

Çeşitli Yırtıcı Kuşlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri'nin Bakteriyosin Benzeri
Madde Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Cem Özkan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ekim 2013

Determination of Bacteriocin Like Substance Production Capacity of Lactic Acid
Bacteria Isolated from Various Birds of Prey and Optimization of the Production
Conditions

Cem Özkan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Biology Mainbranch

October 2013

Çeşitli Yırtıcı Kuşlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri'nin Bakteriyosin Benzeri
Madde Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Cem Özkan

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

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ
İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Ekim 2013

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Cem ÖZKAN'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Çeşitli Yırtıcı Kuşlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri'nin Bakteriyosin Benzeri Madde Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

İkinci Danışman : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Üye : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye : Prof. Dr. Semra İLHAN

Üye : Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

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

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, yırtıcı kuşlardan elde edilen laktik asit bakterilerinin (LAB' nin) bakteriyosin benzeri madde (BBM) üretim potansiyeli konu alınmıştır. LAB izolasyonu için ülkemizde dağılım gösteren Kara Akbaba, Şah Kartal, Kızıl Şahin, Atmaca ve Delice gibi önemli yırtıcı kuş türlerinin ağız, kloak ve dışkılarından örnekler alınmıştır. Elde edilen LAB izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri test bakterilerine karşı agar sandviç ve agar kuyu yöntemleri ile belirlenmiştir. Aktiviteleri belirlenen LAB suşlarının virülans faktörleri taranmış ve virülant suşlar elenmiştir. Seçilen izolat geleneksel ve moleküler yöntemler ile *Enterococcus faecium* olarak isimlendirilmiştir.

Enterococcus faecium ' tarafından üretilen BBM' nin 15 dakikada 45 - 100°C de, 30 dakikada 45 – 90 °C de ve 2 – 11 pH değerlerinde 24 saat stabil kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, proteolitik enzimler, organik çözücüler, bazı deterjanlar ve kimyasallarla muamele edildiğinde aktivitesinin değişmediği belirlenmiştir. Üretilen BBM liyofilize edilerek 4 – 25 °C de raf ömrü araştırılmış, kısmi bir aktivite kaybına karşın aktivitenin 75 gün korunduğu belirlenmiştir.

BBM nin kısmi karakterizasyonu için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapılarak elde edilen konsantre süpernatant SDS-PAGE elektroforezde yürütülmüş ve antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite sonuçları ile jelde elde edilen bantlar karşılaştırılmıştır.

Son olarak *Enterococcus faecium* ' un maksimum verimle BBM üretebilmesi için çevresel ve besinsel koşullar optimize edilmiştir. Elde edilen veriler karıştırılmalı tank reaktöründe BBM üretimi için kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, Bakteriyosin, Yırtıcı kuş, Optimizasyon

SUMMARY

In this study, has been subject to potential for production substance BLS by lactic acid bacteria obtained from birds of prey. Mouth, cloaca and feces samples were taken from major types of birds of prey distributed in our country such as Kara Akbaba, Şah Kartal, Kızıl Şahin, Atmaca ve Delice for the isolation of LAB. Antimicrobial activity of obtained from LAB isolates against test bacteria were determined by agar sandwiches and agar well methods. LAB strains which identified activities were scanned virulence factors and virulent strains were eliminated. The selected isolate named as *Enterococcus faecium* with conventional and molecular methods.

BLS produced by *Enterococcus faecium* was determined to be stable for 24 hours in 15 minutes (45-100 °C) and 30 minutes (45 - 90 °C) at pH (2-11) values. Additionally, when treated with some of detergents, proteolytic enzymes, organic solvents, and chemicals, the activity was determined to unchanged. It was determined to preserve for 75 days against a partial loss of activity and the shelf life was investigated at 4-25 °C. As lyophilized of producing BLS. The concentrated supernatant which obtained by dialysis and ammonium sulfate precipitation for partial characterization of BLS was conducted at SDS-PAGE electrophoresis and antimicrobial activity were determined. Antimicrobial activity results were compared with bands obtained from the gel.

Finally, to produced BLS with maximum efficiency of *Enterococcus faecium* were optimized to environmental and nutritional conditions. The resulting data was used for the production of BLS in stirred tank reactor.

