

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2014-YL-045

**FERMENTE SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE
EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE
BAKTERİYOSİN ÜRETİMİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Esra DEMİR

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Esra DEMİR tarafından hazırlanan “Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyosin Üretiminin Karakterizasyonu” başlıklı tez, 01.09.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Üye	: Doç. Dr. H. Halil BIYIK	Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Doç.Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL	Adnan Menderes Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../20...

Esra DEMİR

ÖZET

FERMENTE SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE BAKTERİYOSİN ÜRETİMİNİN KARAKTERİZASYONU

Esra DEMİR

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL
2014, 66 sayfa

Gelişen teknolojiyle birlikte tükettiğimiz gıdaların güvenilirliğine verilen önem de artmaktadır. Kontrollü mikroflora ve/veya antibakteriyel madde kullanımı ile uzun raf ömrü ve güvenli gıda üretimi sağlama olanağı sunulmaktadır. Laktik asit bakterileri (LAB) ya da bu bakterilerin ürettikleri bakteriyosin gibi maddeler güvenli ve doğal olmaları nedeniyle gıda üretiminde patojenlere karşı inhibitör olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple LAB'nde bakteriyosin üretimi ile ilgili çalışmalar giderek daha fazla ilgi görmektedir. Bu çalışmada, Aydın Merkez'de yer alan mandıra, market, halk pazarlarından ve ev yapımı şeklinde alınan fermente süt ürünlerinden izole edilmiş *Enterococcus* (% 13,76), *Lactococcus* (% 18,84) ve *Lactobacillus* (% 67,39) cinslerine ait 138 LAB kullanılmıştır ve bakteriyosin taraması ve bakteriyosin üreten genlerin genotipik olarak araştırılması gerçekleştirilmiştir. LAB önce agar spot testi ile taranmıştır ve tüm LAB indikatör mikroorganizmalar olarak seçilmiş olan *Geobacillus stearothermophilus* DSMZ 22, *E. coli* ATCC 35218, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria innocua* DSM 20649, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Lactococcus lactis* DSMZ 20729 ve *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20205'e karşı inhibisyon etki göstermiştir. Daha sonra LAB'ne ait hücre içermeyen süpernatantları (CFS, cell-free supernatant) agar kuyu difüzyon testi ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda indikatör mikroorganizmalara karşı pozitif kontrol dışında hiçbir izolatta inhibisyon etkisi gözlenmemiştir. Son olarak izolatlarda bakteriyosin üreten genleri araştırmak için yapılan PCR denemeleri sonucunda *ent-A* (% 5,07), *ent-B* (% 2,17), *lcn-A* (% 2,17) ve *pln* (% 1,44) genleri bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Agar spot test, agar kuyu difüzyon testi, bakteriyosin, laktik asit bakterileri, PCR.

ABSTRACT

**CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN PRODUCTION IN
LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED
DAIRY PRODUCTS**

Esra DEMİR

M.Sc. Thesis, Department of Biology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL

2014, 66 pages

With the developing technology, the importance given to the reliability of the consumed food has been increasing. By the use of controlled microflora and/or antibacterial substances, the opportunities to provide long shelf life and safe food production is presented. Lactic acid bacteria (LAB) or substances such as bacteriocin produced by LAB, as they are safe and natural, are use as the inhibitor against pathogenic microorganisms in food production. For this reason, the researches on bacteriocin production have gained more attention in recent years. In this study, isolated 138 LAB consisting of *Enterococcus* (13,76 %), *Lactococcus* (18,84 %) and *Lactobacillus* (67,39 %) genus isolated from fermented dairy products obtained from local markets, bazaar and dairies, also home-made products were used and bacteriocin screening and bacteriocin producing genes were genotypically examined. First, LAB isolates were screened using agar spot assay method. All of the LAB exhibited inhibitory effect against *Geobacillus stearothermophilus* DSMZ 22, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria innocua* DSM 20649, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Lactococcus lactis* DSMZ 20729 and *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20205, which are the indicator mikroorganisms. Then, cell-free supernatants (CFS) of LAB were analyzed using agar-well diffusion assay method to confirm antibacterial activity. Among LAB isolates none of them were found to be effective against the indicator mikroorganisms except for positive control *Lactococcus lactis* DSMZ 20729. Finally, as a result of PCR tests carried out to investigate bacteriocin-producing genes in LAB isolates, *ent-A* (5,07%), *ent-B* (2,17%), *lcn-A* (2,17%), and *pln* (1,44%) genes were found.

Key words: Agar spot assay, agar-well diffusion assay, bacteriocin, lactic acid bacteria, PCR.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın amaçları doğrultusunda sürdürülmesini sağlayan, çalışmamın her aşamasıyla yakından ilgilenen, bilgi birikimini, deneyimlerini, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca ilgisini, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. H. Halil BIYIK'a görüş ve tavsiyelerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın bir bölümü de dahil olmak üzere her ihtiyaç duyduğumda laboratuvarının kapılarını açan hocam Doç. Dr. Kubilay METİN'e yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Sevgili hocam Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, daha lisans yıllarımda bana laboratuvarının kapılarını açarak yüksek lisans eğitimi almak istememde büyük etkisi olduğu için ve laboratuvarında hiçbir zaman esirgemediği ilgisi, sabrı ve samimiyeti için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesinde FEF-13016 no.lu proje ile çalışmamızı destekleyen ADÜ BAP Başkanlığı'na ve ayrıca Biyoloji Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yardımları ve destekleri için laboratuvar arkadaşlarım Yasemin SERTEL, Melihcan ÖZTEBER'e ve çalışmalarım sırasında birbirimizi tanıma fırsatı bulduğumuz sevgili hocam Dr. Esin POYRAZOĞLU'na tüm desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca dostluklarını, gerektiğinde yardım ve desteklerini hiçbir zaman hiçbir koşulda esirgemeyen, her türlü sıkıntımı paylaşan, bana her zaman yol gösteren ve moral veren dostlarım Çiçek GÜMÜŞ ve Ümit ÜNSAL'a en içten teşekkürlerimi sunar, bu dostlukların hiç bitmemesini umarım.

Lisans eğitimimin başından bu ana kadar iyi günlerimde olduğu gibi zor günlerimde de hep yanımda olan, sevgisini, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, varlığıyla en zor anlarımda bile yüzümü güldüren Erinç ŞEN'e çok

teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, her türlü sıkıntımı sıkıntısı, sevincimi sevinci kabul eden, hep en yakınımnda hissettiğim, maddi ve manevi hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, en umutsuz anlarımda bile bana her şeye yetecek gücümün olduğunu her defasında yenileyerek anlatan ve bana daima güven veren ablam Ayşe DEMİR'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sonsuz sevgilerini, fedakârlıklarını ve emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her anımda yanımda olan ve arkamda duran, her zaman ve her konuda bana yol gösteren sevgili annem Aliye DEMİR ve sevgili babam Halil DEMİR'e ne kadar teşekkür etsem azdır.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Laktik Asit Bakterileri.....	2
1.1.1. <i>Enterococcus</i> Cinsi Bakterilerin Temel Özellikleri.....	6
1.1.2. <i>Lactococcus</i> Cinsi Bakterilerin Temel Özellikleri	7
1.1.3. <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerin Temel Özellikleri	9
1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Önemi.....	10
1.3. Bakteriyosinler, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Laktik Asit Bakterileri	22
3.1.2. Çalışmada Kullanılan İndikatör Bakteriler	23
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları	23
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	27
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Primerler	29

3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Aktifleştirilmesi	30
3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antibakteriyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi	30
3.2.3. Moleküler Yöntemler	31
4. BULGULAR.....	35
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antibakteriyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi	35
4.1.1. Agar Spot Test Sonuçları	35
4.1.2. Agar Kuyu Difüzyon Testi Sonuçları.....	43
4.2. Moleküler Yöntemler	44
4.2.1. PCR ile Bakteriyosin Geni Tarama sonuçları	44
4.2.2. Sekans sonuçları.....	46
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ.....	65

SİMGELER DİZİNİ

bç	Baz Çifti
BHI	Brain Heart Infusion
CFS	Cell-Free Supernatants
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Dideoksinükleotidtrifosfat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulture GmbH (Almanya Mikriorganizmalar ve Hücre Kültürü Koleksiyonu)
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
g	Gram
HCL	Hidroklorik Asit
KCL	Potasyum Klorür
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
M	Molarite
mg	Miligram
MgCl₂	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MRS	De Man-Rogosa and Shape
NA	Nutrient Agar
NaCl	Sodyum Klorür
Na₂HPO₄	Disodyum Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NB	Nutrient Broth

ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
pmol	Pikomol
rDNA	Ribozomal DNA
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
TSYE	Trypticase Soy Yeast Extract
U	Ünite
vd	Ve diğerleri
V/V	Hacim/hacim
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. LAB'nin glikoz fermentasyonu	3
Şekil 2.2. Laktik asit bakterilerinin filogenetik grupları	5
Şekil 4.1. Agar spot test sonunda gözlenen inhibisyon zonları.....	35
Şekil 4.2. Agar kuyu difüzyon testi sonunda sadece pozitif kontrol etrafında gözlenen inhibisyon zonları	43
Şekil 4.3. <i>ent-A</i> (138 bç.) gen bölgesi için PCR ürünleri.....	45
Şekil 4.4. <i>ent-B</i> (201 bç.) gen bölgesi için PCR ürünleri.....	45
Şekil 4.5. <i>lcn-A</i> (771 bç.) gen bölgesi için PCR ürünleri.....	45
Şekil 4.6. <i>pln</i> (428 bç.) gen bölgesi için PCR ürünleri.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması.....	15
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan LAB izolatları, sayıları ve gelişim koşulları ...	22
Çizelge 3.2. İndikatör bakteriler ve gelişim koşulları	23
Çizelge 3.3. Çalışmanın moleküler aşamasında araştırılan genler, kullanılan primerler ve fragmanları.....	29
Çizelge 3.4. Bakteriyosin genlerini çoğaltmak için hazırlanan PCR karışımı	32
Çizelge 3.5. Araştırılan bakteriyosin genleri, fragmanları ve PCR koşulları.....	33
Çizelge 4.1. Agar spot testi sonunda LAB izolatlarının indikatör bakterilere karşı gösterdiği inhibisyon etkisi.....	36
Çizelge 4.2. LAB'nin bakteriyosin gen taraması sonuçları	44
Çizelge 4.3. Araştırılan gen bölgesi sekanslarının BLAST analiz sonuçları	46

1. GİRİŞ

Günümüzde kullanılan modern teknolojiye ve çeşitli güvenlik sistemlerine rağmen gıda kaynaklı hastalıkların ve intoksikasyonların sayısı artmaktadır. Başta et, süt, deniz ve yumurta ürünleri olmak üzere, tüm temel gıdalar aracılığı ile (*Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* ve *Clostridium perfringens* gibi) patojen mikroorganizmaların neden olduğu çok sayıda hastalık vakası meydana gelmekte ve ölümlere yol açmaktadır. Ayrıca, giderek artan nüfus yoğunluğu ile ihtiyaç duyulmuş olan büyük marketlerde gıdaların raf ömrünün dolması ya da bu gıdaların bakterilerin faaliyetleri sonucunda bozulmaları nedeni ile dünyada yüksek miktarda gıda kayıpları meydana gelmektedir. Bu durum, gıdaların mikrobiyal patojenlerden ve bozulma etmenlerinden korunmasına önem kazandırmıştır.

Son yıllarda, özellikle insan ve çevre sağlığı üzerinde yarattığı olumsuz etkiler nedeni ile kimyasal katkıları kullanılarak korunan gıda ürünlerine karşı tepkilerin artması ile yüksek kalitede, kimyasal koruyucu içermeyen, güvenli ve raf ömrü uzun ürünlere doğru olan tüketici eğilimi büyük ilgi çekmektedir (Schnürer ve Magnusson, 2005). Bu da, alternatif gıda koruma yöntemlerinin geliştirilmesi çalışmalarına hız kazandırmıştır.

Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizmaların önemli bir kısmı antimikrobiyal bileşenler üretmelerine rağmen, gıdaların biyokontrolünde laktik asit bakterilerinin ayrı bir önemi vardır. Bu bakteriler fermentasyon teknolojisinin tipik bakterileri olup, gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir şekilde kullanılmaktadırlar (De Martinis vd., 2002).

Gıdaların korunması ve muhafaza sürelerinin uzatılması için; düşük sıcaklık veya ısıtma işlem uygulaması, paketlenme gibi yöntemlerin dışında; gıdalara tuz, şeker ve antimikrobiyal katkı maddeleri de eklenmektedir. Gıdaların güvenliğinin sağlanmasında bu uygulamalardan kaçınılması ve doğal katkı maddelerinin kullanılması gerekmektedir. Ayrıca; kimyasal formülasyona sahip gıda katkı maddelerine alternatif olarak doğal veya antimikrobiyal koruyucuların kullanımı tavsiye edilmektedir (De Martinis vd., 2002).

Biyokontrol adı verilen yöntemde, antagonistik mikroorganizmaların ve metabolitlerinin kullanımıyla patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların inaktive edilmesi sağlanmaktadır. Bunu için LAB gibi koruyucu kültürlerin kullanımı yanında, yine LAB tarafından üretilen, protein yapıdaki antimikrobiyal bileşenler olan bakteriyosinler de kullanılmaktadır.

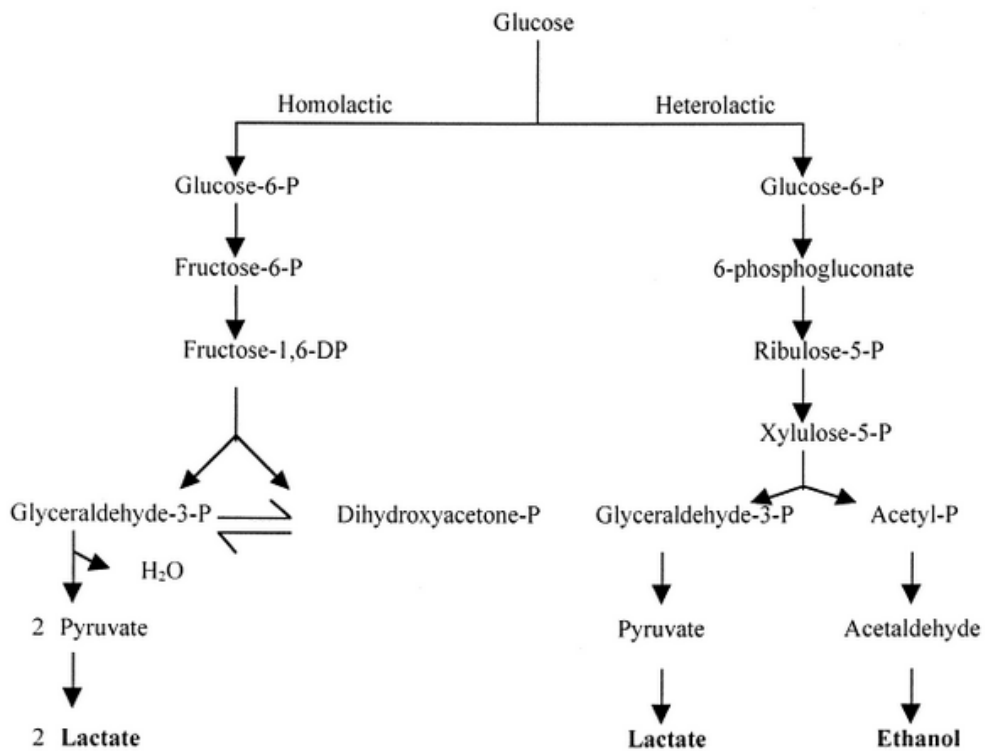
Mikroorganizmaların sahip olduğu savunma sistemleri arasında, pratik uygulamalara uygunluğu nedeni ile en detaylı çalışılan ajanlar bakteriyosinlerdir. Bu bileşiklerin doğada fazla miktarda ve çok çeşitte bulunmaları, söz konusu bileşikler üzerinde çalışmayı kolaylaştırmaktadır. Bakteriyosin proteinleri, etki mekanizmaları, bunları kodlayan gen kümeleri ve genlerin regülasyon mekanizmaları tamamen aydınlatıldığında nasıl bu denli etkili toksinler olabildikleri sorusuna da yanıt bulunacaktır. Bakteriyosinler ile ilgili araştırmaların sürdürülmesi insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu alanda çalışmalar devam ettiği sürece, bakteriyosinler ile ilgili bulgularımız zaman içerisinde artacak ve yeni türler tanımlanacaktır. Bakteriyosinlerin moleküller biyolojisi üzerine bilgiler arttıkça, gıda koruyucusu ve terapötik ajanlar olarak kullanım olanakları yaygınlık kazanacaktır.

