



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİĞ SÜT KAYNAKLI LAKTİK ASİT  
BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİN  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**SEVCİHAN İRAK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ 2017**

**T.C.**  
**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİĞ SÜT KAYNAKLI LAKTİK ASİT  
BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİN  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**SEVCIHAN İRAK**

**Bu tez,**  
**Biyoloji Anabilim Dalında**  
**YÜKSEK LİSANS**  
**derecesi için hazırlanmıştır.**

**KAHRAMANMARAŞ 2017**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Sevcihan İRAK tarafından hazırlanan “Çiğ Süt Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 10/07/2017 tarihinde oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. E. Banu BÜYÜKÜNAL (DANIŞMAN) .....  
Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. Canan CAN (ÜYE) .....  
Biyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep Üniversitesi

Yrd. Doç .Dr. Yaşar ALPTEKİN (ÜYE) .....  
Bitki Koruma Anabilim Dalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. MUSTAFA ŞEKKELİ .....  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Sevcihan İRAK



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2016/3-20 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

# ÇİĞ SÜT KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

SEVÇİHAN İRAK

## ÖZET

Laktik Asit Bakterileri (LAB) çiğ süt doğal mikroflorasının baskın üyelerindedir. Besin kaynaklı çoğu LAB gibi sütte bulunanlar da bakteriyosin adı verilen protein yapısındaki antimikrobiyal metabolitleri oluşturma yeteneğine sahiptir. Mikroorganizmalarda var olan zengin genetik çeşitlilik nedeniyle doğada farklı özellikteki bakteriyosinlerin tespit edilmesi ve bunların tanımlanmaları oldukça önemlidir. Bu nedenle, bu çalışmada Kahramanmaraş ve civarındaki illerden (Gaziantep, Kayseri, Osmaniye, Urfa) toplanan çiğ süt örneklerindeki LAB'nin izolasyonunu takiben bakteriyosin üretenlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzolatlarının bakteriyosin aktivitesi farklı test bakterileri (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Shigella* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) üzerinde agar spot ve well-difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitelerinin belirlenmesi esnasında enterocin üreten *Enterococcus faecium* DSM 20477 suşu kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca bakteriyosin aktivitesine sahip izolatlar arasındaki genetik ilişki Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda süt örnekleri arasında en düşük toplam LAB  $3,0 \log_{10}$ CFU/g ile Kayseri 4, en yüksek LAB sayısı ise  $6,82 \log_{10}$ CFU/g ile Osmaniye 2 örneğinde tespit edilmiştir. Agar spot metodu ile bakteriyosin aktivitesi test edilen 42 izolatın 11 tanesinin (%26,2) iki farklı test bakterisine (*Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus* spp.), 2 tanesinin ise tek bir test bakterisine (*Listeria monocytogenes* ya da *Enterococcus* spp.) karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Tüm bakteriyosin izolatların ERIC-PCR analizi sonucunda üç farklı profil saptanmış ve bu profillerden bir tanesinin dört farklı şehre ait 9 izolatta ortak olduğu görülmüştür. Ayrıca, farklı ERIC-PCR profiline sahip izolatlar 16S rRNA gen dizilimi analizine dayalı olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak *Enterococcus faecalis* en baskın tür olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** LAB, milk, ERIC-PCR

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı, Haziran/2017

Danışman: Doç. Dr. E. Banu BÜYÜKÜNAL

Sayfa Sayısı: 48

# DETECTION OF BACTERIOCIN ACTIVITIES OF LACTIC ACID BACTERIA WITH RAW MILK ORIGIN

(M.Sc. THESIS)

SEVÇİHAN İRAK

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are the dominant members of the natural milk microflora of raw milk. Some LAB in food origin have the ability to produce products called as bacteriocin. Bacteriocins are the antimicrobial metabolites in protein structure. The discovery and identification of new bacteriocins is of great importance due to rich genetic diversity existing among microorganisms.

For this reason, the aims of this study were to isolate LAB from raw milk samples of Kahramanmaraş and nearby cities (Gaziantep, Kayseri, Osmaniye, Urfa) and to determine as well as to identify bacteriocin producers among them.

Bacteriocin activities of isolates were determined using agar spot and well diffusion methods against different test bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Shigella* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644). During bacteriocin activity detection, enterocin-producing *Enterococcus faecium* DSM 20477 strain was used as a control. The genetic relationship between bacterial isolates with bacteriocin activities was also examined by ERIC-PCR. At the end of the study, the lowest and highest LAB counts were detected for Kayseri 4 and Osmaniye 2 samples with 3.0 log<sub>10</sub>CFU/g and 6.82 log<sub>10</sub>CFU/g respectively. Based on agar spot method, 11 of the 42 isolates were found to have bacteriocin activity against two different test bacteria (*Listeria monocytogenes* and *Enterococcus* spp.) and two of them were found to be bacteriocinogenic against only one of the test bacteria (either *Listeria monocytogenes* or *Enterococcus* spp.).

As a result of ERIC-PCR analysis of all bacteriocinogenic isolates, three different profiles were detected and one of this profile was common in 9 strains isolated from four different cities. Furthermore, isolates possessing different ERIC-PCR profiles was identified based on 16S rRNA gene sequence analysis. As a result, *Enterococcus faecalis* was found as predominated species.

**Key Words:** LAB, milk, ERIC-PCR

Kahramanmaraş Sutcu Imam University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology, June/2017

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. E. Banu BÜYÜKÜNAL

Number of Pages: 48

## TEŞEKKÜR

Bu alanda kendisiyle aklıŐma fırsatını bana tanıyan, Yüksek lisans ders dönemi ve tez çalıŐması esnasında desteğini ve yardımını esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleriyle daima bana yol gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. E. Banu BÜYÜKÜNAL'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yardım, destek ve yönlendirmede danışmanlığını gördüğüm sevgili eşim Necati İRAK'a sonsuz teşekkürler ve minnetlerimi sunarım.

Bugüne kadar her zaman yanımda olan bana güvenen, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kıymetli annem Neriman TAŞ ve değerli babam Tevfik TAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Sevcihan İRAK

Kahramanmaraş, Haziran 2017

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VII
KISALTMALAR DİZİNİ .....	VII
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	3
2.1. Çiğ Süt .....	3
2.2. Laktik Asit Bakterileri (LAB) .....	4
2.3. Süt Teknolojisi Açısından Önemli Bazı LAB Cinsleri .....	7
2.3.1. Streptococcus .....	8
2.3.2. Lactobacillus .....	9
2.3.3. Enterococcus .....	10
2.3.4. <i>Lactococcus</i> .....	11
2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Gıdalarda Kullanımı .....	12
2.5. Bakteriyosinler .....	13
2.5.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması .....	14
2.5.2. Bakteriyosinlerin sentezlenmeleri ve etki mekanizmaları .....	15
2.5.3. Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımı .....	17
2.5.4. Bakteriyosinlerin diğer koruyucu maddeler ve prosesler ile birlikte kullanımı .....	18
2.5.5. Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosin kullanımı .....	19
3. MATERYAL VE METOD .....	21
3.1. Materyal .....	21
3.1.1. Kullanılan çözeltiler ve besiyerleri .....	21
3.1.1.1. <i>MRS broth</i> ( <i>Lactobacillus</i> Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE) .....	21
3.1.1.2. Brain Hearth Infusion (BHI) broth .....	21
3.1.1.3. TE çözeltileri .....	22

3.2. Metot.....	22
3.2.1. Çiğ süt örneklerinden LAB sayılarının belirlenmesi.....	22
3.2.2. LAB izolasyonu.....	22
3.2.3. Hücre içermeyen süpernatant (CFS) örneklerinin elde edilmesi .....	22
3.2.4. Well difüzyon testi .....	23
3.2.5. Agar spot testi.....	23
3.2.6. Hücresel DNA ekstraksiyonu.....	23
3.2.7. 16S rRNA geni PCR amplifikasyonları .....	23
3.2.8. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR analizi .....	23
3.2.9. PCR ürünlerinin elektroforez ile ayrımı.....	24
3.2.10. DNA diziliminin belirlenmesi .....	24
4. BULGULAR VE TARIŞMA .....	25
4.1. LAB İzolasyonu ve Bakteriyosin Aktivitesinin Tespit Edilmesi.....	25
4.2. Bakteriyosinjenik İzolatlar Arasında Genetik İlişkinin ERIC-PCR ile Belirlenmesi .....	27
4.3. 16S rRNA Gen Dizilimine Dayalı Moleküler İdentifikasyon .....	28
SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	31
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	42

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Farklı tipteki çiğ süt örneklerinde bakteriyal dağılım. CD: Kültüre bağlı yaklaşım NGS: Yeni Nesil Dizileme sonuçlarını göstermektedir (Quigley ve ark., 2013).....	4
Şekil 2.2. Laktik Asit Bakterileri tarafından heksozların metabolize edilmesinin şematize gösterimi (Kandler, 1983).....	7
Şekil 2.3. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması .....	14
Şekil 4.1. Bakteriyosin aktivitesinin well difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait bazı petri görünümleri .....	26
Şekil 4.2. Bakteriyosin aktivitesinin agar spot yöntemi ile belirlenmesine ait bazı petri görünümleri .....	27
Şekil 4.3. Bakteriyosinjenik izolatların ERIC-PCR profili .....	28

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması (Orla-Jensen, 1919) .....	6
Çizelge 4.1. Süt örneklerindeki LAB sayıları ve agar spot yöntemi ile bakteriyosin aktivitesine sahip olan izolatlar .....	25
Çizelge 4.2. 16S rRNA gen dizilimi analizi ile izolatların tiplendirilmesi .....	29



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BHI:	Brain Heart Infusion
CD:	Kültüre bağlı yaklaşım
CFU:	Colony Forming Unit
CFS:	Hücre İçermeyen Süpernatantlar
dNTPs:	deoksinükleotid trifosfat
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate
EMP:	Embden-Meyerhof-Parnas
ERIC:	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
g:	gram
L:	Litre
Mb	Mega Baz
Mg	Magnezyum
mM:	Milimolar
MRS:	Lactobacillus Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE
NaOH:	Sodyum Hidroksit
ng:	Nanogram
NGS:	Yeni Nesil Dizileme
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pmol:	Pikomol
Trizma base:	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

## 1. GİRİŞ

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen protein yapısında bileşikler olup, özellikle üretici türle yakınlığı olan mikroorganizmalara karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etkiye sahiplerdir. Çoğunlukla gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin gram-negatif bakteriler tarafından üretilenleri de bulunmaktadır. Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler genellikle logaritmik fazdan durağan faza geçiş sırasında sentezlenmektedir (Hammami ve ark., 2007).

Bakteriyosin üreten mikroorganizmalar arasında LAB çok önemli bir grubu oluşturmaktadır. LAB bakteriyosinler dışında organik asit, diacetyl, hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal karakterdeki diğer maddeleri üretebilen mikroorganizmalardır (Klaenhammer, 1993). LAB grubu mikroorganizmaların en önemli özelliklerinden birisi de temelde suda çözünebilir karbonhidratları fermente edebilmeleridir. Sahip oldukları çok sayıda özellikleri ile LAB endüstriyel öneme sahip mikroorganizmalardır.

LAB bakteriyosinleri moleküler ağırlıkları, ısı duyarlılıkları, enzimatik duyarlılıkları, translasyon sonrası modifiye edilen amino asitlerin varlığı gibi çeşitli özellikleri göz önünde bulundurularak sınıflandırmıştır (Klaenhammer, 1988).

Çiğ süt LAB yönünden zengin bir ortamdır. Bu nedenle, çiğ sütte bakteriyosin aktivitesine sahip LAB saptanması oldukça önemlidir. Ülkemiz dahil çeşitli ülkelerde çeşitli süt ürünlerinden (peynir gibi) izole edilen ve bakteriyosin üreten LAB konusunda çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Gurses ve Erdogan, 2006; Isleroglu ve ark, 2012; Kırmacı ve ark., 2016). Ancak, çiğ süt kaynaklı LAB ve bakteriyosinleri hakkında ülkemizde yapılan çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Akçelik ve ark, 2006; Altuntaş ve ark., 2010). Bununla birlikte, literatürde süt kaynaklı LAB izolatları arasında bakteriyosin üretenlerin belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma (Rodriguez ve ark., 2000; Ortolani ve ark., 2010; Bali ve ark., 2011; Moraes ve ark., 2012; Perin ve ark., 2014; Silvetti ve ark., 2014) bulunmaktadır.

LAB'de var olan tür çeşitliliği ve tür içi genetik çeşitlilik göz önüne alındığında ülkemiz orijinli çiğ süt örneklerinde mevcut bakteriyosinojenik LAB izolatların tanımlanmaları büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, çiğ süt kaynaklı izolatların tür düzeyinde tanımlanmalarıyla sahip oldukları bakteriyosinlerin moleküler ve biyokimyasal olarak karakterize edilmesi, bakteriyosinlerden biyoteknolojik açıdan hangi alanlarda

yararlanılabileceği hakkında bilgi sunması beklenmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda ülkemizdeki farklı illere ait süt örneklerinde var olan LAB'nin sahip olduğu bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi, bakteriyosinjenik izolatlar arasındaki genetik ilişkinin ERIC-PCR ile incelenmesi ve farklı profile sahip bakteriyosinjenik izolatların 16S rRNA gen dizilimine bağlı olarak moleküler olarak tanımlanmaları amaçlanmıştır.



