

**T.C.**  
**GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YÖRESEL BİR GIDADAN İZOLE EDİLEN BAKTERİYOSİN ÜRETEN  
BAKTERİNİN TEŞHİSİ VE BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan: Didem ASUTAY**  
**Danışman: Doç.Dr. Zeliha YILDIRIM**

**TOKAT-2007**

**T.C.**  
**GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YÖRESEL BİR GIDADAN İZOLE EDİLEN BAKTERİYOSİN ÜRETEN  
BAKTERİNİN TEŞHİSİ VE BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan: Didem ASUTAY**  
**Danışman: Doç. Dr. Zeliha YILDIRIM**

**TOKAT-2007**

**Bu tez Devlet Planlama Deşkilatı (DTP) (Proje No: 2002K120270) tarafından desteklenmiştir.**

**TOKAT 2007**

**YÖRESEL BİR GIDADAN İZOLE EDİLEN BAKTERİYOSİN ÜRETEN  
BAKTERİNİN TEŞHİSİ VE BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU**

**Didem ASUTAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**TOKAT-2007**

T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖRESEL BİR GİDADAN İZOLE EDİLEN BAKTERİYOSİN ÜRETEN  
BAKTERİNİN TEŞHİSİ VE BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU

Didem ASUTAY  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14/02/2007 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Unvan, Adı ve Soyadı**

**İmza**

- |           |                            |
|-----------|----------------------------|
| 1. Başkan | : Prof. Dr. Metin YILDIRIM |
| 2. Üye    | : Doç. Dr. Zeliha YILDIRIM |
| 3. Üye    | : Y. Doç. Dr. Canan USTA   |

**ONAY:**

Bu tez .../.../2007 tarih ve ..... sayılı Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen jüri üyelerince kabul edilmiştir.

14/02/07

Prof. Dr. Metin YILDIRIM  
Enstitü Müdürü

**ÖZET****YÖRESEL BİR GIDADAN İZOLE EDİLEN BAKTERİYOSİN ÜRETEN  
BAKTERİNİN TEŞHİSİ VE BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU****Didem ASUTAY****Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı****Yüksek Lisans Tezi  
2007, 75 sayfa****Danışman: Doç. Dr. Zeliha YILDIRIM****Jüri: Prof. Dr. Metin YILDIRIM****Jüri: Doç Dr. Zeliha YILDIRIM****Jüri: Y.Doç.Dr. Canan USTA**

Bu çalışmada bozadan izole edilen bakterinin tanısı yapılmış ve bu bakterinin ürettiği antimikrobiyal bileşimin fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri belirlenmiştir.

İzole edilen bakteri genel mikrobiyolojik analizler, karbonhidrat fermantasyon ve yağ asidi profili testleri kullanılarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal bileşimin inhibitör aktivitesi üzerine enzimlerin, pH'nın, ısıl işlemin, depolama koşullarının, bazı organik çözücülerin, deterjanların ve kimyasalların etkisi belirlenmiştir. İnhibitör maddenin antimikrobiyal spektrumu, üretimini etkileyen faktörler (besiyerinin başlangıç pH'sı, inokülüm miktarı, inkübasyon sıcaklığı, gelişme fazı ve farklı besiyerleri) incelenmiştir. Molekül ağırlığı ise trisin-SDS-PAGE ile saptanmıştır.

İzole edilen bakterinin Gram-pozitif, kok şeklinde, hareketli, endospor, katalaz, jelatinaz, indol ve Voges Proskauer negatif, zayıf alfa-hemoliz pozitif, % 3,0-4,0 NaCl konsantrasyonunda, pH 4,5-9,6 ve 10-45°C'de gelişebildiği gözlenmiştir. Karbonhidrat fermantasyonu ile yağ asidi profili analizi sonucunda bakterinin *L. lactis* spp. *lactis* olduğu belirlenmiştir. İnhibitör maddenin papain, pepsin, tripsin ve β-merkaptetanole karşı duyarlı, ancak pankreatin, katalaz, amilaz ve lipaz enzimlerine, organik çözücülere (etanol,

metanol, hekzan, klorofom, aseton, etil eter, isopropil alkol, formaldehit), deterjanlara (SDS, üre, tween 80, triton X-100) ve EDTA'ya karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar bileşiğin bir bakteriyosin olduğunu ortaya koymuş ve laktokosin BO olarak isimlendirilmiştir. Laktokosin BO'nun antimikrobiyal spektrumunun geniş olduğu ve birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif patojen bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Laktokosin BO'nun yüksek ısı işleme dayanıklı (90°C'de 30 dk), asidik ve nötral pH'lara (pH 2,0-9,0) karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Liyofilize formda -20 ve -80°C'de 3 ay, konsantre formda ise -80°C'de 2 ay depolama sürecinde aktivitesini koruduğu saptanmıştır. Besiyeri MRS broth, inokülüm miktarı % 0,1, besiyeri başlangıç pH'sı 6,0-7,0 ve inkübasyon sıcaklığı 25°C olduğu zaman laktokosin BO'nun maksimum düzeyde üretildiği belirlenmiştir. Laktokosin BO'nun logaritmik gelişme fazında üretilmeye başlandığı ve durgun fazın başında üretiminin maksimum düzeye ulaştığı gözlenmiştir. Laktokosin BO'nun molekül ağırlığının yaklaşık 5500 Da olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *L. lactis* spp. *lactis*, laktokosin BO, fiziko-kimyasal özellikler, antimikrobiyal spektrumu, moleküler ağırlığı

**ABSTRACT**

**IDENTIFICATION OF A BACTERIOCIN PRODUCING BACTERIUM  
ISOLATED FROM A TRADITIONAL PRODUCT AND CHARACTERIZATION  
OF ITS BACTERIOCIN**

**Didem ASUTAY**

**Gaziosmanpaşa University  
Graduate School of Natural and Applied Science  
Department of Food Engineering**

**Masters Thesis  
2007, 75 page**

**Supervisor: Assoc. Prof. Zeliha YILDIRIM**

**Jury: Prof. Dr. Metin YILDIRIM**

**Jury: Assoc. Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM**

**Jury: Assist. Prof. Dr. Canan USTA**

In this study, a bacterium isolated from boza was identified, and the physical, chemical and microbiological properties of the inhibitory compound produced by this bacteria were characterized.

The isolated bacterium was identified using general microbiological analysis, carbohydrate fermentation and fatty acid profile identification systems. The effects of enzymes, pH, heat treatment, storage conditions, some organic solvents, detergents and chemicals on the inhibitory activity of the compound were determined. Antimicrobial spectrum of the inhibitor compound and factors affecting its production (initial pH of medium, amount of inoculum, incubation temperature, growth phase and different medium) were analysed. Its molecular weight was determined by tricine-SDS-PAGE

The isolated bacterium was Gram positive, coccus, non-motile, endospore, catalase, gelatinase, indole and Voges-Proskauer negative, weakly alpha-hemolyse positive, and able to grow in the presence of 3,0-4,0 % NaCl, and at pH 4.0 to 9.6 and 10-45°C. Based on

carbohydrate fermentation and fatty acid profile identification systems, the bacterium was identified as *L. lactis* spp. *lactis* BO. It was determined that its antimicrobial compound was sensitive to papain, pepsin, trypsin and  $\beta$ -mercaptoethanol, but resistant to pancreatine, catalase, amylase and lipase enzymes, and organic solvents (ethanol, methanol, hexane, chloroform, acetone, ethyl ether, isopropilalcohole, formaldehyde), detergents (SDS, urea, Tween 80, Triton X-100) and EDTA. These results show that this compound is a bacteriocin and named as lactococcin BO. Lactococcin BO has a wide inhibitory spectrum since it was active against several Gram-positive and Gram-negative foodborne pathogens and food spoilage bacteria. Lactococcin BO maintained its activity after high heat treatment (90°C/30 min), at acidic and neutral pH's (2,0-9,0), and after storage at (-20)-(-80)°C for 3 months in the lyophilized form and at -80°C for 2 months in the concentrated form. It was observed that lactococcin BO was produced maximum level when MRS broth was used as a medium, and inoculum amount 0.1 %, initial pH of medium 6,0-7,0 and incubation temperature 25°C. Lactococcin BO began to produce during the logarithmic phase of *L. lactis* spp. *lactis* BO and its production reached maximum level at the beginning of stationary phase. It was found that molecular weight of lactococcin BO was about 5500 Da.

**Key Words:** *L. lactis* spp. *lactis*, lactococcin BO, physico-chemical properties, antimicrobial spectrum, molecular weight

## TEŞEKKÜR

Tezimin konusunu belirleyip bana yol gösteren, bilgilerinden ve deneyimlerinden tezimin her aşamasında faydalandığım değerli hocam Sayın Doç.Dr. Zeliha YILDIRIM'a, değerli bilgilerinden ve desteğinden dolayı Sayın Prof. Dr. Metin YILDIRIM hocam; bizlere uygun çalışma ortamı hazırlayan başta rektörümüz Sayın Prof. Dr. Zehra SEYFİKLİ'ye, Bölüm başkanımız Prof. Dr. Metin YILDIRIM'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında laboratuvarımızda gösterdiği yardımlaşma ve dayanışmadan ötürü Hilal İŞLEROĞLU'na teşekkür ederim.

İyi bir öğrenim görmem için imkanlar sağlayan, bana her zaman güvenen ve destek olan annem Beyhan ASUTAY'a ve babam Pehlül ASUTAY'a ve her zaman yanımda olan ablam Figen ASUTAY ve kardeşim Sinem ASUTAY'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÇİZELGELAR LİSTESİ .....	1
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	2
1.GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	2
2.1. Bakteriyosinlerin Tarihçesi ve Tanımı .....	2
2.2. Laktik Asit Bakterileri .....	2
2.2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	2
2.2.2. LAB'lerinden Laktokokların Genel Karakteristik Özellikleri.....	3
2.3. LAB Bakteriyosinleri .....	5
2.3.1. Sınıflandırılması.....	5
2.3.2. Biyosentezleri.....	8
2.3.3. Antimikrobiyal Etki Mekanizması.....	11
2.3.4. Antimikrobiyal Etki Spektrumları.....	13
2.3.5. Bakteriyosinlerin Üretimi, Antimikrobiyal Aktiviteleri ve Stabilitelelerini Etkileyen Faktörler .....	17
2.3.6. Bakteriyosinlerin Saflaştırılması.....	23
2.3.7. Uygulama Alanları .....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Gıda Örnekleri.....	27
3.1.2. Bakteri Kültürleri ve Besiyerleri.....	27
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Bakteri Kültürlerinin İzolasyon İçin Hazırlanması.....	28
3.2.2. Bakteri Kültürlerinin İzolasyonu.....	28
3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Testleri .....	28
3.2.4. Bakteriyosin Üreten Bakterinin İzolasyonu ve Tanısı.....	29
3.2.4.1. Gram ve Spor Boyama.....	29
3.2.4.2. Voges-Proskauer ve İndol Testi.....	30
3.2.4.3. Hemoliz ve Katalaz Testi.....	30
3.2.4.4. Jelatin Hidrolizi Testi.....	31
3.2.4.5. Farklı Sıcaklıklarda ve Farklı pH' larda Gelişme Testi.....	31
3.2.4.6. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Durumu.....	32
3.2.4.7. Hareketlilik Testi.....	32
3.2.4.8. Glikoz Broth Besiyerinde ve Sütte Asit Üretimi.....	32
3.2.4.9. Karbonhidrat Fermantasyon ve Yağ Asidi Profili Testleri.....	33
3.2.5. Bakteriyosinin Karakterize Edilmesi.....	33
3.2.5.1. Kaba Bakteriyosin Hazırlanması.....	33
3.2.5.2. Bakteriyosinin Antimikrobiyal Aktivitesi ve Spektrumu.....	33
3.2.5.3. Enzimlerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi.....	34
3.2.5.4. Bakteriyosin Aktivitesine Isıl İşlemin Etkisi.....	35
3.2.5.5. Bakteriyosin Aktivitesine pH'nın Etkisi.....	35
3.2.5.6. Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi.....	35

3.2.5.7. Bazı Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi.....	36
3.2.5.8. Bazı Deterjanların ve Kimyasal Maddelerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi.....	36
3.2.6. Bakteriyosin Üretimine Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi.....	37
3.2.6.1. Bakteriyosin Üretimine İnokülüm Miktarının Etkisi.....	37
3.2.6.2. Bakterinin Gelişme Sıcaklığının ve Gelişme Fazının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi.....	37
3.2.6.3. Başlangıç pH'sının Bakteriyosin Üretimine Etkisi.....	37
3.2.6.4. Farklı Besiyerlerinin Bakteriyosin Üretimine Etkisi.....	38
3.2.7. Bakteriyosinin Kısmen Saflaştırılması.....	38
3.2.8. Bakteriyosinin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi.....	38
3.2.9. İstatiksel Değerlendirme.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	40
4.1. Bakteriyosin Üreten Bakterinin İzole ve Teşhis Edilmesi.....	40
4.2. Bakteriyosinin Antimikrobiyal Aktivitesi ve Spektrumu.....	43
4.3. Enzimlerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi.....	46
4.4. Bakteriyosin Aktivitesine Isıl İşlemin Etkisi.....	47
4.5. Bakteriyosin Aktivitesine pH'nın Etkisi.....	48
4.6. Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi.....	49
4.7. Bazı Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi.....	51
4.8. Bazı Deterjanların ve Kimyasal Maddelerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi.....	52
4.9. Bakterinin Gelişme Sıcaklığının ve Gelişme Fazının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi.....	54
4.10. Bakteriyosin Üretimine Farklı Besiyerlerinin, İnokülüm Miktarının ve Başlangıç pH'sının Etkisi.....	56
4.11. Bakteriyosinin Molekül Ağırlığı.....	59
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	64

**ÇİZELGELER LİSTESİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Çizelge 2.1. Laktokok türlerinin karakteristik özellikleri.....	5
Çizelge 2.2. Bazı Bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar.....	7
Çizelge 2.3. Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri.....	26
Çizelge 4.1. Antibakteriyel aktiviteye sahip bakterinin bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	41
Çizelge 4.2. İnhibitör aktiviteye sahip koloninin karbonhidrat fermantasyon profili.....	42
Çizelge 4.3. İnhibitör aktiviteye sahip koloninin yağ asidi profili.....	43
Çizelge 4.4. Laktokoksin BO'nun antimikrobiyal etki spektrumu (n=4).....	45
Çizelge 4.5. Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine farklı enzimlerin etkisi (n=4).....	47
Çizelge 4.6. Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi (n=4).....	52
Çizelge 4.7. Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine bazı deterjan ve kimyasalların etkisi (n=4).....	53

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 2.1. Lantibiyotiklerin (A) ve Sınıf II ve III bakteriyosinlerin (B) biyosentezi.....	10
Şekil 2.2. Bakteriyosinlerin biyosentezleri.....	10
Şekil 2.3. Barrel- stave mekanizması ile por oluşumu.....	12
Şekil 2.4. Wedge modeli ile hücre membranında por oluşumu.....	14
Şekil 2.5. Lipit II modeli ile hücre membranında por oluşumu.....	14
Şekil 4.1. Amonyum sülfatla kısmi saflaştırılmış bakteriyosin örneğinin <i>Lb. plantarum</i> ' a karşı inhibitör aktivitesi.....	43
Şekil 4.2. Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine ısı işlemin etkisi (n=4).....	48
Şekil 4.3. Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine pH'nın etkisi (n=4).....	49
Şekil 4.4. Liyofilize laktokoksin BO'nun depolama stabilitesi (n=4).....	50
Şekil 4.5. Konsantre laktokoksin BO'nun depolama stabilitesi (n=4).....	51
Şekil 4.6. Farklı gelişme sıcaklıkları ve gelişme fazının laktokoksin BO üretimi ve aktivitesi üzerine etkisi (n=4).....	55
Şekil 4.7. Farklı besiyerlerin laktokoksin BO'nun üretimi üzerine etkisi (n=4).....	57
Şekil 4.8. Besiyeri başlangıç pH'sının laktokoksin BO'nun üretimi üzerine etkisi (n=4).....	58
Şekil 4.9. Laktokoksin BO'nun <i>Lb. plantarum</i> 'a karşı inhibitör etkisini gösteren trisin-SDS-PAGE jeli.....	60

## 1.GİRİŞ

Bakteriyosinler, protein yapısında olan ve bakteriler tarafından üretilen antibakteriyel bileşiklerdir (Jack et al., 1995). Bu maddeler, taksonomik olarak kendilerine yakın bakteriler üzerinde olabildikleri gibi, gıdalarda bozulmalara yol açan ve patojen olan bazı bakteriler üzerinde de bakterisit veya bakteriyostatik bir etki göstermektedir. Genellikle yüksek ısı stabilitesine sahip olan, asidik ve nötral pH değerlerinde aktivitelerini koruyan ve sindirim sistemi orjinli proteolitik enzimlerle parçalanabilmesi bakteriyosinlerin potansiyel gıda koruyucuları olarak önem kazanmasına yol açmıştır (Klaenhammer, 1993).

Laktik asit bakterileri (LAB) gıda fermantasyon proseslerinde önemli rol oynarlar. Antimikrobiyal etkileri ürettikleri organik asit (laktik, asetik asit vb.), hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal peptitlerden kaynaklanmaktadır (Zhennai, 2000).

Kullanımına yasal açıdan bir gıda katkı maddesi olarak izin verilen ilk bakteriyosin *Lactococcus lactis* spp. *lactis* tarafından üretilen nisindir (FDA, 1988). Nisin ilk kez İngiltere’de bir gıda koruyucusu olarak kabul edilmiş ve krem peynirlerde kullanımına izin verilmiştir. Bugün yaklaşık 50 ülkede sağlık açısından güvenli bir gıda koruyucusu olarak kabul edilmiş ve birçok gıda çeşidinde kullanılmaktadır (Cheen and Hoover, 2003).

Bu çalışmada yöresel bir gıda ürünü olan bozadan farklı bakteriler üzerine inhibitör etkisi olduğu belirlenen bir bakteri izole edilmiştir. Araştırmanın amaçları (i) izole edilen bakterinin tanımlaması, (ii) izolatin ürettiği inhibitör maddenin fiziko-kimyasal özelliklerinin (pH’ya, ısıl işleme, enzimlere, depolama koşullarına, bazı organik çözücülere, deterjanlara ve kimyasallara karşı duyarlılığı), (iii) antimikrobiyal spektrumunun (iv) üretimini etkileyen faktörlerin (besiyerin başlangıç pH’sı, inokulum miktarı, inkübasyon sıcaklığı, gelişme fazı, besiyeri bileşimi) ve (v) molekül ağırlığının belirlenmesidir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Bakteriyosinlerin Tarihçesi Ve Tanımı

1925 yılında ilk kez Gratia, *E. coli* V tarafından *E. coli*'nin gelişimini inhibe eden bir antibiyotik madde ürettiğini bildirmiştir. Bu antimikrobiyal madde büyük moleküler ağırlığa sahip bir protein olarak tanımlanmış ve kolisin olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 17 kadar kolisinin farklı *E. coli* türleri tarafından üretildiği bulunmuştur. 1953 yılında Jakob et al. tarafından bakteriyosinin tanımı yapılmıştır. Bu tanım farklı türler arası antagonostik ilişkiler ve kolisin proteinlerini kapsamaktaydı. Daha sonra yapılan çalışmalarda buna benzer çok fazla madde bulununca terimin kapsamı genişletilmiştir. Pasteur ve Joubert (1877) farklı bakteriler arasında antagonostik ilişkileri ilk kez, idrarda bulunan bazı bakterilerin *Bacillus anthracis*'e karşı inhibitör etkiye sahip olduklarını ortaya koymuşlardır. Tagg et al. (1976)'un yaptıkları tanıma göre bakteriyosinler, duyarlı bakteriler üzerinde bakterisit etkisi yaratan, protein yapısında makromoleküllerdir. Klaenhammer (1988) tarafından yapılan tanıma göre de, bakteriyosinler, genellikle üretici mikroorganizma ile yakın akrabalığı olan bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip protein veya protein kompleksleridir. Bakteriyosinler biyokimyasal özellikleri, molekül ağırlıkları, etki spektrumları, etki mekanizmaları ve genetik dayanakları bakımından heterojen büyük bir sınıf oluştururlar.

### 2.2. Laktik Asit Bakterileri

#### 2.2.1. Laktik Asit Bakterileri

Gıdalarda laktik asit bakterilerinin (LAB) fonksiyonları bilim adamlarının dikkatini çekmiş ve 1857'de Louis Pasteur tarafından laktik asit fermentasyonunu gerçekleştirdikleri ortaya konmuştur (Kleerebezem and Mierau, 2005).

LAB'nin sınıflandırılması 1919'da Orla-Jensen tarafından morfolojik, metabolik ve fizyolojik kriterleri dikkate alınarak yapılmış ve LAB'leri Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, çubuk ve kok şeklinde, karbonhidratları ve yüksek alkollerini enerji kaynağı olarak kullanarak laktik asit oluşturan mikroorganizmalar şeklinde tanımlanmışlardır.

LAB farklı ekosistemlerde ve yaygın olarak gıdalar (süt ürünleri, fermente et ve sebzeler, silaj), bitkiler, insan ve hayvanların genital ve intestinal sistemlerinde bulunmaktadır. LAB'nin sınıflandırılması morfolojik ve fizyolojik özelliklere dayanmaktadır. Bunun yanında 16S rRNA analiz ve sekansı, DNA-DNA hibridizasyon, DNA'nın G+S oranı gibi moleküler karakteristikleri de dikkate alınmaktadır (Salama et al., 1995; Axelsson, 1998; Työppönen et al., 2003).