Gıda güvenliği için büyük öneme sahip olan bakteriyosinlerin gıda endüstrisinde kullanımının artması, bakteriyosin üretme yeteneği yüksek ya da konakçı spektrumu geniş yeni bakteriyosin üretici suşların tanımlanmasına bağlıdır. Bu doğrultuda; çalışmamızda, fermente süt ürünlerinden izole edilmiş, moleküler ve morfolojik ve tanısı yapılmış laktik asit bakterileri olan *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinslerine ait bazı türlerin bakteriyosin üretiminin karakterizasyonu ile, inhibisyon spektrumlarına göre bakteriyosinlerin çeşitli patojen bakteri türlerine karşı kullanımları ile ilgili yeni bilgiler edinilmesi ve bu LAB'nde bakteriyosin üretiminin genotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Laktik Asit Bakterileri

Orla-Jensen'a (1919) göre laktik asit bakterileri karbonhidrat fermentasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit oluşturan, çubuk ya da kok şeklinde, hareketsiz, spor oluşturmeyen, genellikle katalaz negatif ve Gram-pozitif doğal bir gruptur. Laktik asit bakterileri (LAB), çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Tüm LAB anaerobiktir fakat birçok anaerobun aksine oksijene duyarlı değildir ve oksijen olsa da olmasa da üreyebilirler. Bu nedenle aerotolerant anaerob

mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadırlar. Fermantasyon sonucu ana ürün olarak laktik asit üreten bu bakteriler porfirinleri ve sitokromları içermedikleri için elektron taşınmasına bağlı fosforilasyon yapamazlar, sadece substrat düzeyinde fosforilasyon ile enerji elde ederler. LAB şekerin fermentasyonu sonucunda oluşan ürünlere göre homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere ikiye ayrılırlar. Homofermentatif grubun ürettiği tek fermentasyon ürünü laktik asittir. Heterofermentatif grubun üyeleri ise laktik asit, etanol ve CO₂ üretirler (Pot vd., 1994; Wood ve Holzapfel, 1995; Klein vd., 1998; Madigan and Martinko, 2006). LAB'nin glikoz fermentasyonu şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



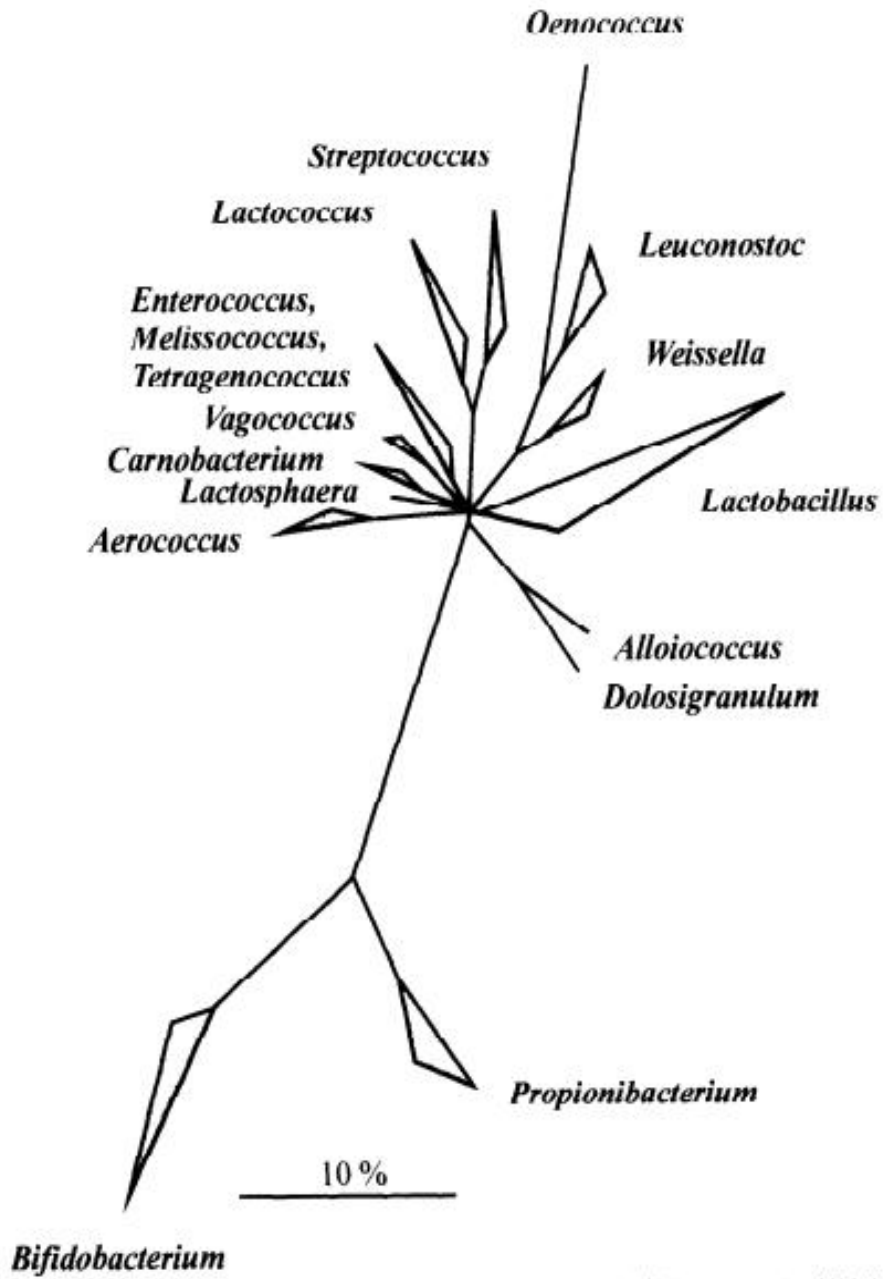
Şekil 2.1. LAB'nin glikoz fermentasyonu (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

LAB taksonomisi uzun yıllardan beri bakterilerin fenotipik özellikleri baz alınarak hücre çeperi bileşiklerinin analizi (özellikle Bifidobacteria'lar), çözünür sitoplazmik proteinlerin anazi, belirli enzimlerin elektroforetik hareketlilik analizi ve FAME (fatty acid methyl esters) analizmetotları ile gerçekleştirilmektedir.

Ancak günümüzde gelişen moleküler biyoloji teknikleri fenotip temelli sınıflandırmanın uygun olmadığını gözler önüne sermektedir (Klein vd., 1998).

Diğer Gram pozitif bakterilerin aksine LAB'nin DNA'larında, *Bifidobacterium* (G+C > %55) hariç, guanin ve sitozin oranı %55'ten daha düşüktür (G+C < %55). *Firmicutes* şubesinin, *Bacilli* sınıfının, *Lactobacillales* takımına aittir (Makarova vd., 2006). LAB'nin içerdiği önemli cinsler; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella*'dır. Diğer cinsler ise; *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* ve *Bifidobacterium*'dur (Parada vd., 2007; Carr vd., 2002;BJ Wood, WHN Holzapfel, 1995 - books.). LAB'nin 16S rRNA bölgelerinin karşılaştırılmaları ile belirlenmiş filonegetik ilişki şekil 2.2.'de gösterilmiştir.

Bakteriyosin üreten LAB'ne ait türler, yine LAB'ne ait türlere karşı inaktivasyon etkisine sahiptirler. Ayrıca bakteriyosin üretici LAB *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Basillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* gibi gıda kaynaklı patojen ve toksijenlere karşı da inaktivasyon etkisine sahiptirler (Franz vd., 1997). Bu bakteri cinslerinden bazıları biyokoruma dışında gıdalarda probiyotikler olarak ya da belirli koşullar altında starter kültürler olarak kullanılmaktadırlar.



Şekil 2.2. Laktik asit bakterilerinin filogenetik grupları (Stiles ve Holzapfel, 1997)

1.1.1. *Enterococcus* Cinsi Bakterilerin Temel Özellikleri

Enterokoklar; tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunurlar ve 37°C'de optimum gelişme gösterirler. Mikroskopik olarak streptokok türlerinden ayırt edilemezler. Gram pozitif, kokobasil şeklinde görülebilirler, bazı türlerde pseudo-katalaz görülse de genellikle katalaz negatiftirler. Alfa, beta veya gama hemoliz yeteneğindedirler. Düşük su aktivitesi, yüksek ısı gibi çevresel koşullara, bazı antiseptiklere karşı direnç gösterirler ve cansız yüzeylerde uzun süre yaşayabilirler (Ruoff vd., 1990; Çelik ve Alhan, 2008).

Hayvanlar ve bitkiler ile ilişkili bakteri türlerini içeren enterokokların sadece evcil hayvanlar ve insanlardan elde edilen türleri ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Bu mikroorganizmalar çoğunlukla insan ve hayvan intestinal florasının bileşenleri olarak kabul edilirler ve vücudun farklı ekstra intestinal bölümlerinde fırsatçı patojen olarak bulunurlar (Devriese vd., 2006).

Enterokoklar ilk olarak DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon çalışmalarına dayanarak *Streptococcus* cinsinden ayrılmıştır (Schleifer ve Kilpper-Bälz, 1984; Schleifer vd., 1985; Schleifer ve Kilpper-Bälz, 1987). Bu ayrılma, enterokokların laktokoklardan ve diğer Gram pozitif koklardan farklı olduğunu da gösteren 16S rRNA analizleri ile doğrulanmıştır. Ayrıca bu analizler ışığında enterokokların düşük G+C oranı ile LAB'ne dahil olduğu da anlaşılmıştır (Collins vd., 1997). *Enterococcus* cinsi taksonomide *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı, *Lactobacillales* takımı, *Enterococcaceae* ailesi içerisinde yer almaktadır (Kilpper-Bälz, 1984; Devriese vd., 2006). Moleküler yaklaşımların sürekli kullanımı bugüne kadar enterokok sınıflandırılmasında önemli gelişmeler sağlamıştır ve bunun sonucunda yaklaşık 35 enterokok türü tanımlanmıştır. Yeni türlerin tanımlanması fenotipik testlerin ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, 16S rRNA dizi analizi ve toplam hücre protein profillerinin analizlerini kapsayan farklı moleküler tekniklerin bir kombinasyonuna dayanmaktadır (Teixeira ve Merquior, 2013).

Bakteriyosin üretme yeteneğinde olan birçok enterokok türünün, özellikle bu tez çalışmasında da bakteriyosin karakterizasyonu için test edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'in, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tyrobutyricum* ve *Listeria monocytogenes*'i de içeren Gram pozitif gıda patojenlerine karşı geniş spektrumlu etki gösterdikleri bilinmektedir (Giraffa, 1995).

1.1.2. *Lactococcus* Cinsi Bakterilerin Temel Özellikleri

Laktokoklar Gram pozitif, kok ya da ovoid şekilli olan, katalaz negatif, hareketsiz ve endospor oluşturmeyen bakterilerdir. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C'dir, 10 °C'nin altında ve 45 °C'nin üzerinde gelişmemeleri nedeni ile hem streptokoklardan hem de enterokoklardan ayrılırlar. Kendi türleri arasında da 40 °C üzerinde ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (>% 4 sodyum klorür) gelişebilme ve farklı şekerlerden (laktoz, mannitol ve rafinoz) asit oluşturma özellikleri bakımından farklılıklar görülmektedir. Homofermentatif özellikte olan laktokoklar, karbonhidrat katabolizması sonucu ana ürün olarak L (+) laktik asit üretmektedir. Beta hemolitik reaksiyon göstermemektedirler. Bazı *L. lactis* subsp. *lactis* suşları zayıf alfa hemolitik zon oluşturmaktadır (Schleifer, 1985; Schleifer, 1987; Holt vd., 1994).

Lactococcus cinsi, *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı, *Lactobacillales* takımı içerisinde yer alan *Streptococcaceae* ailesine dahildir. Bu cinsnükleik asit hibridizasyonu, karşılaştırmalı serolojik çalışmalar, lipid kompozisyonu ve hücre duvarı kimyasal yapısının belirlenmesi sonucu elde edilen veriler ışığında *Streptococcus* cinsinden ayrılmıştır (Schleifer vd., 1985, 1986).

Laktokoklar en çok çiğ inek sütünde görülürken bunun dışındaki ortamlardan da *Lactococcus* cinslerinin izolasyonunun mümkün olduğu bilinmektedir (Esten, 1909; Klijn vd., 1995). Bu bakteriler bitkiler ve hayvan mataryelleri gibi çeşitli ortamlarda da bulunurlar. Örneğin; *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* odun yiyen termitlerin yemek borularının arka kısmından izole edilmiştir (Schultz, 1978). *Lactococcus plantarum*'un dondurulmuş bezelyeden (Collins vd., 1983), *Lactococcus piscium*'un alabalıktan (Williams vd., 1990), *Lactococcus lactis* ve *Lactococcus garvieae*'nin klinik örneklerden (Elliott vd., 1991) izole edildiği bilinmektedir (Klijn vd., 1995). Yakın zamanda da çamur içerisinde oluşan köpükten *Lactococcus chungangensis* (Cho vd., 2008; Odamaki, 2011) ve çin lahanasından (*Brassica rapa* L. var. *glabra* Regel) *Lactococcus fujiensis* izole edilerek *Lactococcus* cinsleri arasında yerlerini almışlardır (Cai vd., 2011; Odamaki, 2011). Ayrıca *L. lactis*'in bir alt türü olan *L. lactis* subsp. *tractae* de ilk kez deniz alası (*Salmo trutta*) ve gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) bağırsak mukusundan izole edilmiştir (Perez vd., 2011).

Lactococcus grubuna ait olan türleri ve alt türlerin tanımlanması için moleküler teknikler önerilmektedir. Örneğin; *L. lactis*'i diğer LAB'den ayırt etmek için polimeraz zincir reaksiyonu – ayırt edici gradient jel elektroforezi (PCR – DGGE) kullanılmaktadır (Coppola vd., 2001; Odamaki vd., 2011). Son yıllarda *L. lactis*'in alt türlerinin sınıflandırılmasında; çoğaltılmış rDNA restriksiyon analizi (ARDRA), rastgele polimorfik DNA amplifikasyonu (RAPD), restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), Pulsed field jel elektroforezi (PFGE) ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) gibi modern analiz teknikleri kullanılmaya başlanmıştır (Samarzija vd., 2002; Delgado ve Mayo, 2004).

Lactococcus cinsi; *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum* ve *L. raffinolactis*, olarak adlandırılan beş tür içermektedir (Holler ve Steele, 1995). Yakın zamanda laktokok grubuna *Lactococcus chungangensis* (Cho vd., 2008) ve *Lactococcus fujiensis* (Cai vd., 2011) adında yeni iki türün daha ilavesiyle günümüzde *Lactococcus* cinsinin 7 tür içerdiği bilinmektedir. *Lactococcus lactis* türünün ise; *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae* ve gruba en son eklenen *L. lactis* subsp. *tractae* olarak bilinen dört alt türü mevcuttur. (Perez vd., 2011; Odamaki vd., 2011).

Lactococcus cinsileri arasında *L. lactis* türü çiğ sütte ve fermente süt ürünlerinde en fazla bulunan LAB'dir. Bu nedenle bu bakteriler endüstriyel işlemlerde probiyotikler ve starter kültürler olarak yoğun bir şekilde kullanılmakta ve peynirlerin olgunlaşmasında rol oynamaktadırlar (Kimoto vd., 2010; Yonezawa vd., 2010; Odamaki vd., 2011). *L. lactis* türünün gıda fermentasyonlarında kullanılmayan tek bir üyesi vardır, o da laktoz fermentasyon yeteneği olmayan *L. lactis* subsp. *hordniae*'dir. Süt bu bakterinin gelişimi bakımından çok fakirken *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* gelişimi bakımından zengindir (Klijn vd., 1995; Nomura vd., 1999).

L. lactis subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* suşları başta peynir imalatında olmak üzere birçok mandıra ürününün kültüre edilmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu suşlar, ürettikleri asit miktarı ve üretim sıklığı, bakteri ve faj enfeksiyonlarına karşı gösterdikleri dirençlilik, raf ömrünün ve gıda güvenilirliğinin artırılması, sütün temel proteini olan kazeini parçalayabilme yetenekleri, imal edilen ürüne aroma, lezzet, kıvam özelliklerinin kazandırılması gibi endüstriyel açıdan sahip oldukları önemli birçok ayrıcalıkları sayesinde diğer

bakteri suşlarından ayrılmaktadır (Tanskanen vd., 1990). *L. lactis* subsp. *cremoris* suşunun süt içerisindeki gelişimi daha iyi olduğu için ve kendilerine özgü aroma profilleri var olduğu için bazı peynirlerin üretimlerinde özellikle starter kültür olarak tercih edildikleri bilinmektedir (Salama vd., 1993; Urbach vd., 1997; Fernandez vd., 2011).

Dünya çapında, her yıl yüz milyon tondan fazla süt starter olarak *L. lactis*'in kullanımıyla fermente süt ürünlerine dönüştürülmektedir. Bu durum söz konusu mikroorganizmaların endüstriyel ve dolayısıyla ekonomik önemini yansıtmaktadır (Parente ve Cogan, 2004; Fernandez vd., 2011).

1.1.3. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Temel Özellikleri

Laktik asit bakterileri arasında yer alan laktobasiller çubuk ya da kokkobasil şeklinde gözlenirler, Gram pozitifler ve spor oluşturmazlar, kompleks beslenme gereksinimleri vardır (karbonhidratlar, amino asitler, peptitler, yağ asidi esterleri, tuzlar, nükleik asit türevleri ve vitaminler). Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaeroburlar ve %5 karbondioksitli ortamda gelişme gösterebilirler. Bazı suşlarında pseudo-katalaz olduğu görülse de genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinirler. Glikozu karbon kaynağı olarak kullanan laktobasiller ya homofermantatif ya da heterofermantatifler. Genellikle DNA'larındaki G+C oranı % 50'den daha azdır (Stiles and Holzapfel 1997; Hammes ve Vogel, 1995).

Laktobasiller, doğada karbonhidrat içeren substratların zengin bir şekilde elde edilebileceği ortamlarda yani hemen hemen her yerde bulunabilirler. Bu cinse ait türler gıdalar (süt ürünleri, fermente et, ekşi hamurlar, sebzeler, meyveler ve içecekler), insan ve hayvanların mukozal membranları, bitkilerin ya da bitkisel materyallerin üzeri, gübreler, lağım pisliği gibi çok geniş bir habitatta bulunabilmektedirler (Hammes and Vogel, 1995; Felis ve Dellaglio, 2007).