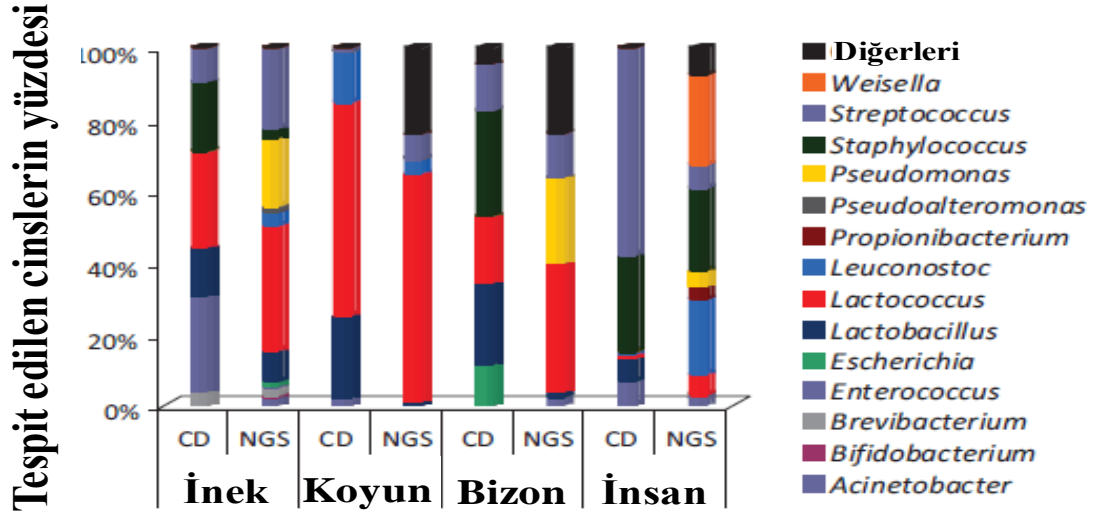
## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2. 1. Çiğ Süt

Çiğ süt; hayvanların memesinden uygun aralıklarla tam olarak sağılan, soğutulan içinden herhangi bir bileşeni uzaklaştırılmamış; içerisine de herhangi bir madde ilave edilmemiş işlenmek üzere işletmelere kabul edilen herhangi bir işleme uğramamış olan süt olarak tanımlanmaktadır (Metin, 1998).

Çiğ süt gıda teknolojisi için oldukça önemli bir ham maddedir. Çiğ sütün kalite standardını belirleyen en temel faktör ise işlenmeden önceki bakteri yüküdür (Alişarlı ve ark., 2003). Bunun dışında renk, koku, fiziksel durum, asitlik durumu gibi kriterler çiğ sütün kalitesini belirtmektedir. Çiğ sütteki mikroorganizmalar çeşitli kaynaklardan gelebilir (sağım ekipmanı, hava, su v.s) ve farklı görevleri üstlenir. Bunlar; süt fermentasyonu ile ilgili olanlar (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* ve fungus popülasyonları), bozulmaya sebep olanlar (*Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* ve diğer spor oluşturan veya thermoduric mikroorganizmalar), sağlığı destekleyenler (lactobacilli ve bifidobacteria) ve hastalık etmeni olanlar (*Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* ve mikotoksin üreten funguslar) olarak gruplandırılır (Coorevits ve ark. 2008; Quigley ve ark. 2013).

İnek sütünün bakteri kompozisyonu önceleri çoğunlukla kültüre bağlı yöntemlerle incelenmiştir. Son yıllarda gelişen yeni nesil DNA sekanslama teknolojileri ile çiğ süt mikrobiyomu hakkında daha çok bilgi edinilmiştir. Bu çalışmalar bakteri çeşitliliğinin bildirilen değerlerden çok fazla olduğunu göstermektedir. Çiğ süt ve Danimarka çiğ süt peynirlerinde bakteriyel komünitenin incelendiği bir çalışmada 16S rDNA ve cDNA'nın V3 ve V4 bölgelerine ait ampikonlar pyrosequencing ile incelenmiştir. Çalışma sonucu çiğ inek sütünde tespit edilen 256 bakteri türü içinden, %43.7 ve %19 okuma oranları ile en yaygın olarak bulunan türlerin *Streptococcus thermophilus* ve *Lactococcus lactis* olduğunu göstermektedir (Masoud ve ark. 2012). Tipik olarak inek sütü LAB popülasyonu *Lactococcus*, *Streptococcus* *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* cinslerini içerir. Ancak önemli miktarda farklı türde mikroorganizmaların var olduğu da tespit edilmiştir (Raats ve ark. 2011). Şekil 2.1'de farklı hayvan kaynaklı çiğ sütlerde kültüre bağlı olan ve olmayan yaklaşımlar ile elde edilen bakteri dağılımı gösterilmektedir (Quigley ve ark. 2013).



Şekil 2.1. Farklı tipteki çiğ süt örneklerinde bakteriyal dağılım. CD: Kültüre bağlı yaklaşım NGS: Yeni Nesil Dizileme sonuçlarını göstermektedir (Quigley ve ark., 2013).

Temel süt bileşenlerini su, yağ, protein, laktoz ve mineraller (kalsiyum, demir, magnezyum, fosfor) meydana getirmektedir. Çiğ sütte ayrıca vitaminlerden Riboflavin ve Vitamin B12 oldukça yüksek düzeyde bulunmaktadır. Süt kompozisyonu çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Örneğin; beslenme yağ ve süt proteinleri konsantrasyonları üzerinde etkilidir. Bunlardan yağ kompozisyonu diyetle ilgili değişimlerden en fazla etkileneni olup, %3 kadar değişim göstermektedir. Süt kompozisyonu ve bileşenleri ayrıca genetik, çevre, süt üretim düzeyi, laktasyon evreleri, hastalık (mastitis), mevsim, inek yaşı gibi faktörlerin etkisi altındadır (Looper, 2014). İnek ırklarına göre değişmekle birlikte inek sütü %3.7-4.9 yağ, %3.1-3.8 protein ve %4.6-4.8 laktoz içermektedir. Süt protein ve yağı süt işleyen sanayi açısından büyük öneme sahiptir. Toplam süt kuru maddesinin %25'i proteinden oluşur. Sütün protein fraksiyonu içinde kazein özellikle peynir yapımı açısından önemlidir. Sütün enerji değeri bileşimine göre farklılık gösterir. 1 litre % 3 yağlı içme sütünün enerji içeriği 615 kcal'dir (Gürsoy, 2014).

## 2.2. Laktik Asit Bakterileri (LAB)

Lactobacillaceae familyası içinde bulunan LAB, çok fazla sayıda cins ve türe sahip basil, kok ve kokobasil şekilde, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, solunum zinciri

bileşenlerinden sitokromlar ile porfirine sahip olmayan, katalaz üretmeyen, mikroaerofilik veya anaerobiktir. Ayrıca aside oldukça dayanıklıdırlar ve güçlü fermentatif özelliğe sahiplerdir. Nitratları indirgemeyen, büyüme ve gelişimleri için glikoz ve amonyuma ilaveten bazı vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duyan mikroorganizmalardır (Axelsson, 1998). Bu genel özelliklerden istisnai olarak katalaz ve sitoktom pozitif olanları da bulunmaktadır. Ayrıca laktozu laktik aside fermente etmeleri ile karakterize edilirler. Morfolojik açıdan çok değişken özellik göstermelerine rağmen (kısa veya uzun, çomak veya kok şekilli), fizyolojik açıdan oldukça benzer özelliktedir (Shape ve ark., 1966).

LAB genellikle süt, et, içecekler, sebzeler gibi besin bakımından zengin habitatlarda bulunmaktadır. Bununla birlikte toprakta, göllerde ve insanlar ile hayvanların sindirim sisteminde bulunabilirler (Tserovska ve ark., 2002).

LAB üzerindeki ilk taksonomik ve bağırsak ekolojisi çalışmaları, 1900 yılında Moro ve 1901 yıllarında ise Beijerinck ve Cahn) tarafından gerçekleştirilmiştir (Holzapfel ve ark., 2001).

Orla Jensen tarafından 1919'da morfolojik ve fenotipik özellikler dikkate alınarak yapılan LAB sınıflandırmasına göre *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus* ve *Microbacterium* gruplarına ayrılmıştır (Orla Jensen, 1919). Bu gruplara dahil olan cinslerin şekil, katalaz özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Bu grup bakterilerin fenotipik sınıflandırılmasında çoğunlukla morfolojik özellikler, glikoz fermentasyonunda takip edilen yol, ekolojik koşullar, optimum üreme sıcaklıkları ve farklı karbonhidratları fermente edebilme gibi özellikler dikkate alınmaktadır (Holzapfel ve ark., 2001).

Günümüzde LAB'nin dört cinsten (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus*) oluşan bir temel yapıya sahip olduğu ortak görüşü kabul edilmektedir. Ancak son taksonomik revizyonlar ile yeni tür ve gruplar (*Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*) bu gruba dahil edilmiştir (Jin et al., 2009). *Lactobacilli*, *Carnobacteria* ve bazı *Weissella* üyeleri çomak şekilli iken, diğer cins üyeleri kok şekle sahiptir.

Çizelge 2.1. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması (Orla-Jensen, 1919)

Tür	Şekil	Katalaz	Nitrit indirgemesi	Fermentasyon	Cinsler
Betabacterium	Basil	-		Heterofermentatif	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
Thermobacterium	Basil	-		Homofermentatif	<i>Lactobacillus</i>
Streptobacterium	Basil	-		Homofermentatif	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i> <i>Streptococcus</i>
Streptococcus	Kok	-		Homofermentatif	<i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagooccus</i> <i>Leuconostoc</i>
Betacoccus	Kok			Heterofermentatif	<i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
Microbacterium	Basil	+	+	Homofermentatif	<i>Brochotrix</i>
Tetracoccus	Kok	+a	+	Homofermentatif	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

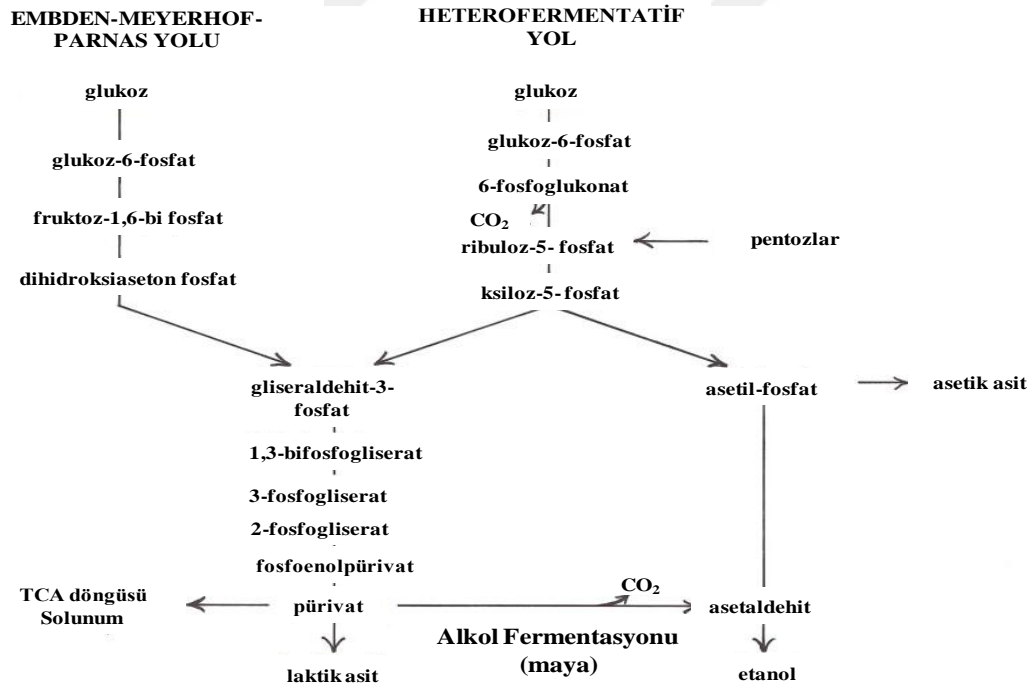
a: *Pediococcus* cinsine dahil türler genelde katalaz negatiftir, fakat bazı türler pseudokatalaz üretiklerinden yanlış pozitif sonuçlara sebep olmaktadır.

LAB, antimikrobiyal aktiviteye sahip organik asitler (asetik, ketoglutarik, melonik asit gibi), hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin ve benzeri bileşikler üretebilmektedir (Kılıç, 2001; Herreros ve ark., 2005). LAB insan konakçısına yararlı etkileri ilk kez Döderlein (Döderlein, 1892) tarafından vajinal bakterilerin şekerlerden ürettiği laktik asitin patojen bakterilerin üremesini engellediğini önermesi ile ortaya çıkmıştır. Sonraları ise fermente süt ürünlerinde sağlığa yararlı bakterilerin bulunduğu bildirilmiştir. Bu bakteriler genel olarak “probiyotik bakteriler” olarak isimlendirilmekte ve sindirim sistemi mikrobiyal dengesini arttırarak konakçıya yarar sağlamaktadır (Fuller, 1989). Sağlık üzerindeki faydalı özellikleri ve fermentasyon yetenekleri nedeniyle endüstriyel açıdan önemli bakterileri meydana getirmektedirler (Şimşek ve Bilgin, 1996).

