bir parçası olan ince bağırsakta da canlılığını koruyabilmelidir. Bundan dolayı, ince bağırsakta salgılanan safra suyunun *E. faecalis* KT11 üzerine

etkisini incelemek için %0,3, %0,5 ve %1 lik konsantrasyonlarda safra tuzu içeren ortamda bakteri kültürü 6 saat boyunca inkübe edilmiştir ve tüm konsantrasyonlarda canlılığını koruduğu belirlenmiştir. Böylece probiyotik olarak kullanılabileceğini düşündüğümüz *E. faecalis* KT11'in ince bağırsakta tutunup canlılığını sürdürebileceği tespit edilmiştir. Buna benzer olarak *E. faecium* OZ-E25 suşunun %0,3, %0,5 ve %1 oranında safra tuzu içeren MRS besiyerinde canlılıkları test edilerek ince bağırsakta salgılanan safra suyunun etkisi incelenmiştir. *E. faecium* OZ-E25 suşu 4 saatlik inkübasyon sonucunda canlı sayısında azalma ile birlikte istenen canlılığı gösterdiği tespit edilmiştir (Yürümez, 2011). Yine benzer sonuçlara sahip başka bir çalışmada bebek gaytasından izole edilen laktik asit bakterilerinden %43'ünün, %0.4'lük safra tuzu konsantrasyonunda, canlılıklarını devam ettirdikleri bulunmuştur (Khalil et al., 2007)

Direnç, bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımı sonucu ortaya çıkmadığı bu durum bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma mekanizmasının bir parçasıdır. Ancak, antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanıma girmesiyle birlikte yıllar içinde farklı ve gittikçe artan sayıda dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmış ve bunlarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar yaşanmaya başlanmıştır.

LAB'de diğer bakterilere benzer antibiyotik direnç sorunu göstermektedir. LAB'nin kendisi patojen değildir, ama antibiyotik direnç genlerini patojen bakterilere transfer ederek insan ve hayvanlarda sağlık sorunlarına neden olabilir (Hereros et al., 2005). Bu yüzden *E. faecalis* KT11'in antibiyotiklere olan duyarlılığı test edilmiştir. Chloramphenicol, erythromycin, penicilin G, amoxycillin, novabiocin, vancomycin ve methicillin karşı duyarlı, optochin, polymixin B, bacitracin, streptomycin, lincomycin ve gentamicine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Yürümez'in (2011) yaptığı araştırmada, *E. faecalis* KT11'den farklı olarak, *E. faecium* OZ-E25 novabiocin ve erythromycine yarı hassas, vankomisine ise dirençli olduğunu belirlemiştir. Ayrıca çalışmada suşun piperallisin, penicilin, clindamycin ve chloramphenicol antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu; piperallisin, cefoperazine, tetracyclin, rifampicin, ve cefuroxime sodium antibiyotiklerine karşı yarı hassas olduğu ve denenen diğer

antibiyotiklere karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Temmerman ve ark., (2003) tarafından yapılan çalışmada, izole edilen *Enterococcus* türlerinin disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılıkları incelenmiş ve %38'inin vankomisine dirençli oldukları belirlenmiştir.