Lactobacillus cinsi, türlerin gelişim sıcaklıklarına ve homofermantatif ya da heterofermantatif olmalarına göre, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* ve *Betabacterium* olmak üzere 3 farklı gruba ayrılmaktadır (Pot, 1994; Hammes ve Vogel, 1995). Laktobasiller de diğer LAB gibi *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı, *Lactobacillales* takımı içerisinde yer alır. *Lactobacillaceae* ailesine ait olan bu cinsin çok sayıda türü vardır. İlk kez Beijerinck (1901) tarafından tanımlanan bu

cins sonradan fenotipik özelliklerine göre gruplandırılmıştır. Moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesi ile *Lactobacillus* cinsi yeniden düzenlenmiştir ve 16S rRNA analizlerine dayanarak yeniden gruplandırılmış ve birçok düzeltme yapılmıştır (Collins vd., 1991). Ayrıca moleküler analizler pek çok yeni türün tanımlanmasını da sağlamıştır. Örneğin; fermente süt ürünlerinden izole edilen *L. rennini* sp. nov. (Chenoll vd., 2006) ve *L. cypricasei* sp. nov. (Lawson vd.,2001). 44 *Lactobacillus* türü ve 11 alttürü 1984 yılında (Kandler ve Weiss, 1986), 88 tür ve 15 alttür 2003 yılında (Coeuret vd., 2003), 135 tür ve 27 alttür ise 2007 yılının Ocak ayında tanımlanmıştır (Bernardeau vd., 2008).

Lactobasillus türleri gıda ve yem üretimindeki önemli rolleri ve bazı suşlarının probiyotik özellikler sergilemesi nedeni ile gıda mikrobiyolojisi ve insan beslenmesinde yer alan en önemli taksonlardan bazılarıdır (Felis ve Dellaglio, 2007). Ayrıca bakteriyosin üretme yetenekleri ile gıdalarda istenmeyen mikroorganizmalara karşı koruma sağladıkları pek çok çalışma ile görülmüştür. Örneğin; *L. gasseri* K7 suşunun sekiz haftalık üretim sürecinde, peynirde *Clostridium tyrobutyricum* akıbetini ve bütirik asit oluşumunu azalttığı görülmüştür (Bogovic Matijasic vd.,2007).

1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Önemi

Fermente gıda ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterileri; gerek starter kültür olarak kullanılarak fermente ürünlerde tat, koku gibi organoleptik adı verilen özelliklerin kazandırılması gerekse bakteriyosin gibi gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilerin gelişimini engelleyen antimikrobiyal madde üretim yetenekleri ile gıda endüstrisi için büyük öneme sahiptirler.

Laktik asit bakterileri (LAB) kavramı 1900'lü yılların başlarında ortaya atılmış ve 19. yüzyılın ikinci yarısı boyunca sistematik bilimi ve teknik gelişimlere de öncülük etmiştir. Gıda kaynaklı LAB'nin birbirleriyle olan etkileşimlerinin bilim insanlarının dikkatini çekmesi 1857 yılında, Pasteur'un laktik asit fermentasyonuna önemli katkılarıyla sonuçlanmış ve bunu 1873 yılında Lister tarafından ilk saf bakteri kültürünün (*Bacterium lactis*) izolasyonu takip etmiştir. Peynir ve ekşi süt üretiminde starter kültürlerin kullanılması 1890 yılında Almanya'nın Kiel şehrinde Weigmann, Kopenhag'da ise Storch tarafından neredeyse eş zamanlı olarak öne sürülmüştür. Bu çalışmalar gıda fermentasyonunda sanayileşmenin yolunu açmıştır (Stiles ve Holzapfel 1997).

Günümüzde LAB fermente süt ürünlerinin, etlerin ve sebzelerin biyoçevriminde temel görevi üstlenen ve gıda endüstrisinde ürün kalitesini arttıran organizmalardır. Bu bakterilerin, tarih boyunca kökeninde tarımcılık olan neredeyse tüm toplumlarda yiyecek ve içeceklerin yapımında kullanıldığı bilinmektedir (Miller ve Wetterstrom, 2000), kahve, konserve, hayvan yemi, kakao, hamur mayası ve çok sayıda doğal yiyeceğin fermentasyon yolu ile üretilmesinde kritik önem taşıdıkları da birçok kaynakta belirtilmiştir (Wood, 1998; Makarova vd., 2006).

Süt endüstrisinde LAB peynir, tereyağı ve lor peyniri gibi fermente süt ürünlerinin günlük imalatında kullanılırlar (Klinj vd., 1995). Peynir gibi ev yapımı fermente süt ürünleri, yaklaşık 8.000-10.000 yıldır insanlar tarafından tüketilmektedir. Ancak süt fermentasyonu 20. yüzyıla kadar doğal süreci ile devam etmiştir. Laktik asit bakterilerinin keşfi ve karakterizasyonu ile süt fermentasyonuna bakış açısı değişmiştir. Son elli yıl içerisinde laktik asit bakterilerinin genetiği, biyokimyası ve fizyolojisi hakkındaki araştırmaların gelişmesi en iyi starter kültürlerin seçilmesini sağlamıştır ve böylece kaliteli ve güvenli fermente süt ürünlerinin üretimi gerçekleşmiştir (Botinavd., 2006). Gıdalarda ürünün duyuşal özelliklerini değiştiren, patojen mikroorganizmaların inhibisyonu ve/veya raf ömrünün uzatılmasını sağlayan antagonistik kültürler, koruyucu kültürler olarak adlandırılmaktadır. Gıdalarda güvenli olarak kabul edilen LAB koruyucu kültürler olarak kullanılırlar. LAB gıdalarda zararlı mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlamaları ve organik asit, hidrojen peroksit, antimikrobiyal enzimler, reuterin ve bakteriyosinler gibi bir veya daha fazla antimikrobiyal metabolitler üretme yetenekleri ile antagonistik özelliğe sahiptirler (Holzapfel vd., 1995; Delieghere vd., 2004).

1.3. Bakteriyosinler, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen peptit ya da protein yapısındaki bileşiklerdir ve genellikle üretici suşa yakın akraba türlere karşı antimikrobiyel etki gösterirler (Kurt ve Zorba, 2005). Bakteriyosinler, üretici hücreler üzerinde öldürücü etki yapmayan ve genellikle dar etki spektrumuna sahip, protein doğasındaki antagonistik maddeler olarak tanımlanmaktadır. Bakteriyosinler, benzer aktivite özelliklerinden dolayı, birçok kaynakta antibiyotiklerle karıştırılmaktadır. Bakteriyosinleri antibiyotiklerden ayıran pek çok fark olmakla birlikte, temel kıstas, antibiyotiklere nazaran çok daha dar bir

etki spektrumuna sahip olmalarıdır (Riley ve Wertz, 2002). Başta *Lactobacillus* olmak üzere *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinsi bakterilere ait pek çok tür bakteriyosin üretme yeteneğine sahiptir.

Bakteriyosinlerin taksonomik olarak üretici suşa yakın türler de dahil olmak üzere birçok gıda patojeni ve bozulma etmeni olan bakteri türü üzerinde inaktivasyon etkileri olmasına rağmen bu maddelerin üretici suş üzerinde öldürücü etkileri yoktur. Birçok durumda, bakteriyosin kodlayan gen kümesi, aynı zamanda kendi kendini öldürmeyi önlemek için, bir veya daha fazla bağışıklık proteinleri içerir. Bağışıklık proteini bakteriyosinin membrana adsorbsiyonunu önleyebilir. Membrana adsorbe olan bakteriyosini dış ortama geri gönderebilir ya da bakteriyosini hücre içine alarak parçalayabilir (Bizani vd., 2008).

Bazı bakteriyosinler hücre inhibisyonunu sağlamak için spesifik ya da spesifik olmayan moleküllere tutunurlar. Örneğin nisin, peptidoglikan alt ünitelerini taşıyan esas molekül olan Lipid II'ye bağlanabilir. Bu durumda sitoplazmadan hücre duvarına peptidoglikan alt üniteleri taşınmaz ve hücre duvarı sentezi doğru şekilde gerçekleşemez. Bunun sonucunda hücre ölür. Daha da önemlisi bakteriyosinler Lipid II'yi tanıma molekülü olarak kullanıp membrana yerleşebilirler, böylece membranda por oluşturmaya başlayarak hızlı hücre ölümüne neden olurlar. Lacticin 3147 gibi bazı bakteriyosinler bu etki mekanizmalarından her ikisine de sahipken, mersasidin sadece Lipid II'ye bağlanma aktivitesine sahiptir, por oluşturmaz. Genelde Sınıf II peptidler amfifilik heliks yapıdadır, bu sayede hedef hücrenin membranına yerleşebilirler, depolarizasyona ve hücre ölümüne neden olurlar. Büyük bakteriyolitik proteinler, örneğin lizostafin, doğrudan Gram pozitif hedef hücrelerin hücre duvarına etki ederek, hücrelerin parçalanmasına ve ölümüne yol açar (Cotter vd., 2005).

İnaktive edebildikleri duyarlı bakterilerin sitoplazmik membranına etki eden, hücre membranında porlar oluşmasına sebep olan bakteriyosinler membran geçirgenliğini değiştirirler. Buna bağlı olarak hedef hücreden K^+ iyonu ve ATP bileşiklerinin sızmasına sebep olurlar. Bunun sonucunda transmembran potansiyeli ve pH gradiyentinin kısmen ya da tamamen yok olması ile proton itici güç (PMF) ortadan kalkar. PMF, hücre içinde iyonların ve metabolitlerin birikmesi ile ATP sentezi gibi sitoplazmik membranda enerjiye bağlı birçok hayati işlemleri yürütmektedir. Dolayısıyla PMF'nin yok olması ya da bozulması ATP'nin

kaybına, besin maddelerinin aktif transportla taşınmamasına, hücre içi pH değerinin korunmasını sağlayan K^+ ve kofaktör olarak rol oynayan Mg^{2+} iyonlarının hücre dışına akışına ve duyarlı bakterilerin enerji kaynaklarının tükenmesine yol açar. Buna paralel olarak bakteriyosinler DNA, RNA ve protein gibi makromoleküllerin sentezini azaltarak bakterilerin inhibisyonuna ve ölümüne neden olmaktadır (Bauer ve Dicks, 2005).

Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenmektedir. Ancak sınıf I bakteriyosinlerin aktif formunun oluşması için post-translasyonel modifikasyona uğramaları gerekmektedir. Bakteriyosin üretimini kodlayan genler kromozom, plazmid ya da tranzpozonlar üzerinde yer alabilir. Operonda bakteriyosinin yapısal geni, bağışıklık proteini geni, bakteriyosinin olgunlaşması, işlenmesi, taşınması ve regülasyonunu sağlayan genler bulunmaktadır. Çoğu bakteriyosinin yapısal genleri operona benzer bir yapı gösterir (Klaenhammer, 1993). Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin sentezlenebilmesi için dört farklı gene ihtiyaç vardır: (I) prepeptidi kodlayan yapısal gen, (II) immünite geni, (III) ABC taşıyıcısı kodlayan gen ve (IV) bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan aksesuar proteinini kodlayan gen (Garneu vd., 2002; Chen ve Hoover, 2003).

Bakteriyosinler, yapısal genler tarafından prepeptit olarak kodlanmaktadır. Bu peptit, bir N-terminal uzantısı ve ya lider dizisiyle başlayan olgun bakteriyosinin ön maddesidir. Prebakteriyosinler biyolojik olarak inaktif olup N-terminalinde lider peptit ve C-terminalinde propeptit içermektedirler. Propeptit domain lider peptidin proteolitik parçalanmasından sonra aktifleşir. Ardından modifikasyon işlemlerine uğrar ve olgun bakteriyosine dönüşür.

Bir bakteriyel ürünün bakteriyosin olarak tanımlanabilmesi için biyolojik yönden aktif bir proteine sahip olması, bakterisit etki göstermesi, dar bir inhibisyon spektrumuna sahip olması, spesifik hücre reseptörlerine tutunması, üretimin ve konakçı hücre bağışıklığının plazmid kökenli genetik determinantlara bağlı olması, üretimin lethal biyosentez yoluyla gerçekleşmesi gereklidir. Bakteriyosinlerin çeşitli sınıfları belirli bir antibakteriyel etkinlik, oligomerler, protein boyutu, şeker kısımların varlığı, pozitif yüklü amino asitler ve aksiyon modu varlığının oluşumu, post-translasyonel modifikasyonların doğası gibi özelliklere göre tanımlanmıştır.

Klaenhammer (1993), Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinleri dört farklı grup altında sınıflandırmıştır. Sınıf I bakteriyosinler, lantibiyotikler olarak da adlandırılırlar ve translasyondan sonra değişikliğe uğrayarak (post-translational modification) aktif hale geçen ve dehidre kısımlar (dehidroalanin, dehidrobütirin), lantionin ve β -metillantionin içeren küçük peptidlerdir (Deraz vd., 2005).

Sınıf II bakteriyosinler ısıya dayanıklı, düşük molekül ağırlığına sahip, membran-aktif peptidlerdir. Sınıf III üyesi bakteriyosinler ise molekül ağırlıkları büyük, ısıya dayanıklı olmayan grubu oluştururken, Sınıf IV grubunda yer alanlar, aktiviteleri için protein olmayan bir kısma (örn: karbohidrat, lipid) gereksinim duyan kompleks bakteriyosinlerdir.

Jack vd. (1995), bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında ve aktivite spektrumlarında disülfid ve monosülfid (lantionine) bağların temel oluşturduğunu belirtmişlerdir. Buna göre bakteriyosinler, dört grup altında sınıflandırılmıştır. İlk sınıf, dehidroalanin, dehidrobütirin, lantionin veya β -metillantionin gibi posttranslasyonel olarak modifiye olmuş aminoasitler içeren antibiyotikler yani lantibiyotiklerdir. İkinci grup ise, aktivite gösterebilmek için en azından bir disülfid köprüsüne ihtiyaç duyan cystibiyotiklerdir. Antibiyotiğin aktivitesi için indirgenmiş formda tek bir -SH rezidüsü içeren thiolbiotikler ise 3. grubu oluşturur. Son grupta ise, sistein kısmı içermeyen antibiyotikler yer alır (Jack vd., 1995).

Cotter vd. (2005), yayınladıkları makalede bu sınıflandırma sistemi için düzeltme önermişlerdir (Çizelge 2.1.). Önerilen düzeltilmiş sınıflandırmaya göre, bakteriyosinler başlıca iki farklı kategori altında sınıflandırılmışlardır. Sınıf I lantionin içeren Lantibiyotikler; Sınıf II ise Lantionin içermeyen bakteriyosinlerdir. Önceki sınıflandırma sisteminde Sınıf III olarak bilinen, büyük, ısıya dayanıksız, mürein hidrolazlar ise “Bakteriyolizinler” olarak ayrıca sınıflandırılmışlardır. Klaenhammer’in sınıflandırmasında IV. Grupta yer alan bakteriyosinler ise aktivite için peptid olmayan bir kısma ihtiyaç duyan bakteriyosinlere ayrılmıştır. Fakat günümüzde, bu tür bir bakteriyosinle ilgili henüz inandırıcı ve kesin bilgiler olmadığı için önerilen yeni sınıflandırmaya dahil edilmemişlerdir. Kemperman vd. (2003), halkasal yapıdaki LAB bakteriyosinlerinin Sınıf V bakteriyosinler olarak gruplandırılmasını; Cotter vd.

ise bu grubun da Sınıf II kategorisine dahil olabileceğini önermişlerdir (Cotter vd., 2005).

Çizelge 2.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

SINIF I	SINIF II	BAKTERİYOLİZİNLER
<p>Lantionin içeren bakteriyosinler/ Lantibiyotikler</p>	<p>Lantionin içermeyen bakteriyosinler</p>	<p>Bakteriyosin olmayan litik proteinler**</p>
<p>Hem tek hem de iki peptidli lantibiyotikler; 11 alt sınıf önerilmiştir.</p> <p>Tek peptidli: Nisin, mersacidin, Laktisin 481</p> <p>İki peptidli: Laktisin 3147, sitolizin</p>	<p>Heterojen küçük peptid grubu: Pediosin benzeri (alt sınıf a bakteriyosinler), İki-peptidli (alt sınıf b bakteriyosinler), Halkasal (alt sınıf c bakteriyosinler, Önceden Sınıf V olarak bilinenler), Pediosin olmayan tek, linear peptidler (altsınıf d)</p> <p>Sınıf IIa: Pediosin PA1, Leukosin A;</p> <p>Sınıf IIb: Laktasin F;</p> <p>Sınıf IIc: Enterosin AS48, Reuterisin 6;</p> <p>Sınıf IId: Laktokokkin A, Divergisin A</p>	<p>Büyük, ısıya dayanıksız proteinler, genellikle mürein hidrolazlar</p> <p>Lizostafin, enterolisin A</p> <p><i>**Bu gruba dahil olan üyeler artık bakteriyosin olarak düşünülmemektedir.</i></p>

Bir bakteriyosinin tanımlanması için diğer bakterilerin gelişiminin inhibisyonuna neden olan üretici suşun kapsamlı testlerden geçirilerek biyolojik aktivitesinin belirlenmesi klasik tanımlama yoludur. Bunun dışında bakteriyosinler, bakteriyosinlerin ve onların biyosentetik kümelerinin tanımlanmasını sağlayan bir web tabanlı yazılım aracıyla da tanımlanabilir. BAGEL, yeni bakteriyosin gen kümelerinin tanımlanması için ilk tam otomatik ve çok hızlı bir web tabanlı

yazılım aracıdır (De Jong vd., 2006). 21 Ocak 2013 tarihinde yapılan son güncellemeye göre sınıf I bakteriyosinler 160, sınıf II bakteriyosinler 236, sınıf III bakteriyolizinler ise 93 üyeden oluşur. Bu bakteriyosinler arasında *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin en iyi bilinen ve en iyi karakterize edilmiş olandır.