Günümüzde gıda ile ilişkisi bulunan LAB, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* gibi cinslerin türlerini içine almaktadır (Stiles et al., 1997). LAB "food-grade" organizmalar olarak kabul edilirler ve koruyucu kültürlerin özelliklerini taşırlar. Organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil, reuterin ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal olarak aktif metabolitlerin biri veya birkaçının üretimi ile diğer mikroorganizmaları inhibe ederek antagonistik etki gösterirler (Axelsson, 1998; Työppönen et al., 2003; Devlieghere et al., 2004).

### **2.2.2. LAB'lerinden Laktokokların Genel Karakteristik Özellikleri**

LAB'leri içerisinde yer alan laktokoklar, starter kültür olarak fermente süt ürünlerinde yıllardır kullanılmaktadır. Laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmaktadırlar. Ayrıca kazeini hidroliz (proteolitik aktivite) etme ve bakteriyosin üretme aktivitesine de sahiptirler.

Bugüne dek söz konusu bakteri grubunun kronik yada enfeksiyöz tipte hastalık etmeni üyesi tanımlanmamıştır. Endüstriyel önemleri nedeniyle biyokimyasal ve genetik araştırmaların odağı haline gelen laktokok türleri evrimsel pozisyonları ile patojenik cinslerden ayrılmaktadır (Erlandson and Batt, 1997).

*Lactococcus* cinsi, *L. lactis*, *L. raffinolactis*, *L. garvieae*, *L. piscium* ve *L. plantarum* olmak üzere 5 türe sahiptir ve Streptococcaceae familyası içinde bulunmaktadır. *Lactococcus* cinsi içinde *L. raffinolactis*, *L. piscium*, *L. plantarum* ve *L. garvieae* türleri yaygın olmamasına karşın *L. lactis* büyük ekonomik öneme sahip tür olmuştur (Samarzija et al., 2001; Sakala et al., 2002).

Bütün türlerin gram pozitif, hareketsiz, aerotolerant, fakültatif anaerob ve kemoorganotrofik özellikte olduğu belirlenmiştir. Spor ve kapsül oluşturmeyen bu bakteriler, “hem” bağlı katalaz enzim sistemleri içermezler. Bu türler mannitol ve laktozdan asit üretim yetenekleri ile farklılık gösterirler. Laktozu fermente etme yetenekleri özellikle süt ürünleri üretiminde kullanılan türler için önemli bir özelliktir (Çizelge 2.1)(Samarzija et al., 2001).

Gelişmeleri için başta azot kaynakları olmak üzere çok sayıda besin maddesine gereksinim duyarlar. Laktokoklar, hemolitik reaksiyon göstermemektedirler. Yalnız bazı *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının zayıf  $\alpha$ -hemoliz yeteneğinde oldukları bulunmuştur. Bazı nadir suşlar hariç, tümü N grup antijen içermektedirler. Homofermentatif özellikte olup başlıca son ürün olarak L (+) laktik asit ve aroma maddeleri üretmektedirler. Gelişmeleri için başta azot kaynakları olmak üzere çok sayıda besin maddesine gereksinim duyarlar. Laktokokların optimum gelişme sıcaklıkları 30°C’dir. 10°C’nin altında, 45°C ‘nin üzerinde, % 6.5 NaCl içeren ortamlarda ve pH 9.6’da üreme gösterememektedirler. Glikozdan CO<sub>2</sub> oluşturmamaktadırlar. İzolasyon kaynakları süt, süt ürünleri ve bitkisel materyallerdir. *L. lactis* spp. *lactis* sadece bitki materyalleri ve sebzelerden izole edilmiştir. *L. lactis* spp. *lactis* biov.

Çizelge 2.1. Laktokok türlerinin karakteristik özellikleri

Test	<i>L.garvieae</i>	<i>L. lactis</i> spp.			<i>L.piscium</i>	<i>L.plantarum</i>	<i>L.raffinolactis</i>
		<i>cremoris</i>	<i>hordniae</i>	<i>lactis</i>			
40°C'de gelişim	+	-	-	(+)	-	-	-
%4 NaCl'de gelişim	+	-	-	+	ND	+	-
Arjinin hidrolizi	+	-	+	+	-	-	(-)
Laktoz'dan asit	+	+	-	+	+	-	+
Mannitoldan asit	(+)	-	-	(-)	+	+	ND
Raffinozdan asit	-	-	-	-	+	-	+
Pirolidoniariilamidaz	+	-	-	(-)	ND	-	-

+ : Pozitif reaksiyon;

- : Negatif reaksiyon;

ND: Belirlenmedi

*diacetylactis* ve *L. lactis* spp. *cremoris* herhangi bir bitki türünde bulunamamıştır (Mundt, 1986; Salama et al., 1995; Samarzija et al., 2001; Sakala et al., 2002).

Laktokokların (PEP-PTS) sistemlerinden dolayı süt ortamında gelişimleri ve adaptasyonları iyidir. Bu yüzden laktokoklar için en iyi bilinen doğal yetiştirme ortamı süt ve süt ürünleridir (Samarzija et al., 2001).

Laktokoklar bakteriyosin üretme yeteneğindedirler. Laktokok bakteriyosinleri, etki mekanizmaları ve biyokimyasal özellikleri esas alınarak 5 grup altında toplanmaktadır. Bunlar diplokoksinler, laktokoksinler, laktokokal porasyon kompleksleri, laktostrepsinler ve lantibiyotiklerdir (Klaenhammer, 1993). Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlere örnek olarak nisin, laktokoksin R, laktokoksin 140, laktokoksin MMT24 ve laktisin 3147 verilebilir (Parente et al., 1994; Yildirim and Johnson 1998; Hill et al., 1999; Berjeaud et al., 2005).

## 2.3. LAB Bakteriyosinleri

### 2.3.1. Sınıflandırılması

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, doğal olarak mikroorganizmalar tarafından üretilen ve ribozomal olarak sentezlenen, küçük amfifilik, antimikrobiyal peptitlerdir. LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinler 3 ana gruba ayrılmaktadır (Papagianni, 2003; Savadogo et.al., 2006).

Sınıf I bakteriyosinleri (lantibiyotikler), düşük molekül ağırlığına sahip (<5 kDa) membran aktif peptitler olup anormal aminoasitler olan lantionin ve dehidro olmuş aminoasitler içermektedirler (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1993). Lantibiyotikler yapılarına göre 2 alt gruba ayrılmaktadırlar. Tip A lantibiyotikler, lineer, esnek ve pozitif yüke sahip moleküllerdir. 2-5 kDa arasında molekül ağırlığına sahiptirler. *L. lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin bu gruba ait en iyi karakterize edilen lantibiyotiktir. Ayrıca *Staphylococcus gallinarum* tarafından üretilen gallidermin, *Streptococcus salivarius* tarafından üretilen salivarisin A ve *L. lactis* tarafından üretilen laktisin 481 bu gruba örnek olarak verilebilir. Tip B lantibiyotikler globüler yapıda olup yaklaşık 2 kDa molekül ağırlığına sahip yüksüz yada negatif yüklü enzim inhibitörleridir. Tip B lantibiyotiklere mersasidin, aktagardin, ankovenin örnek verilebilir (Papagianni, 2003; Koponen, 2004; Bauer and Dicks, 2005).

Sınıf II bakteriyosinleri, küçük molekül ağırlığına sahip (<10 kDa) olmasına karşı anormal amino asitler içermemekte ve 3 grup altında toplanmaktadır. Grup IIa listeria'ya karşı aktif ve N-terminalinde Try-Gly-Asn-Val-Xaa-Cys amino asit dizisi içermektedir. Örnek olarak pediosin PA-1, sakasin A, sakasin P, leusin A-UAL187, curvasin A ve mesenterisin Y105 verilebilir. Grup IIb bakteriyosinlerinin aktivite gösterebilmesi için iki peptide gereksinim duymaktadır. Laktasin F, laktokoksin G ve M örnek olarak verilebilir. Grup IIc

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

Sınıf III bakteriyosinleri büyük moleküllü (>30 kDa), ısıya dayanıksız proteinlerdir. Helvetisin J, laktosin A ve B, enterosin A bu grup içinde yer almaktadır (Zhennai, 2000). Çizelge 2.2'de farklı sınıflara ait bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar verilmiştir (Chen and Hoover, 2003; Nes and Holo, 2000; Ishizaki et al., 1999).

Çizelge 2.2. Bazı Bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar

Bakteriyosin	Üretici Mikroorganizma
<u>SINIF I</u>	
<u>TipA- lantibiyotik</u>	
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>
Laktosin S	<i>Lactobacillus sake</i>
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Laktisin 481	<i>Lactococcus lactis</i>
<u>TipB- lantibiyotik</u>	
Duramisin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Mersasidin	<i>Bacillus spp.</i>
Aktogardin	<i>Actinoplanes spp.</i>
<u>SINIF II</u>	
<u>Sınıf IIa</u>	
Leukosin A/B	<i>Leuconostoc gelidum</i>
Mesenterisin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Diversin V41	<i>Carnobacterium divergens</i>
<u>Sınıf IIb</u>	
Laktokoksin G	<i>Lactococcus lactis</i>
Plantarisin A	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Plantarisin EF	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<u>Sınıf IIc</u>	
Asidosin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Enterosin P	<i>Enterococcus faecium</i>
Enterosin B	<i>Enterococcus faecium</i>
<u>SINIF III</u>	
Helvetisin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Helvetisin V-1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>

### 2.3.2. Biyosentezleri

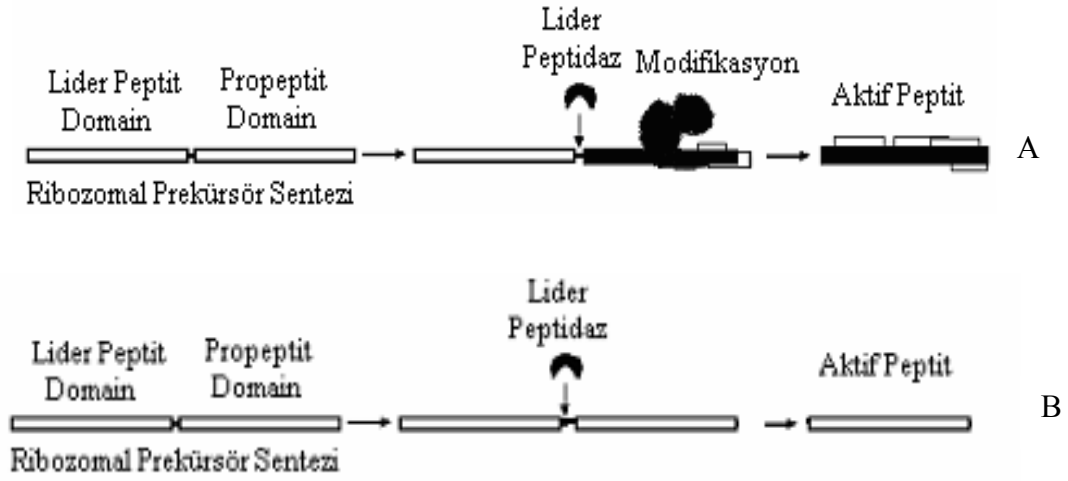
Bakteriyosinlerin genetik determinantları geniş bir şekilde ele alınmıştır. Bakteriyosinler ribosomal olarak sentezlenmektedir. Bakteriyosin üretimini kodlayan genler kromozom, plasmid veya transposon üzerinde bulunabilmektedir. Bakteriyosin üretimi ve immunitiyi kodlayan genler genellikle operonlarda düzenlenmektedir. Çoğu bakteriyosinin yapısal genleri operana benzer bir yapı gösterir (Klaenhammer, 1993). Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin üretiminin gerçekleştirilebilmesi için dört farklı gene ihtiyaç vardır: (i) prepeptidi kodlayan yapısal gen, (ii) immünite geni, (iii) ABC-taşıyıcısını kodlayan gen ve (iv) bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan aksesuar proteinini kodlayan gen (Chen and Hoover, 2000; Garneu et al., 2002; Savadogo et al., 2006; Deegan et al., 2006).

Prebakteriyosinler biyolojik olarak inaktif olup N-terminalinde lider peptit ve C-terminalinde propeptit içermektedirler. Propeptit domain lider peptidin proteolitik parçalanmasından sonra aktifleşmekte ve bunu takiben modifikasyona uğrayarak olgun bakteriyosine dönüşmektedir (Kaiser et al., 1998). Lider peptit genellikle net negatif yüke ve şu fonksiyonlara sahiptir: (i) Üretici bakteriyi yüksek konsantrasyondaki intraselüler bakteriyosine karşı korumak, (ii) biyosentezde prepeptidin olgunlaşma ve taşıma proteinlerine yönelmesini ve (iii) propeptidin domaini ile reaksiyona girerek enzim-substrat interaksyonu için uygun konformasyonun oluşmasını sağlamaktır (Sahl et al., 1995; McAuliffe et al., 2001).

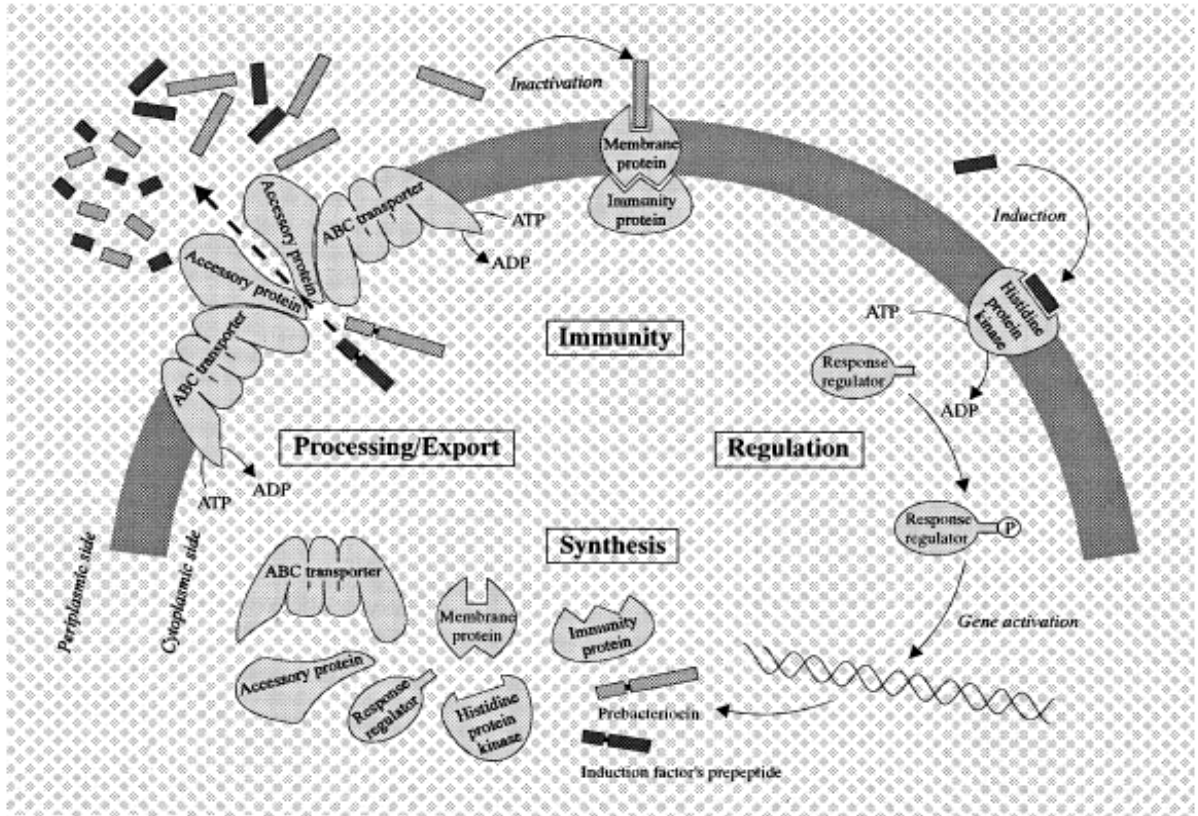
Sınıf I bakteriyosinlerin sentezi sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin biyosentezine benzemektedir. Aralarındaki tek farklılık sınıf I bakteriyosinlerin prelantibiyotik (prebakteriyosin) sentezlendikten sonra dehidrasyon ve çapraz bağlanma (kimyasal modifikasyon) reaksiyonlarına uğramakta ve bunun sonucunda anormal amino asitler (lantibiyotikler, dehidreamino asitler vb.) oluşmaktadır (Şekil 2.1). Sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin sentezinde prebakteriyosin kimyasal modifikasyona uğramamaktadır (Şekil 2.1). Şekil 2.2.'de ise sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin biyosentezi daha detaylı olarak

verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere bakteriyosinlerin üç bileşenli regülatör sisteminden biri olan indüksiyon faktörünü (IF) membranda bulunan histidin protein kinaz (HPK) enzimini uyarır. Bunu takiben HPK enzimi de sitoplazmada bulunan respons regülatörünü (RR) fosforilize ederek bu uyarıyı hücreye iletir ve biyosentezin başlamasını sağlar (Montville and Winkowski, 1997; Ishizaki et.al., 1999; Ennahar et al., 2000; İşleroğlu ve ark., 2005). Sentezlenen prebakteriyosinin hücre dışına taşınması membrana bağlı olan iki protein ABC-transporter ve aksesuar proteini tarafından gerçekleştirilir. ABC-taşıyıcılarının N-terminal ve C-terminal bölgeleri yapısal olarak farklı olup C-terminal kısmı ATP-bağlama bölgesini içermektedir. N-terminal bölgesi hidrofobik olup proteaz aktivitesine sahiptir. Proteaz aktivitesi prebakteriyosini C-terminalindeki çift glisin motifinden parçalayarak lider peptidi uzaklaştırmaktadır. Sonuçta lider peptit uzaklaşmakta ve olgun bakteriyosin sitoplazmik membrandan dışarıya taşınmaktadır. Bakteriyosinlerin taşınmasında aksesuar proteinleri rol oynamaktadır. Aksesuar proteinlerinin membran translokasyonunu teşvik ettiği ve lider peptidin prosesinde rol oynadığı belirtilmektedir (Klaenhammer, 1993; Havarstein et al., 1995; Montville and Winkowski, 1997; Ishizaki et.al., 1999; Ennahar et al., 2000; Rodriguez et al., 2003).

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



Şekil 2.1. Lantibiyotiklerin (A) ve sınıf II ve III bakteriyosinlerin (B) biyosentezi.



Şekil 2.2. Bakteriyosinlerin biyosentezleri.

Lantibiyotik olmayan bakteriyosinlerin immünitesi ise daha basittir. İmmünite proteinini bir gen kodlamaktadır. İmmünite proteinleri üretici bakteriyi kendi bakteriyosinine karşı tamamen, diğer bakteriyosinlere karşı kısmen korumaktadır. İmmünite proteinleri arasında amino asit dizi benzerliği düşük olmasına karşın ortak bazı özellikler taşımaktadırlar. Bunlar katyonik ve hidrofilik moleküller olup  $\alpha$ -heliks yapısına sahiptirler. Transmembran bölmelerine (hidrofobik) sahip olmamaları bunların hem hücre dışına salgılanabildiklerini hem de hücre içinde kalabildiklerini göstermektedir (Jack et al., 1995; Montville and Winskowski, 1997; Ishizaki et.al., 1999; Ennahar et al., 2000).

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

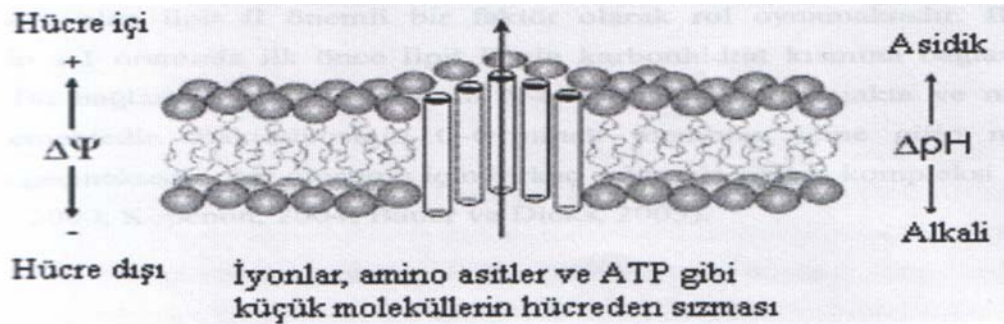
### 2.3.3. Antimikrobiyal Etki Mekanizması

LAB bakteriyosinleri duyarlı bakterilerin sitoplazmik membranına etki gösteren peptitlerdir. Duyarlı bakterilerin hücre membranında porlar oluşturarak membran geçirgenliğini değiştirir. Buna bağlı olarak hedef hücreden  $K^+$  iyonu ve ATP bileşiklerin sızmasına neden olurlar. Bunun sonucunda transmembran potansiyeli ( $\Delta\Psi$ ) ve pH grandyentinin ( $\Delta pH$ ) kısmen veya tamamen yok olması ile proton itici gücü (PMF) ortadan kalkmaktadır. PMF, hücre içinde iyonların ve metabolitlerin birikmesi ile ATP sentezi gibi sitoplazmik membranda enerjiye bağlı birçok hayati işlemleri yürütmektir. PMF'nin yok olması veya bozulması ATP'nin kaybına, besin maddelerinin aktif transportla taşınamamasına, hücre içi pH değerinin korunmasında rol oynayan  $K^+$  ve kofaktör olarak rol oynayan  $Mg^{2+}$  iyonlarının hücre dışına akışına ve duyarlı bakterinin enerji rezervlerinin tükenmesine yol açar. Buna paralel olarak DNA, RNA ve protein gibi makromoleküllerin sentezi azalarak bakterilerin inhibisyonuna ve ölümlerine sebep olmaktadır (Bauer and Dicks, 2005).