LAB, glukozu fermente etmeleri sonucunda oluşturdukları ürüne göre homofermentatif ve heterofermentatif LAB olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (Khalid, 2011). Genel olarak, homofermentatif LAB; glukozu Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolu (glikolitik yol) ile fermente ederek pirüvik asitin dönüştürdükten sonra çok yüksek oranlarda (%95-100) laktik asit üretmektedir. Fermentasyon işleminin son safhasında pirüvik asitin laktik asite indirgenmesi için gliseraldehit 3- fosfat'ın dehidrogenasyonundan elde edilen NADH/H<sup>+</sup> kullanılmaktadır. Heterofermentatif laktik asit bakterileri, EMP

yolunun önemli enzimlerinden fruktoz bifosfat aldolaz ve trioz-fosfat izomeraza sahip olmadıklarından EMP yolunu kullanamamaktadırlar. Bu grupta glukozun yıkımı pentozfosfat (PP) yolu ile gerçekleşmekte ve laktik asit, asetik asit, etanol ve karbondioksit üretilmektedir (Romano ve ark., 1970; White ve ark., 2007) (Şekil 2.2).

Zorunlu homofermentif ve heterofermentif olanlar dışında, fakültatif heterofermentif olan Lactobacillerde üçüncü bir grubu oluşturmaktadır. Bu Lactobaciller yukarıda bahsedilen yollardan biri ile sınırlı olmayıp, her ikisini de kullanabilmektedir. Bu şekilde ortamda var olan şekerlere göre homofermentatif ve heterofermentatif yollar arasında zigzaglı şekilde seçim yapabilmektedir. Genel olarak hekzozlar homofermentatif yol ve pentozlar heterofermentatif yol ile fermente edilmektedir. Bu aşamada suşların çoğunluğu hekzozları, pentozlardan önce kullanmayı tercih etmektedir. Ayrıca fruktoz ve maltozu heterofermentatif yollar ile birlikte metabolize edebilenler çoğunluktadır.



Şekil 2.2. Laktik Asit Bakterileri tarafından hekzozların metabolize edilmesinin şematize gösterimi (Kandler, 1983).

### 2.3. Süt Teknolojisi Açısından Önemli Bazı LAB Cinsleri

Süt teknolojisi açısından öne çıkan LAB cinsleri arasında *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Lactococcus* bulunmakla birlikte, diğer bazı bakteri cins ve türlerinin de önemli olduğu bildirilmiştir (Quigley ve ark., 2013).

### 2.3.1. *Streptococcus*

*Streptococcus* cinsindeki türler, kok şeklinde, gram pozitif, katalaz negatif ve genellikle hareketsiz bakterilerdir. *Streptococcus* cinsi son Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 'e göre; piyojenik, oral, enterokok, laktik ve diğer streptokoklar olmak üzere beş gruba ayrılmıştır (Krieg ve Holt, 1984 ). *Streptococcus thermophilus* diğer streptokoklar grubunda ele alınmıştır (Farrow ve Collins, 1984).

*S. thermophilus*' un proteolitik ve lipolitik aktivitesi oldukça zayıftır (Rajagopal ve Sandine 1990; Kılıç, 2001). Genom DNA' sı G+C içeriği %37-40 mol'dür. *S. thermophilus* türü LAB arasında 1.75-1.82 Mb (Mega baz =1 milyon baz) ile en küçük genoma sahip olmaktadır ve suşlar arasında farklılık olmakla beraber plazmit varlığı açısından diğer LAB ile kıyaslandığında çok daha sınırlıdır (Klaenhammer ve ark. 2002).

*Streptococcus thermophilus*, Gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerob, hareketsiz, spor oluşturmeyen, 0.7-0.9 µm çapında, kok ya da çomak şekilli çiftler veya 10-20 hücrelik uzun zincirler halinde sütün doğal habitatında bulunur. Besin gereksinimi kompleks ve değişkendir. Optimum gelişme sıcaklığı 37-43°C, maksimum ve minimum gelişme sıcaklıkları ise sırasıyla 52°C ve 20°C' dir (Robinson, 1999; Kılıç, 2001; Klaenhammer ve ark., 2002). Düşük pH değerlerine zayıf tolerans gösterir.

*Streptococcus thermophilus* süt endüstrisindeki en önemli Laktik Asit Bakterisidir. Yoğurt fermentasyonu ve peynir yapımında iyi bilinen bir starter kültür bileşenidir. Yoğurt üretimindeki starterler simbiyotik bir birliktelikle büyüyen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* türlerini içermektedir. Bu iki bakteri yoğurt oluşumu sırasında laktozun kısa sürede laktik aside dönüşmesini sağlamak için birbirlerinin fizyolojik gelişmelerini desteklemektedir. Laktik asit oluşumu, kazein misellerinin izoelektrik noktasında presipitasyonunu sağlayarak yoğurdun istenen kıvamda olmasını sağlamaktadır. Yoğurt aromasının ana bileşeni laktik asit ile sınırlı olmayıp asetaldehit, yağ asitleri, aminoasitler, aseton, ketohidroksiasitler de katkıda bulunmaktadır.

*S. thermophilus* ayrıca İsviçre, Fransız ve İtalyan peynirleri üretimi için kullanılan doğal termofilik starterlerde diğer LAB türleriyle kombine halde bulunan temel mikrobiyal bileşendir (Auclair ve Accolas, 1983).

Bu türün tüm genom diziliminin belirlenmesi, metabolizması ile ilgili bilginin artmasına ve yeni starter kültürlerin mühendisliği ve varolan fermentasyon proseslerinin daha iyi kontrol edilmesinde olanak sağlayabilecektir.

### 2.3.2. *Lactobacillus*

*Lactobacillus* türleri gram-pozitif, katalaz-negatif, spor oluşturmeyen çomak biçimli bakterilerdir. Zincir formlarına genellikle logaritmik gelişme döneminin geç evresinde rastlanır. Süt asidi bakterilerinin büyük bir kısmı *Lactobacillus* cinsine dahildir. Son kaynaklara göre 174 tür ve 27 alt türe sahiptir (www.bacterio.cict.fr).

*Lactobacillus*, karbonhidrat içeren tüm nişlerde (bitki, hayvan, silaj ve çiğ süt) bulunan bakterilerdir. İnsanlar ve hayvanlarda, ağız boşluğu, bağırsak ve vajinada bu mikroorganizmalara rastlanır. (Bernardeau ve ark., 2008). *Lactobacillus* biyolojisinin daha iyi anlaşılması ile daha fazla *Lactobacillus* suşunun süt ürünlerine ait endüstriyel uygulamalarda kullanımı mümkün olabilecektir. Özellikle, proteolitik aktiviteleri ve tat bileşikleri yanında eksopolisakkarit üretim yetenekleri süt ürünlerinin kalitesi ve besinsel değerine katkıda bulunmaktadır (Leroy ve De Vuyst, 2004).

*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* (son iki tür sonradan *L. bulgaricus* ve *L. lactis* olarak isimlendirilmiştir) süt endüstrisi açısından önemli türlerdir. *L. helveticus* ilk kez Orla-Jensen tarafından tarafından tanımlanmıştır. Sonrasında bu türün temsilcileri çiğ süt ve çiğ süte dayalı ürünlerden sıklıkla izole edilmiştir (Quigley ve ark., 2011). *L. helveticus* peynir üretimi açısından istenen birçok özelliğe sahiptir. Bunlardan biri olan suşların hızlı otolizi, peynirde intraselüler enzimlerin salınması ve acılığın azalması ve tat skorunun artmasıyla sonuçlanmaktadır (Broadbent ve ark., 2011). Bu tür ayrıca 55°C gibi yüksek sıcaklıklarda üreme ve süt ürünleri üretiminde LAB arasında en proteolitik olma ile karakterize edilir (Kiernan ve ark., 2000). Ayrıca lipolizi izleyen serbest yağ asidi salınımı tad bileşenlerinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Yine bu türe ait bir peynir izolatu olan DPC4571 suşunun genom dizilimi fonksiyon-kayıbı (loss of function) ile ilişkili pseudo-genlerin yüksek oranda varlığını işaret etmektedir. Bu durumun süt nişine adaptasyonu yansıttığı düşünülmektedir (Callanan ve ark., 2008).

Süt ürünlerinin üretimi sırasında kullanılan çiğ süt *Lactobacillus* üyeleri sayıca artış göstermektedir. Bu bakteriler peynir olgunlaşma esnasındaki baskın bakteriler haline gelebilirler (Henri-Dubernet ve ark., 2008). Bu popülasyonlar non-starter LAB olarak isimlendirilir ve çoğu besinin azaldığı, pH'ın düştüğü ve nemin düşük olduğu peynir olgunlaşma koşullarına adaptasyon yeteneğine sahiptirler. Burada, proteoliz ve lipolizi gerçekleştirerek tat ve yapı gelişimine katkıda bulunurlar (Smit ve ark., 2005). Bu türler; *L.*

*casei*, *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum/paraplantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *L. brevis*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus*, *L. fermentum*, *L. buchneri* ve *Lactobacillus gasseri*'dir

### **2.3.3. Enterococcus**

*Enterococcus* cinsi, LAB grubunda yer almaktadır (Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984; Devriese ve ark., 1993). Bu cins bakteriler peynirlerin olgunlaşması ve aroma gelişimine katkıda bulunan adjunct kültür (yoğurt ve peynir yapımında starter kültür ile birlikte kullanıldığında yapı, tat ve besin içeriği yararı sağlayan kültür) olarak kullanılmaktadır (Giraffa, 2003). *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* suşlarının çoğu probiyotik olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, nokozomiyal enfeksiyonlara sebep olan enterokoklar nedeniyle, bu cinse dahil bakterilerin güvenilirlik durumu hala sorgulanmaktadır. Birçok virulens faktörü ve antibiyotik direnç geninin *Enterococcus* türlerinde tanımlanması, bu bakterilerin güvenilirliğini etkilemektedir (Eaton ve Gasson, 2001). Ayrıca, enterokokların sahip olduğu plazmid ya da konjugatif transpozon aracılı etkin gen transfer mekanizmaları ile bu bakterilerce kodlanan antibiyotik direnç genlerinin patojenik bakterilere transfer edilebileceğini ve bu şekilde onları antibiyotiklere karşı dirençli hale getirebileceğini önermektedir (Landman ve Quale, 1997).

Bu grubun çiğ sütte en sık rastlanan üyeleri *Enterococcus faecalis* (eski adı *Streptococcus faecalis*), *Enterococcus faecium* (eski adı *Streptococcus faecium*) ve *Enterococcus durans*'dir. *E. faecalis* ve *E. faecium*'un diğer gram pozitif-bakterilerden farklılığı katalaz-negatif olmaları, 10°C ve 45°C'de gelişebilmeleri, 9.6 pH değerinde %6.5 tuz içeren ortamda gelişebilmeleri ve 60°C'deki ısı işlem uygulamalarında canlılıklarını koruyabilmeleridir.

Süt ürünlerinde istenen tat artışını sağlamaları, bakteriyosin üretmeleri ve probiyotik olarak faaliyet göstermeleri *Enterococcus* türlerinin yararlı özelliklerinden olmasına rağmen ürünlerde bozulmaya yol açmaları istenmeyen özelliklerindedir (Bhardwaj ve ark., 2009). Doğal olarak buldukları birçok ortamdan birisi çiğ süttür. Enterokokların bir kısmı pastörizasyon uygulamasıyla inaktif hale getirilmekle birlikte, bazıları canlılıklarını koruyabilirler. Dolayısıyla, çiğ süte enterokokların bulaşması ve sütün işlenmesi sırasında canlılığın korunması süt ürünlerinde bu bakterilerin bulunmasına yol açar. Bu nedenle, enterokoklar esas olarak üretim hijyenini ya da kalitesini ortaya

koyan indikatör mikroorganizmalardır. Peynir gibi tuz içeren ürünlerde canlı kalabildikleri için, enterokok grubu mikroorganizma sayısının hijyenik kalite göstergesi olarak koliform grubu mikroorganizma sayısından daha güvenilir olduğu kabul edilmektedir. Peynirde enterokok sayısı peynir çeşidine ve üretim mevsimine bağlı olarak değişim göstermektedir. Çoğu peynirde enterokok mevcut değildir, ancak tamamen olgunlaşmış bazı peynirlerde predominant bir durum gösterebilirler. Bu durum, peynirin üretimi ve olgunlaştırması sırasında uygulanan koşullarda enterokokların canlılıklarını koruyabilme ve gelişebilme yeteneklerine bağlı olarak değişmektedir. Enterokoklar geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilir, asit üretebilir ve kazeinin parçalanmasında yer alan proteolitik enzimleri salgırlar. Bu özellikleri de peynirde varlıklarını korumalarını sağlamaktadır.