Nisin geniş spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahip olması, gıda koruyucusu olarak uzun yıllar güvenle kullanılmış olması gibi olumlu özellikleri nedeni ile ticari ve ekonomik alanda büyük öneme sahiptir. Nisinin insanlar tarafından tüketiminin güvenli olduğu 1962 yılında yapılan toksite testleri ile belirlenmiştir. Bu bakteriyosin koruyucu katkı maddesi olarak ilk kez krem peynirde kullanılmıştır. Günümüzde 47 ülke tarafından güvenli gıda koruyucusu olarak kabul edilerek kullanılmaktadır. Nisaplin (Nisin A) 1962-1965 yılları arasında geliştirilen, nisin ilk ticari ekstraktıdır (Thomas ve Delves, 2005). Etki spektrumu diğer birçok bakteriyosine kıyasla daha geniş olup, asidik gıdalarda ve Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde oldukça aktiftirler. Nisin Gram negatif mikroorganizmalara karşı Gram pozitif mikroorganizmalara karşı olduğu kadar başarılı bir aktiviteye sahip değildir.

Gram negatif patojenlerin de varlığı düşünüldüğünde sadece nisin kullanımıyla gıda güvenliği tam anlamıyla sağlanamamaktadır. Bu nedenle nisinle birlikte diğer gıda koruyucu katkıların veya proseslerin kullanılması gerekmektedir. Gram negatif bakterilerin dış zarlarının bütünlüğü bozulduğunda bakteriyosinlere karşı oldukça hassasiyet göstermektedirler. Bu nedenle nisinle beraber hücre zarını bozabilecek trisodyum fosfat veya EDTA gibi çelatların kullanılmasının inhibisyon etkisi yapabileceği bildirilmektedir (Phillips ve Duggan, 2001). Örneğin EDTA, Gram negatif mikroorganizmanın lipopolisakkarit kısmında Mg^{+2} 'u bağlayarak dış zarın yapısını bozup, nisin sitoplazmik zara ulaşmasını sağlamaktadır (Abee vd., 1995). Nisinle birlikte sodyum klorid (Pawar vd., 2000), sarımsak ekstraktı (Singh vd., 2001), potasyum sorbat, bazı organik asitler (Frang ve Tsai, 2003), sodyum sitrat ve sodyum laktat (Long ve Phillips, 2003), kitosan ve türevleri (Lee vd., 2004) gibi birçok katkının kullanımıyla nisin antimikrobiyal etkisinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca nisin etkisini artırmak için koruyucu katkıların yanısıra yüksek basınç ve yüksek voltaj elektrik alan pulslarının (PEF) uygulanması önemli katkı sağlamıştır. Örneğin 100 IU/ml nisinle birlikte 155-400 MPa basınç uygulamasının *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas fluorescens* ve

Staphylococcus aureus' u inaktive ettiği saptanmıştır (Masschalk vd., 2001). Nisinle PEF'in etkisinin araştırıldığı çalışmalarda ise, 10, 100 IU/ml nisinle birlikte farklı seviyelerde (30, 40, 50 kV/cm) PEF uygulamasının, yağsız süt ve sıvı yumurtada *L. innocua*' nın inaktivasyonunu artırdığı tespit edilmiştir (Calderon-Miranda vd., 1999).

Nisinin gıdaların korunmasında uygulanan kullanım şekillerinden birisi de gıda yüzeyine uygulanan filmlerde kullanımıdır. Bu tür antimikrobiyal biyofilmler, temas ettikleri gıda yüzeyinde mikrobiyal gelişimi etkileyebilmektedir. Nisin, kullanıldığı biyofilmlerden gıda yüzeyine belli oranlarda geçerek, yüzeyde mikrobiyal gelişimi engelleyebilmektedir (Kumar ve Anand, 1998). Nisin, protein yapısındaki biyofilmlerin polimer yapısına doğrudan katılarak veya polietilen materyallerin polimer yapısının yüzeyine adsorblanarak kullanılabilirdiği gibi, farklı şekillerde de kullanılabilir (Kurt ve Zorba, 2005).

Bakteriyosinlerin gıda endistrisindeki kullanım alanları ile önemleri arttıka araştırmacıların dikkatleri üretici suşların genetik materyalleri üzerine toplanmış ve geniş bir şekilde ele alınmıştır. Bakteriyosin proteinlerinin etki mekanizmaları, bunları kodlayan gen kümeleri, biyosentezi, regülasyon sistemlerinin tamamen aydınlatılması için birçok çalışma bulunmakta ve yeni bakteriyosin çeşitlerinin tespit edilebilmesi için çalışmalar devam etmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllarda gıda güvenliğinde bakteriyosin kullanımı öneminin artmasıyla bu konuda yapılan çalışmalar da artmış ve büyük önem kazanmıştır.

Macwana ve Muriana (2012) doğal gıda koruyucusu ve mikrobiyal inhibitörler olan bakteriyosin üretici LAB'nde bakteriyosin üretiminden sorumlu yapısal genlerin tespiti için PCR metodunu kullanmışlardır. Amplifikasyon sonucu elde edilen sekans bilgileri GenBank'ta bulunan sekanslar ile karşılaştırılmıştır. *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Pediococcus* türlerinden bakteriyosin yapısal genlerinin amplifikasyonu başarı ile gerçekleşmiştir. Bu çalışma bir mikroplate yöntemi kullanılarak bakteriyosin üreten LAB arasındaki bakteriyosin yapısal genlerinin tanımlanması ve sekanslanması için hızlı bir yaklaşım sağlamıştır.

2011 yılında Mohankumar ve Murugalantha manda, keçi ve inek gibi hayvanların çiğ sütünden bakteriyosin üreten *Lactobacillus* türlerini izole ederek antimikrobiyal aktiviteyi belirlemeyi ve bakteriyosin karakterizasyonunu amaçlayan bir çalışma yapmıştır. 50'si inek sütünden, 22'si manda sütünden ve 28'i keçi sütünden 100 bakteri izole edilmiş ve fenotipik özelliklerine göre Lactobacilli olarak tanımlanmıştır. Bakteriyosin üreten organizmalar agar spot testi ile taranmıştır. Daha sonrasında bakteriyosin üretimi görülen 10 tür indikatör organizmalara karşı ve patojen organizmalara karşı agar kuyu difüzyon testi ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, *Bacillus mycoides*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus vulgaris*'in Lactobacilli izolatları tarafından inhibe edildiği görülmüştür.

2009 yılında Nawaz vd. günümüzde metisilin dirençli bakteriyel enfeksiyonlarda antibiyotik seçimi zorlu hale geldiği için farklı stratejiler geliştirilmesi gerektiğinin altını çizerek, metisilin dirençli bakterilere karşı bakteriyosin üreten bakterilerin etkisini araştırmışlardır. Çeşitli doğal ortamlardan elde edilmiş olan ve bakteriyosin üreticisi olduğu düşünülen izolatların biyokimyasal özelliklerine bakılarak *Lactobacillus fermentum* olduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak da 50 izolattan sadece 1 tanesi MRSA'ya karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu çalışma ile *L. fermentum*'un MRSA'ya karşı etkili bakteriyosin üretimi için kullanılabilceği anlaşılmıştır.

2009 yılında Awaisheh ve Ibrahim yaptıkları çalışmada yenmeye hazır vakumlu paketlerde bulunan et ürünlerinde (RTE-VPMP) farklı kaynaklardan izole edilen LAB'nin antibakteriyel aktivitesini taramayı amaçlamışlardır. Çalışmada kullanılan LAB insan, fermente sebzeler, RTE-VPMP ve günlük süt örneklerinden izole edilmiştir. Bu izolatlar *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktiviteleri için agar spot test tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. 6 LAB örneği patojen türlere karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. Bakteriyosin üretimini teyit etmek için bu izolatların hücre içermeyen süpernatantları (cell-free supernatant) farklı patojen suşlara karşı taranmıştır ve 6 izolat da patojen suşlara karşı etkili olmuştur. İnsan kaynaklı olan LAB izolatlarının diğer LAB izolatlarına göre daha yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışma ile LAB'nin gıda kaynaklı patojenlere karşı etkili olabileceği ve RTE-VPMP üretiminde doğal biyokoruyucular olarak kullanılabilmesi anlaşılmıştır.

Anas vd. (2008) patojen mikroorganizmlara karşı LAB tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin tespiti amacıyla mikrobiyolojik ve biyokimyasal yöntemleri kullanmışlardır. Çalışmada Batı Cezayir'de çiğ keçi sütünden izole edilen LAB'nden 8 izolat belirlenmiştir. Bu türlerden bir tanesinin (*L. plantarum*) *S. aureus*'un gelişimini azalttığı görülmüştür.

Elotmani vd. (2008) Fas geleneksel fermente sütünden aldıkları 74 örnekte anti-*L. monocytogenes* aktivitesi araştırmışlardır. Antilisterial aktiviteye sahip 9 LAB isole edilmiştir ve *L. lactis* (4), *E. faecium* (4) ve *E. faecalis* (1) olarak tanımlanmıştır. Yapılan testler sonucunda Lactococcin R9/2 ve R10/1 en geniş inhibitör etkiyi göstermiştir. Enterocin R69'un *Listeria* spp. inaktivasyon özelliğine sahip olduğu bilinirken enterocin R18 bakteriyosini daha geniş bir aktivite göstermiştir. Sonuç olarak *L. Lactis* R9/2 ve *E. faecalis* R18 30°C'de 24 saatte sterilize UHT sütün koagülasyonunu ve *L. monocytogenes* ATCC 15313 popülasyonunda 2 log azalmayı sağlayabildiği görülmüştür.

Oliveira vd. (2008) çalışmalarında vakumlu ambalajlarla paketlenmiş olan sığırtından LAB izole ederek onların antimikrobiyal aktivitelerini tespit etmeyi amaçlamışlardır. 200 adet izolat seçilerek 5 tane ATCC referans *Lactobacillus* türü üzerindeki inhibitör etkisi için taranmıştır. Agar spot test sonucunda 36 izolat indikatör suşların en az ikisine aktivite göstermiştir. Agar difüzyon testinde ise, hidrojen peroksit ve organik asitlerin etkilerini elemine eden şartlar altında, sadece

6 CFS'nin antimikrobiyal etkisi görülmüştür. *L. acidophilus*'a karşı LAB'nin çoğu tarafından üretilen antagonistik faktörler, geniş bir pH aralığı (4,0-9,0) boyunca ısıtma (100°C 10dk.) dirençli ve kararlı olmuştur. Sonuçta bu çalışma bu izolatların et ürünleri için uzun bir raf ömrü hedefleyen umut verici ve yüksek güvenli olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Knoll vd. (2008) enoloji (şarap, şarap yapımı bilimi) kökenli LAB'ni bakteriyosin kodlayan genler için genetik olarak taramışlardır. Bu çalışmada alkollü ve melolaktik fermentasyon sırasında Güney Afrika kırmızı şarabından izole edilen 330 LAB ve 9 ticari melolaktik bakteri starter kültürleri antimikrobiyal aktivite için taranmıştır. Tüm taranan izolatlardan *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. hilgardii* ve *Oenococcus oeni* türlerine ait 26 suş indikatör suşlara karşı aktivite göstermiştir. PCR bazlı bir tarama seçilmiş olan 5 *L. plantarum* suşunda *pln-A*, *pln-EF*, *pln-J* ve *pln-K* genlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, *L. plantarum* ve *E. faecalis* ile bir ko-kültürü deneyi gerçekleştirilmiştir. *E. faecalis*'in gelişimi 72 saat içinde önlenmiştir. *O. oeni*'nin genomunda dört bakteriyosin kodlayan gen tanımlanmış ve sekanslamıştır. *O. oeni* PSU-1 genomunun *in silico* analizinde BAGEL web sunucusu kullanılmıştır. Bu çalışma farklı *O. oeni* şarap izolatlarında bakteriyosin kodlayan genlerin belirlenmesi üzerine ilk rapor olmuştur.

Ponce vd. (2008) LAB tarafından üretilen bakteriyosin benzeri maddelerin karakterizasyonu için yapraklı sebzelerden elde edilen LAB izolatlarını kullanmışlardır. Bu çalışmada 45 LAB türünün taksonomik olarak kendilerine yakın olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Ayrıca seçilen LAB PCR yöntemiyle genetik olarak tanımlanmışlardır (*Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus hirae* ve *Enterococcus canis*). Agar kuyu difüzyon testi sonucunda bakteriyosin benzeri maddelerin seçilmiş olan Gram pozitif ve Gram negatif gıda kaynaklı patojenlere (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*) karşı aktif olduğu görülmüştür. Daha sonra bu antimikrobiyal etki proteaz ilavesi ile inaktive edilmiştir, böylece inhibisyonun sebebi olan antibakteriyel maddenin protein yapıda olduğu teyit edilmiştir. Bu sonuçlar antibakteriyel etkiye sahip olan 4 LAB türünün minimum işlenmiş sebze üretiminde biyokoruyucu olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

2004 yılında Savadogo vd. Burkina Faso fermente sütünden izole edilen ve bakteriyosin üreten 8 LAB izolatının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır.

İzole edilen bakteriyosin *Enterococcus faecalis* 103907 CIP, *Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Escherichia coli* 105182 CIP suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Gram-pozitif indikatör bakterilerin tümü inhibe olmuştur. Proteolitik enzimlerle (α -kimotripsin, tripsini pepsin) muamele edildiğinde bakteriyosin aktivitesi kaybolmuştur, oysa ki lipaz, katalaz ve α -amilaz bakteriyosin aktivitesini etkilememiştir.

Özdemir vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada Türk fermente sucuğundan izole edilen laktobasil türlerinin *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'e karşı agar spot test ve agar kuyu difüzyon testine göre antibakteriyel etkileri saptanmıştır. Sonuç olarak laktobasil türlerinin antibakteriyel etkilerinin öncelikle kullanılan metotlara ve test edilen laktobasil türlerine göre farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Fermente sucuk üretiminde *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'un gelişiminin kontrol altına alınması için bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri metabolit oluşturan laktobasillerin, gerekli testleri yapıldıktan sonra starter kültür olarak kullanılması önerilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Laktik Asit Bakterileri

Bu çalışmada materyal olarak Melihcan ÖZTEBER'in Yüksek Lisans tez çalışması (2012, Aydın) sırasında fermente süt ürünlerinden izole edilmiş ve 16S rDNA gen bölgesi sekans analizi ile tanısı yapılmış olan 138 adet laktik asit bakteri izolatu kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan LAB izolatları, sayıları ve gelişim koşulları.

Laktik Asit Bakterileri	Sayı	Üreme Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi	Besi Ortamı
<i>Enterococcus durans</i>	3	37°C	24 saat	Brain Heart Infusion Agar (BHI)
<i>Enterococcus hirae</i>	1	37°C	24 saat	BHI
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	37°C	24 saat	BHI
<i>Enterococcus faecium</i>	9	37°C	24 saat	BHI
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	37°C	24 saat	BHI
<i>Lactococcus lactis</i>	26	30°C	24 saat	Trypticase Soy Yeast Extract Agar (TSYE)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3	37°C	48 saat	Man-Rogosa Shape Agar (MRS)
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	2	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus casei</i>	11	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	6	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus curvatus</i>	5	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	27	37°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	1	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus fermentum</i>	5	37°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1	37°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus kefir</i>	7	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus helveticus</i>	2	37°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus otakiensis</i>	1	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus paracasei</i>	5	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	9	37°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus uvarum</i>	1	30°C	48 saat	MRS
<i>Lactobacillus sp.</i>	2	30°C	48 saat	MRS

3.1.2. Çalışmada Kullanılan İndikatör Bakteriler

Çalışmada kullanılan indikatör bakteriler ve gelişim koşulları çizelge 3,2'de verilmiştir.

Çizelge3.2. İndikatör bakteriler ve gelişim koşulları.

İndikatör bakteriler	Üreme Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi	Besi Ortamı
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSMZ 22	55°C	24 saat	Nutrient Agar (NA)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	37°C	24 saat	NA
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	30°C	24 saat	BHI Agar
<i>Listeria monocytogenes</i>	37°C	24 saat	BHI Agar
<i>Listeria innocua</i> DSM 20649	37°C	24 saat	BHI Agar
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	37°C	24 saat	BHI Agar
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	30°C	24 saat	BHI Agar
<i>Lactococcus lactis</i> DSMZ 20729	30°C	24 saat	TSYE Agar
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSMZ 20205	30°C	24 saat	MRS Agar

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları

Trypticase Soy Yeast Extract Broth (TSYE Broth)

Triptik soy broth 30,0 g/L

Maya ekstraktı 3,0 g/L

Besiyeri içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra 1 litre distile su içinde çözülür ve 121 °C 'da 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

Bu besiyeri stok *Lactococcus* suşlarının aktifleştirilmesi için kullanılmıştır.