Bakteriyosinlerinin duyarlı hücreler üzerindeki etkisi iki aşamalı bir süreçtir. İlk aşamada, bakteriyosinler konukçu bakterilerin hücre duvarlarındaki spesifik yada spesifik olmayan reseptörlere tutunmaktadır. Geri dönüşümsüz ikinci aşamada ise, her bir bakteriyosin, spesifik hedef hücresinde patolojik değişimler meydana getirmektedir. Gram pozitif bakterilerin ürettiği bakteriyosinlerin bu şekilde olan etki mekanizması, LAB bakteriyosinlerinde biraz farklılık göstermektedir. Bunların Gram pozitif bakterilere tutunması spesifik değildir. Diğer bir ifade ile, hem duyarlı hem de dayanıklı hücre yüzeylerine tutundukları gözlenmiştir. LAB bakteriyosinlerinin hücre duvarına spesifik olmayan bir tutunma eğilimi göstermelerinin, spesifik reseptörlerin varlığını gizleyebilen hidrofob nitelikteki yapıları ile bağlantılı olabileceği öne sürülmektedir (Bhunja et al., 1991).

Bakteriyosinlerin duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranında por oluşturmaları “Barrel-Stave”, “Wedge-Model” ve “Lipit Model” olmak üzere 3 model ile açıklanabilir.

Barrel-Stave mekanizması ile membranda por oluşumu bakteriyosinlerin katyonik yük taşıyan C-terminali fosfolipitlerin baş grupları ile elektrostatik interaksyona girmesi ile açıklanabilir (Şekil 2.3). Membran potansiyeli varlığında membran içine girerek oligomerize olmakta ve membranda iyonik por oluşturmaktadır. Peptitler merkezi kanalın etrafına dizilmekte ve hidrofobik yüzeyler membrana doğru, hidrofilik yüzeyler ise porun merkezine doğru yönelmektedir (McAuliffe et al., 2001; Kopenon, 2004).



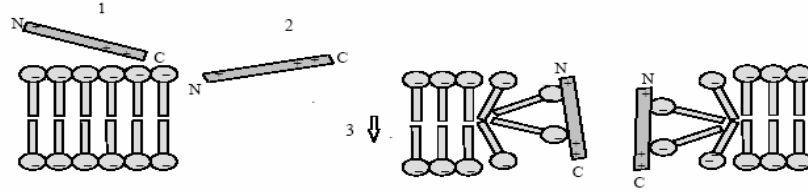
Şekil 2.3. Barrel- stave mekanizması ile por oluşumu.

Wedge modelinde bakteriyosinlerin pozitif yüklü C-terminali anyonik fosfolipitlerle elektrostatik olarak interaksiyona girip membran yüzeyine sıkıca tutunmakta ve lipit dinamiğinin bozulmasına neden olmaktadır (Şekil 2.4). Bakteriyosin molekülleri anyonik fosfolipitlerle interaksiyon halindeyken membran içine girerek membranda bükülmelere ve dolayısıyla porların oluşmasına yol açmaktadır (Kopenon, 2004; Bauer and Dicks, 2005).

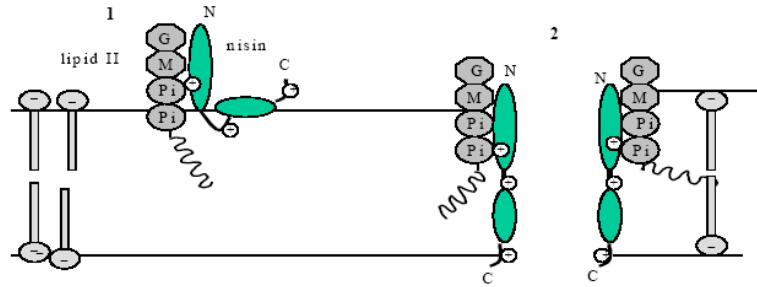
Lipit II modeline göre por oluşumunda ise bir peptidoglukan prekürsörü olan lipit II önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır. Bu modelde bakteriyosin ilk olarak 1:1 oranında lipit II nin karbonhidrat kısmına bağlanmaktadır. Bakteriyosinin N-terminal kısmı bu bağlanmada rol oynamakta ve negatif bir yüzey gerekmemektedir. Lantibiyotiğin C-terminali membran içine girip membranın karşı tarafına geçmektedir. Por oluşumu için birkaç bakteriyosin/lipit II kompleksi gereklidir (Şekil 2.5) (Kopenon, 2004).

#### 2.3.4. Antimikrobiyal Etki Spektrumları

LAB'nin ürettiği bakteriyosinler genellikle Gram-pozitif bakterileri üzerinde inhibitör aktivite gösterirler (Jack et al., 1995). Ancak son zamanlarda Gram-negatif bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip bakteriyosinler de tespit edilmiştir (Lee and Paik 2001; de Kwaadsteniet et al., 2005). LAB'lerinde en iyi tanımlanmış ve en yaygın kullanım alanına sahip bakteriosin, bazı *L. lactis* spp. *lactis* suşları tarafından üretilen nisindir. Nisin, aralarında *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* ve *Listeria* cinslerinin de dahil olduğu birçok türe karşı aktivite gösteren geniş etki spektrumuna sahip bir bakteriosindir. Ancak Gram-negatif bakterilere karşı etkili değildir. Dış membranını uzaklaştırılmış veya zarar görmüş (EDTA ile muamele edilmiş, ısı şoku veya soğuk şoka uğramış Gram-negatifler) üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Liu and Hansen, 1990; Schved et al., 1994; Hauben et al., 1996).



Şekil 2.4. Wedge modeli ile hücre membranında por oluşumu.



Şekil 2.5. Lipit II modeli ile hücre membranında por oluşumu.

Pediocin AcM *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus*' un bazı türlerine karşı bakteri türlerine karşı inhibisyon gösterirken *Salmonella typhimurium*, *E.coli* ve *Aeromonas hydrophila* ya karşı etkili olmadığı gözlenmiştir (Kwon et al., 1997).

*L. lactis* spp. *lactis* CNRZ481 tarafından üretilen laktisin 481'in diğer laktokoklara, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Clostridium tyrobutyricum*'a karşı bakterisidal etki gösterdiği belirlenmiştir (Carolissen-Mackay et al., 1997).

*L. lactis* subsp. *cremoris* R'in ürettiği laktokoksin R'nin inhibitör spektrumunun geniş ve *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*,

*Streptococcus* ve *Pediococcus*'un bazı türlerine karşı inhibitör etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Yildirim and Johnson, 1998).

Bulgaristan'da üretilen bozadan izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* B14'ün ürettiği bakteriyosin laktis B14'ün bazı *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum*, *Lb. delbrueckii* spp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* spp. *delbrueckii*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc dextranicum*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* tür ve suşları üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu, ancak *P. fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiela pneumoniae*, *Clostridium sporogenes* ve *Cl. butyricum*'a karşı inhibitör etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Ivanova et al., 2000).

*L. lactis* NK24 tarafından üretilen laktisin NK24'ün çoğu LAB'lerine karşı geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olduğu Gram negatif bakterilerden *E.coli* KCMM32396 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442'nin gelişimlerin inhibe ettiği ve bunun yanında mayalara karşı hiçbir inhibitör etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir (Lee and Paik, 2001).

*L. lactis* spp. *lactis* CCM, tarafından üretilen bakteriyosinin test edilen tüm *L. monocytogenes* türlerine karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu ancak *Micrococcus flavus*, *L. lactis* spp. *lactis* biov. *diacetylactis* ve *Bacillus* türlerine karşı inhibitör etki göstermediği belirlenmiştir (Benkerroum et al., 2002).

Rigouta peynirinden izole edilen *L. lactis* MMT24 tarafından üretilen laktokoksin MMT24'ün *Lactobacillus* spp. ve *L. lactis*'e karşı inhibitör etki gösterdiği, peynirde bozulma etmeni olan ve fermantasyonda sıklıkla kontaminant olan *E. faecalis* ve *E. faecium*'a karşı aktivite göstermediği belirlenmiştir (Ghraiiri et al., 2005).

*L. lactis* spp. *lactis* IPLA 729 tarafından üretilen nisin Z' nin dar bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve sadece Gram-pozitif bakterilerden birkaç tür ve suşu üzerinde inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Rodriguez et al., 2003).

*E. mundtii* ST15 tarafından üretilen bakteriyosinin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu ortaya konmuştur. Söz konusu bakteriyosinin test edilen *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* ve *Clostridium*'un bazı suşları ile *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Str. caprinus*'un gelişimlerini inhibe ettiği görülmüştür (de Kwaadsteniet et al., 2005).

*Lb. plantarum* ST23LD ve ST341LD, *E. faecium* ST311LD ve *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ST33LD tarafından üretilen bakteriyosinlerin bazı Gram-pozitif bakterilere (*E. faecalis*, *Lb. casei* ve *Str. pneumoniae*) ve Gram-negatif bakterilere (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) karşı inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır (Todorov and Dicks, 2005a).

Yapılan bir çalışmada bozadan izole edilen *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. paracasei* türlerinin ürettiği bakteriyosinlerin *Lb. casei*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis*'e karşı aktivite gösterdiği ancak sadece birkaç Gram-negatif bakteriye karşı aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Dicks and Todorov, 2006a).

Boza'dan izole edilen *Lb. plantarum*'un JW3BZ ve JW6BZ suşları ile *Lb. fermentum*'un JW11BZ ve JW15BZ suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ ve JW15BZ bakteriyosinlerinin Gram-pozitif bakteriler üzerinde geniş bir inhibitör spektruma sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyosin JW15BZ'nin Gram-negatif bakterilerden *Klebsiella pneumoniae*'ya karşı aktif olduğu da belirlenmiştir (von Mollendorff et al., 2006).

*Lb. plantarum* AMA-K tarafından üretilen bakteriyosin AMA-K'nın bazı Gram-pozitif bakterilerden *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus* ile Gram-negatif

bakterilerden *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ya karşı inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Todorov et al., 2007).

### **2.3.5 Bakteriyosinlerin Üretimi, Antimikrobiyal Aktiviteleri ve Stabilitelerini Etkileyen Faktörler**

Bakteriyosin üretimi ve aktivitesi besiyerinin bileşimi, gelişme fazı, pH ve inkübasyon koşullarına bağlıdır. Kullanılan besiyerindeki bazı bileşiklerin (laktoz, maya ekstraktı, tampon madde vb.) bakteriyosin aktivitesini korumakta ve artırmaktadır. Bakterilerin gelişmesi için gereken en uygun sıcaklık ve pH değeri genellikle bakteriyosin üretimi için optimum değerdir. Bazı bakteriyosinler gelişme sıcaklığının biraz altındaki derecelerde daha fazla miktarda üretilmektedir. Ancak optimum sıcaklığın çok altında veya üstünde ve inkübasyon süresinin uzatılmasıyla bakteriyosin aktivitesi azalmaktadır. İnkübasyon süresi uzamasıyla bakteriyosin aktivitesinin azalmasının nedeni artan asitlik ile birlikte bakteri tarafından salgılanan veya lize olan bakterilerden açığa çıkan ekstraselüler intraselüler proteazlardır (Yıldırım and Johnson, 1998; Yıldırım ve Yıldırım, 2000; Todorov and Dicks, 2005b). Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğu bir veya daha fazla proteolitik enzime karşı duyarlı, ısı işleme, geniş pH aralığına, özellikle asidik pH değerlerine, organik çözücülere ve deterjanlara karşı dayanıklıdır (Ray, 1992).

*L. lactis* spp. *lactis* suşlarının ürettiği nisin alfa-kimotripsin, pankreatin ve fisine duyarlı olmasına karşın tripsin, pepsin, erapsin, elastaz, lipaz ve karboksipeptidaz enzimlerine karşı dayanıklıdır. Asidik pH (pH 4.0 ve altındaki değerlerde) koşullarında stabilitesini korumasına karşın pH 8.0'in üstündeki değerlerde aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Buzdolabı ve daha düşük derecelerde depolama koşullarında aktivitesini uzun süre muhafaza etmektedir. Amino asit sayısı 34 olan nisinin molekül ağırlığı 3510 Da'dur. Asidik koşullarda uygulanan ısı işlemlere (121°C'de 15 dk) oldukça dayanıklı, ancak pH 5.0 ve 6.8'de aynı

koşullarda uygulanan ısıt işlemlerde aktivitesinde %50 ve %90 oranında azalma meydana gelmektedir (Ray, 1992).

*Lb. plantarum* NCIM 2084 tarafından üretilen plantarisin LP84'ün antimikrobiyal aktivitesini geç log faz ile erken durgun gelişme fazı arasında gösterdiği ve 121°C'de 20 dk uygulanan ısıt işleme karşı aktivitesini koruduğu bulunmuştur. Katalaz enzimine dayanıklı olduğu fakat tripsin ve kimotripsine duyarlı olduğu gözlenmiştir. Antibakteriyel aktivitesini 37 ve 40°C'de gösterdiği, fakat 30°C'de göstermediği görülmüştür. Optimum aktiviteyi pH 4.5-4.8'de gösterdiği belirlenmiştir (Varadaraj et al., 1998).

*L. lactis* subsp. *cremoris* R'in ürettiği laktokoksin R'nin bazı proteolitik enzimlere (proteaz, proteinaz-K, alfa-kimotripsin, pepsin, pronaz-E) duyarlı, ancak ısıt işleme (121°C/15 dk), geniş pH aralığına (2.0-9.0), organik çözücülere, deterjanlara, β-merkaptotanol, tripsin, papain, katalaz, peroksidaz, lipaz ve amilaza karşı dayanıklı olduğu görülmüştür. Bakteriyosinin -20 ve -70°C'de aktivitesini uzun süre (3 ay) koruduğu gözlenmiştir. Laktokosin R geç logaritmik faz ile erken durgun fazda maksimum düzeyde üretildiği ve molekül ağırlığının 2,5 kDa olduğu saptanmıştır. %0.5 oranında glikoz içeren MRS besiyeri, başlangıç pH'sı 6.5-7.0, inkübasyon sıcaklığı 30°C ve inkübasyon süresi 18-24 saat seçildiğinde laktokoksin R üretiminin maksimum düzeyde olduğu bildirilmiştir. İnkübasyon süresinin uzamasıyla aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Yildirim and Johnson, 1998).

*L. lactis* spp. *lactis* H-559 tarafından üretilen bakteriyosinin α-kimotripsin, proteaz tip III, IX ve XIV'e karşı duyarlı olduğu, α-amilaz, β-amilaz, pepsin, tripsin ve katalaz enzimlerine dayanıklı olduğu, lipaz ile muamelede ise aktivitesini %50 oranında kaybettiği görülmüştür. Bakteriyosin 2.0-11.0 pH aralığında ve 100°C'de 10 dk uygulanan ısıt işleme karşı aktivitesini koruduğu, ancak 121°C'de 20 dk'da ısıt işleme maruz kaldığında aktivitesini büyük oranda kaybettiği gözlenmiştir (Ahn et al., 1999).

Bulgaristan'da üretilen bozadan izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* B14'in ürettiği bakteriyosin laktis B14'ün proteinaz K, pronase E, pepsine duyarlı, fakat tripsin, kimotripsin, rennin, amilaz, lipaz, katalaz, deterjanlara (Tween 20, Tween 80, üre, N-laurilsarkosin, SDS, Triton X-100), EDTA ve pH (3-10)'ya karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ısı işleme duyarlı olduğu, 80°C'de 10 dakika uygulanan ısı işleminde kısmen inaktif, 100°C'de 10 dakika ise tamamen inaktif olduğu saptanmıştır. 30°C'de *L. lactis* subsp. *lactis* B14'ün logaritmik fazın başında laktisin B14'ü üretmeye başladığı ve aktivitenin inkübasyon işleminin 4. ile 8. saatleri arasında maksimum seviyeye (1600 AU/mL) ulaştığı, ancak inkübasyon süresinin uzamasıyla aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Laktisin 14'ün molekül ağırlığının ise 5000 Da olduğu belirlenmiştir (Ivanova et al., 2000).

Yapılan bir çalışmada, *L. lactis* (14 *L. lactis* subsp. *lactis* ve bir *L. lactis* subsp. *cremoris*)'in 15 suşun ürettiği bakteriyosinlerin ısı işleme dayanıklı, bazı proteolitik enzimlere duyarlı ve geniş pH aralığında aktivitesini koruduğu (2.0-8.0 pH) saptanmıştır. Sadece *L. lactis* subsp. *lactis* ITAL 383 suşunun oluşturduğu bakteriyosinin Gram-pozitif bakteriler üzerinde geniş inhibitör spektruma sahip olduğu ve molekül ağırlığının nisninki ile aynı (3.5 kDa) olduğu belirlenmiştir (Morena et al., 2000)

*L. lactis* spp. *lactis* A164 tarafından üretilen nisin benzeri bakteriyosinin pronaz ve  $\alpha, \beta$ -kimotripsine duyarlı, fakat tripsin, pepsin ve  $\alpha$ -amilaza dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Bakteriyosin üretimi için maksimum pH'nın 6.0 olduğu belirlenmiştir (Cheigh et al., 2000).

*L. lactis* NK 24 tarafından sentezlenen laktisin NK'nın logaritmik fazın ortasında üretilmeye başladığı, erken durgun fazda maksimum düzeye ulaştığı ve durgun fazın uzamasıyla aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Laktisin NK'nın proteaz IX veya proteaz XIV ile muamele edildiğinde aktivitesini tamamen kaybettiği,  $\alpha$ -amilaz, lipaz, tripsin, ısı işleme (100°C'de 30 dk), pH (2.0-9.0) ve organik çözücülere (etanol, metanol, aseton, toluen, isopropanol, kloroform) karşı dayanıklı olduğu görülmüştür. Molekül ağırlığının ise 3.0-3.5

kDa arasında olduğu ve inhibitör spektrumunun geniş olduğu, ancak Gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir (Lee and Paik, 2001).

*Lactococcus garvicae* tarafından üretilen garviesin L1-5'in 30°C'de geç logaritmik faz ile erken durgun fazda maksimum düzeyde üretildiği gözlenmiştir. Bakteriyosinin 30°C ve 60°C'de 1 saat uygulanan ısı işleme ve 2-9 pH değerlerine karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Buna karşın 100°C'de 15 dk ısı işleme maruz bırakıldığında aktivitesinin %75'ini, 121°C'de 15 dk ise aktivitesinin tamamını kaybettiği tespit edilmiştir. Bakteriyosinin test edilen tüm proteolitik enzimlere karşı duyarlı olduğu fakat katalaz, lipaz ve  $\alpha$ -amilaz'a karşı dayanıklı olduğu gözlenmiştir (Villani et al., 2001).

*E. faecium* P21 tarafından üretilen enterosin A ve B'nin pH 2-11 aralığında aktivitesini koruduğu, proteazlara karşı duyarlı, 80-100°C'de 20 dk uygulanan ısı işleme, lipaz ve  $\alpha$ -amilaza dayanıklı olduğu, liyofilizasyondan ve -20°C'de 12 ay depolama koşullarından etkilenmediği tespit edilmiştir (Herranz et al., 2001).

*L. lactis*'in ürettiği laktokoksin R9/2 ve R10/1 proteinaz K ve  $\alpha$ -kimotripsine duyarlı, pH ve ısı işleme dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca laktokoksin R9/2'nin  $\alpha$ -amilaza karşı hassas olduğu da gözlenmiştir (Elotmani et al., 2002).

*Lb. salivarius* spp. *salivarius* CRL1328 tarafından üretilen bakteriyosinin üretimi ve gelişimi üzerine kültür ortamını, sıcaklık ve pH'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada optimum gelişmenin MRS broth da 37°C ve 6.5 pH'da olduğu gözlenmiştir. Maksimum bakteriyosin aktivitesinin ise 37°C'de 6h sonra LAPTg broth ve pH 6.5'de olduğu gözlenmiştir. Bakteriyosinin durgun gelişme fazının ikinci kısmında maksimum düzeyde üretildiği saptanmıştır (Tomas et al., 2002).

*L. lactis* subsp. *lactis* A164 tarafından üretilen nisin benzeri bakteriyosinin üretiminin karbon ve azot kaynaklarından fazlaca etkilendiği görülmüştür. A164 suşunun M17 besiyerinde diğer karbon kaynakları yerine laktoz kullanıldığında 4 kat daha fazla bakteriyosin ürettiği gözlenmiştir. Söz konusu bakteriyosinin optimum gelişme sıcaklığı 37°C iken maksimum düzeyde bakteriyosin üretimi için gerekli sıcaklığın 30°C olduğu belirlenmiştir. Gelişme için optimum pH aralığı 5,5-6,5 arasında değişirken bakteriyosin üretimi için optimum pH'nın 6,0 olduğu gözlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesinin besiyeri olarak M17L (% 3 laktoz), inkübasyon sıcaklığı 30°C ve pH'sı 6,0 kullanıldığında erken durgun gelişme fazında maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır (Cheigh et al., 2002).

*Lactococcus* spp. GM005 inkübasyon koşulları sabit tutularak geliştirildiğinde ürettiği bakteriyosin aktivitesinin, kontrolsüz pH koşullarına göre 8 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Onda et al., 2003).

*E. faecium* EK 13 tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitesinin 4 ve -20°C'de uzun depolama periyotlarında değişmediği, optimum bakteriyosin üretiminin 30 ve 37°C ve pH 5.0-6.5 aralığında olduğu saptanmıştır. Bakteriyosinlerin aktivitesinin logaritmik gelişme fazında en yüksek olduğu görülmüştür (Nes et al., 2003).

Fermente bir üründen izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis*'inin ürettiği bakteriyosinin *Clostridium perfringens*, *Cl. difficile*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus* spp., *S. aureus* ve yakın laktik asit bakterilerine karşı aktif olduğu, molekül ağırlığının yaklaşık 4 kDa, asitlik ve ısıl işleme dayanıklı olduğu, ancak yüksek derecelerde uygulanan ısıl işlemlerde (122°C'de 15 dk) aktivitesini kaybettiği, proteolitik enzimlere duyarlı, lizozim, lipaz, katalaz ve beta-glikosidaza dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Park et al., 2003).