#### **2.3.4. *Lactococcus***

*Lactococcus* cinsi üyeleri Gram pozitif, katalaz-negatif, spor oluşturmayan, hareketsiz, fakültatif anaerob olup, çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunabilen kok şekilli bakterilerdir (Casalta ve Montel, 2008). 2012 yılı itibarıyla yedi türü, iki alt türü ve bir biovarı bulunmaktadır (www.bacterio.cict.fr). Bunlardan *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* çiğ süt, peynir ve ısıtılmış işleme görmemiş peynirlerde baskındır (Gaya ve ark., 2001). Ayrıca, *Lactococcus lactis* ile *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* süt ürünlerinde starter kültür olarak işlev görmektedir. *Lactococcus* türleri, sütün fermentasyonu sonucunda laktozu homofermentatif yolla L-laktik aside dönüştürerek enerji sağlarlar. Ancak, bu yol ile şeker molekülünden az miktarda enerji elde edebildiklerinden, enerji kazanımlarını yeterli seviyeye getirebilmek için bu metabolik yolu çok hızlı bir şekilde kullanırlar. Bu durum sonucunda süt ürünlerinde hızlı pH düşüşüne (asidifikasyona) neden olurlar. Ayrıca, proteolize, amino asitlerin tad bileşenlerine (alkol, aldehit, keton gibi) dönüşümüne, sitrat kullanımına ve yağ metabolizmasına katkıda bulunurlar (Smit ve ark., 2005). *Lactococcus lactis*'in belirli suşları sitratı kullanarak diasetil üretmektedir. Diasetil ekşi kremanın ve kültür kullanılarak üretilen tereyağının tat ve aromasına önemli katkıda bulunur.

*Lactococcus* türleri vitaminler ve aminoasitler gibi metabolitler için çok sınırlı bir anabolizmaya sahip olduklarından bu gelişme faktörlerinin büyük bir kısmını çevreden sağlamak zorundadır. *Lactococcus lactis*'in varyeteleri lantibiotic, nisin gibi önemli bakteriosinleri üretirler (Stiles ve Holzapfel, 1997).

Bu cinsin bir türü olan *L. garvieae* balık patojeni olarak fark edildikten sonra, çiğ sütte ve bazı doğal starter kültürlerde tespit edilmiştir (Vendrell ve ark., 2006; Fortina ve ark., 2007). Genomik çalışmalar süt ve balık kaynaklı izolatların iki farklı grupta olduğunu ve yalnızca süt izolatlarının laktoz kullanım yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, her iki kaynaktan elde edilen izolatlarda da proteolitik aktiviteye rastlanmamıştır (Fortina ve ark., 2007).

#### **2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Gıdalarda Kullanımı**

Fermentasyon teknolojisinin tipik bakterileri olan LAB, gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir şekilde kullanılmaktadırlar. Fermente et ve balık ürünleri (örn., sucuk), süt ürünleri (örn., yoğurt, kefir), tahıl ürünleri (örn., ekmek, boza), şarap ve sebzeler (örn., lahana ve salatalık turşusu) gibi pek çok gıdada doğal olarak bulunabildiği gibi starter kültür olarak da ilave edilerek, gıdaların olgunlaştırılması, üretimi, dayanıklılığının artırılmasında önemli rol oynarlar. Fermente ürünlerde tat ve lezzet oluşumu oldukça karmaşık bir olay olmakla birlikte temelde starter kültürün ana kısmını oluşturan LAB tarafından gerçekleştirilen glikoliz, lipoliz ve proteoliz olaylarını kapsamaktadır (Smit ve ark., 2002). Bununla birlikte, LAB insan sağlığı üzerindeki pek çok yararları nedeniyle probiyotik olma özelliğine sahiptirler. Sonuç olarak, LAB, gıda üretimi, sağlığa katkı yanında enzim ve metabolitler gibi makromoleküllerin üretimi şeklindeki kullanımlarından dolayı endüstriyel öneme sahip en önemli bakterilerdir (Pfeiler ve Klaenhammer, 2007). Tüm bu özellikleri ile LAB ve metabolitlerinin kullanımı generally considered as safe (GRAS, Grade One) olarak güvenli kabul edilmektedir (FAO/WHO, 2001).

LAB'nin peynir üretiminde gerek starter kültür olarak gerekse probiyotik olarak ilavesi üzerine pek çok çalışma mevcuttur (Akgün 1995; Başyigit Kılıç ve ark., 2009). Starter kültür kullanımı ile biyojenaminlerin oluşumu ve istenilmeyen mikroorganizmaların gelişimlerinin engellenmesini sağladığından, daha sağlıklı, kaliteli ve standart bir ürün elde edilmektedir. LAB antagonizması, diğer mikroorganizmalarla besin öğeleri için yarışarak ya da organik asitler (asetik, propiyonik asit) veya laktik asit üretimiyle gıdanın asitlenmesiyle bozulmaya neden olacak mikroorganizmaların büyümesi engellemek ya da öldürmek şeklinde gerçekleşir.

LAB tarafından üretilen laktik asit, diasetil, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyel maddeler, gıdaların korunmasında ve güvenliğinde önemli potansiyele sahiptirler. Gıdalarda özellikle patojen ve bozulma sebebi olan bakterilere karşı doğal

koruma yöntemi olarak bakteriyosinlerden yararlanılmaktadır. Patojen bakterilere karşı bakteriyosin kullanımı fermente sucuklarda, sebzelerde ve süt ürünlerinde bildirilmiştir (Leroy ve De Vuyst, 2004). Ayrıca bazı bakteriyosinlerin ısı stabiliteilerinin olması, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır.

Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerden üzerinde en çok çalışılanları nisin ve pediosin oluşturmaktadır. Özellikle ilk ticari formu 1953 yılında üretilen nisin günümüzde gıda koruyucusu olarak endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Ray ve Miller, 2003). E-234 numarası ile katkı maddeleri arasında yer alan ve ticari formu 'Nisaplin' olarak isimlendirilen nisin, çoğunlukla kremalar, konserve gıdalar, peynir ve pastörize sıvı yumurta gibi gıdalarda *Bacillus* ve *Clostridium* gibi gram pozitif bakterilerin spor formlarını inhibe etmeye yönelik olarak kullanılmaktadır (Adams, 2003).

## 2.5. Bakteriyosinler

Bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri bileşikler genellikle protein yapısında doğal antimikrobiyal maddeler olup, biyokimyasal özellikleri ve etki spektrumları sentezleyen mikroorganizmalara bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bir bakteriyel ürünün bakteriyosin olarak tanımlanabilmesi için bazı kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bunlar; biyolojik yönden aktif bir proteine sahip olması, bakterisit etki göstermesi, dar bir inhibisyon spektrumuna sahip olması, spesifik hücre reseptörlerine tutunması, üretimin ve konakçı-hücre bağışıklılığının plazmid kökenli genetik determinantlara bağlı olmasıdır (Tagg ve ark., 1976).

Bakteriyosinlerin tanımlanmasına yönelik ilk çalışma 1925 yılında *E.coli* tarafından sentezlenen colicin ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında *E. coli* haricinde *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* ve *Enterococcus* gibi birçok bakterinin bakteriyosin ürettiği bulunmuştur (Chen ve Hoover, 2003). Buna rağmen, bakteriyosin çalışmalarının çoğunluğu gıdalarda güvenli kullanıma sahip olduğu düşünülen LAB üzerinde yoğunlaşmıştır.

LAB tarafından sentezlenen bakteriyosinlerin etki spektrumları, biyokimyasal özellikleri ve genetik determinantları birbirinden farklılık göstermekle beraber genellikle düşük molekül ağırlığına (<10kDa) sahip olup, katyonik, amphiphilic (hem hidrofilik hem de lipofilik özelliklere sahip), ısı-stabil ve zar geçirgenlerdir (Widyastuti ve ark., 2014).



sahiplerdir. Bununla birlikte geniş pH aralıklarında stabil kalabilmektedirler (Nagao ve ark., 2006).

Grup II bakteriyosinler, Cotter'in sınıflandırmasına göre lanthionine içermeyen, Molekül ağırlıkları 10kDa'dan daha küçük bakteriyosinlerdir. Cotter'in sınıflandırmasının ikinci ana grubunu oluşturan bu grup, çok sayıda heterojen yapıya sahip bakteriyosin içerdiğinden farklı sınıflandırılmalar önerilmiştir (Nes ve ark., 1996; Cotter ve ark., 2005). Isıya dayanıklı membran aktif bakteriyosinlerdir.

Grup III bakteriyosinler, büyük molekül ağırlığına (>30kDa) sahip, ısıya karşı duyarlı peptid zincirlerinden oluşmaktadır.

Grup IV bakteriyosinler, Klaenhammer tarafından önerilen karbonhidrat veya lipid bileşenlerine sahip kompleks gruptaki bakteriyosinlerin yerini evrensen bakteriyosin sınıflandırmasında ribozomal olarak sentezlenen, non-modifiye dairesel antibakteriyal peptitlerden oluşan yeni bir grup almıştır (Heng ve Tagg, 2006).

### **2.5.2. Bakteriyosinlerin sentezlenmeleri ve etki mekanizmaları**

Bakteriyosinlerin üretiminden sorumlu genlerin çoğunluğu plazmid kökenlidir, ancak kromozomal kökenli olanları da mevcuttur. Bakteriyosinlerin üretim aşamaları genelde benzerlik göstermektedir. Ribozomal protein sentezi sonrası kısa bir sinyal peptide sahip olan bakteriyosinler, daha sonraki aşamalarda modifikasyona uğrayarak olgun hale gelirler. Son aşamada sitoplazmaya salgılanırlar.

Bakteriyosinler çok çeşitli kimyasal yapılarından dolayı canlı hücrelerde farklı hayati fonksiyonlar (transkripsiyon, translasyon, replikasyon, hücre duvarı sentezi) üzerinde etkilidir. Ancak çoğunluğu zar kanalları ya da gözenekleri oluşturarak duyarlı hücrelerin enerji potansiyalini tahrip etmektedir. Gram pozitif bakterilerce üretilen bakteriyosinlerin farklı etki yolları konusunda çok sayıda derlemeye rastlanmaktadır (Driessen ve ark., 1995).

Lanthionine içermeyen bakteriyosinlerden pediocin AcH gram-pozitif bakterilere karşı geniş bir etkiye sahipken, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen lactococcin A daha dar bir etki spektrumuna sahiptir (Bhunja ve ark., 1988).

Sınıf I bakteriyosinler (ya da lantibiyotikler) (örneğin nisin) çift yönlü bir etkiye sahiptirler. Düşük nisin konsantrasyonunda nisin, peptidoglikan alt ünitelerini sitoplazmadan hücre duvarına doğru taşıyan temel taşıyıcısı olan lipid II'ye

bağlanabilmektedir. Bu şekilde, hücre duvarı sentezine engel olmakta ve hücre ölümünü başlatmaktadırlar. Buna karşın yüksek nisin konsantrasyonunda, nisin lipid II'yi membran insersiyonu işlemini başlatmak ve por oluşumu ile hızlı hücre ölümünü sağlamak için kullanabilmektedirler (Breukink ve ark., 1999). Bununla birlikte uzun süre nisinin bakteri hücre membranı bütünlüğünü, zar potansiyalinin ortadan kalkmasına ve iyonlar, amino asitler, nükleotidler ve diğer sitoplazmik çözünenler gibi küçük moleküllerin sızmasına yol açacak gözenekler oluşturarak bozduğu ve tüm biyosentez aşamalarının durması ile sonuçlanan hücre ölümüne yol açtığı gösterildi (Ruhr ve Sahl, 1985).

Bununla birlikte, iki peptid lantibiyotiklerinden lacticin 3147 bu çift yönlü aktiviteye iki peptid boyunca dağılmış olarak sahipken, mersacidin sadece lipid II'yi bağlama aktivitesine sahipken, por oluşturmamaktadır.

Genelde Sınıf II peptidleri bunları hedef hücre membranı içine yerleştirmeyi sağlayarak depolarizasyon ve ölüme yönlendirecek amphiphilic sarmal yapıya sahiptir. Büyük bakteriyolitik proteinler (önceleri sınıf III olarak isimlendirilen bakteriyolizinler) (örneğin lysostaphin), hedef Gram-pozitif hücre duvarı hedefleri üzerinde doğrudan görev yaparak, hücre ölümüne ve parçalanmasına yol açmaktadır.

Genel olarak, lantionine içermeyen bakteriyosinlerin hassas hücreler üzerindeki bakterisidal etkisi zar bütünlüğünün bozulmasından ziyade enerji değişimi gibi zar fonksiyonlarının bozulmasıyla oluşturulmaktadır. Bu etki lantibiotiklerin enerji-bağımlı bakterisidal etkisinin aksine, Proton İtici Gücün (PMF) enerji-bağımsız yayılmasından ve sitoplazmik zar geçirgenlik bariyerinin kaybından ileri gelmektedir (Benz ve ark., 1991; Jack ve ark., 1995).

Gözenek oluşturma kapasitelerine ilaveten Pep5 ve nisinin *Staphylococcus simulans* 22'de otolizisi indüklediği gösterilmiştir (Benz ve ark., 1991; Bierbaum ve Sahl, 1991). Bu etki belirtilen bakteriyosinlerin katyonik doğasından ileri gelmektedir. Gerçekte polizin gibi sentetik peptidler bile bu bakterinin hücre duvarındaki teikoik, lipoteikoik ve teikjuronik asitlere bağlanabilir ve normalde bu substratlara bağlanan otolitik enzimleri salarak aktive eder (Bierbaum ve Sahl, 1991). Otolitik aktivite miktarı hücre ile etkileşimde olan katyonik polipeptid derecesine bağlı olduğundan, enzim salınımı iyon-değişim-benzeri processten ileri geldiği anlaşılmaktadır (Bierbaum ve Sahl, 1991).