Key words: Lactic acid bacteria, Bacteriocin, Birds of prey, Optimization.

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen ve bana her zaman destek veren sayın Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ ve Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU' na teşekkür ederim.

Tez çalışmamın SDS-PAGE kısmını gerçekleştirmem için laboratuvar imkânlarını sunan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Ece TURHAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvarda ve laboratuvar dışında gösterdikleri yardımlaşma ve dayanışmadan dolayı, arkadaşlarım Ayşe Betül KARADUMAN, Bilal DOĞAN, Melike BÖRÜHAN ve tüm Fungi Kültür Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu süreçte her daim benimle olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli insan Semra KAPTAN' a çok teşekkür ederim.

İyi bir öğrenim görmem için imkânlar sağlayan, bana her zaman güvenen, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Sultan ÖZKAN ve sevgili babam Ebrar ÖZKAN' a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	1
2.1. Laktik Asit Bakterileri ve bazı kullanım alanları.....	1
2.1.1. Probiyotik olarak kullanımları.....	2
2.1.2. Doğal gıda koruyucu olarak kullanımı.....	5
2.2. Bakteriyosinler.....	5
2.2.1. Tanımı ve tarihçesi.....	5
2.2.2. Sınıflandırılması.....	7
2.2.3. Biyosentezi.....	10
2.2.4. Antimikrobiyal etki mekanizması.....	13
2.2.5. Antimikrobiyal etki spektrumları.....	15
2.2.6. Bakteriyosin üretim, aktivite ve stabilitesini etkileyen faktörler.....	16
2.2.7. Saflaştırılması.....	18
2.2.7.1. Üretici organizmaların izolasyonu ve seçilmesi.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Laktik asit bakteri izolasyonu yapılan yırtıcı kuşlar.....	21
3.1.2. Antimikrobiyal aktivite belirlemede kullanılan test bakterileri.....	21

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.3. Kullanılan besiyerleri.....	23
3.1.4. Kullanılan boyalar ve çözeltiler.....	27
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Çeşitli yırtıcı kuşların sindirim yolunda kolonize olan laktik asit bakteri suşlarının izolasyonu.....	30
3.2.1.1. Ağız boşluğu ve kloaktan izolasyon.....	30
3.2.1.2. Dışkı örneklerinden izolasyon.....	31
3.2.2. Laktik asit bakteri izolatlarının BBM üretme potansiyelinin belirlenmesi.....	32
3.2.2.1. Agar sandviç yöntemi.....	32
3.2.2.2. Agar kuyu yöntemi.....	33
3.2.2.3. BBM' nin antimikrobiyal aktivitesinin onaylanması.....	34
3.2.3. BBM üreten laktik asit bakteri izolatlarının karakterizasyonu ve tanılanması.....	35
3.2.3.1. BBM üreten laktik asit bakteri izolatlarının karakterizasyonu.....	35
3.2.3.1.1. Virulans faktörlerinin belirlenmesi.....	35
3.2.3.1.1.1. DNAz testi.....	35
3.2.3.1.1.2. Hemoliz testi.....	35
3.2.3.1.1.3. Jelatinaz testi.....	35
3.2.3.1.1.4. Koagülaz testi.....	36
3.2.3.2. BBM üreten laktik asit bakteri izolatlarının tanılanması.....	36
3.2.3.2.1. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler.....	36
3.2.3.2.2. Moleküler yöntemler.....	41
3.2.4. Aktif izolatının gelişme fazının BBM üretimine etkisi.....	43
3.2.5. Antimikrobiyal aktiviteden sorumlu maddenin karakterizasyonu.....	43
3.2.5.1. Isıl stabilite.....	43
3.2.5.2. pH stabilitesi.....	44
3.2.5.3. Proteolitik enzimlere direnç.....	44