Trypticase Soy Yeast Extract Agar (TSYE Agar)

Triptik soy broth 30 g/L

Maya ekstraktı 3 g/L

Agar 15 g/L

Bileşenler tartıldıktan sonra 1 litre distile su içinde çözülür. Bu besiyeri otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilip steril petri kutularına dökülür. *Lactococcuslactis*'in geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Trypticase Soy Broth (TSB Broth), (Merck)

Kazein pepton 17,0 g/L

Soya pepton 3,0 g/L

D (+) Glukoz 2,5 g/L

Sodyum klorür 5,0 g/L

Di-potasyum hidrojen fosfat 2,5 g/L

40,0 g besi yeri 1 litre distile suda çözülür ve 121 °C 'da 15 dakika otoklavda sterilize edilir. *Lactococcus* suşları için kullanılan TSYE besiyerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

De Man-Rogosa SharpeBroth (MRS Broth), (Merck)

Kazein pepton 10,0 g/L

Et özütü 10,0 g/L

Maya özütü 4,0 g/L

D (+) glukoz 20,0 g/L

Di-potasyum hidrojen fosfat 2,0 g/L

Tween 80 1,0 g/L

Di-amonuyum hidrojen sitrat 2,0 g/L

Sodyum asetat 5,0 g/L

Magnezyum sülfat 0,2 g/L

Manganez sülfat 0,4 g/L

52,2 g ortam 1 litre distile suda çözülür. 121 °C’de 15 dakika otoklavlanır. Stok *Lactobacillus* suşlarının aktiveştirilmesinde kullanılmıştır.

De Man-Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar), (Merck)

Kazein pepton 10,0 g/L

Et özütü 10,0 g/L

Maya özütü 4,0 g/L

D (+) glukoz 20,0 g/L

Di-potasyum hidrojen fosfat 2,0 g/L

Tween 80 1,0 g/L

Di-amonuyum hidrojen sitrat 2,0 g/L

Sodyum asetat 5,0 g/L

Magnezyum sülfat 0,2 g/L

Manganez sülfat 0,04 g/L

Agar-agar 14,0 g/L

66,2 g ortam 1 litre distile suda çözülür. 121 °C’de 15 dakika otoklavlanır. 45 °C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. *Lactobacillus* suşlarının geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth), (Merck)

Besin yüzeyi (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5 g/L,

D(+) Glucose 2,0 g/L

NaCl 5,0 g/L

Na₂HPO₄ 2,5 g/L

37,0 g dehidre besiyeri 1 litre distile suda çözülür ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus* olmak üzere indikatör bakteri stoklarının ve çalışmada kullanılan diğer tüm *Enterococcus* stoklarının aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar), (Merck)

Besin yüzeyi (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5 g/L,

D(+) Glucose 2,0 g/L

NaCl 5,0 g/L

Na₂HPO₄ 2,5 g/L

Agar-agar 15,0g/L

52,0 g dehidre besiyeri 1 litre distile suda çözülür, 121°C'de 15 dakika otoklavlanır ve petri kaplarına dökülür. Bu besiyeri *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus* olmak üzere indikatör bakterilerin ve çalışmada kullanılan tüm *Enterococcus* suşlarının geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Nutrient Broth (NB), (Merck)

Pepton 5,0 g/L

Et ekstraktı 3,0 g/L

8,0 g besi ortamı 1 litre distile suda çözülür ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Bu besi ortamı *Geobacillus stearothermophilus* DSMZ 22 ve *Escherichia coli* stoklarının aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

Nutrient Agar (NA), (Merck)

Pepton 5,0 g/L

Et ekstraktı 3,0 g/L

Agar-agar 12,0 g/L

20 g dehidre besiyeri 1 litre su ile çözülür ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. *Geobacillus stearothermophilus* DSMZ 22 ve *Escherichia coli* ATCC 35218 suşlarının gelişmesi için kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

%20’lik Skim Milk Çözeltisi

20 g Skim milk 100 mL distile suda çözüldükten sonra, 118 °C’de 10 dakika otoklavlanır. İzolat stoklarının -20 ve -80 °C’de muhafaza edilmesinde kullanılmıştır.

1 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi

4 g NaOH 100 mL distile suda çözdürülerek hazırlanmıştır. CFS pH’larının ayarlanması için kullanılmıştır.

1 M Hidroklorik Asit Çözeltisi

Yoğunluğu 1,19 olan %38’lik derişik HCl’den 8,062 mL distile su ile 100 mL’ye tamamlanır. CFS pH’larının ayarlanması için kullanılmıştır.

% 20’lik Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma)

20 g SDS (sigma) tartılarak 100mL steril distile suda çözdürülür. DNA izolasyonunda lizis işlemi için kullanılmıştır.

Proteinaz K (20 mg/ml), (Sigma)

20 mg Proteinaz K tartılarak 1 mL steril distile suda çözdürülür. DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Sodyum Asetat (3 M pH 5.5)

Toz haldeki Sodyum Asetattan (Sigma) 13,6 g tartılarak 100 mL distile suda çözdürülür ve glasiyel asetik asit ile pH 5,5’e ayarlanır. DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Lizis Tamponu (pH 8.0)

Tris-HCl (Riedel-de Haën), (50 mM) 0,79 g

EDTA (Sigma) (20 mM) 0,74 g

Glukoz (Sigma) 0,99 g

Önce Tris-HCl sonra EDTA çözülür ve üzerine glukoz ilave edilir. Son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözülür. 0,1 M NaOH ile pH 8,0'e ayarlanır. DNA izolasyonunda bakteri hücrelerini parçalamak amacıyla kullanılmıştır.

5X TBE Tamponu

Tris-baz (Sigma) 54 g/L

Borik asit (Riedel-de Haën) 27,5 g/L

EDTA.2H₂O (Sigma) 3,72 g/L

Tampon içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, distile su ile hacim 1 litreye tamamlanır, pH 8.13-8.30'a ayarlanır. 5 kat seyreltilerek agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforezde tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

% 1,5' luk Agaroz Jel (Sigma)

Agaroz 1,5 g

1X TBE 100 mL

Agaroz üzerine 1X TBE tamponu eklenir ve mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale getirilir. Soğutulduktan sonra SafeView™ Classic eklenerek elektroforez tankına dökülür. Genomik DNA'ları ve PCR ürünlerini elektroforezde görüntülemek için kullanılmıştır.

6X Yükleme Tamponu

% 0,015 Bromfenol Mavisı 30 mL

% 0,015 Xylene Cyanol FF 0,015g

% 30 Gliserol 0,015 g

Bromfenol Mavisi ve Xylene Cyanol FFtartılarak üzerine Gliserol eklenir. Steril distile su ile 100 mL' ye tamamlanır. Elektroforezde, DNA ve PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesinde kullanılmıştır.

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Primerler

Enterokoklarda enterosin A ve enterosin B, laktokoklarda latokokkin A ve laktisin, laktobasillerde ise nisin ve plantarisin bakteriyosinleri ile ilgili gen bölgeleri, uygun primerler kullanılarak, PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler ve çoğaltılan fragmanların boyutları çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmanın moleküler aşamasında araştırılan genler, primerler ve fragmanları.

Araştırılan Gen	Primer	Fragman
<i>Enterocin A</i>	F: GGT ACC ACT CAT AGT GGA AA R: CCC TGG AAT TGC TCC ACC TAA (De Vuyst vd., 2003)	138 bç
<i>Enterocin B</i>	F: CAA AAT GTA AAA GAA TTA AGT ACG R: AGA GTA TAC ATT TGC TAA CCC (De Vuyst vd., 2003)	201 bç
<i>Lactococcin A</i>	F: CAA TCA GTA GAG TTA TTA ACA TTT G R: GAT TTA AAA AGA CAT TCG ATA ATT AT (Rodriguez vd., 2000)	771 bç
<i>Lacticin 481</i>	F: TCT GCA CTC ACT TCA TTA GTT A R: AAG GTA ATT ACA CCT CTT TTA T (Rodriguez vd., 2000)	366 bç
<i>Nisin</i>	F: GGA TTT GGT ATC TGT TTC GAA G R: TCT TTC CCA TTA ACT TGT ACT GTG (Ghrai vd., 2004)	598 bç
<i>Plantaricin</i>	F: GGC ATA GTT AAA ATT CCC CCC R: CAG GTT GCC GCA AAA AAA G (Rojo-Bezares vd., 2007)	428 bç

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Aktifleştirilmesi

Çalışmada 19 adet *Enterococcus* izolatu (BHI broth, BHI agar), 26 adet *Lactococcus* izolatu (TSYE broth, TSYE agar), 93 *Lactobacillus* (MRS broth, MRS agar) izolatu kullanıldı. -20°C’de skim milk içerisinde korunan bakteri stok kültürleri öncelikle cam tüplerde 5mL uygun sıvı besiyerinde Enterokoklar 24 saat, Laktokok ve Laktobasiller 48 saat inkübasyonla geliştirildi. Daha sonra uygun katı besiyerlerinde mikroaerofilik olarak jar içerisinde mum kullanılarak, 24 saat inkübe edilerek antibakteriyel etki spektrumlarının belirlenmesi için aktifleştirildi.

3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antibakteriyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etki spektrumları agar spot test ve agar kuyu difüzyon testi olmak üzere iki farklı yöntemle belirlendi.

Agar Spot Test

Antimikrobiyal etki spektrumları belirlenecek olan LAB 24 saatlik sıvı kültürlerinden, her biri için uygun olan, katı besi ortamlarına damla şeklinde 2 µl inokule edildi ve plaklar 24 saat süre ile uygun sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra % 0,5 agar ile hazırlanmış 5mL’lik yumuşak agar içerisine, indikatör mikroorganizmaların 24 saatlik sıvı kültürlerinden 0,5 mL inokule edilerek plakların yüzeyine dökülmüştür ve plaklar her bir indikatör mikroorganizma için uygun olan sıcaklıklarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Schillinger and Lücke, 1989).

Agar Kuyu Difüzyon Testi

Antimikrobiyal etki spektrumları test edilecek olan LAB falkon tüplerde, 50 ml’lik sıvı besi ortamda ve uygun sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kültür sıvıları 8000 rpm’ de 10 dakika (+4°C’de) santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra kültür süpernatantları pelletten ayrılmış ve yeni, steril falkon tüplerde toplanarak 1 M NaOH/HCl kullanılmış ve asit inhibisyonunu ekarte edebilmek için pH: 6.00’ya ayarlanmıştır. Daha sonra bu süpernatantlar steril şırıngalarla çekilerek

0,45 µl por çaplı, steril membran filtreden süzölmüş ve süzöntüleri (CFS, cell-free supernatant) steril deney tüplerinde toplanmıştır.

Çalışmada kullanılan 9 farklı indikatör bakterinin agar ortamındaki 24 saatlik kültürlerinden distile suda 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonları, her bir indikatör bakteri suşu için uygun olan agar ortamlara, steril eküvyon çubuğı ile inkübe edilmiştir. Plaklara 6 mm çaplı steril agar delici ile kuyucuklar açılmıştır. Hazırlanan kuyucuklara CFS'lerden 100 µl konularak indikatör bakteriler için uygun sıcaklıklarda 24 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır (Pringsulaka vd.,2012). Ayrıca *Enterococcus* (89, 94, 129, 130, 132), *Lactococcus* (111, 112, 113, 115, 117) ve *Lactobacillus* (24, 54, 55, 56, 62) izolatlarından ratgele beşer tür seçilerek 6, 12, 16 ve 20 saatlik inkübasyonlar sonucunda agar kuyu difüzyon testi ile tarama yapılmıştır.

3.2.3. Moleküler Yöntemler

Laktik Asit Bakterilerinden Genomik DNA İzolasyonu

Laktik asit bakterilerinin genomik DNA'ları Ronimus vd. (1997)'nin fenol-kloroform yöntemi (modifiye edilerek) veya InstaGene Matrix DNA izolasyon kiti (Bio-rad) ile izole edilmiştir.

Fenol-kloroform yönteminde, izolatların 24 saatlik kültürlerinden steril plastik öze yardımıyla birkaç koloni alınarak, içinde 500 µL lizis tamponu bulunan eppendorf tüplerinde süspansiyon edilmiştir. 10 saniye vorteks yapılan örnekler, 13000 rpm' de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmış ve tüplerdeki pellet üzerine 75 µL lizozim (20 mg/ml) ve 425 µL lizis tamponu eklenmiştir. Tüpler alt-üst edilerek karıştırılmış ve 37 °C'de, 30 dakika inkübe edilmiştir. 25 µL SDS (%20'lik) eklenerek 37 °C'de 30 dakika daha inkübe edilmiştir. Daha sonra 10 µL Proteinaz K ile muamele edilen örnekler, 50 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Tüplere (v/v) olacak şekilde fenol: kloroform: izoamil alkol (Riedel-de Haën) karışımından eklenmiş ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üstteki berrak faz toplanarak 1/10 (v/v) oranında Na-asetat (3 M, pH 5.5) eklenmiş ve tüpler alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Tekrar eşit hacimde (v/v) olacak şekilde isopropanol eklenerek -20 °C' de 30 dakika bekletilen tüpler 13000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak pelletin üzerine 500 µL etil alkol (%70) eklenmiştir. 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenen örneklerden süpernatant tekrar

atılmış ve tüpler 50 °C lik etüvde tutularak alkol uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 100 µL steril distile su eklenmiş ve bir gece 37 °C’de DNA’nın çözünmesi için inkübe edilmiştir. İzole edilen DNA’lar kullanılabildiği kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Genomik DNA’yı görüntülemek amacıyla örneklerin % 1’lik agarozda elektroforezi yapılmıştır (Thermo EC330). Elektoroforez sonunda, DNA bantlarını görüntülemek için UVP LM-20E cihazı kullanılmıştır.

İzole edilen DNA’lar bakteriyosin genlerinin taranmasında kullanılmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Bakteriyosin Gen Taraması

Çalışma kapsamında bu laktik asit bakterilerinden genomik DNA izole edildikten sonra uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile bakteriyosin genleri araştırılmıştır. Enterokoklarda enterocin A ve enterocin B, laktokoklarda lactococcin A ve laktisin 481, laktobasillerde ise nisin ve plantarisin bakteriyosinleri ile ilgili gen bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılmış, dizi analizi yapılarak bakteriyosin üretiminden sorumlu genetik belirleyiciler saptanmıştır. PCR karışımı çizelge 3.4.’te verildiği gibidir.

Çizelge 3.4. Bakteriyosin genlerini çoğaltmak için hazırlanan PCR karışımı.

Reaktifler (Konsantrasyon)	Hacim
PCR buffer (10x, +KCL, -MgCl ₂)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer F (20 pMol)	1 µl
Primer R (20 pMol)	1 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0,4 µl
Steril distile su	36,1 µl
DNA (20 ng/µl)	1 µl
TOPLAM	50 µl

Çizelge 3.5.Araştırılan bakteriyosin genleri, fragmanları ve PCR koşulları.