Laktik asit bakteriyosinlerinin sahip olduğu pozitif yük, sitoplazmik zarın hidrofobik kısımları üzerinde etkili olmalarında rol oynamaktadır. Bu şekilde, duyarlı

hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat grupları ile elektrostatik etkileşim sonucunda bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır. Tutunma sonrası hidrofobik kısım zar yapısının içine girerek “barrel-stave” ve “wedge” olarak isimlendirilen modellerde gözenek oluşumuna yol açmaktadır. Nisinin “Barrel-stave” modelde gözenek oluşumunda, her bir nisin molekülü dikey bir şekilde zara bağlanarak, zarda bir iyon kanalı oluşturmaktadır. “Wedge” modelde ise, belirli sayıda nisin molekülü fosfolipidlerin baş gruplarıyla etkileşime girdikten sonra, lipid-protein gözeneği oluşmaktadır (Kurt ve Zorba, 2005).

Bakteriyosinler bütün duyarlı türler üzerinde aynı etkiye sahip değildir. Ortam pH'sı ve kritik inhibisyon konsantrasyonu gibi faktörler aktivite üzerinde etkilidir (Salminen ve Wright von, 1993).

Nisin sadece vegetatif hücrelerde etkili değildir, bakteri sporları üzerinde de inhibisyon etkisi vardır. Sporlar üzerinde nisinin etki mekanizması, yapısındaki dehydrobutyrin ve dehydroalanin aminoasitlerinin zarin sülfidril gruplarıyla reaksiyona girmesi ve sporun germinasyonunun önlenmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Kurt ve Zorba, 2005).

### **2.5.3. Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımı**

Gıda güvenliği açısından, patojen mikroorganizmaların gıdalarda gelişiminin önlenmesi gerekmektedir. Gıdalarda zehirlenme ve bozulmalara sebep olan mikroorganizmaların önlenmesi için çok çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler ısı muamele (pastörizasyon, sterilizasyon), pH ile su aktivitesinin azaltılması (asidifikasyon ve dehidrasyon) ve koruyucuların eklenmesi (antibiyotikler, propionate, sorbate, benzoate, lactate ve acetate gibi organik bileşikler) olup oldukça etkilidir. Ancak, gıdalarda gelişen patojen mikroorganizmalar üzerinde bakteriyosin gibi antagonistik etkili metabolik ürünlerinin kullanımı doğal bir yaklaşım sunması açısından önemlidir. Bununla birlikte bakteriyosin kullanımı gıda raf ömrünün arttırılmasında da etkilidir (Deegan ve ark., 2006).

Bakteriyosinler gıda teknolojisinde çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. Bunlar, doğrudan gıda maddesine katma, bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürlerin gıdaya inokulasyonu veya gıdanın koruyucu ambalaj materyali ile birlikte kullanım şeklinde olabilmektedir (Galvez ve ark., 2007). Ancak bakteriyosin üreten kültürlerin fermentasyon sürecini gerçekleştiren mikroorganizmalara olumsuz etkisinin olduğu düşünüldüğünden fazla tercih edilmemektedir.

LAB tarafından üretilen nisin ve pediosin gıda endüstrisinde kullanımı onaylanan bakteriyosinlerdendir (Ennahar ve ark., 1999). Nisinin etki spektrumu diğer birçok bakteriyosine göre oldukça geniş olup, asidik gıdalarda ve gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde oldukça etkilidir. Özellikle peynirlerde hastalık ve ölümlere yol açabilen *Listeria monocytogenes*'i ile *Clostridium botulinum*'u inhibe edebilir. Ayrıca, et ve et ürünlerinde oldukça tehlikeli bir patojen olan *Clostridium botulinum* üzerinde de etkilidir. Nisin, antimikrobiyal olarak nitrit için belli düzeylerde alternatif oluşturabilmektedir. Nisin pH 2'de, pH 8'den 228 kez fazla çözünür (Liu ve Hansen, 1990). Fizyolojik pH'da çözünürlüğü az olduğundan ve sindirim proteazlarına hassas olduğundan tıbbi alanda kullanılmamaktadır. Nisinin katkı maddesi olarak kullanımına ilk kez krem peynirlerinde izin verildikten sonra, günümüzde 50'den fazla ülke tarafından kullanılmaktadır (Delves-Broughton ve ark., 1996). Nisinin inhibisyon etkisinin görülebilmesi kullanım miktarına, pH, tuz ve fosfat içeriği ile proses şartlarına bağlı olarak değişebilmektedir.

#### **2.5.4. Bakteriyosinlerin diğer koruyucu maddeler ve prosesler ile birlikte kullanımı**

Nisinle birlikte diğer gıda koruyucu katkıların veya proseslerin kullanılması bakteriyosinlerin sınırlı antimikrobiyal etki spektrumunun artırılması için gerekli hale gelmektedir. Gram negatif bakterilerin dış zarlarının bütünlüğü bozulduğunda bakteriyosinlere karşı hassasiyetleri artmaktadır. Bu nedenle nisinle beraber hücre zarının bozulmasına sebep olacak trisodyum fosfat veya EDTA kullanılması inhibisyon etkisini arttırabileceği bildirilmektedir. Örneğin EDTA, Gram negatif mikroorganizmanın lipopolisakkarit kısmında  $Mg^{+2}$ 'u bağlayarak dış zarın yapısını bozarak nisinin sitoplazmik zara ulaşmasını sağlamaktadır (Ebee ve ark., 1995). Nisinle birlikte sodyum klorid, sarımsak ekstraktı, potasyum sorbat, bazı organik asitler, sodyum sitrat ve sodyum laktat kitosan ve türevleri gibi birçok katkının kullanımıyla nisinin antimikrobiyal etkisinin arttığı tespit edilmiştir (Herrerros ve ark., 2005). Nisinin etkisini ayrıca yüksek hidrostatik basınç basınç, titreşimli elektrik alanı gibi uygulamalar arttırabilmektedir (Morgan ve ark., 2000; Galvez ve ark., 2008). Bir diğer çalışmada, çiğ süttten peynir üretimi sırasında yüksek basınç uygulaması ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterisinin kombine kullanımının, 2 ve 3 gün sonunda *Staphylococcus aureus* sayısında sırasıyla 1.02 ve 4.00 log kob/g azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Arques ve ark., 2005).

Bakteriyosinlerin gıdaların korunmasında uygulanan kullanım şekillerinden birisi de gıda yüzeyine uygulanan filmlerde kullanımıdır (Kumar ve Anand, 1998). Bu biyofilmlerden temas ettikleri gıda yüzeylerine belirli oranlarda geçen bakteriyosinler mikrobiyal gelişimi engelleyebilmektedir. Nisin, kullanıldığı biyofilmlerden gıda yüzeyine belli oranlarda geçerek, yüzeyde mikrobiyal gelişimi engelleyebilmektedir. Nisin gibi bakteriyosinler protein yapısındaki biyofilmlerin polimer yapısına direkt olarak katılmak veya polietilen materyallerin polimer yapısının yüzeyine adsorblanmak suretiyle kullanılabilir.

### **2.5.5. Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosin kullanımı**

Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosinlerin kullanımı bakteriyosinin saflaştırılarak kullanılması veya bakteriyosin üreten kültürün kullanımı şeklinde olmaktadır.

*Lactococcus* tarafından üretilen Lacticin 3147 süt ürünlerinin muhafazasındaki uygulamalarda yüksek potansiyele sahiptir (Ross ve ark., 1999). Martinez-Cuesta ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, peynir üretimi sırasında kullanılan starter kültüre (*L. lactis* IFPL359), Laktisin 3147 bakteriyosinini üretme yeteneğinde olan *Lactococcus lactis* IFPL105 suşundan 46 kb'lık bir plazmid aktarılmış ve transkonjugantın peynirin olgunlaşma süresi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonunda araştırmacılar konjugant starter kültür kullanımının peynir üretim prosesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadan peynir asitliğinin düzenli bir şekilde geliştiğini ve duyusal özelliklerin arttığını bulmuşlardır.

Sütte ve geleneksel peynirlerde yoğun şekilde bulunan *Enterococcus* cinsine ait çoğu bakteriyosinogenik suş sütte gelişebilir ve bakteriyosin üretebilir. Bu durum onları gıda kaynaklı patojenlere karşı korunmada adjunct kültürler olarak görev en uygun adaylar haline getirir. Enterosin AS-48 üreten *Enterococcus* suşları süt ve süt ürünlerinde test edilmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Termofilik Streptococci yoğurt ve bazı peynir çeşitlerinin üretimindeki önemli starterlerdir. Bu grup bakterilerin thermophilin adı verilen bakteriyosinleri ürettiği bilinmektedir (Aktypis et al., 1998; Fontaine ve Hols, 2008). Thermophilinlerin starter kültürler ile engellenmesi, bunlarla ilgili en temel endişelerden biridir. Bu nedenle, thermophilinlerin gıda sistemlerindeki uygulamaları üzerine oldukça az çalışma bulunmaktadır.

Son yıllarda nisinin dışında, önemli bir gıda patojeni olan *Listeria spp.* karşı kuvvetli inhibitör etkiye sahip oldukları bilinen pediosin ve pediosin benzeri bakteriyosinlerin gıdalarda özellikle süt ve süt ürünlerinde kullanım potansiyelinin yüksek olduğu belirtilmektedir (Pucci ve ark., 1988; Galvez ve ark., 2008). Ancak Pediocin üreten *Pediococcus* üyelerinin süt ortamına adaptasyonları güç olduğundan pediosin üreten kültürlerin süt ve süt ürünlerinde kullanımı sınırlıdır (Galvez ve ark., 2008).

*Propionibacterium jensenii* (thoenii) P126 tarafından üretilen jenseniin G bakteriyosini *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* üzerindeki inhibisyon aktivitesi nedeniyle yoğurt ve diğer fermente ürünlerde fazla miktardaki asidifikasyonu kontrol etmede kullanılmaktadır (Weinbrenner ve ark., 1997).

Bakteriyosin üreten starter veya adjunct kültürlerin fermente süt ürünlerinde kullanımı, bakteriyosin eklenmesinden kaynaklanan proses harcamaları dahil çoğu problemi çözebilir. Nisin üreten starter kültürlerin peynirde gaz-itme sorunlarını önlemede önerilmesi 1951 yıllarına uzanmaktadır (Hirsch ve ark., 1951).

Bakteriyosinlerin kullanımında güncel yaklaşım starter kültürlerden intraselüler enzimlerin salınmasının artırımıyla olgunlaşmanın hızlandırılması ve/veya peynir tadının geliştirilmesidir (Lortal ve Chapot-Chartier, 2005).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada beş farklı şehirden (Kahramanmaraş, Gaziantep, Kayseri, Osmaniye, Urfa) 36 farklı noktayı temsil eden 15 adet çiğ süt örneği kullanılmıştır.

##### 3.1.1. Kullanılan çözeltiler ve besiyerleri

###### 3.1.1.1. MRS broth (Lactobacillus Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE)

LAB izolatların büyütülmesi amacıyla kullanılmıştır. Gerekğinde agar eklenerek (15 g/L) MRS agar elde edilmiştir.

MRS içeriği	(g/L)
Peptone from casein	10,0
Meat extract	10,0
Yeast extract	4,0;
D (+) glucose	20,0
Dipotassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ )	2,0;
Tween® 80	1,0
di-ammonium hydrogen citrate	2,0
Sodium acetate	5,0
Magnesium sulfate ( $MgSO_4$ )	0,2
Manganese sulfate	0,04

52,2 g MRS Broth'un 1 litre saf su içinde çözülmesini takiben 15 dakika 121°C'de otoklavlamak suretiyle hazırlanmıştır. 25°C'da pH'sı 5,7±0,2'dir.

###### 3.1.1.2. Brain Hearth Infusion (BHI) broth

İzolatların büyütülmesi ve bakteriyosin varlığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Gerekğinde agar eklenerek (15 g/L) BHI agar elde edilmiştir.

BHI içeriği	(g/L)
Nutrient Substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar)	27,5

D(+) Glucose	0,2
NaCl	0,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (di-sodyum hidrojen fosfat)	2,5

37 g besiyeri 1 litre saf su içinde çözüldükten sonra, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilerek hazırlanmıştır. Sterilizasyon sonrası besiyerinin 25°C'da pH'sı 7,4±0,2'dir.

### **3.1.1.3. TE çözeltisi**

10 mM Trizma base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) ve 1 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate), pH 8.0 konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır.

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Çiğ süt örneklerinden LAB sayılarının belirlenmesi**

Toplanan çiğ süt örnekleri seri dilüsyona tabii tutulduktan sonra MRS agar üzerine ekilerek 35°C'de 2 gün süre ile anaerobik olarak inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılarak örneklerdeki toplam LAB sayıları CFU/ml olarak ifade edilmiştir.

### **3.2.2. LAB izolasyonu**

MRS agar üzerinde gözlemlenen kolonilerden farklı morfolojik görünümlü olanların koloni görünüşleri not edilmiş ve aralarından rastgele seçilen toplam 42 adet izolat bakteriyosin aktivitesinin test edilmesi amacıyla çalışmada kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan izolatlardan ayrıca uzun süreli çalışma stokları yapılmıştır.