*Lb. acidophilus* DSM 20079 tarafından üretilen asidosin D20079'un tripsin, fisin, pepsin gibi proteolitik enzimlere karşı duyarlı olduğu, 121°C'de 30 dk uygulanan ısıtma işlemi ve geniş pH aralığında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Deraz et al., 2005).

Laktokoksin MMT24 (*L. lactis* MMT24)'nin pH (3-10)'ya, ısıtma işlemi ve liyofilizasyona dayanıklı ve -20°C'de uzun süre aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Ancak, proteolitik enzimlere karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. Laktokoksin MMT24'ün iki peptidli bir bakteriyosin olduğu saflaştırma işleminde ortaya konmuştur (Ghraiiri et al., 2005).

*Pediococcus pentosaceus* ST18 tarafından üretilen anti-listerial bir bakteriyosin olan pediosin ST18'in ısıtma işlemi (121°C'de 30 dk), pH (2-12)'ya,  $\alpha$ -amilaza, SDS, Tween-20, Tween-80, üre, Triton X-100 ve EDTA karşı dayanıklı, proteolitik enzimlere karşı hassas olduğu belirlenmiştir (Dicks and Todorov, 2005c).

*Lb. plantarum* ST23LD ve ST341LD, *E. faecium* ST311LD ve *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ST33LD logaritmik fazın sonu ile durgun fazın başında maksimum düzeyde bakteriyosin ürettikleri ve bu bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere ve Triton X'e karşı duyarlı, alfa amilaz, SDS, Tween-20, Tween-80, üre, EDTA ve ısıtma işlemi (121°C'de 20 dakika) dayanıklı olduğu gözlenmiştir (Todorov and Dicks, 2005a).

*L. lactis* subsp. *lactis* HV219'in sentezlediği bakteriyosin HV219'un proteolitik enzimlere (proteinase K, pronase, tripsin), SDS, Triton X-114 ve Triton X-100'e karşı duyarlı, fakat Tween-20, Tween-80, üre, EDTA, pH (2.0-10.0) ve ısıtma işlemi (121°C/20 dk) dayanıklı olduğu belirlenmiştir. MRS besiyeri başlangıç pH'sı 6,0-6,5 ve inkübasyon sıcaklığı 30°C olduğu zaman bakteriyosin aktivitesinin maksimum olduğu saptanmıştır. Bakteriyosin üretiminin 30°C'de daha fazla olduğu ve daha uzun süre stabilitesini koruduğu, ancak 37 °C hem bakteriyosin üretimi hem de stabilitesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bakteriyosin üretiminin logaritmik fazın başında başladığı ve durgun fazda maksimum düzeyde üretildiği tespit edilmiştir (Todorov et al., 2006b).

*Lb. plantarum* ve *Lb. fermentum* (boza izolatları)'un ürettikleri JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ ve JW15BZ bakteriyosinlerinin tripsin, pronaz, proteinaz K, pepsin ve papain'e karşı duyarlı, ancak pH (2-10), ısıtma işlemi (100°C'de 20 dakika), SDS, üre, Tween-20, Tween-80 ve EDTA'ya karşı stabil olduğu bulunmuştur. Bakteriyosin JW3BZ ve JW11BZ'nin Triton X-100, bakteriyosin JW3BZ, JW6BZ ve JW11BZ'nin ise Triton X-114'e karşı hassas olduğu ve aktivitelerini tamamen kaybettiği belirlenmiştir. En yüksek aktiviteye 30°C MRS besiyerinde üreten bakterilerin gelişmelerinin 18. saatinde bakteriyosin JW3BZ (25600 AU/mL), 15. saatinde bakteriyosin JW6BZ (25600 AU/mL), 15. ve 12. saatlerinde bakteriyosin JW11BZ ve JW15BZ (12800 AU/mL)'lerin ulaştığı gözlenmiştir. Bakteriyosinlerin molekül ağırlıklarının ise yaklaşık 2.3 to 3.3 kDa olduğu tespit edilmiştir (von Mollendorff et al., 2006).

Campos et al. (2006) *L. lactis* spp. *lactis* USC-39'in erken durgun fazda maksimum düzeyde bakteriyosin oluşturduğu ve bakteriyosinin proteinaz K'ya duyarlı ve ısıtma işlemi (121°C'de 15) dayanıklı olduğu bildirmişlerdir.

### 2.3.6. Bakteriyosinlerin Saflaştırılması

Bakteriyosin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler bakteriyosinlerin bakteriler tarafından üretilmeleri, katyonik moleküller olmaları, üreten bakterinin ve diğer Gram-pozitif bakterilere adsorbe olabilmeleri ve adsorpsiyonun pH'ya bağlı olması özelliklerine esas alınarak geliştirilmiştir. Saflaştırmanın ilk aşamasında kullanılan yöntemler tuzla ayırma, asitle veya diğer organik çözücülerle pıhtılaştırma, diyaliz, ultrafiltrasyon, üreten bakteriye, silikik asit ve çeltik kabuğu külüne adsorpsiyon/desorpsiyonudur. Bu yöntemlerin uygulanmasında temel amaç çalışma hacmini azaltmak, istenmeyen bazı protein ve lipit gibi bileşikler uzaklaştırmaktır. Saflaştırma işleminin ikinci aşamasında ise besiyerinde ve hücre metabolizmasından kaynaklanan kontamine proteinlerden iyi derecede bir arındırma sağlamak

amacıyla kromatografik yöntemler kullanılmaktadır (Yang et al.,1992; Coventry et al., 1996; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

### **2.3.7. Uygulama Alanları**

Bilindiği gibi gıda güvenliği açısından, patojen mikroorganizmaların gıdalarda gelişiminin önlenmesi gerekmektedir. Gıdalarda gelişen patojen mikroorganizmalar üzerinde antagonistik mikroorganizmaların ve bakteriyosin gibi metabolik ürünlerinin etkili olması nedeniyle, gıda güvenliğinde bakteriyosin kullanımının önemi oldukça artmıştır. Bakteriyosinlerin gıdalarda antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra, doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları da ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir. Peptit veya protein yapılarında olmaları ise pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden, mide salgılarından etkilenebildiklerini ve insan vücudunda sindirilebileceklerini göstermektedir. Ayrıca bazı bakteriyosinlerin (Grup II) ısı stabilitelerinin olması, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır (Delves-Broughton et al.,1996; Alves et al., 2003). Hatta bazı bakteriyosinler otoklavlama sıcaklığında bile stabil kalabilmektedir. Dolayısıyla bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır.

Gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımı için 3 uygulama şekli vardır. Bunlar: (i) direk olarak bakteriyosinlerin gıdalara ilavesi, (ii) bakteriyosin üreten LAB'lerin gıdaların üretiminde kullanılması ve (iii) ambalajlama materyaline (yenilebilir filmlere) bakteriyosin ilavesidir (Daeschel, 1990; Ray, 1992). Gıdalarda bakteriyosinlerin etkili bir şekilde kullanımları gıdaların çeşidi, bakteriyosinle inhibe edilmek istenen mikroorganizmaların tipi ve sayılarını içeren birçok faktöre bağlıdır. Genel olarak, bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımını etkileyen faktörler (i) bakteriyosine dayanıklı patojen veya bozulmaya neden olan bakterilerin ortaya çıkması, (ii) bakteriyosinlerin biyolojik aktivite ve stabilitesini azaltan koşullar örneğin spesifik olmayan proteolitik enzimler, oksidasyon, ağır metaller, aşırı

karıştırma, köpüklenme ve sıcaklık, (iii) gıda bileşiklerine bağlanma ve (iv) ortamın pH değeridir (Abdel-Bar and Haris, 1984).

Nisin birçok Avrupa ülkesinde ve Orta Doğu ülkelerinde süt ve konserve gıdalar gibi çeşitli gıdalarda güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. 1988 yılından beri FDA tarafından pastörize işlem görmüş peynirlerde *Clostridium botulinum* sporlarının gelişmesini ve toksin oluşumunu önlemek amacıyla GRAS (Generally Regarded As Safe) olarak kullanımına izin verilmiştir (Daeschel, 1989). Avrupa Birliği ülkelerinde ise irmik, tapioka pudringler, olgunlaştırılmış ve işlem görmüş peynirler ile ekşitilmiş kremada nisin (E 234) kullanımına izin verilmektedir (Roller ve Lusengo, 1997). Ülkemizde de halen Avrupa Birliği ülkelerinde geçerli olan gıdalarda kullanılmaktadır (Anonim, 1997). Son yıllarda peynir, süt ve konserve gıdalar dışında nisin sütlü tatlılar, yoğurt, alkollü içecekler, krlenmiş etler, balık, sıvı yumurta ve ekmek gibi çeşitli gıdalarda kullanımı ile ilgili çalışmalar bildirilmiştir. Çizelge 2.3’de bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri verilmiştir (Daeschel, 1990; Cleveland et.al., 2001; Eckner, 1992; de Martinis et al., 2002; Chen and Hoover, 2003; Kışla ve Ünlütürk, 2003).

Çizelge 2.3. Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri.

Bakteriyosin	Uygulanan gıda	Etkileri
Nisin A	Et ürünleri	Bakteriyel inaktivasyon sağlanmıştır
Nisin A	Ricotta peynirinde <i>L. monocytogenes</i> 'in kontrolü için kullanılmıştır.	<i>L. monocytogenes</i> 'i 8 hafta etkili bir şekilde inhibe etmiştir.
Pediosin AcH	Pediosin AcH sentezleyen <i>Lb. plantarum</i> WHE 92, olgunlaşmanın başlangıcında Munstar peynirinin yüzeyine spreyleneştir.	<i>L. monocytogenes</i> 'in gelişimini engellemiştir.
Enterodin 4	Enterodin sentezleyen <i>E. faecalis</i> INIA4, Manchego peyniri üretiminde kullanılmıştır.	<i>L. monocytogenes</i> Ohio 'yu inhibe ederken, <i>L. monocytogenes</i> Scott A'yı inhibe etmemiştir.
Linodin M-18	<i>B. lines</i> Limburger peynir üretiminde starter olarak kullanılmıştır	<i>L. ivanovi</i> ve <i>L. monocytogenes</i> 'te 2 log düşüşe neden olmuştur
Piskikolin 126	Jambonda <i>L. Monocytogenes</i> kontrolü için kullanılmıştır	Ticari bakteriyosinlerden daha etkili bulunmuştur
Leukodin A	<i>Leu. gelidium</i> UAL187 vakum paketlenmiş sığır etinde bakteriyel bozulma kontrol etmek için kullanılmıştır.	<i>Lb. sake</i> 'nin de etkisiyle bozulma 8 haftaya kadar geciktirilmiştir.
Lactocin 705	Kıyılmış sığır etinde <i>L. monocytogenes</i> ' in gelişimini önlemek için kullanılmıştır.	<i>L. monocytogenes</i> ' in kıyılmış etlerde gelişimini önlemiştir.
Pediosin AcH	Tavuk eti sosisinde <i>L. monocytogenes</i> 'i inhibe etmek için pediosin üreten <i>P. acidilactici</i> kullanılmıştır.	Etkili bir şekilde <i>L. monocytogenes</i> sayısını azaltmıştır.
Pediosin	Şarap ve fırıncılık ürünlerinde kullanım potansiyeli araştırılmıştır	Bu tür ürünlerde kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir.
Pediosin AcH	Tavuk etine pediosin preparatı ilave edilmiştir.	5 °C'de 28 gün <i>L. monocytogenes</i> gelişimini kontrol etmiştir
Pediosin PA-1	Fermente sosiste starter olarak <i>P. acidilactici</i> kullanılmıştır.	<i>L. monocytogenes</i> 'i etkili bir şekilde kontrol etmiştir.
Enterodin	Jambon, domuz eti, tavuk göğüs eti, pate ve sosis'te kullanılmıştır	Çeşitli şartlar altında <i>L. monocytogenes</i> gelişimini kontrol etmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Gıda Örnekleri

Bu çalışmada, çeşitli yörelerde üretilen geleneksel gıda ürünlerinden örnekler temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolasyon kaynakları farklı peynir çeşitleri, sucuk, turp, karnıbahar, ıspanak, mantar, brokoli, marul, havuç, portakal, limon, pırasa, kara lahana, patates, lahana, elma, kivi, muz, tarhana, ekşi hamur ve bozadır. Örnek toplama ve izolasyon işlemleri 6 aylık bir zaman periyoduna yayılmıştır. Örnekler mikroorganizmaların izolasyon işlemleri tamamlanıncaya kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Örnekler temin edildikten hemen sonra izolasyon işlemine geçilmiştir. Araştırma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarında yapılmıştır.

##### 3.1.2. Bakteri Kültürleri ve Besiyerleri

Çalışmanın amacı, izole edilen suşların patojen ve patojen olmayan mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesi olduğu için bu suşların bazı indikatör organizmalar üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. İndikatör test mikroorganizmaları olarak *Lactobacillus plantarum*, *Esheriachia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis* kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan indikatör mikroorganizmalar Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü ve Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir. Laktik asit bakterileri % 20 gliserol içeren de Mann Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinde, diğer bakteriler ise % 20 gliserol içeren Brain Hearth Infusion (BHI) besiyerinde -80°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Araştırmada gıda örneklerinden bakterilerin izole edilmesinde Nutrient broth, izole edilen bakteriler ile patojen mikroorganizmaların geliştirilmesinde ise BHI, indikatör bakterilerden laktik asit bakterilerinin geliştirilmesinde MRS besiyeri kullanılmıştır.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Bakteri Kültürlerinin İzolasyon İçin Hazırlanması**

Gıda örneklerinden steril kabinde steril bıçak, pens ve spatülalar vasıtasıyla 10-25 gram alınıp 90 ml Nutrient Broth besiyerine aktarılmış ve karıştırılarak homojenize edilmiştir. Zenginleştirme amacıyla 25°C’de 1-3 saat bekletildikten sonra  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ ’ye kadar peptonlu su (1g pepton/1000 mL destile su) tamponu kullanılarak dilüsyonlar hazırlanmıştır.

#### **3.2.2. Bakteri Kültürlerinin İzolasyonu**

Gıda örneklerindeki mikroorganizmaların aktiveştirilmesinde Nutrient agar kullanılmıştır. Bölüm 3.2.1’de hazırlanan dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak Nutrient agar’a 6’şar paralelli olacak şekilde aktarılmış ve drigalski spatülü ile petri döndericisi kullanılarak yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

#### **3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Testleri**

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde Sandviç Yöntemi kullanılmıştır (Mayr-Harting et al., 1972). Laktik asit bakterileri için % 0,8 agarlı MRS, diğer bakteriler için ise % 0,8 agarlı BHI besiyerleri eritilip 35-40°C’ye soğutulduktan sonra üzerine 3.1.2’de belirtilen indikatör mikroorganizmalar ilave edilmiştir. İndikatör mikroorganizmaları içeren yumuşak agarlı besiyerleri 3.2.2.’de izole edilen ve 30-300 arasında koloni bulunan

petrilere eklenmiştir. Besiyeri katılaştıktan sonra petriler indikatör bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarında 32°C ve 37°C’de 24-48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon işlemi sonucunda inhibisyon zonu gösteren koloniler steril koşullarda öze ile alınarak MRS besiyerine aktarılmıştır.

#### **3.2.4. Bakteriyosin Üreten Bakterinin İzolasyonu ve Tanısı**

İnhibitör aktivite gösteren koloniler MRS besiyerine öze yardımı ile aktarıldıktan sonra genel mikrobiyolojik yöntemlerden Gram boyama, spor boyama, optimum gelişme sıcaklığı ve pH’sı, gelişebildiği NaCl konsantrasyonu, kanlı agardaki aktivitesi, Voges Proskauer testi, indol testi, katalaz testi, jelatin hidroliz testi, sütte asit üretimi, glikoz sıvı besiyerinde (Glikoz Broth) oluşturduğu en son asitlik, karbonhidrat fermantasyon testi (API Strep 50 ve API 50 CHL) ve yağ asidi profili gibi teknikler kullanılarak bakterilerin tanısı yapılmıştır.

##### **3.2.4.1. Gram ve Spor Boyama**

Gram boyama için izolatların genç kültürleri (18-24 saatlik) Gram boyama işlemine tabi tutulmuş ve mavi-mor renkli koloniler Gram pozitif, kırmızı-pembe renkli koloniler ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol olarak *Lactobacillus plantarum* ve *E. coli* kullanılmıştır.

Spor boyama için karbonhidrat içeriği azaltılmış besiyerinde geliştirilen yaşlı kültürleri spor boyamaya tabi tutulmuş ve hücre içerisine malaşit yeşili boyasını alanlar endospor pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol olarak *Bacillus cereus* kullanılmıştır.

### 3.2.4.2. Voges-Proskauer ve İndol Testi

Voges-Proskauer analizi için bakteri izolatları glikoz-fosfat besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonunda tüplerin üzerine  $\alpha$ -naftol (6 g  $\alpha$ -naftol/100 ml % 95'lik etanol) ve KOH (16 g KOH/100 ml saf su) çözeltisi ilave edilmiştir. 20 saniye kuvvetlice çalkalanan tüplerde 5 dakika içerisindeki kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol olarak *E. coli* kullanılmıştır.

İndol testi için tripton besiyerine bakteri izolatu aşılandıktan sonra 37°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben kültüre Kovac's ayracı (0,5 mL) aktarılmış ve tüp çalkalanmıştır. Kültür sıvısının üst kısmında kırmızı renkli halkanın oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). *E. coli* biyotip I pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

### 3.2.4.3. Hemoliz ve Katalaz Testi

İntimikrobiyal aktiviteye sahip genç kültürlerden (18-24 saat) öze yardımı ile örnek alınarak kanlı agar'a sürülmüş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kolonilerinin etrafında opak bir zon oluşmuşsa  $\beta$ -hemoliz; bulanık ve yeşilimsi zona  $\alpha$ -hemoliz, zon oluşmamışsa  $\gamma$ -hemoliz olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* kullanılmıştır.

Katalaz testi için inhibitör etkiye sahip bakteriler MRS agar'da geliştirilmiş üzerine hidrojen peroksit (% 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ten 1 mL) ilave edilmiş ve gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif olarak kabul edilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol olarak kullanılan bakteri *S. aureus*'tur.

#### 3.2.4.4. Jelatin Hidrolizi Testi

Bu test için % 10-15 oranında jelatin içeren Nutrient broth besiyeri kullanılmıştır. İnhibisyon aktivitesi gösteren bakteri kültüründen tüpte hazırlanan bu besiyerine saplama ekim yapılmış ve tüpler 20-25°C'de 10-30 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde sivilaşma meydana gelip gelmediği hergün kontrol edilmiştir (Temiz, 2000). Negatif kontrol olarak ekim yapılmamış besiyeri, pozitif kontrol olarak da *Bacillus subtilis* içeren besiyeri kullanılmıştır.

#### 3.2.4.5. Farklı Sıcaklıklarda ve Farklı pH' larda Gelişme Testi

İzole edilen suşlar MRS sıvı besiyerine % 1 oranında aşılansarak 4, 10, 30, 37, 40, 45, 50 ve 55°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 24 ve 48. saatlerde örnek alınarak 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Perkin Elmer UV/VIS Spektrofotometre Lambda EZ) absorbans değeri belirlenmiştir. Gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Axelsson, 1993). Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Bakterilerin farklı pH'larda gelişme aralığını belirlemek için fosforik asit ve NaOH (5 M ve 0,01 M) kullanılarak pH'sı 3,0, 4,0, 4,4, 6,0, 8,0, 9,2 ve 9,6'ya ayarlanan MRS sıvı besiyerlerine % 1 oranında ilave edilmiş ve 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin 24. ve 48. saatlerinde örnek alınarak 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma yapılmıştır. Absorbans değeri artanlar pozitif, absorbans değeri değişmeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Axelsson, 1993). Bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

#### 3.2.4.6. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Durumu

Değişik oranlarda tuz içeren (% 3,0, 4,0, 6,5 ve 10) MRS besiyerine test bakterisi (% 1) katıldıktan sonra 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbans değeri belirlenmiştir (Axelsson, 1993). Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS besiyeri, pozitif kontrol olarak ise tuz içermeyen ancak izolat katılmış MRS besiyeri kullanılmıştır.

#### 3.2.4.7. Hareketlilik Testi

MRS broth besiyerinde hazırlanan inhibisyon aktivitesi gösteren bakteri kültüründen yumuşak agarlı (% 0,8) MRS agar besiyerine iğne öze ile saplama ekim yapılmıştır. Diğer bir yumuşak agarlı besiyerine alevde tutularak sterilize edilmiş bir iğne öze ile örnek alınmaksızın saplama ekim yapılmış ve bu tüp de diğeri ile birlikte 37°C'de 48 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu sürenin sonunda inokülasyon hattının yanlarına doğru yayılmış, bulanıklık şeklinde üreme görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol bakterisi olarak *Proteus mirabilis* kullanılmıştır.

#### 3.2.4.8. Glikoz Broth Besiyerinde ve Sütte Asit Üretimi

Glikoz Broth besiyerinde bakterinin oluşturduğu en son asitliği belirlemek için % 1 oranında izole edilen bakteri besiyerine inoküle edilmiş ve 32°C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi sonunda kültür ortamının pH değeri belirlenmiştir.

UHT süte % 1 oranında bakteri ilave edilip 37°C'de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işleminin belirli aralıklarında (6, 16, 24. saat ve 7. gününde) örnek alınıp pH metre ile pH değeri ölçülmüştür.