5.8. *E. faecalis* KT11'e Ait Süpernatanın Antioksidan Aktivitesi

Antioksidan maddeler, fermentasyon sırasında oluşurlar ve insanlarda aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır (Young and Woodside, 2001). Çalışmanın bu aşamasında liyofilize edilerek saklanan süpernatanın, aerobik ve anaerobik koşullarda üretilen süpernatanın antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Aktiviteleri kontrol olarak kullanılan askorbik asit ve butillenmiş hidroksi toluen ile karşılaştırılmıştır. İnhibisyon yüzdesi hesaplandığında antioksidan aktivitesi en yüksek olan örneğin, anaerobik koşulda elde edilen süpernatana (%95,65) ait olduğu belirlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- 1- *E. faecalis* KT11'in kültür süpernatanı, antibiyotik dirençli bakteriler de dahil olmak üzere bir çok Gram pozitif ve bazı Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Antimikrobiyal aktiviteden sorumlu madde/maddelerin protein/peptid yapısında olduğu da kısmi saflaştırma ve tanımlama çalışmaları sonucunda belirlenmiş ve bu madde/maddeler bakteriyosin olarak adlandırılmıştır. Yüksek sıcaklıkta ve geniş bir pH aralığında stabil kalan ve liyofilizasyon sonrasında aktivitesini yitirmeyen bu bakteriyosinin, saflaştırılması ve protein yapısının aydınlatılmasından sonra, tıbbi ve gıda koruma amaçlı kullanım potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.
- 2- Ayrıca *E. faecalis* KT11'in birçok biyolojik bariyere karşı dirençli olması (düşük pH, yüksek safra konsantrasyonu ve yapay mide sıvısı), laktozu fermente etmesi, EPS, antioksidan maddeler ve bakteriyosin üretimi gibi özellikler taşıması, probiyotik bir kültür olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu

göstermektedir. Probiyotik niteliklerinin in-vivo çalışmalarla desteklenmesinden sonra, insan ve diğer canlı gruplar için probiyotik olarak kullanım olanakları değerlendirilebilir.

- 3- Buna ek olarak *E. faecalis* KT11'in; homofermantatif olması, laktozu fermente etmesi, asit üretimi, kazeini hidrolize etmesi ve yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklı olması, probiyotik nitelikli süt ürünleri üretiminde starter kültür olarak kullanım potansiyeli olduğunu göstermektedir.

KAYNAKÇA

- Abo-Amer, A. E., Shobrak, M. Y., 2012, Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* isolated from oral cavity of desert foxes, African Journal of Microbiology Research, Vol 6 (36), 6589-6599.
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M., 2009, Bakteriyosinler: alternatif gıda koruyucuları, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 25 (1-2) 59-70.
- Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A. and Valdivia, E., 2005, Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48, Int. J. Food Microbiol., 103, 179–190.
- Anderson, R., 1989, Food processing, lactic acid bacteria in the production of food, SIK Publication, Food Laboratory Newsletter, 14-17.
- Altuntaş, E. G. ve Ayhan, K., 2010, Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosinlerin kullanımı, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, Cilt 16, Sayı 1, 2010, Sayfa 113-120.
- Aslam M., Shahid M., Rehman F. U., Naveed N. H., Batool A. I., Sharif S. and Asia A., 2011, Purification and characterization of bacteriocin isolated from *Streptococcus thermophilus*, African Journal of Microbiology Research Vol. 5(18), pp. 2642-2648,
- Aslım, B., Beyatlı Y. ve Halkman, K., 2000, Yoğurt starter kültür metabolitlerinin inhibisyon etkisi Turk J Biol., 24 , 65–78
- Asutay, D., 2007, Yöresel bir gıdadan izole edilen bakteriyosin üreten bakterinin teşhisi ve bakteriyosinin karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 89 s.
- Axelsson, L. T., 1993, Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In ‘‘ Lactic Acid Bacteria’’, Ed: Salmina, S., Wright, A.V., Marcel Dekker Inc., USA, 1-63.

- Balla, E., Dicks, L.M.T., Du Toit, M., Van Der Merwe, M.J. and Holzapfel, W.H., 2000, Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071, Applied and Environmental Microbiology, 66; 1298-1304.
- Başığit, G., 2004, Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılma özellikleri, Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 106 s.
- Batistaa, C.V.F., Román-González, S.A., Salas-Castillo, S.P., Zamudio, F.Z., Gómez-Lagunas, F. and Possani, L.D., 2007, Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, Volume 146, Issues 1–2, 147–157.
- Belguesmia, Y., Choiset, Y., Prévost, H., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M., and Drider, D., Partial Purification and Characterization of the Mode of Action of Enterocin S37: A Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* S37 Isolated from Poultry Feces Journal of Environmental and Public Health, 8 pages.
- Bergey, D. H., 1923, All of the unknowns will fall into the following groups in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The pink book on the shelf in the laboratory).
- Biler, B., 2009, *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu ve saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bilgin, H., 2008, Fermente süt ürününden izole edilen bakteriyosinojenik bir bakterinin antimikrobiyal aktivitesi, Yüksek lisans tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 53 s.
- Campos, C.A., Rodríguez, O., Calo-Matab, P., Pradob, M. and Barros-Velázquez, J., 2006, Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*), Food Research International, Volume 39, Issue 3, 356–364.
- Caliskan, F., Garcíab, B.I., Coronas, F. I. V., Restano-Cassulini, R., Korkmaz, F., Sahin, Y., Corzo, G. and Possani, L. D., 2012, Purification and cDNA cloning of a