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.2.5.4. Organik çözücülere direnç.....	44
3.2.5.5. Bazı deterjanlara ve kimyasal maddeye direnç.....	45
3.2.6. Depolama sıcaklığı ve süresinin BBM aktivitesine etkisi.....	45
3.2.7. BBM’ nin kısmi saflaştırılması.....	45
3.2.8. BBM’ nin molekül büyüklüğünün tayini.....	46
3.2.9. BBM üretiminin optimize edilmesi.....	47
3.2.9.1. pH tercihi.....	47
3.2.9.2. Sıcaklık tercihi.....	47
3.2.9.3. Karbon kaynağı tercihi.....	48
3.2.10. Derin kültür koşullarında BBM üretimi.....	49
3.2.10.1. Erlen ölçeğinde üretim.....	49
3.2.10.2. Karıştırmalı Tank Reaktör ölçeğinde üretim.....	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	50
4.1. Çeşitli yırtıcı kuşların sindirim yolunda kolonize olan laktik asit bakteri suşlarının izolasyonu.....	50
4.2. Laktik asit bakteri izolatlarının BBM üretme potansiyelinin belirlenmesi.....	50
4.2.1. Agar sandviç yöntemi.....	51
4.2.2. Agar kuyu yöntemi.....	52
4.2.3. Laktik asit bakteri izolatlarının antimikrobiyal aktivitesinin onaylanması.....	53
4.3. BBM üreten laktik asit bakteri izolatlarının karakterizasyonu ve tanılanması...54	54
4.3.1. BBM üreten laktik asit bakteri izolatlarının karakterizasyonu.....	54
4.3.1.1. Virulans faktörlerinin belirlenmesi.....	54
4.3.2. BBM üreten laktik asit bakteri izolatlarının tanılanması.....	55
4.3.2.1. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler.....	55

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

4.3.2.2. Moleküler yöntemler.....	57
4.4. <i>Enterococcus faecium</i> 16-1 izolatının gelişme fazının BBM üretimine etkisi.....	59
4.5. Antimikrobiyal aktiviteden sorumlu maddenin karakterizasyonu.....	60
4.5.1. Isıl stabilite.....	60
4.5.2. pH stabilitesi.....	61
4.5.3. Proteolitik enzimlere direnç.....	64
4.5.4. Organik çözücülere direnç.....	66
4.5.5. Bazı deterjanlara ve kimyasal maddeye direnç.....	67
4.6. Depolama sıcaklığı ve süresinin BBM aktivitesine etkisi.....	67
4.7. BBM nin kısmi saflaştırılması.....	69
4.8. BBM nin molekül büyüklüğünün tayini.....	69
4.9. BBM üretiminin optimize edilmesi.....	70
4.9.1. pH tercihi.....	70
4.9.2. Sıcaklık tercihi.....	71
4.9.3. Karbon kaynağı tercihi.....	72
4.10. Derin kültür koşullarında BBM	75
4.10.1. Erlen ölçeğinde üretim.....	75
4.10.2. Karıştırılmalı Tank Reaktör ölçeğinde üretim.....	76
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	78
5.1. Çeşitli yırtıcı kuşların sindirim yolunda kolonize olan laktik asit bakteri suşlarının izolasyonu.....	78
5.2. LAB izolatlarının BBM üretme potansiyelinin belirlenmesi.....	79
5.2.1. Agar sandviç yöntemi.....	79
5.2.2. Agar kuyu yöntemi.....	80