### **3.2.3. Hücre içermeyen süpernatant (CFS) örneklerinin elde edilmesi**

MRS agarda büyüyen koloniler, 1 ml MRS broth içeren tüplere inoküle edildikten sonra 35°C'de 2 gün süre ile anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler 4°C'de 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar temiz eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen CFS örnekleri "nötralize edilmemiş CFS örnekleri" olarak well-difüzyon testinde kullanılmıştır. Sonrasında nötralize edilmemiş CFS örneklerinin pH'sı NaOH ile nötrleştirilmiştir. Bu işlemden sonra örnekler "nötralize edilmiş CFS örnekleri" olarak isimlendirilmiş ve well-difüzyon testinde

kullanılmıştır. Nötrale edilen CFS örnekleri ayrıca 0.2 µM porlu steril filtrelerden (Millipore) süzöldükten sonra well-difüzyon testi tekrarlanmıştır.

#### **3.2.4. Well difüzyon testi**

İzolatların bakteriyosin aktivitesine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla yapılmıştır (Schillinger ve Lucke, 1989). Test bakterisi olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli*, *Shigella boydi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acitenobacter baumannii*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., VRE, *E. faecium*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staphylococcus aureus* kullanılmıştır. Gece boyu BHI içinde büyütölmüş test bakterilerinden 150 µl alınarak BHI agarlı petrilere yayılmıştır. Agar aseptik koşullarda delinerek, 50 µl hücre içermeyen süpernatant (CFS) boşluklara uygulanmıştır. Buzdolabında birkaç saat tutulan petrilere, daha sonra 35°C’de gece boyu inkübe edilmiştir (Büyökünöl ve ark., 2012).

#### **3.2.5. Agar spot testi**

İzolatların bakteriyosin aktivitesine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla önceden belirtildiği şekilde yapılmıştır (Büyökünöl ve ark., 2012).

#### **3.2.6. Hücresel DNA ekstraksiyonu**

Bakteriyosin aktivitesine sahip izolatlara ait kromozomal DNA MRS broth içinde 35°C’de 2 gün süre ile büyütölen kültürlerden önceden belirtildiği şekilde elde edilmiştir (Büyökünöl ve ark., 2010). Bu örnekler PCR amplifikasyonları için kullanılmıştır.

#### **3.2.7. 16S rRNA geni PCR amplifikasyonları**

16S rRNA genine ait PCR amplifikasyonları universal primerlerden 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') kullanılarak yapılmıştır (Lane, 1991). PCR amplifikasyonlarının her biri 30 µL toplam hacminde, 5 µL hedef DNA (yaklaşık 25 ng), 0.2 mM deoksinökleotid trifosfat (dNTPs), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir 30 pmol primer, 3 µL 10X PCR tamponu ve 1 ünite Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific) içerecek şekilde önceden belirtilen reaksiyon koşullarına göre yapılmıştır (Büyökünöl ve ark., 2012).

#### **3.2.8. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR analizi**

Genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla bakteriyosinjenik izolatlara ait total DNA örnekleri ERIC-1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3' ve ERIC-2 (5'-

AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır (Versalovic ve ark., 1991).

Her bir PCR amplifikasyonu 25 µl toplam hacimde, 5 µl hedef DNA, 0,2 mM dNTP, 50 pmol primer, 2,5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (500 KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, ve 1 ünite Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna göre 94°C'de 3 dakikalık bir denatürasyon sonrası, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 48°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 5 dakika sentez aşamalarından oluşan 35 döngü uygulanmıştır. En son 72°C'de 5 dakika daha bekletilmiştir.

### **3.2.9. PCR ürünlerinin elektroforez ile ayrımı**

PCR amplifikasyonları sonrası elde edilen PCR ürünleri ml'sinde 1 µg Etidyum Bromür bulunan %1 agaroz jel elektroforezinde ayrılmıştır. Elektroforez sonrası ayrılan PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat, France) belirlenmiştir.

### **3.2.10. DNA diziliminin belirlenmesi**

PCR reaksiyonları sonrasında temizlenen PCR ürünlerinin dizilimi Refgen Biyoteknoloji Ltd. tarafından belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. LAB İzolasyonu ve Bakteriyosin Aktivitesinin Tespit Edilmesi

Bu çalışmada Kahramanmaraş ve civarındaki illerden (Gaziantep, Kayseri, Osmaniye, Urfa) toplanan çiğ süt örneklerindeki canlı LAB sayımları belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Süt örneklerindeki LAB sayımları 3 ila 6,67 log<sub>10</sub> CFU/ml arasında değişmekle birlikte en düşük LAB Kayseri 4, en yüksek LAB ise Maraş 3 örneğinde saptanmıştır. Diğer bir deyişle, çalışmamızda süt örnekleri için saptanan en düşük ve en yüksek LAB sayımları arasında farklılık yaklaşık 3 birim kadar olmuştur.

Çizelge 4.1. Süt örneklerindeki LAB sayıları ve agar spot yöntemi ile bakteriyosin aktivitesine sahip olan izolatlar

Süt örneği	LAB (log <sub>10</sub> CFU/ml)	Bacteriosinogenik İzolatlar	Antagonistik etki gösterdiği bakteri
Osmaniye 1	5,24	1 5	<i>L. monocytogenes</i> <i>Enterococcus</i> spp.
Osmaniye 2	6,82	-	
Osmaniye 3	6,14	-	
Osmaniye 4	4	10	<i>Enterococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>
Urfa 2	6,28	15	<i>Enterococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>
Urfa 3	5,32	17, 19	<i>Enterococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>
Urfa 4	4,48	22, 23, 24	<i>Enterococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>
Maraş 3	5,67	43	<i>Enterococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>
Maraş 4	5,26	49	<i>Enterococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>
Kayseri 4	3	54	<i>Enterococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>
Gaziantep 3	4	32	<i>Enterococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>

Bluma ve Ciprovia (2015) tarafından Litvanya’da çiğ ve pastörize süt örneklerinde toplam bakteri ve LAB sayılarının farklı mevsimlerde incelenmiştir. Belirtilen çalışma süt örneklerinin mikrobiyal kompozisyonu ve çiğ süt miktarında mevsimsel bir varyasyon olduğunu ortaya koymuştur. Bluma ve Ciprovia tarafından bildirilen en düşük ve en yüksek LAB sayımları arasındaki farklılık CFU olarak 21 birim kadar olduğundan çalışma sonuçlarımızdan farklılık göstermektedir. Ayrıca, belirtilen çalışmada en düşük LAB sayısı varyasyonunun saptandığı mevsim olan Mart ayı, çalışmamızda da süt örneklerinin toplandığı döneme rastladığından çalışma sonuçları arasında benzerlik bulunmuştur.

Aynı araştırma sonuçlarına göre pastörize süt örneklerindeki LAB sayıları çiğ süt örneklerindeki kadar düşük düzeyde bulunmuştur (Bluma ve Ciprovia, 2014).

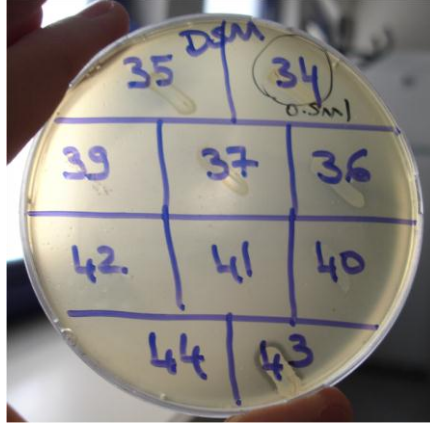
Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda özellikle çüğ sütün üretilen peynirlerde LAB sayılarının depolama ve olgunlaşma sürecinde artış gösterdiği vurgulanmaktadır (Coppola ve ark., 1997). Bu tarz bir üretim sürecinde genelde *Enterococcus* sayısında bir azalma buna karşın *Lactobacillus* sayısında artış gözlemlenmektedir.

Çalışma sonucunda farklı çiftliklerden toplanan 9 süt örneğinden 42 LAB izolatu elde edilmiştir. İzolatlar iki farklı metod (well-difüzyon ve agar spot) ile bakteriyosin aktivitesi yönünden test edilmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). Agar spot metoduna göre izolatların 11 tanesinin (%26,2) iki farklı test bakterisine (*Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus* spp.), 2 tanesinin ise tek bir test bakterisi *Listeria monocytogenes* veya *Enterococcus* spp.) karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Bakteriyosin aktivitesinin well difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait bazı petri görünümüleri

Çalışmamızda agar spot metodu ile bakteriyosinjenik izolatların hiçbirinde *Staphylococcus aureus* test bakterisine karşı bakteriyosin aktivitesi gözlenmemiştir. Bu durum ülkemizde çüğ süt kaynaklı LAB izolatlarının agar spot metodu ile bakteriyosin aktivitelerinin incelendiği çalışmaya ait sonuçlardan farklılık göstermiştir. Belirtilen çalışmada iki izolatın (izolat 5 ve 7) hem *Listeria monocytogenes* ATCC7644 hem de *Staphylococcus aureus* test bakterilerine karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Altuntaş ve ark., 2010).



Şekil 4.2. Bakteriyosin aktivitesinin agar spot yöntemi ile belirlenmesine ait bazı petri görünümleri

Çalışmamızda bakteriyosin aktivitesi iki farklı metod (agar spot testi ve well difüzyon) ile belirlenmiştir. Sonuçlar agar spot testi ile daha fazla izolatın bakteriyosin aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Benzer durum farklı çalışmalarda da tespit edilmiştir (Altuntaş ve ark., 2010; Bali ve ark., 2011).

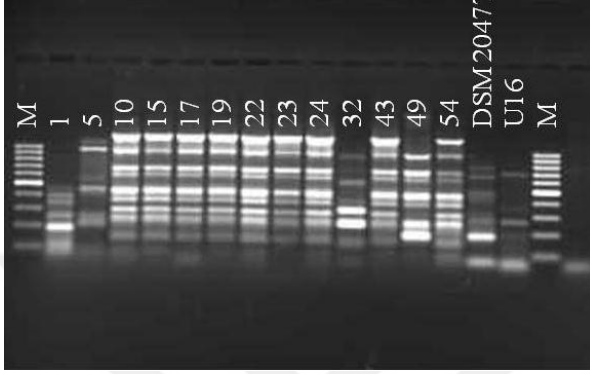
Bu çalışmada bakteriyosinojenik LAB izolatlarının hemen hemen hepsinin *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'e karşı antagonistik etki gösterdiği bulunmuştur. Benzer şekilde farklı araştırmacılar tarafından çiğ süt LAB izolatları arasında *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'a karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olanlar rapor edilmiştir (Ortolani ve ark., 2010; Perin 2014b).

#### **4.2. Bakteriyosinojenik İzolatlar Arasında Genetik İlişkinin ERIC-PCR ile Belirlenmesi**

PCR temelli çok sayıda tiplendirme metodu birbirleri ile ilişkili bakteriler arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlardan repetitive palindromic-PCR (rep-PCR) ve random amplification of polymorphic DNA (RAPD-PCR) metodları farklı çalışmalarda süt ürünleri ve süt kaynaklı bakteriyosinojenik LAB izolatları arasındaki farklılıkları belirlemede kullanılmıştır (Silvetti ve ark., 2014; Perin ve ark., 2014b).

Çalışmamızda agar spot metodu ile bakteriyosin aktivitesi tespit edilen toplam 13 adet izolat ERIC-PCR ile incelenmiştir. Şekil bakteriyosinojenik izolatlar için tespit edilen

ERIC-PCR profillerini göstermektedir. ERIC-PCR profilinin 9 izolatta aynı, 4 izolatta (1, 5, 32, 49) ise farkı olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Bu sonuç farklı coğrafi bölgelerden izole edilen LAB türlerinin benzer genetik yapıya sahip olabileceğini göstermektedir. Diğer bir olasılık, ERIC-PCR yönteminin izolatlar arasındaki genetik farklılığı belirlemede yetersiz olabileceğidir.



Şekil 4.3. Bakteriyosinojenik izolatların ERIC-PCR profili

#### 4.3. 16S rRNA Gen Dizilimine Dayalı Moleküler İdentifikasyonu

ERIC-PCR sonuçlarına göre farklı profil özelliği gösteren izolatlar 16S rDNA dizilimine göre tiplendirilmiştir.

ERIC-PCR profili ortak olan izolatların aynı türe ait olması beklendiğinden, ortak profile sahip izolatlardan sadece üç tanesi için 16S rRNA gen dizilimi analizi ile moleküler identifikasyona tabii tutulmuştur. Sonuçlar her üç izolatında %92-97 dizilim benzerliği ile *Enterococcus faecalis* olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.2. bakteriyosinojenik izolatlara ait moleküler identifikasyon sonuçlarını göstermektedir. Bu sonuçlara göre bakteriyosinojenik izolatların çoğu *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır. Çiğ süt ve süt ürünlerinde bakteriyosinojenik LAB suşlarının tür düzeyinde tanımlandığı diğer çalışmalar incelendiğinde tespit edilen türlerin tür dağılımında farklılıklar görülmüştür. Örneğin, Ortolani ve ark. (2010) tarafından çiğ sütte tespit edilen tek LAB türü *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* olmuştur. Aynı çalışmada izolatlarda nisin kodlayan genlerin (nisAf1, nisAr2 gibi) varlığı PCR ile gösterilmiştir.

Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada ise Ankara ve civarından toplanan çiğ süt örneklerinden izole edilen 7 adet bakteriyosinojenik LAB izolatının API 50 CHL ile

tanımlanması yapılmıştır. Sonuçlar, izolatların 4'ünün *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1, 2'sinin *Lactobacillus plantarum* ve birinin *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 3 olduğunu gösterdiğinden, saptanan türlerin baskınlığı yönünden çalışma sonuçlarımızdan farklılık göstermiştir (Altuntaş ve ark., 2010).

Rodriguez ve ark. (2000) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, çiğ süt kaynaklı bakteriyosinjenik LAB izolatları arasında en sık rastlanan tür çalışma sonuçlarımızdan farklı olarak *L. lactis* subsp. *lactis* olmuştur. Koyun, keçi ve inek sütlerinden oluşan toplam 298 örneğin bakteriyosinjenik LAB izolatlarının varlığı yönünden incelendiği çalışmada fenotipik ve genotipik olarak tanımlanan 82 bakteriyosin üreticisi suşun dağılımı; *L. lactis* subsp. *lactis* (59 izolat), *L. lactis* subsp. *cremoris* (2 izolat), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (6 izolat), *E. faecalis* (7 izolat), *E. faecium* (1 izolat), *L. paracasei* subsp. *paracasei* (4 izolat), *L. plantarum* (1 izolat) ve *Leuconostoc* spp. (2 izolat ) şeklinde bulunmuştur. Aynı çalışmada, PCR ile bakteriyosin-üreten 67 *Lactococcus* türünün 39'unda nisin, 23'ünde lacticin 481 tespit edilmiştir. *Enterococcus* izolatlarının sadece 4'ünde Enterocin AS-48 üretimi saptanırken, bakteriyosini tanımlanamayan 16 izolatın 4'ünde en az 3 bakteri türüne karşı etkili geniş spektrumlu bakteriyosin aktivitesi görülmüştür. Belirtilen çalışmanın aksine, çalışmamızda tanımlanan bakteriyosinjenik izolatların hiçbirinde bir geniş inhibisyon spektrumu tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.2. 16S rRNA gen dizilimi analizi ile izolatların tiplendirilmesi

İzolat	Şehir	ERIC-PCR* profili	Moleküler identifikasyon	Dizilim benzerliği (%)
1 <sup>■</sup>	Osmaniye 1	II	<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus casei</i>	93
5 <sup>■</sup>	Osmaniye 1	III	<i>Enterococcus durans</i>	90
10	Osmaniye 4	I	<i>Enterococcus faecalis</i>	
15	Urfa 2	I	<i>Enterococcus faecalis</i>	
17	Urfa 3	I	<i>Enterococcus faecalis</i>	
19 <sup>■</sup>	Urfa 3	I	<i>Enterococcus faecalis</i>	92
22	Urfa 3	I	<i>Enterococcus faecalis</i>	
23	Urfa 4	I	<i>Enterococcus faecalis</i>	
24 <sup>■</sup>	Urfa 4	I	<i>Enterococcus faecalis</i>	92
32	Gaziantep 3	IV	-	
43	Kahramanmaraş 3	I	<i>Enterococcus faecalis</i>	
49 <sup>■</sup>	Kahramanmaraş 4	V	<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Lactococcus formosensis</i>	99
54 <sup>■</sup>	Kayseri 4	I	<i>Enterococcus faecalis</i>	97

■ Dizilim analizi gerçekleştirilen izolatları; \* ise farklı Romen Rakamlarıyla temsil edilen farklı ERIC-PCR profillerini göstermektedir.

Çalışmamızda identifikasyonu yapılan 13 adet bakteriyosinojenik suş içerisinde tek bir suş (izolat 49) *Lactococcus garvieae* ya da *Lactococcus formosensis* olarak tanımlanırken, bir suş (izolat 1) ise *Lactobacillus paracasei* ya da *Lactobacillus casei* olarak tanımlanmıştır. Bu durum, belirtilen suşlara ait 16S rRNA gen diziliminin Gen Bankasındaki diğer dizilimler ile karşılaştırılması sonucunda iki farklı türe ait dizilim ile eşit düzeyde benzerliğe sahip olmasından ortaya çıkmıştır. Her bir suş için tespit edilen türler arasındaki taksonomik yakınlık oldukça fazla olduğundan bu suşların tür düzeyinde tam olarak identifikasyonu için ek analizler yapılması gerekliliğini göstermektedir.



## SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çok farklı habitatları işgal eden LAB, fermentasyon yapma ve farklı tipteki metabolitleri üretme yönünden, endüstriyel açıdan oldukça önemli bir bakteri grubunu meydana getirmektedir. Bu grup bakteriler özellikle bakteriyosin adı verilen ve genellikle protein karakterinde olan antimikrobiyal maddeleri üretmeleri açısından tercih edilmektedirler. Bu durum, bu grup bakterilerinin probiyotik özellikleriyle birlikte düşünüldüğünde daha fazla önem taşımaktadır. Bilindiği gibi probiyotikler konak mikroorganizmada yeterli sayıda bulduklarında sağlığa olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalardır.

Bugüne kadar çok sayıda bakteriyosin tanımlanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bununla beraber, mikroorganizmalarda var olan zengin genetik çeşitlilik nedeniyle doğada farklı özellikteki bakteriyosinlerin tespit edilmesi ve bunların tanımlanmaları endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Bu nedenle, bu çalışmada Kahramanmaraş ve civarındaki illerden (Gaziantep, Kayseri, Osmaniye, Urfa) toplanan çiğ süt örneklerindeki LAB'nin izolasyonunu takiben bakteriyosin üretenlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzolatlarının bakteriyosin aktivitesi farklı test bakterileri (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Shigella* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) üzerinde agar spot ve well-difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitelerinin belirlenmesi esnasında enterocin üreten *Enterococcus faecium* DSM 20477 suşu kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca bakteriyosin aktivitesine sahip izolatlar arasındaki genetik ilişki Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda süt örnekleri arasında en düşük toplam LAB  $3,0 \log_{10}\text{CFU/g}$  ile Kayseri 4, en yüksek LAB sayısı ise  $6,82 \log_{10}\text{CFU/g}$  ile Osmaniye 2 örneğinde tespit edilmiştir. Bakteriyosin aktivitesi test edilen 42 izolatın 11 tanesinin (%26,2) iki farklı test bakterisine (*Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus* spp.) 2 tanesinin ise tek bir test bakterisine (*Listeria monocytogenes* ya da *Enterococcus* spp.) karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bakteriyosin aktivitesine sahip izolatların elde edildiği süt örnekleri LAB sayımları ile bunlardan elde edilen bakteriyosinjenik izolatların sıklığı incelendiğinde, iki parametre arasında belirgin bir pozitif ilişki saptanmamıştır.

ERIC-PCR analizi sonucunda *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus* spp. için bakteriyosin aktivitesine sahip izolatlar arasında üç farklı profil saptanmış ve bu

profillerden bir tanesinin dört farklı şehre ait 9 izolatta ortak olduğu görülmüştür. Bu sonuç farklı coğrafi bölgelerden izole edilen LAB türlerinin benzer genetik yapıya sahip olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca, farklı ERIC-PCR profiline sahip izolatlar 16S rRNA gen dizilimi analizine dayalı olarak tanımlanmıştır. İdentifikasyon sonuçları en sık rastlanan türün *Enterococcus faecalis* olduğunu göstermiştir. Çalışmada tanımlanan diğer türler ise *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus durans* ve *Lactobacillus paracasei* olmuştur. Çalışma sonuçları bakteriyosinjenik izolatların sahip olduğu aktivite spektrumları arasında benzerlik bulunduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, 11 izolatın özellikle önemli bir gıda patojeni olan *L. monocytogenes* ile birlikte *Enterococcus* spp.'ye karşı antagonistik aktiviteye sahip olması, sahip oldukları bakteriyosinlerin özellikle gıda endüstrisinde kullanım potansiyali olabileceğini göstermektedir. Bu olasılık suşların ürettiği bakteriyosinlerin karakterizasyonuna yönelik olarak yapılacak testler sonucunda daha iyi anlaşılacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. 1995. Bacteriocins: Modes of Action and Potentials in Food Preservation and Control of Food Poisoning. *International Journal Food Microbiology*, 28:169-85.
- Achemchem, F., Cebrian, R., Abrini, J., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M. 2012. Antimicrobial Characterization and Safety Aspects of the Bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* F420 Isolated from Moroccan Raw Goat Milk. *Canadian Journal of Microbiology*, 58: 596-604.
- Adams, M. 2003. Nisin in Multifactorial Food Preservation. Chapter 2 In Natural Antimicrobials for The Minimal Processing of Foods. (Editör: by Sibel Roller), 306 p.
- Akgün, S. 1995. Beyaz Peynir Üretiminde *Lactobacillus sake*'nin Starter Kültür olarak Kullanılması. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 42: 271-279.
- Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis in't Veld, J. H., ten Brink, B. 1998. Purification and Characterization of Thermophilin T, A Novel Bacteriocin Produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 568-576.
- Alişarlı, M., Solmaz, H. Ve Akaya, L . 2003. Süt ineklerinde Meme Başı Derilerinin Bazı Mikroorganizmalar ve Çiğ sütlerinde Mikrobiyolojik kalite yönünden İncelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14 (1) , 35 – 39.
- Arques, J.L., Rodriguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B. and Nunez, M. 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in Raw Milk Cheese by Combinations of High-Pressure Treatments and Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 254-260.
- Altuntaş, E.G., Ayhan, K., Okcu, G. , Erkanlı, K., Balcı, M.H., Sonakın, Ş.S. 2010. Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri. *Gıda* 35: 197-203.
- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. (Editörler: Salminen, S, Von Wright), A. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2nd editör: Marcel Dekker Inc., New York, s.1-72
- Auclair, J., Accolas, J.P. 1983. Use of Thermophilic Lactic Startersin the Dairy Industry. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49: 312-326.
- Büyükünal, E.B., Bayar, S., Bal, M.A., 2010. Antimicrobial Susceptibilities of Coagulase-Negative *Staphylococci* (CNS) and *Streptococci* from Bovine Subclinical Mastitis Cases. *Journal of Microbiology*, 48: 267-274.
- Büyükünal, E.B., Isevi, T., Bal, M.A. 2012. Characterization of an Anti-listerial Enterocin from Wheat Silage Based *Enterococcus faecium*. *Journal of Basic Microbiology*, 52: 496-503.

- Bali, V., Panesar, P.S., Bera, M.B. 2011. Isolation, Screening and Evaluation of Antimicrobial Activity of Potential Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria Isolate. *Microbiology Journal*, 1: 113-119.
- Başıyigit Kılıç, G., Kuleaşan, H., Eralp, İ., Karahan, A.G. 2009. Manufacture of Turkish Beyaz Cheese Added with Probiotic Strains. *LWT- Food Science and Technology*, 42: 1003-1008.
- Benz, R., Jung, G., Sahl, H.-G. 1991. Mechanism of Channel Formation by Lantibiotics in Black Lipid Membranes (Editörler: Jung, G. Sahl, H.-G.) Nisin and Novel Lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands. s.359-372.
- Bhardwaj, A., Kapila, S., Mani, J., Malik, R.K. 2009. Comparison of Susceptibility to Opsonic Killing by in vitro Human Immune Response of *Enterococcus* Strains Isolated from Dairy Products, Clinical samples and Probiotic Preparation. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 513-515.
- Bierbaum, G., Sahl, H.-G.. 1991. Induction of autolysis of *Staphylococcus simulans* 22 by Pep5 and nisin and influence of the cationic peptides on the activity of the autolytic enzymes, (Editörler: Jung, G., Sahl, H.-G.). Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands. s.386-396.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H.G., de Kruijff, B. 1999. Use of the Cell Wall Precursor Lipid II by a Pore-Forming Peptide Antibiotic. *Science*, 286: 2361-2364.
- Broadbent, J.R., Cai, H., Larsen, R.L., Hughes, J.E., Welker, D.L., De Carvalho, V.G., Tompkins, T.A., Ardö, Y., Vogensen, F., De Lorentiis, A., Gatti, M., Neviani, E., Steele, J.L. 2011. Genetic Diversity in Proteolytic Enzymes and Amino Acid Metabolism Among *Lactobacillus helveticus* Strains. *Journal of Dairy Science* 94: 4313-4328.
- Bluma, A., Ciprovica, I. 2015. Diversity of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk. *Research For Rural Development*, 1: 157-161.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C. Ray B. 1988. Purification, Characterization and Antimicrobial Spectrum of a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici* H. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 261-268.
- Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J., O'Sullivan, O., Jordan, K., McAuliffe, O., Sangrador-Vegas, A., Slattery, L., Fitzgerald, G.F., Beresford, T., Ross, R.P. 2008. Genome Sequence of *Lactobacillus helveticus*, An Organism Distinguished by Selective Gene Loss and Insertion Sequence Element Expansion. *Journal of Bacteriology*, 190: 727-735.
- Casalta, E., Montel, M.C. 2008. Safety Assessment of Dairy Microorganisms: The *Lactococcus* Genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126; 271-273.
- Chen, H., Hoover, D.G. 2003: Bacteriocins and Their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 82-100.