Araştırılan Genler	Fragman Uzunlukları	PCR Koşulları			
<i>ent-A</i>	138 baz çifti	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	} 35 döngü
		Denatürasyon:	95°C	30 saniye	
Primer Bağlanma:	58°C	30 saniye			
Zincir Uzama:	72°C	30 saniye			
Son Uzama:	72°C	5 dakika			
(Moreno, 2003)					
<i>ent-B</i>	201 baz çifti	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	} 35 döngü
		Denatürasyon:	95°C	30 saniye	
Primer Bağlanma:	56°C	30 saniye			
Zincir Uzama:	72°C	30 saniye			
Son Uzama:	72°C	5 dakika			
(Moreno, 2003)					
<i>lcn-A</i>	771 baz çifti	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	} 30 döngü
		Denatürasyon:	92°C	2 dakika	
Primer Bağlanma:	38°C	2 dakika			
Zincir Uzama:	72°C	2 dakika			
Son Uzama:	72°C	5 dakika			
(Rodriguez vd., 2000)					
<i>lac-481</i>	366 baz çifti	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	} 26 döngü
		Denatürasyon:	92°C	30 saniye	
Primer Bağlanma:	51°C	30 saniye			
Zincir Uzama:	72°C	1 dakika			
Son Uzama:	72°C	5 dakika			
(Rodriguez vd., 2000)					
<i>nisin</i>	598 baz çifti	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	} 26 döngü
		Denatürasyon:	92°C	2 dakika	
Primer Bağlanma:	41°C	2 dakika			
Zincir Uzama:	72°C	2 dakika			
Son Uzama:	72°C	5 dakika			
(Ghraiiri vd., 2004)					
<i>pln</i>	428 baz çifti	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	} 30 döngü
		Denatürasyon:	94°C	3 dakika	
Primer Bağlanma:	53°C	1 dakika			
Zincir Uzama:	72°C	1 dakika			
Son Uzama:	72°C	5 dakika			
(Rojo-Bezares vd., 2007)					

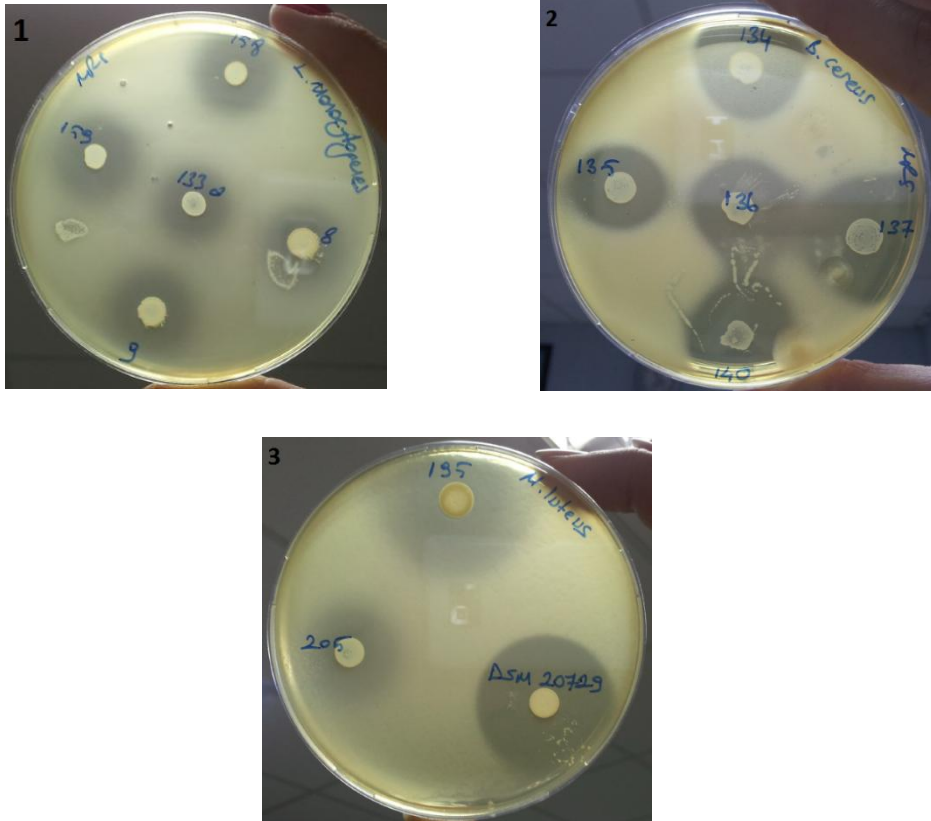
PCR ürünlerinden 5 µL alınarak üzerine 2 µL 6X yükleme tamponu eklenmiş ve örnekler, %5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) içeren, % 1,5' luk agaroz jelde, 80 voltta, 45 dakika yürütülmüştür. Baz büyüklüğü tespiti için, 100 bp'lik marker (Fermentas GeneRuler™) kullanılmıştır. Dizi analizi için Macrogen Firmasına (Kore) gönderilen örneklerin sekans sonuçları GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve homologiler belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antibakteriyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi

4.1.1. Agar Spot Test Sonuçları

Agar spot testi sonucunda çizelge 4.1.'de verildiği gibi örneklerin hepsinin tüm indikatörlere karşı zon oluşturduğu görülmüştür. İnhibisyon zonlarının çapları $+ < 0,5\text{cm}$, $0,5\text{cm} < ++ < 1\text{cm}$, $1\text{cm} < +++$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. Agar spot test sonunda gözlenen inhibisyon zonları. 1) indikatör *L. monocytogenes*'e karşı, 2) *B. cereus* ATCC 11778'e karşı, 3) *M. luteus* ATCC 9341'e karşı elde edilen sonuçlar.

Çizelge 4.1. Agar spot testi sonunda LAB izolatlarının indikatör bakterilere karşı gösterdiği inhibisyon etkisi.

İzola No	İzolatlar	<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> DSMZ 22	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B.cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i> DSM 20649	<i>E.faecalis</i> ATCC 51299	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>L. lactis</i> DSMZ 20729	<i>L. plantarum</i> DSMZ 20205
GLM 8	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	++	+	++	++	+	++	+	+
GLM 9	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	++	+	++	++	+	++	++	+
GLM 13	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	++	+	+	++	+	+	++	+
GLM 14	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	+++	++	++	++	++	++	++	+
GLM 17b	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLM 18a	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLM 18b	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLM 24	<i>Lactobacillus casei</i>	+	+	++	++	++	+	++	++	+
GLM 34	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	+	++	++
GLM 35	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	++	+	+	+	+	++	+	++
GLM 37	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	++	+	++	++	++	++	++	++
GLM 42	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	++	+	++	+	++	++	++	++
GLM 43	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	++	+	++	++	++	++
GLM 44a	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLM 44b	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLM 49	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	++	+	++	+	++	++	+	+
GLM 52	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	++	++	+++	+	++	+	+	++
GLM 53	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	++	+	+++	+	++	++	++	++
GLM 54	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	+++	+	++	+++	+	+
GLM 55	<i>Lactobacillus casei</i>	+	++	++	+++	++	++	++	++	++

Çizelge 4.1. devamı

İzola No	İzolatlar	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSMZ 22	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B.cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i> DSM 20649	<i>E.faecalis</i> ATCC 51299	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>L. lactis</i> DSMZ 20729	<i>L. plantarum</i> DSMZ 20205
GLM 56	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	+	++	+++	+++	++	++	+++	++	++
GLM 58	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+++	+++	+	+	++	+	++	++	++
GLM 59	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	++	+	+	+	+	++	+	+
GLM 60	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	+	++	+	+	++	+	+
GLM 61	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	+++	++	+	+	+	+	+	++
GLM 62	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	++	++	+	+++	+	++	++	+	+
GLM 66	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+	++	+++	+	++	+	+	+
GLM 67	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+	++	+++	++	++	++	++	++
GLM 68	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	++	++	+	+	+	++	+	++
GLM 69	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	++	+	++	+	++	++	++
GLM 70	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	++	++	+	++	++	++	+	++
GLM 71	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	+++	++	+	++	++	++	+	+
GLM 72	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	+++	++	+	++	++	++	+	+
GLM 76	<i>Lactobacillus kefir</i>	++	++	++	++	++	++	++	+	++
GLM 77	<i>Lactobacillus kefir</i>	++	++	++	+	++	++	++	++	++
GLM 79	<i>Lactobacillus kefir</i>	+	+	++	+	+	++	++	+	+
GLM 80	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	++	++	+	++	++	+	+	++
GLM 83	<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	++	++	++	+	++	++	+	+
GLM 84	<i>Lactobacillus curvatus</i>	++	++	+	++	+	+	++	++	++
GLM 86	<i>Lactobacillus casei</i>	+	+	++	++	++	+	++	++	++
GLM 88	<i>Lactobacillus otakiensis</i>	+	++	++	++	++	+	++	++	++

Çizelge 4.1. devamı

İzola No	İzolatlar	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSMZ 22	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B.cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i> DSM 20649	<i>E.faecalis</i> ATCC 51299	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>L. lactis</i> DSMZ 20729	<i>L. plantarum</i> DSMZ 20205
GLM 89	<i>Enterococcus durans</i>	++	+	++	+	+	+	++	++	+
GLM 90	<i>Lactobacillus casei</i>	++	+++	++	+++	++	+	++	+	+
GLM 91	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>	+	++	+	+++	+	+	++	+	+
GLM 92	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	+++	+	+	+	+	++	++	++
GLM 93	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	++	+++	+	+++	++	++	++	++	++
GLM 94	<i>Enterococcus hirae</i>	++	++	++	+	+	+	++	+	+
GLM 95	<i>Lactobacillus paracasei</i>	++	++	+	++	++	+	++	+	++
GLM 96	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>	+	++	+	+	++	+	++	+	+
GLM 99	<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLM 101	<i>Lactobacillus uvarum</i>	++	+++	+	++	++	++	+++	++	+
GLM 102	<i>Lactobacillus coryniformis subsp. torquens</i>	++	+++	+	++	++	+	+++	+	+
GLM 103	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	++	++	+++	++	++	+	++	++
GLM 104	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	+	+	++	++	++
GLM 105	<i>Lactobacillus kefir</i>	+	+	++	++	+	+	++	+	+
GLM 106	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
GLM 107	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	++	+	++	++	+	+	++	++	++
GLM 108	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	++	++	++	++	+	+	++	+	+
GLM 109	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	++	+	+	++	++	+	+
GLM 110	<i>Lactobacillus kefir</i>	+	+	++	+	+	++	+	+	++
GLM 111	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	+++	+	++	+	+++	+	++	++
GLM 112	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+++	++	++	++	+	++	+++	++	+

Çizelge 4.1. devamı

İzola No	İzolatlar	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSMZ 22	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i> DSM 20649	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>L. lactis</i> DSMZ 20729	<i>L. plantarum</i> DSMZ 20205
GLM 113	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+++	+	++	++	++	++	+	++	++
GLM 114	<i>Lactobacillus casei</i>	++	+++	++	++	++	++	++	++	++
GLM 115	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+++	++	++	++	+	++	++	+	++
GLM 117	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	+++	++	+	+	++	+++	+	++
GLM 118	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	++	+	++	+	+	+	+	++	+
GLM 119	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	+	+	++	+	++	++	++
GLM 120	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	+
GLM 122	<i>Lactobacillus casei</i>	+	+	++	++	++	++	+	++	++
GLM 123	<i>Lactobacillus kefir</i>	+	+	++	+	+	++	+	++	+
GLM 125	<i>Lactobacillus kefir</i>	++	++	++	+	+	+	++	+	+
GLM 129	<i>Enterococcus gallinarum</i>	++	+++	+	+	++	++	++	++	++
GLM 130	<i>Enterococcus faecium</i>	++	++	+	++	++	++	++	++	++
GLM 132	<i>Enterococcus faecalis</i>	++	++	++	++	++	++	++	+	++
GLM 133	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	+	++	++	+++	++	++	++
GLM 133a	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	+	+	++	++	+	+	++	++
GLM 134	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	+	++	++	++	+	++	+	++
GLM 135	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	+++	+	+	++	++	+	++
GLM 136	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	+++	+	+	++	+++	++	++
GLM 137	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	+++	++	+	+	++	++	++
GLM 140	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	+++	++	++	+	++	+	++
GLM 144	<i>Enterococcus faecium</i>	++	++	++	+	+	++	+++	+++	+

Çizelge 4.1. devamı

İzola No	İzolatlar	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSMZ 22	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B.cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i> DSM 20649	<i>E.faecalis</i> ATCC 51299	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>L. lactis</i> DSMZ 20729	<i>L. plantarum</i> DSMZ 20205
GLM 152	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	+	+	++	++	++	++	+	++
GLM 154	<i>Lactobacillus curvatus</i>	++	++	++	+	+	+	+	+	+
GLM 157	<i>Enterococcus gallinarum</i>	+	+	++	++	+	++	+++	+	++
GLM 158	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	++	++	++	+	++	++	+
GLM 159	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++	++	++	++	++	+	+++	+	++
GLM 160	<i>Enterococcus faecium</i>	++	+++	++	++	++	++	+	++	+
GLM 161	<i>Enterococcus faecium</i>	+++	+++	++	+	++	++	+	+	+
GLM 162	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
GLM 164	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	++	++	++	++	++	+	++	++	++
GLM 165	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	+	++	++	++	++	++	+	+
GLM 166	<i>Lactobacillus helveticus</i>	+	+	+	+	+	+	++	++	+
GLM 167	<i>Lactobacillus fermentum</i>	++	++	++	++	+	+	++	+	+
GLM 168	<i>Enterococcus faecium</i>	+	++	++	++	+	++	++	++	+
GLM 169	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	++	++	+++	+++	+	+	+	+	+
GLM 170	<i>Lactobacillus casei</i>	++	+++	++	+++	+	+	++	++	++
GLM 172	<i>Lactobacillus brevis</i>	++	++	++	++	+	+	++	++	++
GLM 173	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	+	++	+	+	+	+	+++	++	+
GLM 174	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	+	++	+	+	+	+	++	+	+
GLM 175	<i>Enterococcus faecium</i>	++	++	++	++	+	++	++	++	++
GLM 176	<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	++	++	+	++	+++	+	++
GLM 177	<i>Lactobacillus paracasei</i>	++	++	+	+	+	+	+	+	+

Çizelge 4.1. devamı

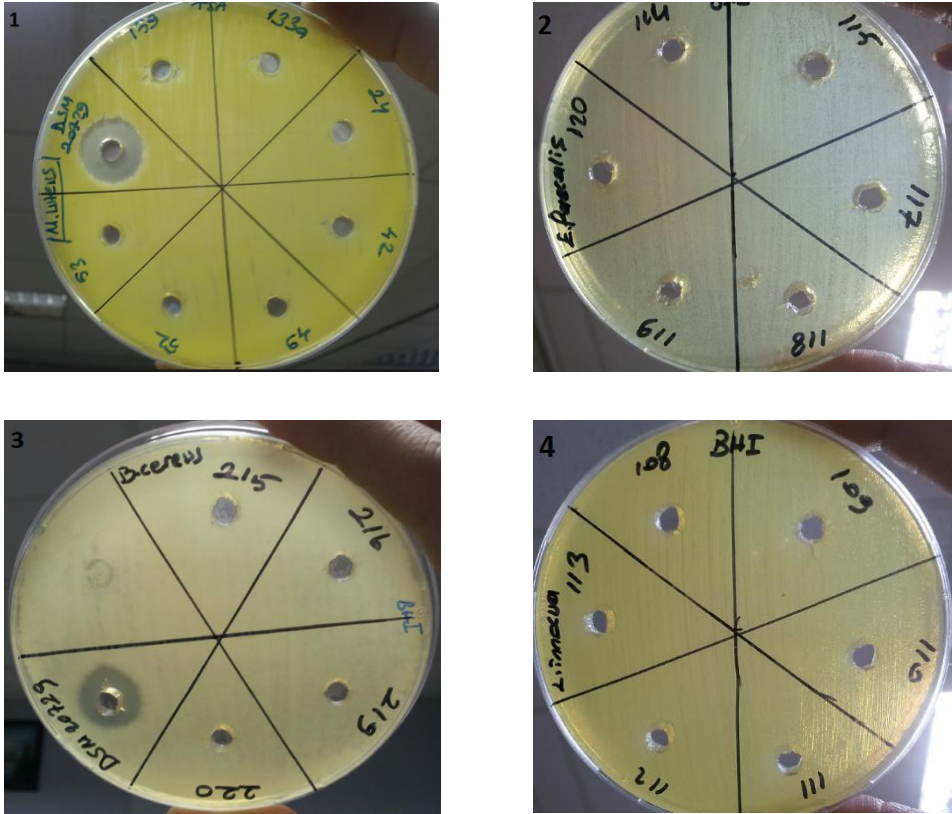
İzola No	İzolatlar	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSMZ 22	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B.cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i> DSM 20649	<i>E.faecalis</i> ATCC 51299	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>L. lactis</i> DSMZ 20729	<i>L. plantarum</i> DSMZ 20205
GLM 178	<i>Enterococcus durans</i>	++	+++	++	+	++	++	++	+	++
GLM 179	<i>Enterococcus faecium</i>	++	++	++	++	++	+++	++	++	++
GLM 180	<i>Lactobacillus gasseri</i>	++	++	+	+	+	+	+	+	++
GLM 181	<i>Enterococcus faecalis</i>	++	+++	+	+	++	++	+	+	+
GLM 182	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	++	++	++	+++	++	++	++	+	++
GLM 183	<i>Enterococcus faecalis</i>	++	++	++	++	++	+	++	+	+
GLM 184	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	++	+	++	++	+	+	+	+
GLM 185	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	++	+	+	+	+	++	+	+
GLM 186	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	++	++	+	+	+	+	+	++	+
GLM 188	<i>Lactobacillus helveticus</i>	+	++	++	++	+	++	++	+	++
GLM 189	<i>Lactobacillus casei</i>	+	++	++	+++	+	++	++	+	+
GLM 190	<i>Lactobacillus fermentum</i>	++	++	+++	++	+	++	++	+	+
GLM 191	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLM 192	<i>Enterococcus durans</i>	+	++	+++	++	+	++	+++	+	++
GLM 194	<i>Lactobacillus fermentum</i>	++	++	+++	++	+	+	+	++	+
GLM 195	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	++	+	++	++	++	+++	+	+
GLM 197	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	++	++	++	++	++	++	++	++
GLM 199	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++	++	+	++	+	+	++	+	++
GLM 201	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	++	+++	++	+++	++	++	+++	+	+
GLM 202	<i>Lactobacillus coryniformis subsp. torquens</i>	++	++	+++	++	+++	++	++	+	+
GLM 203	<i>Lactobacillus coryniformis subsp. torquens</i>	++	+	++	++	++	+	++	+	++

Çizelge 4.1. devamı

İzola No	İzolatlar	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSMZ 22	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B.cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i> DSM 20649	<i>E.faecalis</i> ATCC 51299	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>L. lactis</i> DSMZ 20729	<i>L. plantarum</i> DSMZ 20205
GLM 204	<i>Lactobacillus curvatus</i>	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++
GLM 205	<i>Enterococcus faecium</i>	++	++	++	++	++	+	++	+	++
GLM 208	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	++	++	++	+	++	++	++	+
GLM 209	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	++	++	++	++	++	++	+
GLM 210	<i>Lactobacillus casei</i>	+	++	+++	++	++	++	++	+	+
GLM 212	<i>Lactobacillus casei</i>	+	++	+++	++	++	++	+	+	+
GLM 213	<i>Lactobacillus casei</i>	++	+++	++	+	+	++	++	++	++
GLM 215	<i>Lactobacillus casei</i>	++	++	++	++	+	++	+	+	++
GLM 216	<i>Lactobacillus fermentum</i>	++	+++	++	++	++	++	++	+	+
GLM 217	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	++	+++	++	++	++	++	+	+
GLM 219	<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	++	++	+++	+	++	++	++	++
GLM 220	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	++	+++	+++	+++	++	++	++	+	++
GLM 221	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	++	+	++	+	+	+	++	++
Pozitif kontrol	<i>Lactococcus lactis</i> DSMZ 20729	++	++	++	++	++	++	+++	++	++

4.1.2. Agar Kuyu Difüzyon Testi Sonuçları

Bu test sonucunda pozitif kontrol olarak kullanılan *L. lactis* DSMZ 20729 dışında hiçbir LAB izolatu indikatör bakterilere karşı antagonistik aktivite göstermemiştir.