#### **3.2.4.9. Karbonhidrat Fermantasyon ve Yağ Asidi Profili Testleri**

İnhibitör aktiviteye sahip bakterinin çeşitli karbonhidrat kaynaklarını kullanım kabiliyetleri API strep 20 ve API 50 CHL fermantasyon testi kullanılarak TÜBİTAK Atal'da yaptırılmıştır. İzolatların yağ asidi profilleri Sherlock Tanımlama Sistemi (MIS) kullanılarak Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi tarafından yaptırılarak belirlenmiştir.

#### **3.2.5. Bakteriyosinin Karakterize Edilmesi**

##### **3.2.5.1. Kaba Bakteriyosin Hazırlanması**

İzole edilen bakteri % 0,1 oranında MRS sıvı besiyerine (1 L) inoküle edilip bakterinin geliştiği optimum sıcaklığı olan 25°C'de 15-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra bakteri kültürü 8500 x g'de 30 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı toplanmıştır. Toplanan supernatant, 0,45 µm gözenek çaplı membran filtre ile (Milipore) sterilize edildikten sonra dondurulup liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuştur.

##### **3.2.5.2. Bakteriyosinin Antimikrobiyal Aktivitesi ve Spektrumu**

Hazırlanan kaba bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi ve inhibitör spektrumu Spot-on-lawn yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Mayr-Harting et al., 1972). Aktivite arbitrary ünite (AU) olarak ifade edilmiştir. Arbitrary ünite, inhibisyon aktivitesi gösteren en son dilüsyonun tersi şeklinde tanımlanmaktadır.

Bakteriyosinin preparatları iki kat seyreltilip (1/2, 1/4, 1/8 vs.) her dilüsyondan 20 µl alınmış ve nokta halinde indikatör mikroorganizma olarak *Lb. plantarum* içeren yumuşak agarlı MRS üzerine konulmuştur. Bu petriyerler 32°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda oluşan 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Kaba bakteriyosinin antimikrobiyal spektrumunun belirlenmesinde ise iki kat seyreltilen kaba bakteriyosin örneğinden 20 µl alınmış ve nokta halinde indikatör mikroorganizma içeren yumuşak agarlı MRS besiyeri üzerine eklenmiştir. 32-37°C'de 24 saat inkübasyon işleminden sonra 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.5.3. Enzimlerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi**

Proteolitik ve proteolitik olmayan enzimlerin bakteriyosin aktivitesine etkisini belirlemek için lipaz (Sigma), papain (Merck), pepsin (Merck), pankreatin (Sigma), katalaz (Sigma – Aldrich), tripsin (Sigma) ve proteaz (Sigma) enzimleri kullanılmıştır. Belirtilen bu enzimler, fosfat tamponunun (4 mM, pH 7) konsantrasyonu 300 mg/ml olacak şekilde çözündürülüp, üzerine bakteriyosin supernatantı eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 37°C'de 1 saat inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra bakteriyosin aktivitesi agar-Spot yöntemine göre belirlenmiştir (Bhunia et al., 1988). Bakteriyosin içeren ve içermeyen fosfat tamponu, sadece enzim içeren fosfat tamponu negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.5.4. Bakteriyosin Aktivitesine Isıl İşlemin Etkisi**

Bakteriyosinin ısı stabilitesini belirlemek için 60 ve 70°C'de 30 dk, 80 ve 90°C'de 15 ve 30 dk, 110 ve 121°C'de 15 dk ısıl işlemine maruz kalan kaba bakteriyosin örnekleri (2'şer mL) oda sıcaklığına soğutulmuş ve bunu takiben antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Kontrol örneği olarak ısıl işlem uygulanmamış bakteriyosin kullanılmıştır.

#### **3.2.5.5. Bakteriyosin Aktivitesine pH'nın Etkisi**

Kaba bakteriyosin örnekleri 4 mM fosfat tamponunda 250 mg/ml konsantrasyonda çözündürülmüş ve 11 eşit kısma bölünmüştür. Son hacimler eşit olacak şekilde pH'ları 2'den 12'ye kadar birer birim artırılarak NaOH veya fosforik asit (5 M) ile ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra örneklerin pH'sı 6,5'e ayarlanıp aktiviteleri belirlenmiştir (de Kwaadsteniet et al., 2005).

#### **3.2.5.6. Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi**

Depolama sıcaklığının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde bakteriyosin örnekleri 25°C'de 2, 7, 11 gün ve 3 ay, 4, -20 ve -80°C' de 3 ay süreyle tutulmuştur. Belirli aralıklarla örnek alınarak antimikrobiyal aktivitesi saptanmıştır. Ayrıca liyofilizasyon işleminin bakteriyosin aktivitesine etkisi belirlemek için filtre sterilize edilmiş supernatantın aktivitesi belirlendikten sonra dondurulup liyofilizasyonla kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra steril fosfat tamponuyla çözündürüp başlangıç hacmine getirilip aktivitesi saptanmıştır (Yildirim and Johnson, 1998).

### 3.2.5.7. Bazı Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

Organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde formaldehit (% 10), kloroform (% 10), aseton (% 10), propanol (% 10), metanol (% 10), etil alkol (% 25), hekzan (% 25) ve etil eter (% 25) çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltilerin mililitresinde 250 mg kaba bakteriyosin olacak şekilde bakteriyosin preparatı katılıp 25°C'de 1 saat inkübe edilmişlerdir. Bu işlemin ardından örneklerin antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Bakteriyosin içermeyen organik çözücüler ve organik çözücü içermeyen bakteriyosin örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır (Bhunja et al.,1988).

### 3.2.5.8. Bazı Deterjanların ve Kimyasal Maddelerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

Bakteriyosin supernatantlarına sodyum dodesil sülfat (SDS), tween 80, üre ve triton X-100 deterjanları % 1 oranında ilave edildikten sonra 37°C'de 5 saat inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda örneklerin aktivitesi saptanmıştır. Negatif ve pozitif kontrol olarak belirtilen deterjanların % 1'lik çözeltileri ve bakteriyosin supernatantı kullanılmıştır.

Bakteriyosin supernatantına konsantrasyonu 0,1, 2,0 ve 5,0 mM olacak şekilde EDTA (etilen diamin tetra-asetik asit) ilave edilmiş ve 37°C'de 5 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda bakteriyosin aktivitesi belirlenmiştir. Bakteriyosin içermeyen EDTA'nın belirtilen çözeltileri ve bakteriyosin örneği negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

$\beta$ -merkaptetanolün bakteriyosin aktivitesine etkisini tespit etmek için bakteriyosin supernatantına % 10 oranında  $\beta$ -merkaptetanol ilave edilerek 90°C'de 5 dk ısıl işleme tabi tutulmuş ve oda sıcaklığına soğutulduktan sonra bakteriyosin aktivitesi belirlenmiştir. Kontrol olarak ısıl işlem uygulanmış ve uygulanmamış bakteriyosin supernatantı, ısıl işlem uygulanmış  $\beta$ -merkaptetanol çözeltisi kullanılmıştır (de Kwaadsteniet et al. 2005).

### **3.2.6. Bakteriyosin Üretimine Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi**

#### **3.2.6.1. Bakteriyosin Üretimine İnokülüm Miktarının Etkisi**

İnokülüm miktarının bakteriyosin üretimine etkisini saptamak için % 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ve 2,5 oranlarında bakteri MRS sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 25°C’de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi süresince belirli aralıklarla steril koşullarda örnek alınıp bakteriyosin aktivite, pH ve absorbans değeri testlerine tabi tutulmuştur.

#### **3.2.6.2. Bakterinin Gelişme Sıcaklığının ve Gelişme Fazının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi**

Bakteriyosinin hangi gelişme sıcaklığı ve hangi gelişme fazında maksimum düzeyde üretildiğini belirlemek amacıyla, izole edilen bakteri MRS besiyerine % 0,1 oranında inoküle edilip 25, 32 ve 37°C’de 72 saat süreyle inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi sırasında belirli aralıklarla kültür ortamından örnek alınıp bakteriyosin aktivitesi, pH’sı ve absorbans değeri (600 nm) spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

#### **3.2.6.3. Başlangıç pH’sının Bakteriyosin Üretimine Etkisi**

Başlangıç pH’sı 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 ve 8,5’e ayarlanan MRS sıvı besiyerine % 0,1 oranında bakteri ilave edildikten sonra 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin 0, 12, 15, 18 ve 24. saatlerinde örnekler alınıp bakteriyosin aktivitesi, pH değeri ve absorbans değerleri (600 nm) belirlenmiştir (Todorov and Dicks, 2005).

#### **3.2.6.4. Farklı Besiyerlerinin Bakteriyosin Üretimine Etkisi**

Farklı besiyerlerinde bakteriyosin üretimini belirlemek amacıyla BHI, PCA, NB, NB(E) ve MRS besiyerleri kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine % 0,1 oranında bakteri ilave edilmiş ve 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi süresince belirli periyotlarla örnekler alınarak bakteriyosin aktivitesi, pH değeri ve absorbans değeri (600 nm) tespit edilmiştir.

#### **3.2.7. Bakteriyosinin Kısmen Saflaştırılması**

MRS besiyerinde geliştirilen kültür santrifüj (8500 g’de 30 dk) edildikten sonra hücre uzaklaştırılmıştır. Hücre içermeyen süpernatantın pH değeri 6,5’e NaOH (10 N) kullanılarak ayarlanmıştır. Daha sonra yavaş bir şekilde % 45 oranında amonyum sülfat ilave edilmiş ve 4°C’de gece boyunca karıştırılmıştır. Karışım santrifüj (4°C’de 8000 g/ 60 dk) edildikten sonra yüzeyde ve altta biriken pelet toplanarak 10 mL sodyum fosfat tamponunda (pH 6,5) çözündürülmüştür. Bu işlemin ardında 15 mL metanol/kloroform karışımı (1:2, v/v) ilave edilerek 4°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Örnek santrifüj edildikten sonra pelet liyofilizasyon yöntemiyle kurutularak -80°C’de muhafaza edilmiştir (Moreno et al., 2000).

#### **3.2.8. Bakteriyosinin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi**

Bakteriyosinin molekül ağırlığı % 16 trisin-SDS-PAGE (Sodyum dodecil sülfat-Poliakrilamid jel) kullanılarak saptanmıştır (Schagger and Jagov 1987; Bhunia et al., 1991). Elektroforez işleminden sonra jel iki kısma bölünmüştür. Jellerden birisi Coomassie blue G-250 ile 1 saat boyanıp boyayı uzaklaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Antimikrobiyal aktivite testi için diğer jel Coomassie blue G-250 ile 30 dk boyanıp 1,5 saat boyayı uzaklaştırmak için yıkama işlemine maruz kalmıştır. Bu işlemin ardından, jel 3 saat süresince steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra jel büyük petri kutusunda bulunan

MRS agar üzerine dikkatlice konulmuştur. Jel üzerine *Lb. plantarum* içeren 45°C'deki yumuşak MRS agar dökülüp 30°C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur.

### **3.2.9. İstatiksel Değerlendirme**

Araştırma 4 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler Minitab programı kullanılarak istatiksel değerlendirmeye tabi tutulmuştur (Minitab release 12.1, Minitab Inc., 1998).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Bakteriyosin Üreten Bakterinin İzole ve Teşhis Edilmesi

Tokat, İstanbul, Kars, Van, Erzurum yörelerinde üretilen geleneksel bazı gıdalar ile farklı sebzeler, meyveler metaryal ve metot bölümünde ifade edildiği gibi bakteriyosin üreten bakterilerin izolasyonu amacıyla incelenmiştir. Bu tarama sonucunda çeşitli hububatların fermente edilmesiyle elde edilen bir gıda olan bozada, kullanılan indikatör bakterilere karşı inhibitör aktiviteye sahip koloniler belirlenmiştir. İnhibitör zonu veren bakteri kolonileri MRS broth besiyerine aktarılarak saf kültürleri hazırlanmıştır.

Saf kültürleri hazırlanan koloniler ilk olarak genel mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuştur. Analizler sonucunda izole edilen bakterinin Gram pozitif, tek, ikili ve kısa zincirler halinde kok şeklinde ve hareketsiz olduğu, zayıf alfa- hemoliz pozitif, katalaz, indol ve Voges Proskauer negatif olduğu, endospor oluşturmadığı ve jelatinaz aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bakterinin 10-45°C sıcaklıklarda, 6,0-9,6 pH aralığında ve % 3,0-4,0 NaCl konsantrasyonlarınsa gelişebildiği, ancak belirtilen sıcaklık, pH ve NaCl konsantrasyonların üzerine çıkıldığında gelişemediği gözlenmiştir. Bakterinin UHT sütte gelişimi sırasında pH değerini 24 saat ve 7 gün sonra 5,28 ve 4,58 değerlerine düşürdüğü ve glikoz broth besiyerinde 24 saat sonra oluşturduğu en son asitliğin ise 3,80 pH olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1).

API strep 20 ve API 50 CHL kullanılarak belirlenen karbonhidrat fermantasyon analiz sonuçları Çizelge 4.2’de, yağ asidi profili analiz sonuçları ise Çizelge 4.3’te sunulmuştur. Karbonhidrat ve yağ asidi profili analizleri sonucunda cins ve tür düzeyinde yüksek bir korelasyonla izolataın *Lactococcus lactis* spp. *lactis* olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen bakteri *L. lactis* spp. *lactis* BO ve bakteriyosini ise laktokoksin BO olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 4.1. Antibakteriyel aktiviteye sahip bakterinin bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

<b>Analizler</b>	<b>İzolat</b>
Gram Boyama	+
Şekli	Kok
Katalaz Testi	-
Endospor Testi	-
Hemoliz testi	zayıf $\alpha$ -hemoliz
Hareketlilik	-
İndol Testi	-
Voges Proskauer	-
Jelatin Hidrolizi	-
pH Gelişme Aralığı	
pH 3,0	-
pH 4,0	-
pH 4,4	-
pH 6,0	+
pH 8,0	+
pH 9,2	+
pH 9,6	+
NaCl Gelişme Aralığı	
% 3 NaCl	+
% 4 NaCl	+
% 6,5 NaCl	-
%10 NaCl	-
Sıcaklık Gelişme Aralığı	
10°C	+
30°C	+
37°C	+
40°C	+
45°C	+
50°C	-
55°C	-
Sütte asit üretimi	pH 4,58
Glikoz Broth besiyerinde oluşturulan en son asitlik	pH 3, 80

+ : Üreme var; - : Üreme yok

Çizelge 4.2. İnhibitör aktiviteye sahip koloninin karbonhidrat fermantasyon profili

Karbonhidratlar	İzolat	Karbonhidratlar	İzolat
Gliserol	-	Maltoz	+
Eritritol	-	Laktoz	+
D-Arabinoz	-	Melibiyoz	-
L-Arabinoz	-	Sakkaroz	-
Riboz	+	Trehaloz	+
D-Ksiloz	+	İnulin	+
L-Ksiloz	-	Melezitoz	-
Adonitol	-	D-Rafinoz	-
$\alpha$ - metil-ksilosit	-	Amidon	+
Galaktoz	+	Glikojen	-
D-Glukoz	+	Ksilitol	-
D-Fruktoz	+	$\beta$ -gentiobiyoz	-
D-Mannoz	+	D-Turanoz	-
L-Sorboz	-	D-Lyxose	-
Ramnoz	-	L-Tagotoz	-
Dulsitol	-	D-Fukoz	-
İnositol	-	L-Fukoz	-
Mannitol	-	D-Arabitol	-
Sorbitol	-	L-Arabitol	-
$\alpha$ - metil-mannozit	-	Glukonat	-
$\alpha$ - metil-D- glukozit	+	2-keto-glukonat	-
N-asetil-glukozamin	+	5-keto-glukonat	-
Amigdalin	+	Hippurat hidrolizi	ND
Esculine	+	Pirorolidonilarilamidaz	-
Salisin	+	$\beta$ -Galaktosidaz	+
Sellobioz	+	Lösin aminopeptidaz	+
Arbutin	+	Arjinin dihidrolaz	+

+ : Pozitif reaksiyon;      - : Negatif reaksiyon;      ND: Belirlenmedi

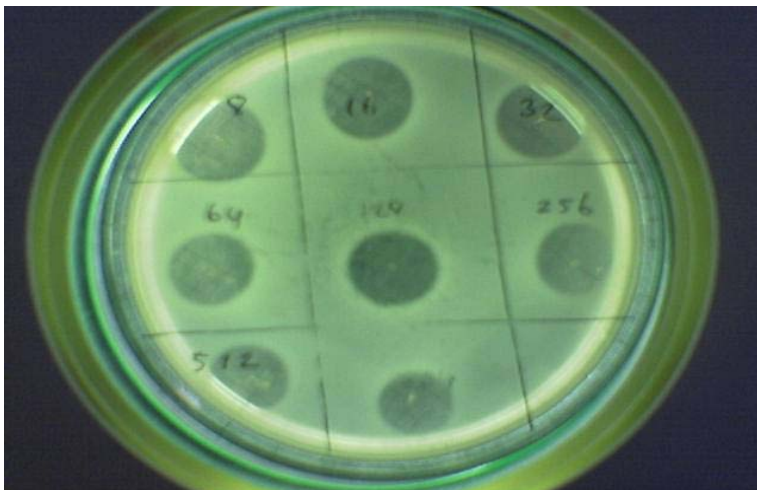
Çizelge 4.3. İnhibitör aktiviteye sahip koloninin yağ asidi profili<sup>a</sup>

Yağ asidi	%
Laurik Asit (12:0)	1,50
Miristik Asit (14:0)	9,69
Sum in featured 3 (16:1 w7c/15 iso 2OH)	4,25
Palmitik Asit (16:0)	36,89
Oleik Asit (18:1 w9c)	9,98
Cis- vaksenik Asit (18:1 w7c)	11,42
Stearik Asit (18:0)	1,89
Sum in featured 7 (19:1 w6c/.846/19cy)	8,00
10-metilen oktadekonat (19:0 cyclo w8c)	14,50
Gadoleik asit (20:1 w9c)	1,89
Summed Feature 3 (16:1 w7c/15 iso 2OH;15:1 iso 2OH/16:1w7c)	4,25
Summed Feature 7((19:1 w6c/.846/19cy; 19:0 cyclo w10c/19w6)	8,00

<sup>a</sup>Sherlock Microbial Identification System (version 4.0), MIS Operating manual, 145 pp, MIDI, Inc, Newark, DE, USA

#### 4.2. Bakteriyosinin Antimikrobiyal Aktivitesi ve Spektrumu

*Lb. plantarum*'a karşı steril kültür supernatının antimikrobiyal aktivitesinin 300 AU/mL, konsantre bakteriyosinin (500 mg/mL) 1600 AU/ml; kısmi saflaştırılmış bakteriyosinin (100 mg/mL) ise 1024 AU/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Amonyum sülfatla kısmi saflaştırılmış bakteriyosin örneğinin *Lb. plantarum*' a karşı inhibitör aktivitesi

*L. lactis* spp. *lactis* BO test edilen Gram-pozitif bakterilerden *Lb. plantarum*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. dissduens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. cremoris*, *L. monocytogenes*, *L. ivonovi*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. treurgesis* spp. *plateni* ve Gram negatif bakterilerden *Enterobacter cloaceae*, *E. coli* Tip I, *Rhodococcus equi*, *Hafnia alvevi*, *Salmonella* spp., *S. enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Camphylobacter jejuni* ve *Citrobacter freundii*'ye karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu, ancak *S. aureus* CAMP, *E. coli* O157:H7, *Proteus mirabilis*, *Y. enterocolitica* O:3 ve *Enterobacter aerogenes*'e karşı inhibitör aktiviteye sahip olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.4). Verilerden de anlaşılacağı üzere laktokosin BO'nun antibakteriyel aktivitesi tür, hatta suş spesifikdir. Laktokosin BO 3'ten fazla yani 14 farklı cins üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olduğu için antimikrobiyal spektrumu oldukça geniştir. Özellikle Gram-negatif bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip olması oldukça ilgi çekicidir. Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin büyük bir kısmı genellikle Gram-pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkiye sahiptirler. Ancak son yıllarda Gram-negatif bakteriler üzerinde de inhibitör etkiye sahip bazı bakteriyosinler tespit edilmiştir.

*L. lactis*'in değişik suşları tarafından üretilen birçok bakteriyosinlerin *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria*, *Micrococcus* ve LAB'leri üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu ve bu inhibitör etkinin suş spesifik olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Yang, 1992; Klaenhammer, 1993; Jack et al., 1995; Yildirim and Johnson, 1998; McAuliffe et al., 1999; von Mollendorff et al. 2006; Savagodo et al., 2006).

Son yıllarda bazı LAB bakteriyosinlerinin Gram-pozitif bakterilerin yanı sıra bazı Gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu ortaya konmuştur. Bu bakteriyosinlerden laktisin NK24'nın *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* (Lee and Paik, 2001), laktis B14'ün *E. coli* (Ivanova et al., 2000), bakteriyosin ST23LD, ST341LD, ST311LD ve ST33LD'nin *E. coli* ve *P. aeruginosa* (Todorov and Dicks, 2005b), bakteriyosin ST15'in *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* ve *P. aeruginosa* (de Kwaadsteniet et al., 2005), bakteriyosin HV219'un *E. coli*, *Proteus vulgaris* ve *P. aeruginosa* (Todorov et al. 2006b), bakteriyosin JW15BZ'nin Gram-negatif bakterilerden *K. pneumoniae* (von Mollendorff, et

Çizelge 4.4. Laktokoksin BO'nun antimikrobiyal etki spektrumu (n=4).