novel neurotoxic peptide (Acra3) from the scorpion *Androctonus crassicauda*, *Peptides*, Volume 37, Issue 1, September 2012, Pages 106–112.

Campos, L.A. and Sancho, J., 2003, The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH, *FEBS Letters*, Volume 538, Issue 1, Pages 89-95.

Chang, Y., Kim, J., Kim, H., Kim, W., Kim, Y. and Park, Y., 2001, Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies, *Antonie van Leeuwenhoek*, 80; 193-199.

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

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

Cintas, P., 2001, Chirality of living systems: A helping hand from crystals and oligopeptides, *Angewandte Chemie International Edition*, Volume 41, Issue 7, pages 1139–1145.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L., 2001, Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1-20.

Cotter P. D., Hill C., Ross R. P., 2005, Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788.

Çakır, İ., Karahan, A., G., Çakmakçı, L., 2002, Probiyotikler ve Etki Mekanizmaları, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, Vol. 6, No. 12, 15-19.

Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., Weilan, H.E., Norton, R.S. and Nakajima, T., 2001, Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*, *Biochem. J.* (2001) 359 (35–45).

- Çon, A. H., Gökalp, H. Y., 2000, Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 30, 180-190.
- Daeschel, M. A., 1989, Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, Food Technology, 164-167.
- Davidson, P. M. and Hoover, D. G., 1993, Antimicrobial components from lactic acid Bacteria, "Salminen, S. and von Wright, a. (ed): Lactic Acid Bacteria". Marcel Dekker Inc. New York, 127.
- Deraz, S.F., Karlssoni, E.N., Hedstörn, M., Andersson, M.M., Mattiasson, B., 2005, Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, Journal of Biotechnology 117: 343-354.
- Devriese, L. A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K., Haesebrouck, F., 1995, Identification of *Enterococcus* Species Isolated From Foods of Animal Origin, International Journal of Food Microbiology, Vol. 26, No. 2, 187-197.
- Dicks, L.M.T., Heunis, T.D.J., Van Staden, D.A., Brand, A., Sutyak Noll, K. and Chikindas, M.L., 2011, Medical and Personal Care Applications of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. In: Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications, D. Drider and S. Rebuffat (eds.), DOI 10.1007/978-1-4419-7692-5_19, p: 391-421.
- Diep D. B., Nes I. F., 2002, Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria, Current Drug Targets, 3, 107.
- Diez-Gonzalez, F., 2007, Applications of Bacteriocins in Livestock. Curr. Issues Intest. Microbiol. 8: 15-24 . Current Issues in Intestinal Microbiology (CIIM).
- Dinçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H., 2009, Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler, Journal of Food, 35, 55-62.
- Doğan, P., 2009, *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminden sorumlu genin aktarımı, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 115s.

- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Metaxopoulos, J., 2006, Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131, Meat Science Volume 74, Issue 4, December 2006, Pages 690–696.
- Drinan, D. F., Robin, S. and Cogan, T. M., 1976, Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria, Applied Environment Microbiology, 31(4):481.
- Dündar, H., 2006, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu ve saflaştırılması, Doktora, Biyoteknoloji A.B.D., 195 s.
- Elçiöğlü, Ö., 2010, Kargu tulum peynirinden izole edilen laktik asit bakterilerinin starter kültür ve probiyotik özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- El-Gendy A. O., Essam T. M., Amin M. A., Ahmed S.H., Nes I. F., 2012, Clinical Screening for Bacteriocinogenic *Enterococcus faecalis* Isolated from Intensive Care Unit Inpatient in Egypt, Journal Microbiology Biochemical Technology, 4: 161-167.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A., 2000, Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev., 24; 85-106.
- FAO/WHO, 2002, Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods, Report of a Joint FAO/WHO Working Group, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1 2002.
- Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. and Holzapfel, W. H., 2003, Enterococci in foods a conundrum for food safety, International Journal Food Microbiology, 88, 105-122.
- Fenelon, M.A., Ryan, M.P., Rea, M.C., Guinee, M.C., Ross, R.P., Hill, C. and Harrington, D., 1999, Elevated temperature ripening of reduced fat cheddar made with or without lacticin 3147-producing starter culture, Journal of Dairy Science, V:82 I:1 10-22.
- Garcia, M.T., Lucas, R., Abriouel, H., Omar, N. B., Perez, R., Grande, M.J., Canamero, M.M. and Galvez, A., 2004, Antimicrobial activity of enterocin EJ97 against