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

5.2.3. Laktik asit bakteri izolatlarının antimikrobiyal aktivitesinin onaylanması.....	80
5.3. BBM üreten laktik asit bakteri izolatlarının karakterizasyonu ve tanılanması.....	81
5.3.1. BBM Üreten LAB İzolatlarının virulans faktörlerinin belirlenmesi.....	81
5.3.2. BBM üreten laktik asit bakteri izolatlarının tanılanması.....	81
5.4. <i>Enterococcus faecium</i> 16-1 izolatının gelişme fazının BBM üretimine etkisi.....	83
5.5. Antimikrobiyal aktiviteden sorumlu maddenin karakterizasyonu.....	83
5.5.1. Isıl stabilite.....	83
5.5.2. pH stabilitesi.....	84
5.5.3. Proteolitik enzimlere direnç.....	84
5.5.4. Organik çözücülere direnç.....	86
5.5.5. Bazı deterjanlara ve kimyasal maddeye direnç.....	86
5.6. Depolama sıcaklığı ve süresinin BBM aktivitesine etkisi.....	87
5.7. BBM nin kısmi saflaştırılması.....	88
5.8. BBM nin molekül büyüklüğünün tayini.....	88
5.9. BBM üretiminin optimize edilmesi.....	89
5.10. Derin kültür koşullarında BBM üretimi.....	90
KAYNAKLAR.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Lantibiyotiklerin gen organizasyonu.....	11
Şekil 2.2. Wedge- Model mekanizması ile por oluşumu.....	14
Şekil 2.3. Barrel-Stave mekanizması ile por oluşumu.....	14
Şekil 3.1. Ağız boşluğu ve kloak bölgesinden sürüntü yöntemi ile örnek alınması.....	31
Şekil 3.2. Biolog testinde çalışılan parametreler.....	48
Şekil 4.1. LAB izolatının çoğalma eğrisi.....	57
Şekil 4.2. LAB izolatının erime eğrisi.....	57
Şekil 4.3. <i>Enterococcus faecium</i> 16-1 izolatının gelişime fazında BBM üretimi.....	59
Şekil 4.4. BBM' nin <i>E. faecalis</i> ' e karşı aktivitesi.....	64
Şekil 4.5. Proteinaz K ile işlem görmüş BBM nin <i>E. faecalis</i> ' e karşı aktivitesi.....	64
Şekil 4.6. Proteinaz K + tampon çözeltisinin <i>E. faecalis</i> ' e karşı aktivitesi.....	65
Şekil 4.7. BBM aktivitesinin 4 °C de depolama süresine bağlı değişimi.....	67
Şekil 4.8. BBM aktivitesinin 25 °C de depolama süresine bağlı değişimi.....	67
Şekil 4.9. BBM' nin molekül büyüklüğünün ve elde edilen bantaların aktivitesinin belirlenmesi.....	69
Şekil 4.10. <i>Enterococcus faecium</i> ' un BBM üretiminde besiyeri pH tercihi.....	70
Şekil 4.11. <i>Enterococcus faecium</i> ' un BBM üretiminde inkübasyon sıcaklığı tercihi.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.12. <i>Enterococcus faecium</i> 16-1 izolatının biolog testi sonucu.....	72
Şekil 4.13. <i>Enterococcus faecium</i> ' un BBM üretiminde karbon kaynağı tercihi.....	73
Şekil 4.14. <i>Enterococcus faecium</i> 16-1 izolatının optimize olmayan besiyerinde erlen ölçeğinde zamana bağlı büyüme özellikleri ve antimikrobiyal aktivitesi....	74
Şekil 4.15. <i>Enterococcus faecium</i> 16-1 izolatının optimize besiyerinde erlen ölçeğinde zamana bağlı büyüme özellikleri ve antimikrobiyal aktivitesi.....	75
Şekil 4.16. Optimize Reaktörün zamana bağlı çalışma verileri.....	76
Şekil 4.17. <i>Enterococcus faecium</i> 16-1 izolatının optimize besiyerinde reaktör ölçeğinde zamana bağlı büyüme özellikleri ve antimikrobiyal aktivitesi.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Bazı bakteriyosinler ve bakteriyosinleri üreten üretici mikroorganizmalar.....	8
Çizelge 2.2. Lantibiyotik olan ve olmayan bakteriyosinlerin üretici suşları.....	12
Çizelge 3.1. LAB izole etmek amacı ile kullanılan yırtıcı kuş türleri.....	21
Çizelge 3.2. Antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan test bakterileri.....	22
Çizelge 3.3. Swablardan ve dışkı örneklerinden yapılan mikroorganizma izolasyonları.....	32
Çizelge 4.1. İzolatların agar sandviç yöntemiyle test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	51
Çizelge 4.2. İzolatların agar kuyu yöntemiyle test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	52
Çizelge 4.3. LAB lara ait kültür süpernatantlarının katalaz enzimi ve nötralizasyon işlemi sonrası antimikrobiyal aktiviteleri.....	54
Çizelge 4.4. LAB izolatlarının virülans faktörlerinin belirlenmesi.....	54
Çizelge 4.5. 16-1 izolatının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	56
Çizelge 4.6. LAB izolatının biyoinformatik analiz sonuçları.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.7. Farklı ısıt işlemleri ve süre uygulamalarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi	60
Çizelge 4.8. Farklı pH derecesi ve süre uygulamalarının <i>Staphylococcus aureus</i> 'a karşı antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi.....	61
Çizelge 4.9. Farklı pH derecesi ve süre uygulamalarının <i>Enterococcus faecalis</i> 'e karşı antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi.....	62
Çizelge 4.10. Proteolitik enzimlerin BBM' nin antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkisi.....	63
Çizelge 4.11. BBM'nin antimikrobiyal aktivitesi üzerine 25°C de 1 saat uygulanan organik çözücülerin etkisi	65
Çizelge 4.12. BBM'nin antimikrobiyal aktivitesi üzerine 37°C de 5 saat uygulanan deterjan ve kimyasal maddelerin etkisi.....	66
Çizelge 4.13. Konsantre BBM' nin aktivitesi ve protein içeriği.....	68
Çizelge 4.14. <i>Enterococcus faecium</i> 16-1 izolatının BBM üretimi için optimum koşullar.....	73
Çizelge 5.1. <i>Enterococcus faecium</i> 16-1 izolatının optimizasyon verileri.....	91