Bakteri	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Lactobacillus plantarum</i> (RSKK)	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i> (AÜ)	+++
<i>Enterococcus faecium</i> (RSKK-ATCC 9097)	++
<i>Enterococcus faecalis</i> (RSKK- ATCC 8043)	++
<i>Enterococcus faecium</i> (RSKK)	+++
<i>Enterococcus dissduens</i> (AÜ)	++
<i>Lactococcus cremoris</i> (AÜ)	+++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (AÜ)	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> (AÜ)	++
<i>Listeria ivonovii</i> (RSKK)	+
<i>B. cereus</i> (AÜ)	+
<i>B. subtilis</i> (AÜ)	++
<i>B. treurgensis</i> spp. <i>plasteni</i> (AÜ)	++
<i>Enterobacter cloaceae</i> (AÜ)	++
<i>Escherichia coli</i> Tip I (AÜ)	+
<i>Escherichia coli</i> (AÜ)	++
<i>Rhodococcus equi</i> (AÜ)	++
<i>Hafnia alvevi</i> (AÜ)	+
<i>Salmonella</i> spp.	+
<i>Salmonella enteritidis</i> (AÜ)	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 (AÜ)	+
<i>Camphylobacter jejuni</i> (AÜ)	+
<i>Citrobacter freundii</i> (AÜ)	+
<i>Staphylococcus aureus</i> CAMP (AÜ)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (AÜ)	-
<i>Listeria ivonovii</i> (AÜ)	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (AÜ)	-
<i>Proteus mirabilis</i> (AÜ)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 (AÜ)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (AÜ)	-

+: İnhibisyon pozitif (+++; inhibisyon çapı 20 mm'den büyük, ++; inhibisyon çapı 11-19 mm, +; inhibisyon çapı 4-10 mm)

-: İnhibisyon negatif;

AÜ: Ankara Üniversitesi; RSKK: Refik Saydam Hıfzısıhha Kültür Koleksiyonu

al. 2006), bakteriyosin AMA-K'nın *E. coli* ve *K. pneumoniae* (Todorova et al., 2007)'ya karşı aktif olduğu da belirlenmiştir.

### 4.3. Enzimlerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

*L. lactis* spp. *lactis* BO tarafından üretilen laktokoksin BO'nun test edilen enzimlerden papain, pepsin ve tripsine karşı duyarlı olduğu, diğer enzimlerden ise etkilenmediği görülmüştür (Çizelge 4.5). Bakteriyosin aktivitesinin amilaz ve lipazdan etkilenmemesi bakteriyosin aktivitesinde karbonhidrat ve lipit bileşenlerinin etkisinin olmadığını, katalazdan etkilenmemesi ise inhibitör aktivitenin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den kaynaklanmadığını göstermektedir. Bakteriyosinin aktivitesinin proteolitik enzimlerden papain, pepsin ve tripsin ile muamele edilen bakteriyosinin aktivitesini tamamen kaybetmesi bu molekülün protein tabiatında olduğunu ortaya koymaktadır.

Laktis B14 (*L. lactis* subsp. *lactis* B14) proteinaz K, pronase E ve pepsine duyarlı, tripsin, kimotripsin ve rennine dayanıklı (Ivanova et al., 2000); nisin (*L. lactis* spp. *lactis* A164) β-kimotripsin, α-kimotripsin ve pronaz E'ye hassas, tripsin ve pepsine stabil (Cheigh et al., 2000); bakteriyosin H-559 (*L. lactis* spp. *lactis* H-559) α-kimotripsin ve proteaza duyarlı, pepsin ve tripsine dayanıklı (Ahn et al., 1999); bakteriyosin 24 (*L. lactis* NK 24) proteaza duyarlı, tripsine stabil (Lee and Paik, 2001); bakteriyosin HV219 (*L. lactis* subsp. *lactis* HV219) proteinase K, pronaz ve tripsine; bakteriyosin JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ ve JW15BZ (*Lb. plantarum* ve *L. fermentum*) tripsin, pronaz, proteinaz K, pepsin ve papaine duyarlı olduğu bildirilmiştir (Todorov et al., 2006a). Yukarıda belirtilen bütün bakteriyosinlerin amilaz, lipaz ve katalaz enzimlerine karşı dayanıklı olduğu ifade edilmiştir.

Çizelge 4.5. Laktokosin BO'nun aktivitesi üzerine farklı enzimlerin etkisi (n=4).

Enzimler	Bakteriyosin Aktivitesi
Lipaz (EC 3.1.1.3)	+ (%100)
Katalaz (EC 1.11.1.6)	+ (%100)
Tripsin (EC 132.650.8)	- (%50)
Papain (EC 3.4.22.2)	- (%0)
Pepsin (EC 3.4.23.1)	- (%0)
Pankreatin (EC 232.468.9)	+ (100)

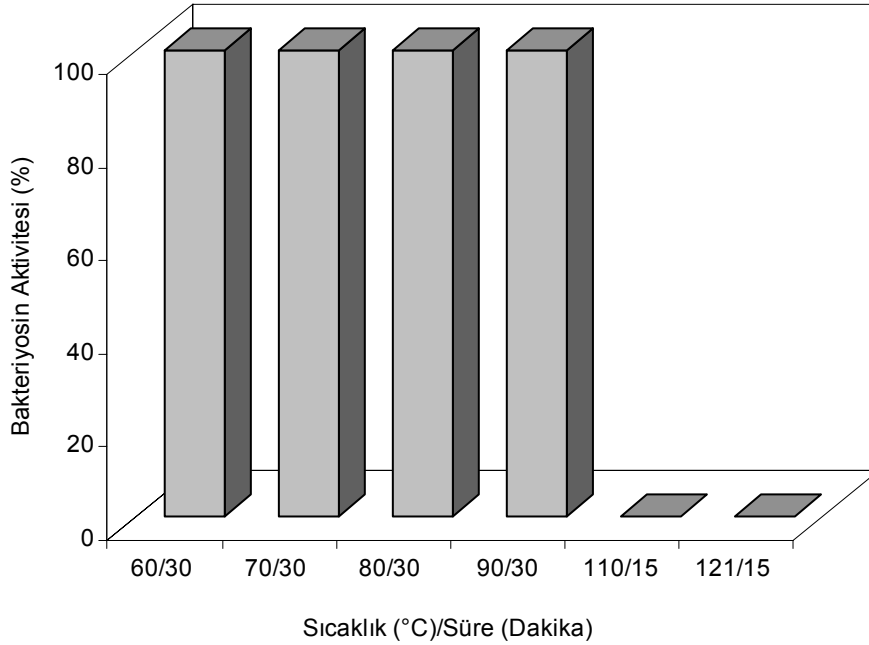
+ : inhibisyon var; - : inhibisyon yok

Yukarıda verilen literatür bilgileri ışığında laktokosin BO proteolitik enzimlere karşı duyarlılığı açısından diğer laktokoklar ve bozadan izole edilen diğer bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerden (örneğin nisin, laktis B14, bakteriyosin HV219 vb.) farklılık sergilemektedir. Bu da laktokosin BO'nun yeni bir bakteriyosin olduğunu ortaya koymaktadır. Farklılığın nedeni amino asit dizisinden kaynaklanmaktadır.

#### 4.4. Bakteriyosin Aktivitesine Isıl İşlemin Etkisi

*L. lactis* spp. *lactis* BO'nun ürettiği laktokosin BO'nun 90°C'de 30 dakika ısıtma işlemine dayanıklı olduğu ve aktivitesini tamamen koruduğu, 110 ve 121°C'de 15 dakika ısıtma işlem koşullarında ise inhibitör aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Yüksek derecelerde uygulanan ısıtma işlemine dayanıklı olması bu proteinin yapısından kaynaklandığı ve söz konusu bakteriyosinin yapısında ikincil ve üçüncül yapıların olmadığı ve daha çok globüler yapıda olduğunu ortaya koymaktadır.

Laktis B14 (*L. lactis* subsp. *lactis* B14)'ün ısıtma işlemine duyarlı olduğu, 80°C'de 10 dk uygulanan ısıtma işlemde kısmen, 100°C'de 10 dk'da tamamen inaktif (Ivanova et al., 2000), bakteriyosin H-559 (*L. lactis* spp. *lactis* H-559)'nin 100°C'de 10 dk uygulanan ısıtma

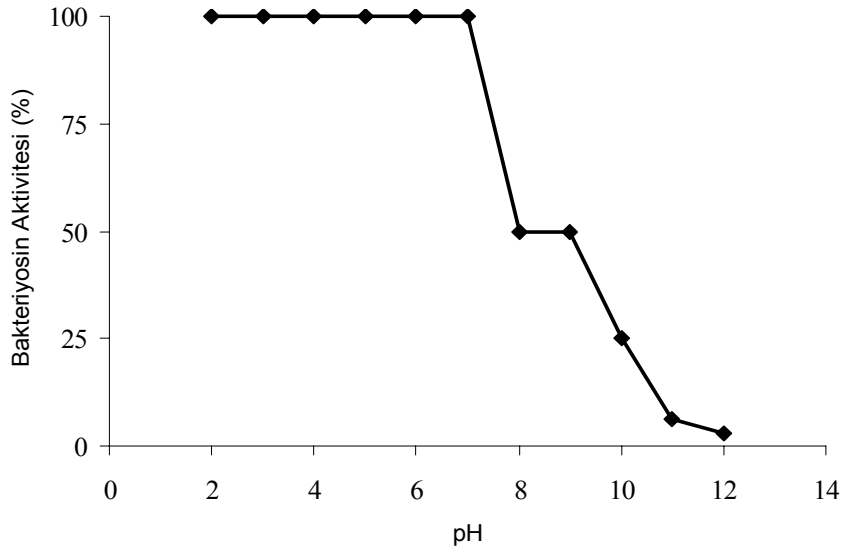


Şekil 4.2. Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine ısıl işlemin etkisi (n=4).

işleme karşı aktivitesini koruduğu, ancak 121°C'de 20 dk'da aktivitesini büyük oranda kaybettiği (Ahn et al., 1999) ve garviesin L1-5 (*L. garvica*)'in 100°C'de 15 dk uygulanan ısıl işlemde aktivitesinin %75'ini, 121°C'de 15 dk ise aktivitesinin tamamını kaybettiği belirlenmiştir (Villani et al., 2001). Nisin, bakteriyosin HV219, JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ ve JW15BZ, plantarisin LP84, enterosin A ve B'nin yüksek ısıl işleme (121°C/20 dk) dayanıklı olduğu bulunmuştur (Yang et al., 1992; Varadaraj et al., 1998; Herranz et al., 2001; Todorov et al., 2006; von Mollendorff et al., 2006).

#### 4.5. Bakteriyosin Aktivitesine pH'nın Etkisi

Laktokoksin BO'nun aktivitesinin asidik ve nötral pH'larda maksimum düzeyde olduğu belirlenmiştir. pH 8,0 ve 9,0'da aktivitesinde % 50 oranında ve pH 10,0 ve üzerindeki değerlerde ise % 75-95 oranında azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.3). Alkali koşullarda aktivitesini kaybetmesi laktokoksin BO'nun izoelektrik noktasının alkali bir



Şekil 4.3. Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine pH'nın etkisi (n=4).

değerde olduğunu ifade etmektedir.

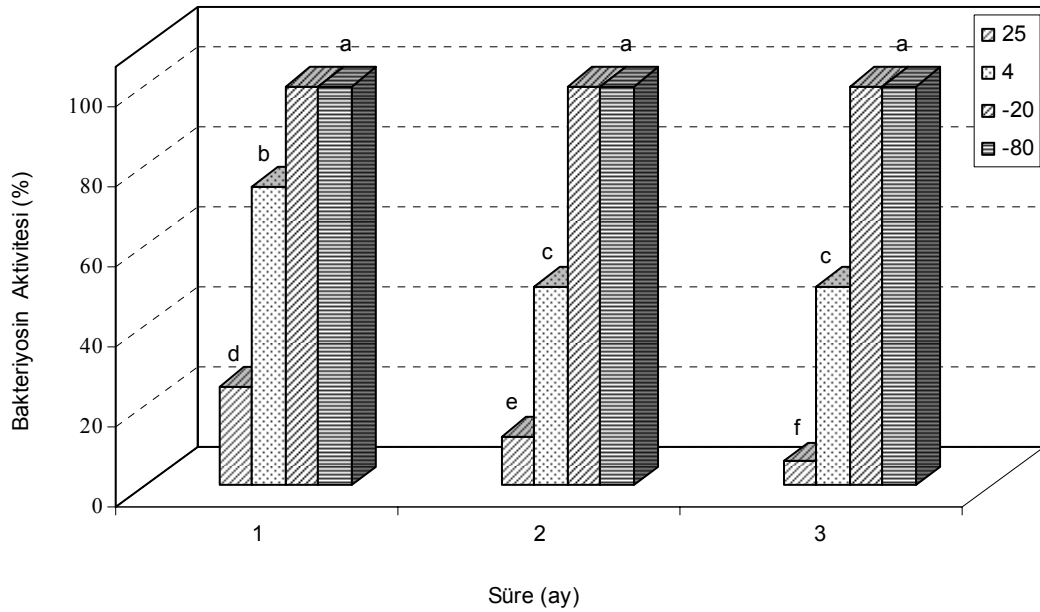
*L. lactis* subsp. *lactis* B14'in ürettiği laktis B14'ün 3,0-10,0 pH; *L. lactis* spp. *lactis* H-559 ve HV219'un salgıladığı bakteriyosinlerin 2,0-11,0 pH; *L. garvicæ*'nin ürettiği garviesinin L1-5'in 2,0-9,0 pH; ve *E. faecium* P21 tarafından üretilen enterosin A ve B'nin 2,0-11,0 pH aralığında aktivitesini koruduğu bulunmuştur (Ivanova et al., 2000; Ahn et al., 1999; Villani et al., 2001; Herranz et al., 2001; Todorov et al. 2006b).

#### 4. 6. Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi

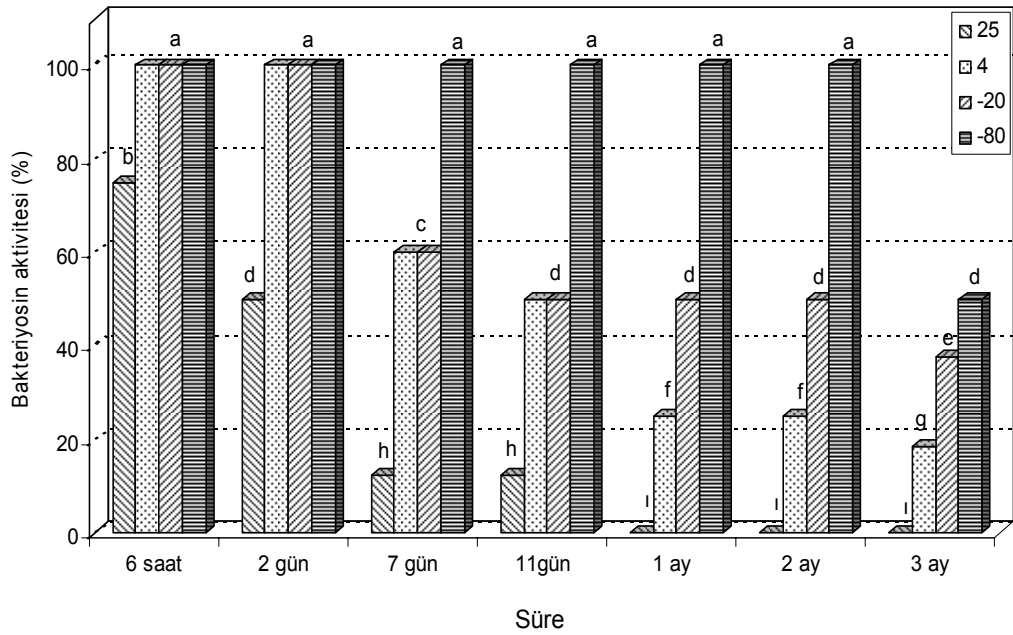
Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine depolama sıcaklığı ve süresinin etkisini belirlemek için liyofilize edilmiş ve dondurulmuş konsantre bakteriyosin örnekleri kullanılmıştır. Araştırma sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.4 ve 4.5'te sunulmuştur. Şekillerde de görüldüğü üzere liyofilize formda -20 ve -80°C'de depolandığında 3 ay süresince aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4). Ancak konsantre dondurulmuş formda muhafaza edildiğinde -20°C'de depolamanın 7. günden itibaren aktivitesinde %40

dolayında azalma olduğu, 3. ayın sonunda bu azalmanın ise %62,5'ya ulaştığı tespit edilmiştir. Aynı örnek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildiğinde ise 2 ay süresince aktivitesini muhafaza ettiği, fakat depolamanın 3. ayında aktivitesinde %50 oranında bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). Liyofilizasyon işleminin ise bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

*L. lactis* tür ve suşları tarafından üretilen nisin, laktokoksin R ve laktokoksin MMT24 (Ray, 1992; Yildirim and Johnson, 1998; Ghrairi et al., 2005) ve enterokoklar tarafından üretilen enterosin A, B ve EK 13'ün (Herranz et al., 2001; Nes et al., 2003) liyofilizasyon işleminden etkilenmediği ve düşük derecelerde depolama koşullarında ( $-20$  ve  $-80^{\circ}\text{C}$ ) aktivitesini uzun süre muhafaza ettiği belirtilmektedir. Laktisin B14'ün sıvı formda  $4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildiğinde 2 aydan, dondurulmuş formda muhafaza edildiğinde ise 6 aydan daha fazla süre aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir (Ivanova et al., 2000).



Şekil 4.4. Liyofilize laktokoksin BO'nun depolama stabilitesi (n=4). Aynı harfli ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir ( $P>0.05$ ).



Şekil 4.5. Konsantre laktokoksin BO'nun depolama stabilitesi (n=4). Aynı harfli ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir ( $P>0.05$ ).

#### 4.7. Bazı Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

*L. lactis* spp. *lactis*'in sentezlediği laktokoksin BO'nun aktivitesinin test edilen organik çözücülerden etkilenmediği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Laktokoksin BO'nun organik çözücülerden etkilenmemesi inhibitör aktivitesinden sorumlu olan bölgede karbonhidrat ya da lipit türevli bileşenlerin olmadığını göstermektedir. Birçok araştırmacı tarafından da LAB'lerinin ürettiği bakteriyosinlerin organik çözücülere karşı dayanıklı olduğu bulunmuştur (Ray, 1992; Yildirim and Johnson, 1998; Lee and Paik, 2001; Dicks and Todorov, 2005a).

Çizelge 4.6. Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi (n=4).

Organik Çözücü	Bakteriyosin içermeyen organik çözücüler	Bakteriyosin Aktivitesi (AU/mL)
Formaldehit (%10)	+	6400
Isopropil Alkol (%10)	-	6400
Aseton (%10)	-	6400
Metanol (%10)	-	6400
Kloroform (%10)	-	6400
Etil Eter (%25)	-	6400
Hekzan (%25)	-	6400
Etil Alkol (%25)	-	6400

Organik çözücü içermeyen bakteriyosin aktivitesi (AU/ml): 6400

+ : inhibisyon var - : inhibisyon yok

#### 4.8. Bazı Deterjanların ve Kimyasal Maddelerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine deterjanların etkisi aktif molekülün yapısı hakkında bilgi vermektedir. Anyonik deterjanlar proteinlerin doğal yapılarındaki hidrofobik merkezle kompleks oluşturarak proteinin açılmasına ve üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Deterjan uygulaması ile bakteriyosin aktivitesinde bir kayıp meydana gelmesi, bakteriyosinin kısmi denatürasyonu ya da aktivitesi üzerinde stabilizasyon etkisi olan diğer moleküllerle birlikteliğinin bozulmasından kaynaklanmaktadır (Ivanova et al., 1998). EDTA, bakteriyosin aktivitesinde rol oynayan divalent katyonlarla kompleks oluşturarak bakteriyosin aktivitesini olumsuz yönde etkileyebileceği gibi hücre membranına zarar vererek bakteriyosinin etkisini kolaylaştırabilmektedir.  $\beta$ -merkaptetanol ise bakteriyosin yapısında bulunan ve aktivitesinde rol oynayan olası disülfid bağlarını kırarak bakteriyosin aktivitesinin azalmasına yada tamamen kaybolmasına neden olmaktadır (Hammes et al., 1999).

Laktokoksin BO deterjanlardan SDS, üre, Tween 80 ve Triton X-100 ile kelatlaştırıcı madde olan EDTA'la muamele edildiğinde aktivitesini muhafaza ettiği, ancak %10  $\beta$ -merkaptetanol ile birlikte muamele edildiğinde aktivitesinde %50 oranında

Çizelge 4.7. Laktokoksin BO'nun aktivitesi üzerine bazı deterjan ve kimyasalların etkisi (n=4).