'*Bacillus macroides/Bacillus maroccanus*' isolated from zucchini pure, Journal Applied Microbiology, 97, 731–737.

Gardiner , G. E., Ross, R. P., Wallace, J. M., Scanlan, F. P., Jägers, P. P. J. M., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K. and Stanton, C., 1999, Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47 (12), pp 4907–4916.

Ghamat, A., 2010, Bozadan izole edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA23 suşunun ürettiği bakteriyosinin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Ghraiiri, T., Frere, J., Berjeaud, J.M., Manai, M., 2000, Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese, Inter. J. Food Microbiol., 105:389-398.

Gillor, O., Nigro, L. M., Riley, M. A., 2005, Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials, Current Pharmaceutical Design, Volume 11, Number 8, pp. 1067-1075(9).

Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. A., 2008, The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics, Applied Microbiology and Biotechnology, 81 (4): 591-606.

Goktepe, I., Juneja, K.V. and Ahmedna, M., 2006, Probiotics in Food Safety and Human Health, A.B.D.

Guder, A., Wiedemann, I. and Sahl, H. G., 2000, Posttranslationally modified bacteriocins the lantibiotics, Peptide Science, Volume 55, Issue 1, pages 62–73.

Gültekin, M., 2004, Probiyotikler, ANKEM Dergisi, 18 (Ek 2): 87-89.

Hammes, W., P. and Hertel, C., 2001, Research Approaches for pre- and Probiotics: Challenges and Outlook Food Research, International Journal of Food Microbiology, 35, 165-170.

Hampikyan, H. ve Çolak, H., 2007, Nisin ve gıdalardaki antimikrobiyal etkisi, TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 6 (2).

- Harrigan, W. F., 1998, Laboratory Methods in Food Microbiology, Part:I,p103.
- Hartwig, V. G., Brumovsky, L. A., Fretes, R. M. and Sanchez Boado, L., 2012, A novel procedure to measure the antioxidant capacity of yerba maté extracts, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32 (1): p. 126-133.
- Havenaar, R., Ten Brink, B. ad Huis in't Veld J.H.C., 1992, Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R., Ed., *Probiotics: The Scientific Basis*, Chapman and Hall, London.
- Herrerosa, M.A., Sandovalb, H., Gonzáleza, L., Castrob, J.M., Fresnoa, J.M. and Tornadijo, M.E., Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese), *Food Microbiology* Volume 22, Issue 5, 455–459.
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martinez, J.M., Rodríguez, J.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Cintas, L.M., 2001, *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B, *Food Microbiology*, 18(2): 115-131.
- Huang, E., Zhang, L., Chung, Y. K., Zheng, Z. and Yousef, A. E., 2013, Characterization and Application of Enterocin RM6, a Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* , *BioMed Research International*, 6 pages.
- Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S., and Dousset, X., 2000, Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza bulgarian traditional cereal beverage, *Vestnik Moskovskogo Universiteta, Khimiya*, Vol. 41, No. 6.
- Jacob, F., Lwoff, A., Simonovitch, A. and Wollman, E. L. 1953, Définition de quelques terms relatifs á la lysogénie, *Ann. Inst. Pasteur*, 84, 222-224.
- Kang, J.H. and Lee M.S., 2005, Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant, *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1169–1176.