Şekil 4.2. Agar kuyu difüzyon testi sonunda sadece pozitif kontrol etrafında gözlenen inhibisyon zonları. 1) İndikatör *M. luteus* ATCC 9341'e karşı, 2) *E. faecalis* ATCC 51299'a karşı, 3) *B. cereus* ATCC 11778'e karşı, 4) *L. innocua* DSM 20649'a karşı elde edilen sonuçlar.

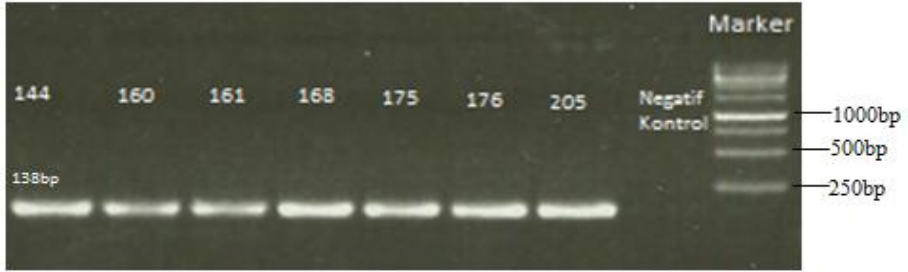
4.2. Moleküler Yöntemler

4.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Bakteriyosin Geni Tarama Sonuçları

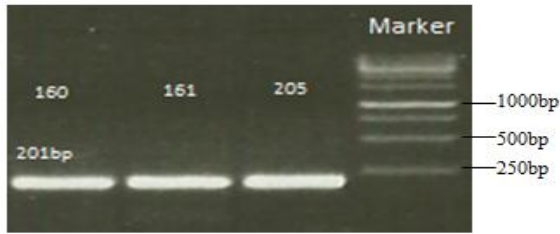
PCR yöntemi ile bakteriyosin genlerinin taranması sonucunda 7 *Enterococcus* suşunda (% 5,07) *ent-A* geni varlığı (şekil 4.1), 3 *Enteococcus* suşunda (% 2,17) *ent-B* geni varlığı (şekil 4.2), 3 *Lactococcus* suşunda *lcn-A* (% 2,17) geni varlığı (şekil 4.3) ve 2 *Lactobacillus* (% 1,44) suşunda *pln* geni varlığı (şekil 4.4) saptanmıştır.

Çizelge 4.2. LAB'nin bakteriyosin gen taraması sonuçları

İzolot No	İzolatlar	Tespit Edilen Bakteriyosin Genleri
GLM 144	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>ent-A</i>
GLM 160	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>ent-A, ent-B</i>
GLM 161	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>ent-A, ent-B</i>
GLM 168	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>ent-A</i>
GLM 175	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>ent-A</i>
GLM 176	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>ent-A</i>
GLM 205	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>ent-A, ent-B</i>
GLM 134	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>lcn-A</i>
GLM 135	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>lcn-A</i>
GLM 136	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>lcn-A</i>
GLM 208	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pln</i>
GLM 209	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pln</i>



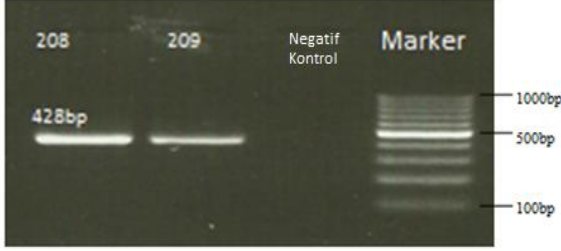
Şekil 4.3. *ent-A* (138 bç.) gen bölgesi için PCR ürünleri



Şekil 4.4. *ent-B* (201 bç.) gen bölgesi için PCR ürünleri



Şekil 4.5. *lcn-A* (771 bç.) gen bölgesi için PCR ürünleri



Şekil 4.6. *pln* (428 bç.) gen bölgesi için PCR ürünleri

4.2.2. Sekans Sonuçları

Çizelge 4.3. Araştırılan gen bölgesi sekanslarının Blast analiz sonuçları

İzolat No	Örnekler	Sekans Sonuçları	Uyumluluk Derecesi
GLM 134	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>lactococcin-A</i>	%94
GLM 135	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>lactococcin-A</i>	%96
GLM 136	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>lactococcin-A</i>	%95
GLM 144	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-A</i>	%98
GLM 160	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-A</i>	%100
GLM 160	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-B</i>	%98
GLM 161	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-A</i>	%99
GLM 161	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-B</i>	%98
GLM 168	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-A</i>	%98
GLM 175	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-A</i>	%99
GLM 176	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-A</i>	%97
GLM 205	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-A</i>	%97
GLM 205	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>enterocin-B</i>	%94
GLM 208	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>plantaricin</i>	%99
GLM 209	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>plantaricin</i>	%98

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmamızda Melihcan ÖZTEBER'in tez çalışması sırasında, Aydın Merkez'de yer alan mandıra, market, halk pazarlarından alınan ev yapımı ya da hazır fermente süt ürünlerinden izole edilmiş LAB kullanılmıştır. *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cislerine ait olan 138 tür bakteriyosin üretiminin karakterizasyonu için incelenmiştir. Çalışmamızda LAB'nin antibakteriyal etki spektrumlarının belirlenmesi için agar spot test ve agar kuyu difüzyon testi olmak üzere iki ayrı yöntem belirlenmiştir. Agar spot test sonucunda 138 LAB de (% 100) zon oluşturmuş yani indikatör mikroorganizmalara karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. Agar kuyu difüzyon testinde ise, her iki metotta da pozitif kontrol olarak kullanılan *L. lactis* DSMZ 20729 dışında hiçbir LAB'nin zon oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bunun üzerine *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Lactobacillus*'lar içerisinde rastgele beşer tür seçilerek 6, 12, 16 ve 20 saatlik inkübasyonları sonucunda agar kuyu difüzyon testi ile tarama yapılmıştır ve yine hiçbir LAB izolatında indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonu görülmemiştir. Çalışmamızda LAB türlerinin indikatör mikroorganizmalara karşı oluşturdukları antibakteriyal etki agar spot test ve agar kuyu difüzyon testlerine göre değişkenlik göstermiştir. 2014 yılında Rubio vd. fermente sosisten izole ettikleri LAB'nde antagonistik aktiviteyi belirlemek için bizim de çalışmamızda seçmiş olduğumuz iki tarama yöntemini kullanmışlardır. İlk aşamada 23 farklı *Lactobacillus* türünden *L. gasserii* suşlarının *L. monocytogenes* ve *Salmonella* indikatörlerinin gelişimini engellediklerini tespit etmişlerdir. İkinci aşamada yani, nötralize süpernatantların test edildiği agar kuyu difüzyon testinde hiçbir LAB'nin indikatör suşları inhibe edemediğini görmüşlerdir ve agar spot test sonuçlarındaki inhibisyon etkisinin asit üretimi ile ilgili olduğunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmanın sonuçları bizim çalışmamızla da örtüşmektedir.

2011 yılında Sieladie vd. Kamerun'daki çiğ inek sütünden izole edilmiş laktobasil suşların probiyotik özelliklerini araştırmışlardır. Araştırmalarında antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için agar spot test ile yaptıkları taramalarda tüm izolatların patojen indikatör suşların (*L. innocua* ATCC 33090, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25922, *S. aureus*, *S. mutans* DSM 20523, *E. faecalis* ATCC10541, *E. coli* ATCC 13706, *E. coli*) gelişimini inhibe ettiğini, agar kuyu difüzyon testi sonucunda ise 15 *Lactobacillus* türünden sadece bir tanesinin indikatör suşlara karşı inhibisyon zonu oluşturduğunu görmüşlerdir.

Alegria vd. 2010 yılında çiğ süttten yapılan geleneksel İspanyol peynirlerinden izole ettikleri *L. lactis* suşlarının bakteriyosin üretimini araştırmışlardır. Agar spot test ile taraması yapılan 60 suş da indikatör bakteriler olarak seçilen gıda patojenlerini inhibe etmiştir. Agar kuyu difüzyon testinde ise sadece 17 suş inhibitör etki göstermiştir. Araştırmacılar sürpriz olmayan bu durumdan, ilk testte pozitif sonuç veren fakat ikinci testte inhibisyon etkisi yok olmuş olan suşların ürettikleri H_2O_2 ve yağ asitlerini içeren antimikrobiyal bileşiklerin sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir. De Vuyst ve Leroy'un 2007 yılında yapmış olduğu çalışma da bu sonucu desteklemektedir.

Awaisheh and Ibrahim (2009) yapmış oldukları çalışmada diğer birçok çalışmada olduğu gibi, agar spot testi ile yaptıkları taramalar sonucunda tespit ettikleri inhibisyon etkisinin organik asitler, H_2O_2 , bakteriyosinler ya da reuterin gibi inhibitör bileşiklerin üretiminden kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir. Bu görüşlerini Fuller ve Gibson (1997) ve Jacobson vd. (1999) tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarıyla desteklemişlerdir. Agar kuyu difüzyon testinde ise bakterilerin anaerobik şartlar altında inkübe edilmesiyle H_2O_2 'in, CFS'lerin nötralize edilmesiyle de laktik asitlerin inhibe edici etkilerini ortadan kaldırmışlardır. Böylece agar kuyu difüzyon testi sonucunda patojen ve gıda bozulmalarına neden olan bakterilere karşı oluşan inhibisyon zonlarının bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri maddelerden kaynaklanmış olduğunu ortaya koymuşlardır.

Maragkoudakis vd. (2006) çalışmalarında antimikrobiyal aktiviteyi saptamak için agar spot test, agar kuyu difüzyon testi ve mikrotitre plaka metodunu kullanmışlardır. Uygun kontrol ortamı (pH 6,5 MRS) ve nötre yakın süpernatant (pH 6,5) ile uygulanmış olan agar spot test ve agar kuyu difüzyon testinde hiçbir patojene karşı inhibisyon zonu oluşmazken, mikrotitre plaka yönteminde (pH 4,5 süpernatant ve pH 4,5 MRS) tüm patojenlere karşı inhibisyon gerçekleşmiştir. Bunun sonucunda araştırmacılar oluşan inhibisyon zonlarının bakteriyosin etkisinden değil, büyük ihtimalle düşük pH ile birlikte organik asit üretiminden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Oliveira vd.'nin (2008) yapmış olduğu çalışmada 200 LAB'den 36'sı agar spot testte indikatör bakterilerin gelişimini inhibe etmişlerdir. Agar kuyu difüzyon testi sonucunda da bu 36 LAB'nin 6'sının inhibisyon etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar diğer 30 LAB izolatının agar spot testteki inhibitör

etkisini laktik ve asetik asit üretimi ve buna bağlı olarak pH azalması ya da H₂O₂ varlığına atfetmişlerdir (Sawitzki vd., 2007). Ayrıca bakteriyosinlerin difüze olamaması, proteaz inaktivasyonu ve konsantrasyon etkilerinin agar spot testteki pozitif sonuçların agar kuyu difüzyon testinde yanlış negatif sonuçlara neden olmuş olabileceğini belirtmişlerdir (Bromberg vd., 2004; Schillinger ve Lücke, 1989). Odeyemi vd. (2011) CFS kullanılmayan yöntemlerin birincil/ön tarama testleri olarak belirlenmesi gerektiğini ve bu tür bir yöntem için agar spot testin çok uygun olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar doğrulama testi olarak CFS'lerin kullanıldığı agar kuyu difüzyon testi, agar disk difüzyon testi ya da mikropate yönteminin uygun olduğunu rapor etmişlerdir.

Son yıllarda bakteriyosinler ve onların gıda süreçlerindeki muhtemel uygulamaları için yapılan araştırmalara gösterilen ilgi artmıştır. Özellikle de *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Lactobacillus* suşları derinlemesine araştırılmaktadır, moleküler çalışmalar büyük önem taşımaktadır (Dal Bello vd., 2010). Şimdiye kadar bu türlere ait gıda, insan, çevre ve hayvansal kaynaklı izolatlarda bakteriyosin genlerinin tespiti birçok çalışmada rapor edilmiştir (Migaw vd., 2014; Stoyancheva vd., 2014; Algeria vd., 2010; Strompfová vd., 2008; Knoll vd., 2008; Foulquie Moreno vd., 2006). LAB'nin gıdalarda kullanımları genellikle güvenli olarak (GRAS) tanımlandığından beri, bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar ve patojen mikriorganizmaların kontrolü ve yok edilmesi için bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımı önerilmiştir (De Vuyst ve Vandamme, 1994). Bizim çalışmamızın da son aşamasında antimikrobiyal aktivite testleri yapılan *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Lactobacillus* suşlarından oluşan 138 LAB izolatında PCR yöntemiyle bakteriyosin genleri taranmıştır. *Enterococcus* suşlarında *ent-A* geni (% 5,07) varlığı (şekil 4.1) ve *ent-B* geni (% 2,17) varlığı (şekil 4.2), *Lactococcus* suşlarında *lcn-A* geni (% 2,17) varlığı (şekil 4.3) ve *Lactobacillus* suşlarında *aplN* geni (% 1,44) varlığı (şekil 4.4) saptanmıştır (Çizelge 4.2). Genotipik olarak bakteriyosin genlerinin varlığı tespit edilmiş olan bu suşlar antimikrobiyal aktivite tarama testlerinde pozitif sonuç vermemiştir.

Yapısal genler bakımından pozitif olan suşlarda antibakteriyal etkinin tespit edilememesinin sebeplerinden birisi, LAB'nin inhibisyon etkisinin kullanılan indikatör bakteri suşlarına ve kullanılan yöntemlere göre değişkenlik göstermesi olabilir (Özdemir vd., 2002). Bazı bakteriyosinler çok dar bir hedef hücre kitlesine sahiptirler, bu yüzden de LAB'nin antimikrobiyal aktivite testlerinde, üretici suşlara karşı duyarlı indikatör suşların seçimi kilit önem taşımaktadır (Nes vd.,

2007). Diğer bir sebep ise, kodlanan bakteriyosinlerin ifade edilmemesi olabilir. Bakteriyosin üretimi için bakteriyosin genlerinin varlığı koşulsuz olarak gerekli ise de bu yapısal genlerin varlığı mutlaka bakteriyosin üretiminin gerçekleşeceği anlamına gelmez. Ayrıca, peptid bakteriyosin üretimi bir regülatör sistem tarafından sıklıkla düzenlenir. Peptid bakteriyosinler için en iyi anlaşılmış olan düzenleyici sistem iki bileşenli sistemdir ancak diğer düzenleme mekanizmaları da mevcuttur (Nes vd., 1999). Bizim çalışmamızda olduğu gibi bakteriyosin yapısal genlerine sahip suşların antimikrobiyal aktivite üretimindeki aksaklığın sebebi bir işlevsiz genetik sistem olabilir. Bazen bakteriyal genomların sadece bakteriyosin üretici sistemin bir kısmını kodladığı ya da mutasyonların bakteriyosin genlerinin işlevselliğini inaktive ettiği de görülür (Nes vd. 2007; Başbülbul Özdemir, 2011).

Karakterize edilememiş olan bakteriyosin üreticisi suşlarda, bu metabolitlerin üretiminden sorumlu genlerin tespitinde PCR tekniğinin oldukça hızlı, kuvvetli ve diğer tekniklere göre daha zahmetsiz olduğu birçok araştırmacı tarafından ispat edilmiştir. Bu uygulama GenBank'ta var olan sekans bilgileriyle zaten iyi karakterize edilen bakteriyosin çalışmaları için zaman kaybı yaratan çabaları en aza indirmektedir (Macwana ve Murina, 2012).

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre bazen izolatların ilk tarama testinde görülen inhibitör yetenekleri başka bir yöntemle yapılan ikinci bir taramada gözlenemeyebilir, bu yüzden tarama testlerinin Odeyemi vd.'nin (2011) de belirttiği gibi ön ve doğrulama testleri olarak gruplandırılması önerilmektedir. Ön tarama testi muhtemel antimikrobiyal madde üreticilerinin indikatör bakterilerin gelişimini engellemesi olasılığını belirlemek için, ikincil yani doğrulayıcı testler ise ilk tarama sonuçlarını doğrulamak, kontrol etmek için önemlidir. İnkübasyon süresi ve ortamı, pH, bakteri taraması için kullanılan yöntemler gibi faktörler elde edilen sonuçlara etki yeteneğine sahiptir. Bu yüzden en iyi sonuç için dikkatli seçimler yapılması önerilmektedir.