Deterjan ve Kimyasallar	Bakteriyosin İçermeyen Deterjan Ve Kimyasalların İnhibisyon Etkisi	Bakteriyosin Aktivitesi (%)
SDS (% 1)	-	100
Tween 80 (% 1)	-	100
Triton X-100 (% 1)	-	100
Üre (% 1)	-	100
EDTA		
0,1 mM	-	100
2,0 mM	-	100
50,0 mM	-	100
1,0 M	-	100
β-merkaptöetanol (% 10)	-	50

+ : inhibisyon var      - : inhibisyon yok

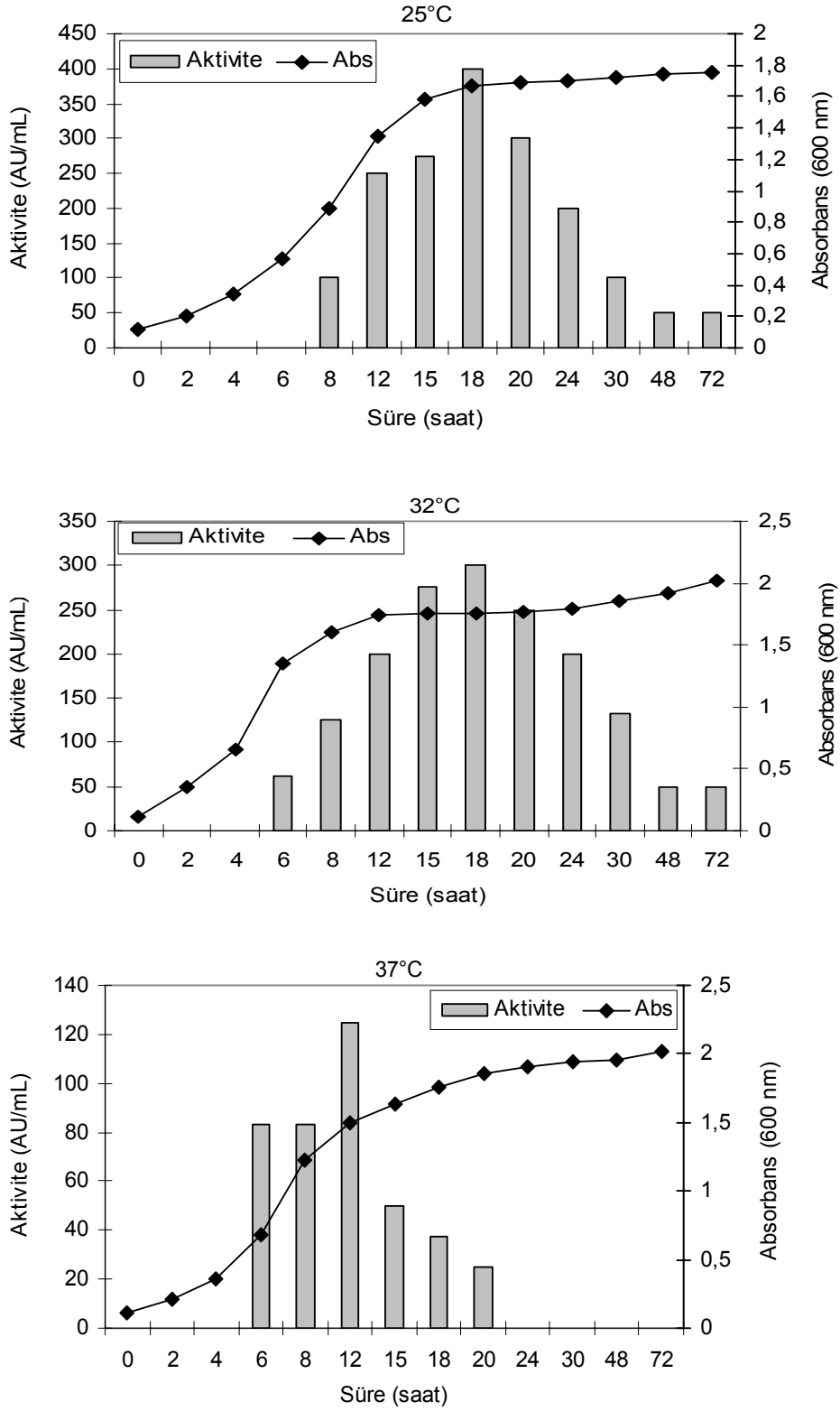
bir azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Elde edilen bu sonuçlar bakteriyosinin yapısında ikincil ve üçüncül yapıların olmadığı ve ayrıca aktif bölgesinin hidrofobik nitelikte olmadığı anlaşılmaktadır. Ancak bakteriyosinin β-merkaptöetanol uygulaması ile aktivitesinin %50'ni kaybetmesi aktif bölgesinde disülfid bağların olduğunu göstermektedir. EDTA'nın bakteriyosin aktivitesini etkilememesi ise divalent katyonların inhibitör etki üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Yapılan araştırmalarda laktokoksin R, pediosin ST18 ve laktisin B14'ün SDS, Tween-20, Tween-80, üre, Triton X-100, EDTA ve β-merkaptöetanol ile muamele edildikten sonra aktivitelerinde herhangi bir kayıp olmadığı ortaya konmuştur (Yildirim and Johnson, 1998; Ivanova et al., 2000; Dicks and Todorov, 2005c ). JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ ve JW15BZ bakteriyosinlerinin SDS, üre, Tween 20, Tween 80 ve EDTA'ya karşı stabil olduğu, ancak bakteriyosin JW3BZ ve JW11BZ'nin Triton X-100, bakteriyosin JW3BZ, JW6BZ ve JW11BZ'nin ise Triton X-114'e karşı hassas olduğu ve aktivitelerini kaybettiği belirlenmiştir (von Mollendorff et al., 2006). Başka bir çalışmada bakteriyosin HV219'nin SDS, Triton X-114 ve Triton X-100'e karşı duyarlı, ancak Tween 20, Tween 80, üre ve EDTA'ya dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Todorov et al., 2006b).

#### 4.9. Bakterinin Gelişme Sıcaklığının ve Gelişme Fazının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

Üretici bakterinin gelişme sıcaklığının ve gelişme fazının laktoksin BO'nun üretimi ve aktivitesi üzerine etkisini saptamak için *L. lactis* spp. *lactis* MRS broth besiyerinde 25, 32 ve 37 °C'de 72 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda, *L. lactis* spp. *lactis*'in 25°C'ye göre 32 ve 37°C'de daha iyi geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.6). Bakteriyosin üretimi ve aktivitesi açısından incelendiğinde ise laktoksin BO'nun 25°C'de maksimum düzeyde üretildiği ve bu sıcaklık derecesinde aktivitesini daha uzun süre koruduğu tespit edilmiştir. Laktoksin BO üretiminin 37°C'de çok düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. 25 ve 32°C'de bakteriyosin üretiminin logaritmik gelişme fazında başladığı (6 ve 8. saatlerde) ve durgun gelişme fazın başlarında maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte bakteriyosin aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. İnkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte bakteriyosin aktivitesinin azalmasının nedeni üretici bakteri tarafından ortama salgılanan ekstraselüler proteolitik enzimlerden kaynaklanmaktadır.

Laktoksin BO'nun üretildiği maksimum aktivite açısından diğer laktokok bakteriyosinleri ve bozadan izole edilen LAB bakteriyosinleri ile karşılaştırıldığında aynı besiyeri ve gelişme sıcaklığı kullanıldığı halde daha düşük olduğu görülmektedir. Birçok LAB bakteriyosinlerinin logaritmik fazda sentezlenmeye başladığı ve logaritmik fazı sonu ile durgun fazın başında maksimum düzeye ulaştığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Ray 1992; Yildirim and Johnson, 1998, 2000; Ivanova et al., 2000; Todorov and Dicks, 2006a).



Şekil 4.6. Farklı gelişme sıcaklıkları ve gelişme fazının laktokoksin BO üretimi ve aktivitesi üzerine etkisi (n=4).

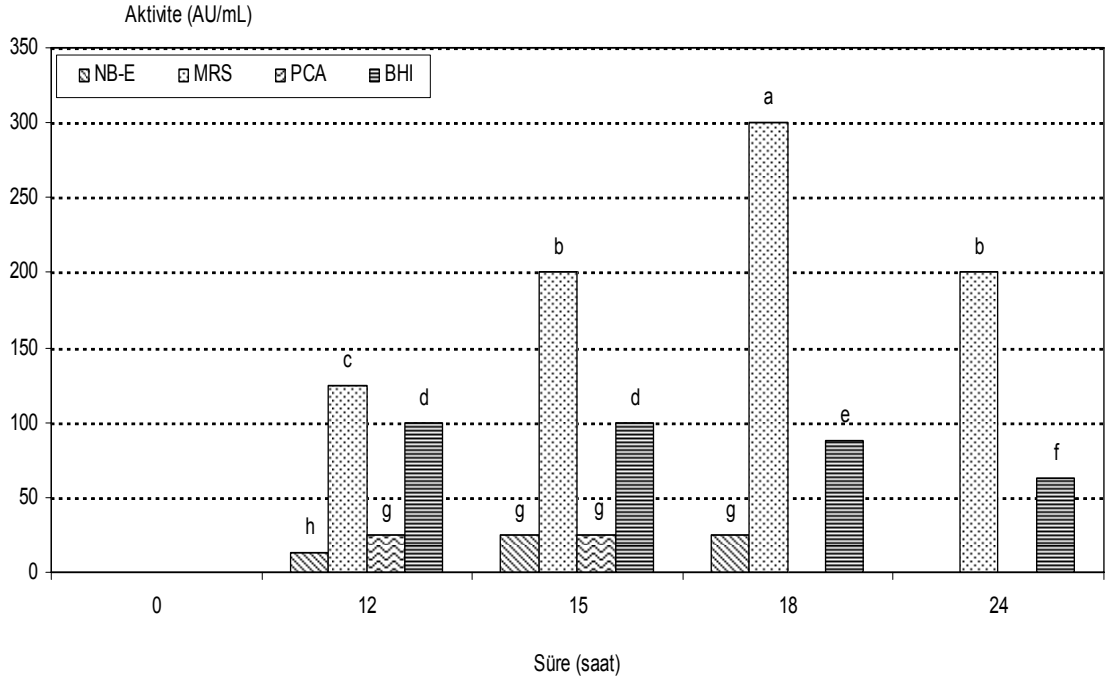
JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ ve JW15BZ bakteriyosinlerinin 30°C MRS broth'da logaritmik fazda üretilmeye başlandığı ve logaritmik fazın sonu ile durgun fazın başında maksimum düzeye ulaştığı bildirilmiştir (von Mollendorff et al., 2006).

*L. lactis* subsp. *lactis* HV219'in gelişme sıcaklığı 30°C olduğu zaman bakteriyosin HV219'un daha fazla üretildiği ve aktivitesini daha uzun süre koruduğu bulunmuştur. Fakat, 37°C gelişme sıcaklığında hem bakteriyosin üretimi hem de stabilitesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bakteriyosin üretimi her iki sıcaklık derecesinde logaritmik fazın başında başladığı ve 30°C'de durgun fazın başlarında (13-28 saat), 37°C'de ise durgun faza girdikten sonra (22-25 saat) maksimum düzeyde üretildiği ortaya konmuştur (Todorov et al., 2006b).

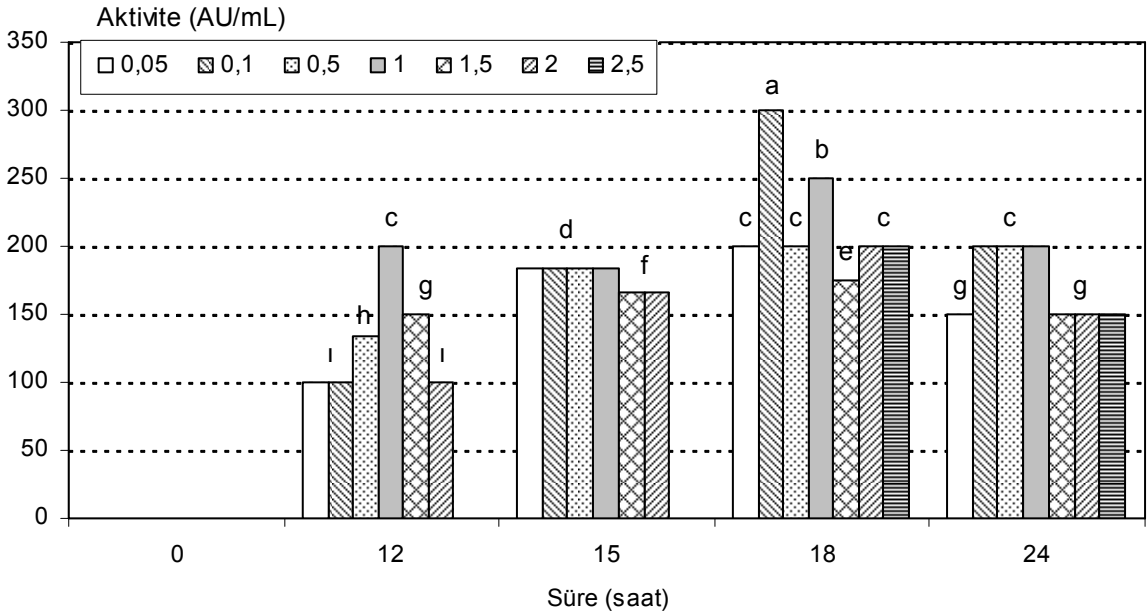
#### **4.10. Bakteriyosin Üretimine Farklı Besiyerlerinin, İnokülüm Miktarının ve Başlangıç pH'sının Etkisi**

Laktokoksin BO'nun hem üretimi hem de aktivitesini artırmak amacıyla Nutrient broth (NB), Plate Count (PC), Brain Heart Infusion (BHI) ve de Mann Rogosa Sharpe (MRS) besiyerleri kullanılmıştır. Analiz sonucunda, laktokoksin BO'nun besin içeriği açısından oldukça zengin ve laktik asit bakterilerin gelişiminde kullanılan kompleks MRS besiyerinde daha iyi geliştiği ve maksimum düzeyde bakteriyosin ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Şekilde de görüleceği üzere üretici bakteri olan *L. lactis* spp. *lactis* BO'nun MRS besiyerinde yoğun bir şekilde gelişmiştir.

İnokülüm miktarının etkisini ortaya koymak için değişik düzeylerde (%0,05-2,5) üretici bakteri MRS besiyerine ilave edilip bakteriyosin üretiminin maksimum olduğu 25°C'de 18 h inkübe edilmiştir. Analiz sonucunda inokülüm miktarı % 0,1 düzeyinde kullanıldığında laktokoksin BO üretiminin maksimum düzeyde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8).



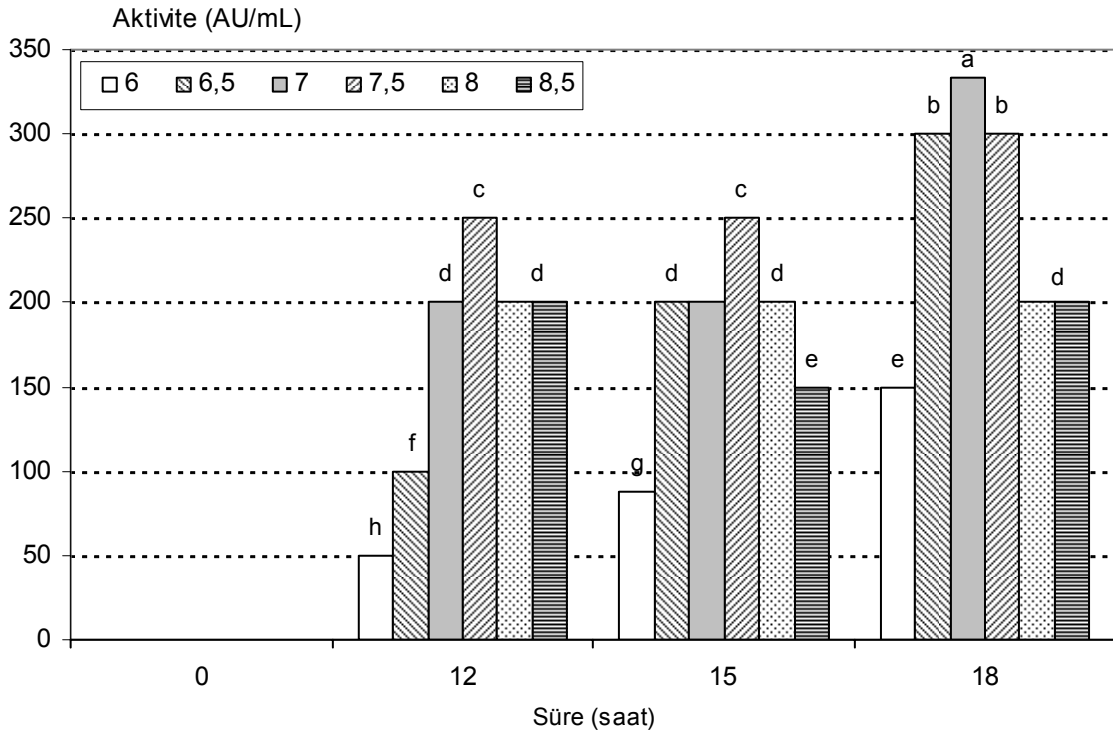
Şekil 4.7. Farklı besiyerlerin laktokoksin BO'nun üretimi üzerine etkisi (n=4). Aynı harfli ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir ( $P>0,05$ ).



Şekil 4.8. İnokülüm miktarının laktokoksin BO'nun üretimi üzerine etkisi (n=4). Aynı harfli ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir ( $P>0,05$ ).

MRS besiyerinin başlangıç pH'sının hem *L. lactis* spp. *lactis* BO'nun gelişimi hem de laktokosin BO'nun üretimi üzerine önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). Besiyeri pH'sı nötral yani 6,0-7,0 pH değerlerde olduğu zaman *L. lactis* spp. *lactis* BO'nun yoğun bir şekilde geliştiği ve buna paralel olarak laktokosin üretiminin arttığı ve özellikle inkübasyon işleminin 18. saatinde maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır. pH 7,0'den yüksek olduğunda söz konusu üretici bakteri gelişiminin iyi olmasına karşın bakteriyosin üretiminin daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Düşük başlangıç pH'larında (pH 5,0-5,5) ise bakteri gelişiminin oldukça düşük düzeyde olduğu ve bakteriyosin üretiminin olmadığı görülmüştür.

*L. lactis* subps. *cremoris* tarafından üretilen laktokosin R'nin üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığı ve süresinin, inokülüm miktarının ve besiyeri başlangıç pH'sının etkili olduğu belirlenmiştir (Yildirim and Johnson, 1998).



Şekil 4.8. Besiyeri başlangıç pH'sının laktokosin BO'nun üretimi üzerine etkisi (n=4). Aynı harfli ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir (P>0,05).

*L. lactis* subsp. *lactis* A164'in optimum gelişme sıcaklığı 37°C ve pH'sı 5,5-6,5 olmasına karşın 30°C ve pH 6,0'da maksimum düzeyde nisin ürettiği bulunmuştur. Bakteriyosin aktivitesinin besiyeri olarak M17L (%3 laktöz), inkübasyon sıcaklığı 30°C ve pH'sı 6,0 kullanıldığında erken durgun gelişme fazında maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır (Cheigh et al., 2002).

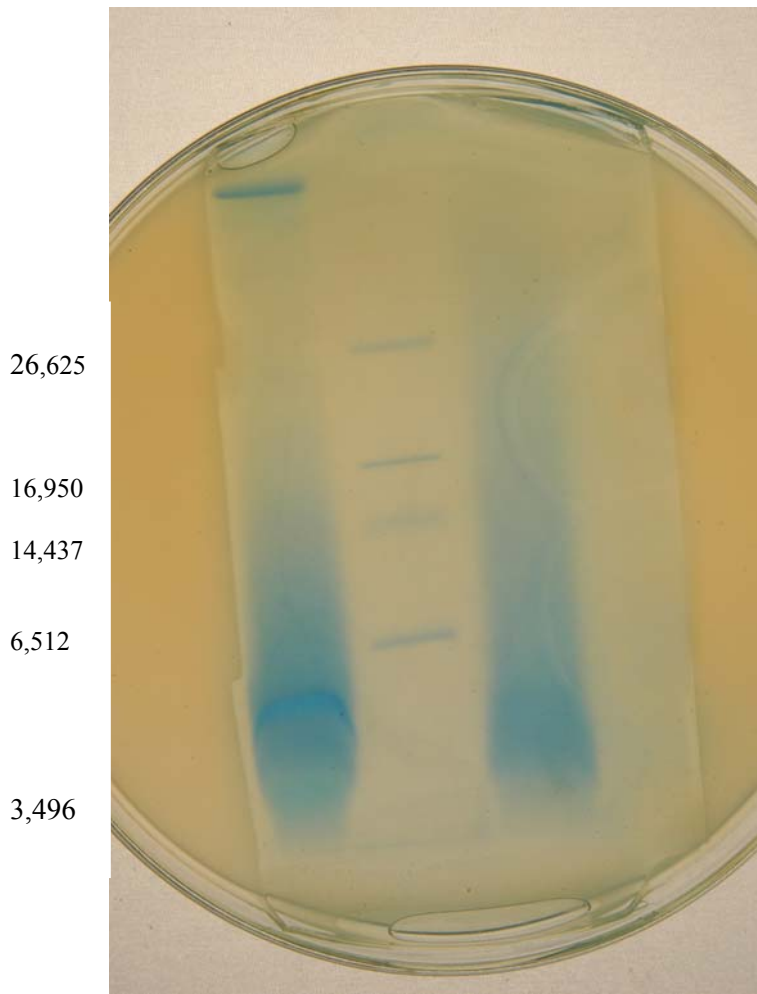
Bakteriyosin HV219 (*L. lactis* subsp. *lactis* HV219)'un MRS besiyeri başlangıç pH'sı 6,0-6,5 ve inkübasyon sıcaklığı 30°C olduğu zaman üretiminin ve aktivitesinin maksimum olduğu saptanmıştır (Todorov et al., 2006b).

#### 4.11. Bakteriyosinin Molekül Ağırlığı

Tuzla çöktürme ile kısmen saflaştırılan laktokoksin BO'nun molekül ağırlığının belirlenmesi için % 16 trisin-SDS-PAGE kullanılmıştır. Boyama ve boya giderme işlemlerinden sonra jelde laktokoksin BO'nun yüklendiği kısımda birden fazla bant gözlenmiştir (Şekil 4.9). Bu bantlardan hangisinin antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğunu belirlemek için *Lb. plantarum*'a karşı antimikrobiyal aktivite testi yapılmıştır. Sonuçta molekül ağırlığı 6512 ile 3496 Da arasında olan bantın inhibitör aktivite gösterdiği saptanmıştır. Laktokoksin BO'nun molekül ağırlığının yaklaşık 5500 Da olduğu tespit edilmiştir. Laktokoksin BO β-merkatoetanole karşı duyarlı olduğu için örnek tamponu β-merkatoetanollü ve β-merkatoetanolsuz hazırlanmıştır. Merkatoetanol içeren örnek tamponunda hazırlanan laktokoksin BO aktivitesini kaybettiğinden *Lb. plantarum*'a karşı inhibitör etkisi göstermemiştir.