- Karakaş, A., 2005, Beyaz peynir ve fermente sucuklardan *Enterococcus faecium*'un izolasyonu ve tanımlanması, Yüksek Lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kayser, F. H., 2003, Safety aspects of Enterococci from the medical point of view, International Journal Food Microbiology, 88,255– 262.
- Khalil, R., Mahrous, H., El-Halafawy, K., Kamaly, K., Frank, J. and El Soda, M., 2007, Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt, African Journal of Biotechnonology, 6 (7); 939-949.
- Kıran, F., 2006, Hücre duvarı protein profilleri ve pilazmid içeriklerine göre laktik asit bakterilerinin moleküler tanısı, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 142 s.
- Klaenhammer, T.R., 1988, Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie, 70; 337-349.
- Klaenhammer, T. R., 1993, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, FEMS Microbiol. Rev., 12; 39-86.
- Koral, G., 2011, Bozadan izole edilen *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* GLY32 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 94 s.
- Köseoğlu, V. K., 2007, Model sistemlerde laktik asit bakterilerinin bazı patojenler üzerine antibakteriyal etkilerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 59 s.
- Kurt, Ş. ve Zorba, Ö., 2005, Bakteriyosinler ve gıda kullanım olanakları, YYÜ Vet. Fak. Derg. 16 (1): 77-83.
- Lee, N.K., Paik, H.D., 2001, Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal, Food Microbiology, Volume 18, Issue 1, 17–24.

- Leroy, F., and Vuyst, L. D., 2001, Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C35 is cell density limited and occur in the very early growth phase, *International Journal of Food Microbiology*, 72 (2002) 155-164.
- Line, J. E., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E., Seal, B. S., Siragusa, G. R., Stern, N. J., 2008, Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, *Antimicrob. Agents. Chemother.*; 52: 1094–1100
- Losteinkit, C., Uchiyama, K., Ochi, S., Takaoka, T., Nagahisa, K. and Shioya, S., 2001, Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91; 390-395.
- Madera, C., Garcia, P., Janzen, T., Rodriguez, A. and Suárez, E. J., 2003, Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistance to phage infection, *Int. J. Food Microbiol.*, 86; 213-222.
- Manero, A., Blanch, A. R., 1999, Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10): 4425.
- Marekova, M., Nes, I.F., Laukova, A., De Vuyst, L., Skaugen, M., 2003, Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13, *J of Appl. Microbiol.*, 94:52-530.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L. M., Hernández, P. E., 2006, Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of *Enterococci* isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*), *Journal of Food Protection*, 480-698 , 520-531(12).
- 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', Vol 7A, 465 p., 315-422.
- Mayra-Makinen, A. and Biret, M., 1993, Industrial use and production of lactic acid Bacteria, "Salminen, S. and Von Wright, A. (ed), *Lactic Acid Bacteria.*", Marcel Dekker Inc., New York, 65 p.

- McAuliffe, O., Hill, C. and Ross, R. P., 1999, Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 86, Issue 2, pages 251–256.
- Montville, T. J. and Chen, Y., 1995, Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A, *Journal of Applied Bacteriology*, Volume 79, Issue 6, pages 684–690.
- Morgan, S. M., Ross, R. P., Beresford, T. and Hill, C., 2000, Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*, *Journal of Applied Microbiology*, V88: 414-420.
- Moshood A. Y. and TengkuHaziyaamin A. T. A. H., 2012, Optimization of temperature and pH for the growth and bacteriocin production of *Enterococcus faecium* B3L3, *Journal of Pharmac*, pp.49-59.
- Nes, I. F. and Holo, H., 2000, Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria, *Biopolymers*, 55; 50-61.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. and Holo, H., 1996, Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 70; 113-128.
- Nes, I.F., Yoon, S-S. and Diep, D.B., 2007, Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review, *Food Sci. Biotechnol.* 16, 675-690.
- Ogier, J. C., Serror, P., 2008, The enterococcus genus, *International Journal Food Microbiology*, 126, 291-301.
- Okereke, A. and Montville, T.J., 1991, Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria, *Journal of Food Protection*, 54; 349-353.
- Oscariz, J. C. and Pisabarro, A., 2001, Classification and mode of action of membrane active bacteriocins produced by gram-positive bacteria, *Int. Microbiol.*, 12; 123-127.

- Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z., Scheerens J. C. and Miller A. R., 2006, Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (4), 1151- 1157 p.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S. and Kim, H.Y., 2006, Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *J. Appl. Microbiol.* 100, 1171-1185.
- Pasteur, L. ve Joubert, F., 1877, Charbon et septicemie, *C.R. Soc. Biol. Paris*, 85, 101-115.
- Pingitore, E. V., Salvucci, E., Sesma, F., and Nader-Macias, M. E., 2007, Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 557-568.
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi B., Saravanakumar, A., 2010, Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from Marine environment, *Advance Journal of Food Science and Technology* 2(2): 138-144.
- Ray, B., 1992., Nisin of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* as food biopreservative, p. 209-257, In 'Food Biopreservatives of Microbial Origin', B. Ray and M.A. Daeschel, (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P. de Vos, W.M. and Siezen, R.J., 1995, Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 61; 2873-2878.
- Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C. and Ross, R. P., 1996, An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147, *Applied Environment Microbiology*, Vol:62 No:2 612-619.

- Sabia, C., Manicari, G., Messi, P., De Niederhausern, S. and Bondi, M., 2002, Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from italian sausages, *Int. J. Food Microbiol.*, 75, 163- 170.
- Sağdıç, O., Küçüköner, E., Özçelik, S., 2004, Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35 (3-4), 221-228.
- Salminen, S., Deighton, M .A., Benno, Y. and Gorbach, S. L., 1998, Lactic acid bacteria in health and disease, In: Salminen S., von Wright, A. ads. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 211-254.
- Sarika, A. R., Lipton, A. P., Aishwarya, M. S., and Dhivya, R. S., 2011, Efficacy of Bacteriocin of *Enterococcus faecalis* CD1 as a Biopreservative for High Value Marine Fish Reef Cod (*Epinephelus diacanthus*) under Different Storage Conditions *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1 (4): 18-24.
- Schillinger, U. and Lucke, F.K., 1989, Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat, *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8); 1901-1906.
- Seçkin, A. K., Baladura, E., 2010, Gıdaların muhafazasında bakteriyosin ve bakteriyofaj uygulamaları, *Gıda*, 35 (6): 461-467.
- Settanni, L., Valmorri, S., Suzzi, G. ve Corsetti, A., 2008., The role of environmental factors and medium composition on bacteriocinlike inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains, *Food Microbiol.*, 25, 722-728.
- Shagger, M. and Von Jagow, G., 1987, *Anal. Biochem.*, 166,pp. 368–379.
- Sifour, M., Tayeb, I., Haddar, H. O., Namous, H. And Aissaoui, S., 2012, Production and characterization of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* F12 with inhibitory a activity against *Listeria monocytogenes*, the *Online Journal of Science and Technology*, Volume 2, Issue 1, 7 p., 55-61.
- Sit, C. S., Vederas, J. C., 2008, Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins, *Biochemistry and Cell Biology*, 86, 116.

- 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.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ, Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R., 1989, Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, TC Anadolu Üniv. Eğitim, Sağlık ve Bilimsel araştırma çalışmaları Vakfı Yayınları, No: 74, 260s, Eskişehir.
- Temiz, A., 2000, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. III. Baskı. Hatipoğlu Yayınevi. Ankara.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J., 2003, Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products, *International Journal of Food Microbiology*, 81, 1-10.
- Thomas, L.V., Wimpenny, J.W.T., 1996, Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2006-2012.
- Todorov S. D. and Dicks, L.M.T., 2005, Effect of Growth Medium on Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a Strain Isolated from Boza, *Food Technol. Biotechnol.*, 43 (2) 165–173.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2006, Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria Comparison of the bacteriocins, *Process Biochemistry*, 41:11-19.
- Todorov, S.D., Danova, S.T., Van Reenen, C.A., Meincken, M., Dinkova, G., Ivanova, I.V., Dicks, L.M.T., 2006, Characterization of bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions, *Journal of Basic Microbiology*, Volume 46, Issue 3, pages 226–238.
- Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T. ve Holzapfel, W.H., 2000, Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces, *J. Appl. Microbiol.*, 88, 482-494.