Bu çalışma sonucunda LAB'nde antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin ön tarama ve doğrulama testleri olarak gruplandırılmasının ve bu testlerin sonuçlarının moleküler yöntemlerle teyit edilmesinin büyük önem taşıdığı anlaşılmıştır. Çalışmamızın gıdalarda bakteriyosin kullanımına bağlı olarak biyokorumayı amaçlayan ileri çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int Journal Food Microbiology**, 28: 169-85.
- Algeria, A., Delgado, S., Roces, C., Lopez, B., Mayo, B. 2010. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, stater- free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, 143: 61-66.
- Anas, M., Eddine, H. J., Mebrouk, K. 2008. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, 3 (2): 39-49.
- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. H., Nissen-Meyer, J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C 11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin E/F and J/K, and the induction factor plantaricin A. **Applied Environmental Microbiology**, 64: 2269-2272.
- Awaisheh, S.S., Ibrahim S. A. 2009. Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against different pathogens found in vacuum-packaged meat products. **Foodborne Pathogens and Disease**, 6: 1125-1132.
- Başbülbul Özdemir, G., Oryaşın, E., Bıyık, H. H., Özteber, M., Bozdoğan, B. 2011. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian J Microbiol*, 51(2): 182-187.
- Bauer, R., Dicks, L. M. T. 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. **Int J Food Microbiol**, 101: 201-216.
- Beijerinck, M.W. 1901. Sur les ferments lactiques de l'industrie. **Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles**, 6, 212–243.

- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, 126: 278-285.
- Bizani, D., Morrissy, J. A. C., Dominguez, A. P. M., Brandelli, A. 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. **Int J Food Microbiol**, 121: 229-233.
- Bogovic Matijasic B., Koman Rajsčp, M., Perko, B., Rogelj, I. 2007. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. **International Dairy Journal**, 17: 157-166.
- Botina, S. G., Tsygankov, YU. D., Sukhodolets, V. V. 2006. Identification of Industrial Strains of Lactic Acid Bacteria by Methods of Molecular Genetic Typing. **Russian Journal of Genetics**, 42: 1367-1379.
- Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.L., Delboni, R. R., Oliveira, J. 2004. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Braz. J. Microbiol**, 35: 137-144.
- Cai, Y., Yang, J., Pang, H., Kitahara, M. 2011. *Lactococcus fujiensis* sp nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. **Int J Syst Evol Microbiol**, 61: 1590-1594.
- Calderón-Miranda, M. L., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. 1999. Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. **Int Journal of Food Microbiology**, 51: 7-17.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 50: 131-149.
- Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, 28 (4): 281-370.
- Chen, H., Hoover, D. G. 2003. Bacteriosins and their food applications. **Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety**, 2: 82-100.

- Chen, H. and Hoover, D. G. 2003. Bacteriosins and their food applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*.
- Chenoll, E., Macian, M.C., Aznar, R. 2006. *Lactobacillus rennisp.* nov., isolated from rennin and associated with cheese spoilage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56: 449–452.
- Cho, S. L., Nam, S. W., Yoon, J. H., Lee, J. S., Sukhoom, A., Kim, W. 2008. *Lactococcus chungangensis* sp. nov., lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. **Int J Syst Evol Microbiol**, 58: 1844–1849.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J.P. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. **Lait**, 83: 269–306.
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Kandler, O. 1983. *Streptococcus garviea* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. **J. Gen. Microbiol**, 129:3427–3431.
- Collins, M.D., Rodrigues, U.M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of the 16S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, 77: 5–12.
- Collins, M.D.F.E.L.J., Akervall, E., Sjöden, B., Lawson, P.A. 1997. Phenotypic and phylogenetic characterization of some Globicatella-like organisms from human sources: description of *Facklamia hominis* gen. nov., sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 47:880–882.
- Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G. 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. **J Appl Microbiol**, 90: 414–420.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. 2005. Bacterial antibiotics: strategies to improve their therapeutic potential. **Curr. Prot. Pept. Sci.**, 6(1): 61-75.

- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, 3: 777-788.
- Çelik, Ü., Alhan, E. 2008. Pediatrik enfeksiyonlarda zorlu patojen: Enterokoklar. **J Pediatr Inf**, 3: 58-66.
- Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., Cocoli, L., 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **Food Science of Technology**, 43: 1151-1159.
- De Jong, A., Van Hijum, S. A. F. T., Bijlsma, J. J. E., Kok, J., Kuipers, O. P. 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. **Nucleic Acids Research**, 34: 273-279.
- De Vuyst, L., Foulquie Moreno, M. R., Revets, H. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **Int J Food Microbiol**, 84: 299-318.
- De Vuyst, L., Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 13: 194-199.
- De Vuyst, L., Vandamme, E. J., 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology genetics and applications. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom.
- De Martinis, E.C.P., Alves, V.F., Franco, B.D.G.M. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat. **Food Reviews International**, 18 (2): 191-208.
- Delgado, S., Mayo, B. 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, 90: 309-319.

- Deraz, S. F., Karlsson, E. N., Hedström, M., Andersson M. M., Mattiasson, B. 2005. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Biotechnology**, 117: 343-354.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, 14: 278-285.
- Elliott, J. A., Collins, M. D., Pigott, N. E., Facklam, R. R. 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. **J. Clin. Microbiol**, 29: 2731–2734.
- Elomani, F., Revol-Junelles, A. M., Assobhei, O., Millie`re J. B. 2002. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* strains isolated from Rai`b, a Moroccan traditional fermented milk. **Current Microbiology**, 44: 10-17.
- Esten, W. M. 1909. *Bacterium lactis acidii* and its sources. **Conn. Agric. Exp. Sta. Res. Bull**, 58:27.
- Felis, G. E., Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Curr. Issues Intestinal Microbiol**, 8: 44-61.
- Ferna´ndez, E., Alegría, A., Delgado, S., Martín, M. 2011. Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* Genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, 77: 5324-5335.
- Fang, T. J., Tsai, H. C. 2003. Growth patterns of *Escherichia coli* O 157:H 7 in ground beef treated with nisin, chelators, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. **Food Microbiology**, 20: 243-253.
- Franz, C. M. A. P., Du Toit, M., Von Holy, A., Schillinger, U., Holzapfel, W. H. 1997. Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. **Journal Basic Microbiol**, 37 (3): 187-196.

- Foulquie Moreno M. R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., De vuyst L. 2003. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. **Journal of Applied Microbiology**, 94: 214-229.
- Foulquie Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou, E., de Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, 106: 1-24.
- Fuller R. and Gibson G. 1997. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. **Scan J Gastro**, 32: 28–31.
- Garneau, S., Martin, N. I., Vederas, J. C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, 84: 577-592.
- Giraffa, G. 1995. Enterococcal bacteriocins: Their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. **Food Microbiology**, 12: 291-299.
- Ghraiiri, T., Manai, M., Berjeaud, J. M., Frere, J. 2004. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. **Journal of Applied Microbiology**, 97(3) : 621-628.
- Hammes, W. P., Vogel, R. F. 1995. The genus *Lactobacillus*. The Lactic Acid Bacteria (Wood B. J. B., Holzapfel, W. H. Eds.) Springer US, pp. 19-54, US.
- Holler, B. J., Steele, J. L. 1995. Characterization of Lactococci Other than *Lactococcus lactis* for Possible Use as Starter Cultures. **Int. Dairy Journal**, 5: 275-289.
- Holzapfel, W. H., Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, 24: 343-362.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, 59(2): 171-200.

- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. H., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Pærrengaard, A., Sandström, S., Tvede, M., Jakobsen, M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by invitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Appl Environ Microbiol**, 65: 4949–4956.
- Kandler, O., Weiss, N., 1986. Genus *Lactobacillus*. (Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. Eds.), *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore M.D. pp. 1209–1234. USA.
- Kemperman, R., Jonker, M., Nauta, A., Kuipers, O. P., Kok J. 2003. Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(10): 5839-5848.
- Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M., Mizumachi, K. 2010. Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. **Int J Food Microbiol**, 143: 226–229.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 12: 39-85.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 41: 103-125.
- Klijn, N., Weerkamp, A. H., De Vos Nizo, W. M. 1995. Detection and Characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 788-792.
- Knoll, C., Divol, B., Du Toit, M. 2008. Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. **Food Microbiology**, 25: 983-991.

- Kumar, C. G., Anand, S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, 42: 9–2.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö. 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. **YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 16 (1): 77-83.
- Lawson, P.A., Papademas, P., Wachter, C., Falsen, E., Robinson, R., Collins, M.D. 2001. *Lactobacillus cypricasei* sp. nov., isolated from Halloumi cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51: 45–49.
- Lee, C., Park, H., Lee, D. 2004. Influence of antimicrobial packaging on kinetics of spoilage microbial growth in milk and orange juice. **Journal of Food Engineering**, 65: 527-531.
- Long, C., Phillips, C. A. 2003. The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 on chicken. **Food Microbiology**, 20: 495-502.
- Macwana, S. J., Muriana P.M. 2012. A 'bacteriocin PCR array' for identification of bacteriocin-related structural genes in lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 88: 197-204.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. 2006. Mikroorganizmaların Biyolojisi (Prof. Dr. Çökmüş, C. Ed.), Ankara.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchineb, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. H., Díaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianovl, V., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **Pnas**, 103: 15611-15616.

- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, 16: 189-199.
- Masschalck, B., Houdt, R. V., Michiels, C. W. 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. **Int Journal Food Microbiol**, 64: 325-32.
- Migaw, S., Ghrairi, T., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Berjeaud, J. M., Chobert, J. M., Hani, K., Haertle, T. 2014. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. **World J Microbiol Biotechnol**, 30: 1207-1217.
- Miller, N., Wetterstrom, W. 2000. in *The Cambridge World History of Food*. (Kiple K, Ornelas K Eds.) Cambridge Univ Press, Cambridge, vol. 2. pp1123–1139. UK.
- Mohankumar, A., Murugalantha, N. 2011. Characterization and Antibacterial Activity of Producing *Lactobacillus* Isolated from Raw Cattle Milk Sample. **International Journal of Biology**, 3 (3).
- Nawaz, S. K., Riaz, S., Riaz S., Hasnain, S. 2009. Screening for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteriocin producing bacteria. **African Journal of Biotechnology**, 8 (3): 365-368.
- Nes, F. I., Diep, D. B., Holo, H. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology*, 189 (4): 1189-1198.
- Nes, F. I., Eijsink, V. G. H. 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-Sensing mechanisms. In: *Cell-cell signaling in bacteria* (Dunny, G. M. and Winans, S. C., Eds.), ASM Press, p. 175–192. Washington, DC.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Suzuki, I. 1998. Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 48: 163-166.

- Odamaki, T., Yonezawa, S., Kitahara, M., Sugahara, Y., Xiao, J. Z., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Ohkuma, M. 2011. Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species. **Letters in Applied Microbiology**, 52: 491-496.
- Odeyemi, O. A., Ahmad, A., Usub, G. 2012. In-vitro antimicrobial activity of *Aeromonas* spp. isolated from estuary using different screening protocols. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 3(2): 428-433.
- Oliveira, B. P., Afonso De L., Glória M. A. 2008. Screening of lactic acid bacteria from packaged beef for antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39: 368-374.
- Orla-Jensen, S. 1919. The Lactic Acid Bacteria. (S. Orla-Jensen Ed.), pp. 1-196. S. Copenhagen: A. F. Hest and Son.
- Özdemir, H., Küplülü, Ö., Çelik, T. H. 2002. Türk Fermente Sucuğundan Elde Edilen Laktobasillerin Antibakteriyel Ekilerinin Saptanması. **Gıda**, 27 (6): 539-544.
- Özteber, M. 2012. Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., Soccol, C. R. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 50: 521-542.
- Parente, E., and T. M. Cogan. 2004. Starter cultures: general aspects, (In P. O. Fox Ed.) p.123-147., *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 3rd ed. Elsevier, Oxford, United Kingdom.

- Pawar, D. D., Malik, S. V. S., Bhilegaonkar, K. N., Barbuddhe, S. B. 2000. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. **Meat Science**, 56: 215-219.
- Phillips, C. A., Duggan, J. 2001. The effect of EDTA and trisodium phosphate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. **Food Microbiology**, 18: 547-554.
- Ponce, A. G., Moreira, M. R., Del Velle, C. E., Roura, S. I. 2008. Preliminary Characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from leafy vegetables. **LWT-Food Science and Technology**, 41 (3): 432-441.
- Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., Schleifer, K. H. 1994. Taxonomy of Lactic Acid Bacteria. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (De Vuyst L., Vandamme E. J. Eds.) Springer US, pp. 14-67, US.
- Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A. 2012. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish. **Food Control**, 23: 547-551.
- Pe´rez, T., Balca´zar, J. L., Peix, A., Valverde, A., Vela´zquez, E., De Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I. 2011. *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64: 1894-1898.
- Riley, M. A., Wertz J. E. 2002. BACTERIOCINS: Evolution, Ecology and Application. **Annual Reviews in Microbiology**, 56: 117-137.
- Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. 2007. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. **Food Microbiology**, 24: 482-491.

- Roriguez, E., Gonzales, B., Gaya, P., Nurinez, M., Medina., M. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, 10: 7-15.
- Rubio, R., Jofre, A., Martin, B., Aymerich, T., Garriga, M. 2014. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausage. **Food Microbiology**, 38: 303-3011.
- Ruoff, K. L. , De La Maza, L., Murragh, M. J., Spargo, J. D., Ferraro M. J. 1990. Species Identities of Enterococci Isolated from Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, 28: 435-437.
- Salama, M. S., Sandine, W. E., Giovannoni, S. J. 1993. Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* from nature by colony hybridization with rRNA probes. **Appl. Environ. Microbiol**, 59: 3941–3945.
- Samaržija, D., Sikora, S., Redžepović, S., Antunac, N., Havranek, J. 2002. Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains isolated from artisanal cultures. **Microbiological Research**, 157: 13-17.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N., Traore A. S. 2004. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. **Pakistan Journal of Nutrition**, 3 (3): 174-179.
- Sawitzki, M. C., Fiorentini, Â. M., Brod, F.C. A., Tagliari, C., Bertol, T. M., Arisi, A.C. M., Sant'Anna, E. S. 2007. Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausages. **Braz. J. Microbiol**, 38: 547-552.
- Schillinger U., Lüke, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, 55(8): 1901-1906.

- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, K. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 34: 31-34.
- Schleifer, K. H., Kilpper-Bälz, R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci. **Syst. Appl. Microbiol**, 10: 1-19.
- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins M. D., Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. **Syst. Appl. Microbiol**, 6: 183–195.
- Schultz, J. E., Breznak, J. A. 1978. Heterotrophic bacteria present in the hindguts of wood-eating termites. [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. **Apple Environ. Microbiol**, 35: 930–936.
- Sieladie, D. V., Zambou. N. F., Kaktcham, P. M., Cresci, A., Fonteh, F. 2011. Probiotic properties of lactobacilli strain isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, 9: 12-28.
- Singh, B., Falahee, M. B., Adams, M. R. 2001. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. **Food Microbiology**, 18: 133-139.
- Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, 36: 1-29.
- Strompfova, V., Laukova, A., Simonova, M., Marcinacova, M. 2008. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. **Veterinary Microbiology**, 132: 293-301.
- Tanskanen, E. I., Tulloch, D. L., Hillier, A. J., Davidson, B. E. 1990. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Sma*I Digests of Lactococcal Genomic DNA, a Novel Method of Strain Identification. **Applied and Environmental Microbiology**, 56: 3105-3111.

- Teixeira, L. M., Merquior, V. L., Vianni, M.C., Carvalho, M.G., Fracalanza, S.E., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Facklam, R. R. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffaloes with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 46: 664–668.
- Thomas, L. V., Delves, B. 2005. Nisin. In: Antimicrobials in food. (Davidson, P. M., Sofos, J. N., Branen, A. L., Eds.). Taylor & Francis Group, pp. 237–275, New York.
- Urbach, E., Daniels, S., Salama, M. S., Sandine, W. E., Giovannoni, S. J. 1997. The 16S rDNA phylogeny for environmental isolates of *Lactococcus lactis* consistent with rRNA genotypes but not with phenotypes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63: 694–702.
- Williams, A. M., Fryer, J. L., Collins, M. D. 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov., a new *Lactococcus* species from salmonid fish. **FEMS Microbiol. Lett.**, 68: 109–114.
- Wood, B. J. B., Holzappel, W. H. 1995. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: Blackie Academic and Professional, pp. 2–398, London.
- Yonezawa, S., Xiao, J. Z., Odamaki, T., Ishida, T., Miyaji, K., Yamada, A., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K. 2010. Improved growth of bifidobacteria by co-cultivation with *Lactococcus lactis* sp. *lactis*. **J Dairy Sci.**, 93: 1815–1823.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Esra DEMİR
Doğum Yeri ve Tarihi : Salihli / MANİSA – 30.05.1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-
Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen
Bilimleri Entitüsü, Biyoloji Bölümü
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

Uğur ARSLAN, Esra DEMİR, Erman ORYAŞIN, Hatice TÜRK DAĞI, İnci TUNCER, Duygu FINDIK, Bülent BOZDOĞAN. 2013. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Vankomisine Dirençli *Enterococcus faecium* Suşlarının MLST Tipleri. **Mikrobiol Bul**, 47 (3): 432-441.

b) Bildiriler

-Uluslararası

Arslan U., Demir E., Oryasin E., Tuncer I., Findik D., Bozdogan B. 2011. MLST-types of vankomisin Resistant *Enterococcus faecium* isolated from blood samples in a university hospital in Konya, TURKEY. **21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, (07-10 Mayıs 2011), Milan, Italy.

Demiripek, U., Eskin, Z., Demir, E., Oryasin, E., Ozyurt, M., Haznedaroglu, T., Bozdogan, B. 2010. Identification and antimicrobial susceptibilities of beta hemolytic Streptococci isolates from patient in a tertiary hospital. **110th ASM General Meeting**, (23-27 Mayıs 2010), San Diego, ABD.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : esrademir1986@hotmail.com
esrademir29@gmail.com

Tarih : .../.../20..