*L. lactis* subsp. *lactis*'in ürettiği nisinin molekül ağırlığı 3510 Da (Ray, 1992), *L. lactis* subsp. *cremoris* R'in ürettiği laktokoksin R'in molekül ağırlığının 2,5 kDa (Yildirim and Johnson, 1998), boza izolatı *L. lactis* subsp. *lactis* B14'in ürettiği laktis B14'ün molekül ağırlığının SDS-PAGE ile 5000, amino asit dizisi analizi ile 6000 Da (Ivanova et al., 2000), *L. lactis* subsp. *lactis* ITAL 383'ün oluşturduğu bakteriyosinin molekül ağırlığının 3.5 kDa (Morena et al., 2000), *L. lactis* NK 24 tarafından sentezlenen laktisin

NK'nın moleköl ağırlığının 3.0-3.5 kDa (Lee and Paik, 2001), *L. lactis* subsp. *lactis*'inin ürettiği bakteriyosinin moleköl ağırlığının yaklaşık 4 kDa (Park et al., 2003), boza izolatları *Lb. plantarum* ve *L. fermentum*'un üretmiş oldukları bakteriyosinlerinin moleköl ağırlıklarının ise yaklaşık 2.3 to 3.3 kDa olduğu tespit edilmiştir (von Mollendorff et al., 2006).



Şekil 4.9. Laktokoksin BO'nun *Lb. plantarum*'a karşı inhibitör etkisini gösteren trisin-SDS-PAGE jeli. I. sütun, merkaptotanol içermeyen örnek tamponuyla hazırlanan laktokoksin BO; II. sütun, düşük moleköl ağırlıklı standart; III. sütun, kaba laktokoksin BO.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bozadan antimikrobiyal aktiviteye sahip bir bakteri izole edilmiş ve buna paralel olarak bakterinin tanısı ve ürettiği antimikrobiyal bileşiğin fiziko-kimyasal özellikleri ile üretimini etkileyen faktörler belirlenmiş ve moleküler ağırlığı saptanmıştır. Araştırmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. İzolatın Gram pozitif, kok şeklinde, hareketsiz, endospor, katalaz, jelatinaz, indol ve Voges Proskauer negatif, zayıf  $\alpha$ -hemoliz pozitif, 10-45°C sıcaklıklarda, 6,0-9,6 pH aralığında ve % 3,0-4,0 NaCl konsantrasyonlarında gelişebildiği, ancak belirtilen sıcaklık, pH ve NaCl konsantrasyonların üzerine çıkıldığında gelişemediği gözlenmiştir. Bakterinin glikoz broth besiyerinde 24 saat sonra oluşturduğu en son asitliğin ise 3,80 pH olduğu saptanmıştır. Karbonhidrat fermantasyon ve yağ asidi profili testleri sonucunda bakterinin *L. lactis* spp. *lactis* olduğu belirlenmiş ve izolat *L. lactis* spp. *lactis* BO olarak adlandırılmıştır.
2. Antimikrobiyal aktiviteye sahip maddenin enzimlerden tripsin, papain ve pepsine duyarlı, pankreatin, katalaz, amilaz ve lipaz enzimine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. İnhibitör etkinin supernatant pH'sı nötrlendiğinde de devam etmesi bu etkinin asitlikten kaynaklanmadığını ortaya koymuştur. İnhibitör maddenin proteolitik enzimlerden tripsin, papain ve pepsine duyarlı olması bu maddenin protein tabiatında bir bakteriyosin olduğuna işaret etmiştir. Bundan dolayı *L. lactis* subsp. *lactis* BO'nun ürettiği bu bakteriyosin laktokoksin BO olarak adlandırılmıştır.
3. Laktokoksin BO'nun inhibitör aktivitesinin diğer laktokok bakteriyosinlere göre daha düşük olduğu, fakat inhibitör spektrumunun diğer bakteriyosinlere göre oldukça geniş olduğu belirlenmiştir. Laktokoksin BO'nun *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Esherichia*, *Rhodococcus*, *Hafniai*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Camphylobacter* ve *Citrobacter*'nin bazı şuşlarına karşı inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ancak bu inhibitör etkinin suş spesifik olduğu gözlenmiştir.

4. Laktokoksin BO'nun 90°C'de 30 dakika uygulanan ısıtma işlemi ve geniş pH aralığına (2-9) karşı dayanıklı olduğu, ancak yüksek ısıtma işlemi (121°C'de 15 dk) ve pH değerlerinde aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir.
5. Laktokoksin BO liyofilize formda -20 ve -80°C'de depolandığında 3 ay süresince aktivitesini koruduğu, konsantre dondurulmuş formda ise sadece -80°C'de muhafaza edildiğinde 2 ay süresince aktivitesini muhafaza ettiği, depolama süresinin uzamasıyla aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir.
6. Laktokoksin BO test edilen organik çözücüler (etanol, metanol, hekzan, kloroform, aseton, etil eter, isopropil alkol, formaldehit), deterjanlar (SDS, üre, Tween 80 ve Triton X-100) ve EDTA ile muamele edildiğinde aktivitesini koruduğu, ancak %10 β-merkaptoetanol ile muamele edildiğinde aktivitesinde %50 oranında bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. β-merkaptoetanolle karşı duyarlı olması aktif bölgesinde disülfid bağlarının bulunduğunu göstermektedir.
7. Laktokoksin BO'nun besiyeri olarak MRS, besiyeri başlangıç pH'sı 6,0-7,0, inkübasyon sıcaklığı 25°C, inokulum miktarı %0,1 ve inkübasyon süresi 18 saat seçildiğinde maksimum düzeyde üretildiği saptanmıştır.
8. Laktokoksin BO'nun üretiminin bakterinin gelişme fazına da bağlı olduğu görülmüştür. Bakteriyosin üretiminin logaritmik gelişme fazında başladığı (6 ve 8. saatlerde) ve durgun gelişme fazının başlarında maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte bakteriyosin aktivitesinin azaldığı saptanmıştır.
9. Laktokoksin BO'nun molekül ağırlığının yaklaşık 5500 Da olduğu belirlenmiştir.

Boza izolatu *L. lactis* subsp. *lactis* BO tarafından sentezlenen laktokoksin gerek laktokoklar gerekse bozadan izole edilen bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerden enzimlere, ısıtma işlemi, pH'ya, depolama sıcaklığına, deterjan ve kimyasallara karşı duyarlılığı, inhibitör aktivitesi, inhibitör spektrumu açısından farklılık göstermektedir. Özellikle inhibitör spektrumunun çok geniş olması yani birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif patojen ve bozulma etmeni bakterileri imha etmesi önemli bir nitelik kazandırmaktadır. Ancak, aktivitesi diğer bakteriyosinlere göre oldukça düşüktür. Bundan

dolay? bundan sonraki çalışmalarda inhibit?r aktivitesinin artırılması y?n?nde çalışmalar ?nerilebilir.

**KAYNAKLAR**

**ABDEL-BAR, N.M., HARRIS, N.D. 1984.** Inhibitory effect of *Lactobacillus bulgaricus* on psychrotrophic bacteria in associative cultures and in refrigerated foods. J. Food Prot., 47: 61-64.

**AHN, J., LEE, H., JOO, Y., PARK, C., KIM, S., HWANG, I., MHEEN, T. 1999.** Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from Kimchi. J. Biosci. Bioeng., 88(2): 153-159.

**ALVES, V. F., LAVRADOR, M. A. S., DE MARTINIS, E. C. P. 2003.** Bacteriocin exposure and food ingredients influence on growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in a model meat gravy system. J. Food Safety, 23, 201–217.

**ANONİM 1997.** Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete, sayı: 23172, Ankara.

**AXELSSON, L.T., 1993.** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In “ Lactic Acid Bacteria” Salmina, S., Wright, A.V., pp. 1-63, Marcel Dekker Inc. USA.

**BAUER, R., DICKS, L.M.T. 2005.** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. Intr. J. Food Microbiol. 101: 201– 216.

**BENKERROUM, N., GHOUATI, Y., GHALFI, H., ELMEJDOUB, T., ROBLAIN, D., JACOQUES, P., THONART, P. 2002.** Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in the model cultured milk (Iben) by in situ bacteriocin production from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. Int. J. Dairy Technol. 55(3). 145-151.

**BHUNIA, A., JOHNSON, M.C., RAY, B. 1988.** Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 65:261-268.

- BHUNIA, A., JOHNSON, M.C., RAY, B., KALCHANAND, N. 1991.** Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. J. Appl. Bacteriol. 70: 25-33.
- CAMPOS, C. A., RODRIGUEZ, O., CALO-MATA, P., PRADO, M., BARROS-VELAZQUEZ J. 2006.** Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). Food Res. Int., 39, 356-364.
- CAROLISSEN-MACKAY, V., ARENDSE, G., HASTINGS, J.W. 1997.** Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria problems and pointers. Inter. J. Food Microbiol. 34:1-16.
- CHEIGH, C.I., CHOI, H.J., PARK, H., KIM, S.B., KOOK, M.C., KIM, T.S., HWANG, J.K., PYUN, Y. R. 2002.** Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. J. Biotech. 95: 225–235.
- CHEIGH, C.I., CHOI, KIM, S.B., PYUN, Y. R. 2000.** Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. J.Appl. Microbiol. 88: 563-571.
- CHEN, H., HOOVER D.G. 2003.** Bacteriocins and their food applications. Compre. Rev. Food Sci. Food Safety. 2: 82-100.
- CLEVELAND, J., MONTVILLE., J.T., NES, F.I., CHIKIDAS, L.M. 2001.** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Intr. J. Microbiol. 71: 1-20.
- COVENTRY, M.J., GORDON, J.B., WILCOCK, A, HARMARK, K., DAVIDSON, B.E., HICKEY, M.W., HILLIER, A.J., WAN, J. 1997.** Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. J. Appl. Microbiol. 83: 248-258.

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

**DAESCHEL, M.A. 1990.** Application of bacteriocins in food systems. In “Biotechnology And Food Safety” Shain-Doco, K (Ed), Butterworths, London.

**DE KWAADSTENIET, M., TODOROV, S.D., KNOETZE, H., DICKS, L.M.T., 2005.** Characterization of a 3 944 Dalton bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 105:433–444.

**DE MARTINIS, E.C.P., ALVES, V.F., FRANCO, B.D.G.M. 2002.** Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Rev. Inter.* 18(2-3):191-208.

**DEEGAN, L.H., COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, P. 2006.** Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Inter. Dairy J.* 16:1058-1071.

**DELVES-BROUGHTON, J., BLACKBURN, J., EVANS, R.J., HUGENHOLTZ, J. 1996.** Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Leewenhoek.* 69:193-201.

**DERAZ, S. F., KARLSSON, E. N., HEDSTROM, M., ANDERSSON, M. M., MATTIASSON, B. 2005.** Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *J. Biotech.* 117:343-354.

**DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J. 2004.** New preservation technologies: possibilities and limitations. *Inter. Dairy J.* 14: 273-285.

**ECKNER, K. F., 1992.** Bacteriocins and food applications. *Dairy Food Environment Sanit.* 12: 204-209.

**ELOTMANI, F., JUNELLES, A.M.R., ASSOBHEI, O., MILLIERE, J. 2002.** Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*,

*Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a moroccan traditional fermented milk. *Current Microbiol.* 44:10-17.

**ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A. 2000.** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 85-106.

**ERİNÇ, H., YILDIRIM, Z., YILDIRIM, M. 2006.** Lantibiyotikler. Gıda Mühendisleri Odası Kongresi. Kongre Bildiri Kitapçığı. Ankara.

**ERLANDSON, K., BATT, C.A., 1997.** Strain-specific differentiation of lactococci in mixed populations using RAPD-derived probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2702-2707.

**FDA. 1988.** Nisin preparation: affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. *Federal Register.* 53:11247.

**GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDERAS, J.C. 2002.** Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* 84: 577–592.

**GHRAIRI, T., FRERE, J., BERJEAUD, J.M., MANAI, M. 2005.** Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from *rigouta* cheese. *Inter. J. Food Microbiol.* 105:389-398.

**HAMMES, W. P., GANZLE, M.G., WEBER, S. 1999.** Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Inter. J. Food Microbiol.* 46:207–217.

**HAVARSTEIN, L.S., DIEP, B.D., NES, I.F. 1995.** A family of bacteriocin abc transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16: 229-240.

**HAUBEN, K.J.A., WUYTACK, E.Y., SOONTJENS, C.C.F., MICHIELS, C.W. 1996.** High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *J.Food Prot.*, 59, 350–355.

**HERRANZ, C., CASAUS, P., MUKHOPADHYAY, S., MARTINEZ, J.M., RODRIGUEZ, J.M., NES, I.F., HERNANDEZ, P.E., CINTAS, L.M. 2001.** *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. Food Microbiology, 18(2): 115-131.

**HILL, C., MCAULIFFE, O., ROSS, R.P., 1999.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. J.Applied Microbiol., 86: 251-256.

**ISHIZAKI, A., ENNAHAR, S., SONOMOTO, K. 1999.** Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. J. Bio. Bioeng. 87: 705-716.

**IVANOVA, I., KABADJOVA, P., PANTEV, A., DANOVA, S., DOUSSET, X. 2000.** Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza Bulgarian traditional cereal beverage. Biocatalysis: Fundamentals & Applications Vol. 41, No. 6 Supplement, pp. 47-53.

**İŞLEROĞLU, H., YILDIRIM, Z., YILDIRIM, M. 2005.** Sınıf IIa bakteriyosinlerin biyosentezi, yapısı ve antimikrobiyal aktivitesi. Gıda Kongresi, Kongre Bildiri Kitapçığı. İzmir.

**JACK, R. W., TAGG, J. R., RAY, B. 1995.** Bacteriocins of gram positive bacteria. Microbiol. Rev. 171-200.

**KAISER, D., JACK, R.W., JUNG, G. 1998.** Lantibiotics and microcinns: novel post translational modifications of polypeptides. Pure & Appl. Chem. 70: 97-104.

**KIŞLA, D., ÜNLÜTÜRK, A. 2003.** Nisinin antimikrobiyal etkisi, taze ve işlenmiş balıklarda kullanımı. E.U. J. Fisheries & Aquatic Sciences. 20:543-550.

- 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 Microbiol.* 12: 39-86.
- KLEEREBEZEM , M., MIERAU, I. 2005.** 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotec.* 68:705-717.
- KOPONEN, O. 2004.** Studies of producer self – protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*. Doctoral Dissertation, Institute Of Biotech. And Department Of Appl. Chemistry And Microbiol. Helsinki.
- KWON, D. Y., KIM, W.J., ELEGADO, F.B. 1997.** Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *Intr. J. Microbiol.* 37:1-11.
- LEE, N.K., PAIK, H.D. 2001.** Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 Isolated From Jeot-Gal. *Food Microbiol.*18:17-24.
- LIU, W., HANSEN, J. N., 1990.** Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 551-2558.
- MAYR-HARTING, A., HEDGES, A.J., BERKLEY, R.W. 1972.** Methods for studying bacteriocins. Pp. 315-442. In ‘Methods In Microbiology, J.R. Norris And N.W. Ribbons (Eds.) Vol 7A.
- McAULIFFE, O., ROSS, R. P., HILL, C. 2001.** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Reviews.* 25: 285-308.
- MONTVILLE, T. J., WINSKOWSKI, K. 1997.** Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In “Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers”, M. P. Doyle, L.R. Beuchat & T. J. Montville (Eds.) ASM, Washington D.C.

- MORENO, I., LERAYER, A.L.S. , BALDINI, V.L.S., LEITÃO, M.F.F. 2000.** Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. Brazilian J. Microbiol. 31, 183-191.
- MUNDT, J.O. 1986.** Lactic acid streptococci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2. ed. Sneath PHA et al. pp. 1065–1066. Baltimore, MD: The Williams & Wilkins Co.
- NES, I.F., HOLO, H. 2000.** Class II Antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Biopolimers (Peptide science). 55:50-60.
- NES, I.F., MAREKOVA, M., LAUKOVA. A., DE VUYST, L., M. SKAUGEN, M. 2003.** Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. J of Appl. Microbiol. 94:52-530.
- ONDA, T., YANAGIDA, F., TSUJI, M., SHINOHARA, T., YOKOTSUKA, K. 2003.** Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* spp. strain GM005, isolated from Miso-Paste. Inter. J. Food Microbiol. 87:153-159.
- ORLA-JENSEN, S. 1919.** The Lactic Acid Bacteria. pp. 1-196, Host&Son: Copenhagen
- PARENTE, E., RICCIARDI, A., ADDARIO, G. 1994.** Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotech., 41: 388-394.
- PARK, S.H., ITOH, K., KIKUCHI E, N.H., FUJISAWA, T. 2003.** Identification and characteristics of nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Kimchi. Curr. Microbiol., 46(5):385-388.
- PAPAGIANNI, M. 2003.** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. Biotech. Advances. 21:465-499.
- PASTEUR, L., JOUBERT, F. 1877.** Charbon Et Septicemie. C.R. Soc. Biol. Paris 85: 101-115.

- RAY, B. 1992.** Nisin of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* as food biopreservative. p. 209-257. In 'Food Biopreservatives of Microbial Origin', B. Ray and M.A. Daeschel, (Eds). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- RODRIGUEZ, A., RILLA, N., MARTINEZ, B., DELGADO, T. 2003.** Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. Inter. J. Food Microbiol. 85: 23- 33.
- ROLLER, S., LUSENGO, J. 1997.** Developments in natural food preservatives. Agro-Food Industry Hi-Tech. July/August: 22-25.
- SAHL, H-G., JACK, R.W., BIERBAUM, G. 1995.** Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. Eur. J. Biochem. 230: 827-853.
- SAKALA, R.M., HAYASHIDANI, H., KATO, Y., KANEUCHI, C., OGAWA, M. 2002.** Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. J. Appl. Microbiol., 92 (1), 173–179.
- SALAMA, M. S., MUSAFIJA-JEKNIC, T., SANDINE, W. E., GIOVANNONI, S. J. 1995.** An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. J. Dairy Sci. 78:1004–1017.
- SAMARZIJA, D., ANTUNAC, N., HAVRANEK, J. L., 2001.** Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. Mljekarstvo., 51 (1): 35-48.
- SAVADOGO, A., OUATTARA C.A.T., BASSOLE, I.H.N., TRAORE, S.A. 2006.** Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. African J. Of Biotec. 5(9):678-683.
- SCHAGGER, H., G. VON JAGOV. 1987.** Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379.

**SCHVED, F., HENIS, Y., JUVEN, B.J. 1994.** Spheroplasts and chelator-permeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *Inter. J. Food Microbiol.* 21, 305–314.

**STILES, M. E., HOLZAPFEL, W. H. 1997.** Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *Inter. J. Food Microbiol.* 36: 1- 29.

**TAGG, J.R., DAJANI, A.S., WANNAMAKER, L.W. 1976.** Bacteriocins Of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.

**TEMİZ, A. 2000.** Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. III. Baskı. Hatıñoğlu Yayınevi. Ankara.

**TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. 2005a.** Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.* **45**(4): 312–322.

**TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. 2005b.** Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiol. Res.* 161(2): 102-108.

**TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. 2005c.** Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry.* 40:365-370.

**TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. 2006a.** Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry.* 41:11-19.

**TODOROV, S.D., DANOVA, S.T., VAN REENEN, C.A., MEINCKEN, M., DINKOVA, G., IVANOVA, I. V., DICKS, L.M.T. 2006b.** Characterization of bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions. *J. Basic Microbiol.* **46**(3): 226–238.

**TODOROVA, S.D., NYATI, H., MEINCKEN, M., DICKS, L.M.T. 2007.** Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. Food Control 18, 656–664.

**TOMAS, M.S.J., BRU, E., WIESE, B., DE RUIZ HOGADO, A.A.P., NADER-MACIAS, M.E. 2002.** Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. J.Of Apply. Microbiol.93(4):714–724.

**TYÖPPÖNEN, S., PETAJA, E., MATTILA-SANDHOLM, T. 2003.** Bioprotectives and probiotics for dry sausages. Intr. J. Food Microbiol. 83: 233– 244.

**VARADARAJ, M.C., SUMA, K., MISRA, M.C.1998.** Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. Int. J. Food Microbiol. 40:17-25.

**VILLANI, F., APONTE, M., BLAIOTTA, G., MAURIELLO, G., PEPE, O., MOSCHETTI, G. 2001.** Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. J. Appl. Microbiol.. 90: 430-439.

**VON MOLLENDORFF, J.W., TODOROV, S. D., DICKS, L. M. T. 2006.** Comparison of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from the Balkan Peninsula. Curr. Microbiol., 53(3): 209-216

**YILDIRIM, Z., JOHNSON, M.G. 1998.** Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. Lett. Appl. Microbiol. 26: 297-304.

**YILDIRIM, Z., YILDIRIM, M. 2000.** Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. Süt Mikrobiyolojisi Ve Katkı Maddeleri Sempozyumu. 247-253 S. 22-23 Mayıs Tekirdağ.

**ZHENNAI, Y. 2000.** Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. University of Helsinki, Helsinki, Finland.

## ÖZGEÇMİŞ

21.11.1982' de İstanbul'un Şişli ilçesinde doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 1999 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazandı. 2003 yılında Gıda Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2004-2006 yılları arasında Özkaleli Gıda Üretim ve Pazarlama A.Ş.'de Sorumlu Yönetici olarak çalıştı. Şu anda İstanbul Terekki Toplu Yemek Gıda Dağıtım Taah.Tic. ve San. Ltd. Şti.'de Gıda Mühendisi olarak görev yapmaktadır.