- Tok, E. ve Aslım, B., 2007, Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, Cilt 37, Sayı 1, 62-68.
- Toy, N., 2010, Laktik asit bakterileri serbest hücre ekstraktlarının patojen bakterilerin gelişimine ve biyojenik amin üretimine etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Trotter, M., McAuliffe, O. E., Fitzgerald, G. F., Hill, C., Ross, R. P. and Coffey, A., 2004, Variable bacteriocin production in the commercial starter *Lactococcus lactis* DPC4275 is linked to the formation of the cointegrate plasmid pMRC02, Appl. Environ. Microbiol., 70; 34-42.
- Tulini, F. L., Gomes, B. C., DE Martinis, E. C. P., 2011, Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* 130 isolated from mozzarella cheese, Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 31(1): 155-159.
- Tuncer, Y., 2005, Laktokok suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanısı ve bu özelliğin genetik doğasının belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tuncer, Y., Özden, B., Akçel, M., 2008, Tulum Peynirlerinden izole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBML9 ve YBML21 Suşları Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Kısmi Karakterizasyonları, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12-2(2008),141-148.
- Twomey, D., Ross, R. P., Rayn, M., Meaney, B. and Hill, C., 2002, Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications, Antonie van Leeuwenhock, 82: 165-185.
- Unakal, C., Yismaw, G., Gebrehiwot, A., Endris, M. and Moges, F., 2012, Effect of bacteriocin produced from *Enterococcus faecium* against drug resistant bacterial isolates, International Journal of Biomedical and Advance Research.
- Urgas, S., Sezen, K., Katı, H., ve Demirbağ, Z., 2012, Purification and characterization of the bacteriocin Thuricin Bn1 produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bn1 isolated from a hazelnut pest, Journal of Microbiology and Biotechnology (2013), 23(2), 167-176.

- Uymaz, B., 2009, Probiyotik özellik taşıyan gıda ve insan kaynaklı laktobasillerin izolasyonu tanımlanması ve bakteriyosin üretim yeteneklerinin karakterizasyonu, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 146 s.
- Üstündağ, A.Ö. ve Özdoğan, M., 2011, Kanatlı hayvan beslemede bakteriyosinlerin kullanım olanakları, Hayvansal Üretim, 52(2): 69-73.
- VanBelkum M. J., Stiles M. E., 2000, Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria, Nat. Prod. Rep.; 17: 323–335
- Vandenbergh, P. A., 1993, Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth, FEMS Microbiology Reviews, 12; 221-237.
- Vinderola, C. G., Reinheimer. J. A., 2003, Lactic acid starter and probiotic bacteria, a comparative ‘in vitro’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance, Food Research International, 36, 895-904.
- Vuyst, L. D. and Leroy, F., 2007, Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications, Journal of Molekuler Microbiology Biotechnology, 13:194–199
- Whichard, J. M., Sriranganathan, N., Pierson F. W., 2003, Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters, J Food Prot, 66, 220-225.
- Xie L., Miller L. M., Chatterjee C., Averin O., Kelleher N. L., van der Donk W.A., 2004, Lactacin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity, Science, 303, 679.
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., Drosinos, E., H., 2008, Purification and characterization of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* E131, Meat Science, 80, 194-203.

- Yalanca, İ., 2009, Geleneksel et ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direncinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 50 s.
- Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., and Okazaki, M., 2003, Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11, Applied and Environmental Microbiology, p. 5746-5753.
- Yaman, F. ve Esenal, Ö., 2004, Balıklarda Probiyotik Kullanımı, Orlab on-line Mikrobiyoloji Dergisi, Vol. 2, No. 6, 1-18.
- Yıldırım, Z., Johnson, M.G., 1998, Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish, Lett. Appl. Microbiol., 26: 297-304.
- Yılsay, T.O. ve Kural, E., 2000, Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Ed: Demirci, M.), 279-286.
- Yiğit, T., 2009, Süt ve süt ürünlerinden probiyotik bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 150s.
- Yürümez, E., 2011, Gayta örneklerinden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Young, I. S., and Woodside, J.V., 2001, Antioxidants in Health and Disease, Journal Clin. Pathol., 54:176-186.