- Coorevits, A., D Jonghe, V., Vandroemme, J., Reakmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P., Heyndriks, M. Syst Appl Microbiology 2008 Jun; 31(2) : 126-40 . Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788.
- Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Grazia, L. 1997. Survey of Lactic Acid Bacteria Isolated during the Advanced Stages of the Ripening of Parmigiano Reggiano Cheese. *Journal of Dairy Research*, 64: 305-310.
- Deegan L.H., Cotter P.D., Colin H., Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. *International Dairy Journal*, 16: 1058-1071.
- Devriese, L.A, Pot, B., Collins, M.D. 1993. Phenotypic Identification of the Genus *Enterococcus* and Different of Phylogenetically Distinct Enterococcal Species and Species Groups. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 399-408.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. 1996. Applications of The Bacteriocin, Nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 193-202.
- Döderlein, A. 1892. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. (The Vaginal Transsudate and its Significance for Childbed fever.) *Centralblatt für Bacteriologie* 11:699-700 (in German).
- Driessen, A. J., van der Hooven, H. W., Kuiper, W., van de Kamp, M., Sahl, H.G., Konings, R.N., Konings, W.N. 1995. Mechanistic Studies of Lantibiotic Induced Permeabilization of Phospholipid Vesicles. *Biochemistry*, 34: 1606-1614.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J. 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1628-1635.
- Ennahar, S., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 1999. Class IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Antibacterial Activity and Food Preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87: 705-716.
- FAO/WHO. 2001. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. FAO of the UN and WHO Expert Consultation Report, Cordoba.
- Farrow, J.A.E., Collins, M.D. 1984. DNA Base Composition, DNA-DNA Homology and Long-Chain Fatty Acid Studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*, 130: 357-362.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Foschino, R., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L., Manachini, P.L. 2007. Phenotypic Typing, Technological Properties and Safety Aspects of *Lactococcus garvieae* strains from Dairy Environments. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 445-453.

- Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Microbiology*, 66:365-378.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N. 2007. Bacteriocin-Based Strategies for Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 51-70.
- Galvez, A., Lucas Lopez, R., Abriouel, H. 2008. Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 28: 125-152.
- Gaya, P., Babin, M., Medina, M., Nunez, M. 2001. Diversity Among Lactococci Isolated from Ewes' Raw Milk and Cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 849-855.
- Giraffa, G. 2003. Functionality of Enterococci in Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 215-22.
- Gurses, M., Erdogan, A. 2006. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Tulum Cheese During Ripening Period, *International Journal of Food Properties*, 9:3:551-557.
- Gürsoy, A. Süt Kimyası ve Biyokimyası. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008 Erzurum, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 37*, s: 759-760.
- Hammami, R., Zouhir, A., Ben Hamida, J., Fliss, I. 2007. BACTIBASE: a New Web-Accessible Database for Bacteriocin Characterization. *BMC Microbiology*, 17;7:89.
- Heng, N.C.K., Tagg, J.R. 2006. What's in a Name? Class Distinction for Bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4.
- Henri-Dubernet, S., Desmaures, N., Gueguen, M. 2008. Diversity and Dynamics of Lactobacilli Populations During Ripening of RDO Camembert Cheese. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 218-228.
- Herreros, M.A., Sandoval, H., González, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. 2005. Antimicrobial Activity and Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Armada Cheese (a Spanish Goats' Milkcheese). *Food Microbiology*, 22: 455-459.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganisms in Food and Nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl): 365S-373S.
- Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H.R., Mattick, A.T.R. 1951. A Note on the Inhibition of an Anaerobic Spore Former in Swiss-Type Cheese by A Nisin-Producing *Streptococcus*. *Journal of Dairy Research*, 18: 205-206.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*, 59: 171-200.

- Jin, Y.L., Ai, H.L., Cheng, J., Wu, M.Y. 2009. First Description of a Novel *Weissella* Species As An Opportunistic Pathogen for Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology* 136: 314-320.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49: 209-224.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39-86.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M., Siezen, R. 2002. Discovering Lactic Acid Bacteria by Genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82: 29-58.
- Khalid, K. 2011. An Overview of Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Biosciences*. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 1: 1-13.
- Kılıç, S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:542, 1. Baskı, 451s, İzmir.
- Kırmacı, H.A. Özer, B.H., Akçelik, M., Akçelik, N. 2016. Identification and Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Urfa Cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 69: 301-307.
- Kiernan, R.C., Beresford, T.P., O'Cuinn, G., Jordan, K.N. 2000. Autolysis of Lactobacilli During Cheddar Cheese Ripening. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 39: 95-106.
- Krieg, N.R., Holt, J.G., 1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1043-1234 s.
- 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. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16: 77-83.
- Landman, D., Quale, J.M. 1997. Management of Infections Due to Resistant *Enterococci* : A Review of Therapeutic Options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 161-170.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. (Editörler: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. Wiley, Chichester) , s.115-175

- Leroy, F, De Vuyst, L. 2004. Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry. *Trends in Food Science and Technology* 15, 67-78.
- Liu, W., Hansen, J.N. 1990 . Some Chemical and Physical Properties of Nisin, a Small-Protein Antibiotic Produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2551- 2558.
- Looper, M. 2014. Factors Affecting Milk Composition of Lactating Cows. Agriculture and Natural Resources, Department of Agriculture Research and Extension, University of Arkansas System. <http://www.uaex.edu/publications/pdf/fsa-4014.pdf> retrieved on 1/9/2014.
- Lortal, S., Chapot-Chartier, M.P. 2005. Role, Mechanisms and Control of Lactic Acid Bacteria Lysis in Cheese. *International Dairy Journal*, 15: 857-871.
- Martinez-Cuesta, M., Requena, T., Pelaez, C. 2001. Use of a Bacteriocin-Producing Transconjugant as Starter in Acceleration of Cheese Ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 70: 79-88.
- Masoud, W., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Al-Soud, W.A., Sorensen, S.J., Jakobsen, M. 2012. The Fate of Indigenous Microbiota, Starter Cultures, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* in Danish Raw Milk and Cheeses Determined by Pyrosequencing and Quantitative Real Time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 192-202
- Metin, M. 1998. Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları No: 33, İzmir. 388, 632-654 s.
- Moraes P.M., Perin, L.M., Todorov, S.D., Silva, A. Jr., Franco, B.D., Nero, L.A. 2012. Bacteriocinogenic and Virulence Potential of *Enterococcus* Isolates Obtained from Raw Milk and Cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 113:318-328.
- Nagao J., Asaduzzaman S.M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., Sonomoto, K. 2006. Lantibiotics: *Insight and Foresight for New Paradigm*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102:139-49.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. 1996. Biosynthesis of Bacteriocins in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70: 113-128.
- Nishie, M., Nagao, J., Sonomoto, K. 2012. Antibacterial Peptides "Bacteriocins": An Overview of Their Diverse Characteristics and Applications. *Biocontrol Science*, 17: 1-16.
- Orla-Jensen, S. 1919. The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen: Anhr Fred Host and Son.
- Ortolani, M.B., Moraes, P.M., Perin, L.M., Viçosa, G.N., Carvalho, K.G., Silva Júnior, A., Nero, L.A. 2010. Molecular Identification of Naturally Occurring Bacteriocinogenic and Bacteriocinogenic-like Lactic Acid Bacteria in Raw Milk and Soft Cheese. *Journal of Dairy Science*, 93: 2880-2886.

- Perin L.M., Miranda, R.O., Todorov, S.D., Franco, B.D., Nero, L.A. 2014a. Virulence, Antibiotic Resistance and Biogenic Amines of Bacteriocinogenic Lactococci and Enterococci Isolated from Goat Milk. *International Journal of Food Microbiology*, 18: 121-126.
- Perin, L.M., Nero, L.A.. 2014b. Antagonistic Lactic Acid Bacteria Isolated From Goat Milk and Identification of A Novel Nisin Variant *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiology* 14:36.
- Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R. 2007. The Genomics of Lactic Acid Bacteria. *Trends in Microbiology*, 15: 546-553.
- Pucci, M.J., Vedamuthu, R.E.R., Kunka, B.S., Vandenberg, P.A. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Using Bacteriocin PA-1 Produced by *Pediococcus acidilactici* PAC11.0. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2349-2353.
- Quigley, L., O' Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. 2013. The Complex Microbiota of Raw Milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37: 664-698.
- Rajagopal, S.N., Sandine, W. E. 1990. Associative Growth and Proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in Skim Milk. *Journal of Dairy Science*, 73: 894-899.
- Ray, B., Miller, W. 2003. Bacteriocins Other Than Nisin: Pediosin-Like Cystobiotics of Lactic Acid Bacteria. Chapter 4 in *Natural Antimicrobials for The Minimal Processing of Foods* Edited by Sibel Roller. 306 s.
- Robinson, R. K. 1999. Fermented Milks/Yoghurt. (Editörler: Robinson R.K., Batt, C.A., Patel, P.D.) *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London. 784-791 s.
- Rodriguez, E., Gonzalez, B., Gaya, P., Nunez, M., Medina, M. 2000. Diversity of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Milk. *International Dairy Journal*, 10: 7-15.
- Romano, A.H., Eberhard, S.J., Dingle, S.L., McDowell, T.D. 1970. Distribution of the Phosphoenolpyruvate: Glucose Phosphotransferase System in Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 104:808-813.
- Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S., Ryan, M., Twomey, D. P., Meaney, W. J., Hill, C. 1999. Developing Applications for Lactococcal Bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 337-346.
- Ruhr, E., Sahl, H.G. 1985. Mode of Action of the Peptide Antibiotic Nisin and Influence on the Membrane Potential of Whole Cells and on Cytoplasmic and Artificial Membrane Vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, 841-845.
- Salminen S., Wright von, A. 1993. *Lactic Acid Bacteria*, 270 Madison Avenue, New York 1001, USA.

- Schillinger, U., Lucke, F.K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1901-1906.
- Silvetti, T., Morandi, S., Brasca, M. 2014. Biopreservation Potential of *Enterococcus faecalis* Isolated From Italian Traditional Raw Milk Cheeses. *CyTA-Journal of Food*, 12: 210-217.
- Şimşek, O., Bilgin, B. 1996. Gıda Sanayinde Kullanılan Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturdukları Antibiyotiklerin Biyokimyasal ve Genetik özellikleri. *Standart*, 409: 89-96.
- Smit, G., Vlieg, J.H., Smit, B.A., Ayad, E.H.E. 2002. Fermentative Formation of Flavour Compounds by Lactic Acid Bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57 (2): 61-68.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. 2005. Flavour Formation by Lactic Acid Bacteria and Biochemical Flavour Profiling of Cheese Products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 591-610.
- Stiles, M.E., Holzaphel, W.H. 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40: 722-756.
- Tserovska, L., Stefanova S., Yordanovu T. 2002. Identification of Lactic Acid Bacteria isolated From Katyk, Goat Milk and Cheese. *Journal of Culture Collections*, 3: 48-52.
- Vendrell, D., Balcazar, J.L., Ruiz-Zarzuola, I., de Blas, I., Girones, O., Muzquiz, J.L. 2006. *Lactococcus garvieae* in Fish: A Review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29: 177-198.
- Weinbrenner, D.R., Barefoot, S.F., Grinstead, D.A. 1997. Inhibition of Yogurt Starter Cultures by Jensenin G, a *Propionibacterium* Bacteriocin. *Journal of Dairy Science*, 80: 1246-1253.
- Widyastuti, Y., Rohmatussolihat, Febrisiantosa, A. 2014. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 5:435-442.
- White, D., Drummond, J.T., Fuqua, C. 2007. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. New York: Oxford University Press.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevcihan İRAK  
Uyruđu : T.C  
Dođum Tarihi / Yeri : 10.10.1992-Gaziantep  
Ünvanı : Biyolog  
e-posta : Sevcihan27\_@hotmail.com

### Eđitim

Derece	Eđitim	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ, Biyoloji Bölümü	2017
Lisans	KSÜ, Biyoloji Bölümü	2014
Lise	İsmet Paşa Lisesi	2010
İlkokul-Ortaokul	Namık Kemal İ.Ö.O	2006

### Yayınlar

1. Taş, S., Yıldırım, Y. Sır Barajı ve Çevresinden Alınan Örneklerden Gram Negatif Bakterilerin İzolasyonu ve Elde Edilen İzolatların Beta-Laktam Antibiyotiklere Dirençliliklerinin Ölçülmesi. 2014. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Lisans Tezi. Kahramanmaraş.
2. Büyükünäl, E.B., Taş, S. Surveillance of Aflatoxin M1 in Raw Milk Samples from Southern Turkey. 2. International Congress of Forensic Toxicology 26-30 May 2016-Ankara.
3. Büyükünäl, E.B., Taş, S. Çiğ Süt Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyoosin Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Bakteriyosinogenik İzolatların ERIC-PCR Analizi. 23. Ulusal Biyoloji Kongresi 05-09 Eylül. 2016 - Gaziantep.

4. Büyükünal, E.B., Taş, S. Recent Develepments on Genomics of Lactic Acid Bacteria. International DNA Day and Genome Congress 24-28 April 2017-Kırşehir.
5. Büyükünal, E.B., Taş, S. Microbial Composition of Raw Milk as Detected by Culture Depentent and Culture Independent Methods. International DNA Day and Genome Congress 24-28 April 2017 - Kırşehir.
6. E.B. Buyukunal, Tas, S. 2017. Gram Negative Bacterial Diversity and Antimicrobial Resistance Profiles in Heavily Polluted Environmental Samples around The Sır Dam Lake (Turkey). Microbiology Research Journal International, 19(5): 1-10.

### **Bilgisayar Bilgisi**

Microsoft Programları (Word, Excel, Power Point) , SAP.

### **Sertifikalar**

MEB'den Onaylı İngilizce Sertifikası