SİMGELER DİZİNİ

BBM	Bakteriyosin Benzeri Madde
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
LAB	Laktik Asit Bakterisi
AU	Aktivite (Arbitrary Unit)
mL	Mililitre
kDa	Kilo Dalton
DNA	Deoksiribonukleik Asit
RNA	Ribonukleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
mA	Miliamper
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
N	Normal
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TCA	Triklor Asetik Asit
TEMED	Tetrametil Etilen Diamin
µg	Mikrogram

1. GİRİŞ

Antibiyotikler, çeşitli mikrobiyal enfeksiyonların kontrolünde terapötik ve profilaktik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca gıda işleme ve depolama sırasında, bozulma etkeni ve/veya patojen bakterilerin gelişimini kontrol altına almak amacıyla da antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak, insan ve hayvanlar için patojen olan birçok bakteriyel patojenin antibiyotik direnci kazanması, yeni antibiyotiklerin üretilmesini ya da alternatif antimikrobiyal stratejilerin geliştirilmesini gerektirmektedir.

Bakteriyosinler özellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkilidir ve etkileri de genelde siddetlidir. Bu nedenle bakteriyel gelişimi kontrol altına almak amacıyla antibiyotiklere alternatif olabilecekleri düşünülmektedir.

Bakteriyosinlerin antimikrobiyal etki spektrumları oldukça sınırlıdır, tür hatta suş seviyesinde etkili bakteriyosinler bulunmaktadır. Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitelerindeki türe özgü olma durumu, diğer mikrobiyal popülasyonlara zarar vermeden, tek bir bakteri türünün ya da suşunun hedef alındığı uygulamalar için önemli avantajlar sağlayabilecektir. Probiyotik adı verilen LAB nin; insan ve hayvanların gastrointestinal bölgelerinde kolonize olmuş, faydalı bakterilere zarar vermeden, patojen ve zararlı bakterilerin kontrol altına alınması bu duruma örnektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Laktik Asit Bakterileri ve bazı kullanım alanları

Laktik asit bakterileri (LAB); genel olarak gram pozitif basil ve kok, spor oluşturmayan, katalaz negatif, aerotolerant özelliklerine sahip bakterilerdir. Laktik asit bakterileri; hidrojen peroksit, diasetil, organik asit, bakteriyosin gibi antimikrobiyal bileşikler üretebilme yeteneğine sahip olduğu için gıda fermentasyon işlemlerinde önemli rol oynamaktadır (Asutay, 2007; Dinçer ve ark., 2010). Çeşitli süt, et ve bitkisel ürünlerin fermentasyonunda starter kültür olarak kullanımlarının dışında, önemli kullanım alanları bulunmaktadır.

2.1.1. Probiyotik olarak kullanımları

“Probiyotik” terimi ilk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından kullanılmıştır. 1989 yılında Roy Fuller tarafından “tüketici sağlığına bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkıları” olarak tanımlamıştır (Gürsoy ve Kınık, 2005).

1974 yılında Parker probiyotik kelimesinin tanımını; intestinal sistemin mikrobiyal dengesine katkıda bulunan madde ve organizmalar olarak yapmıştır. Sonraki aşamada “probiyotik” kelimesinin tanımına son şeklini Avrupalı bilim insanları vermiştir. Onlar probiyotikleri; “vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamıştır (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

Probiyotik tanımı, 1998 yılında Salminen ve arkadaşları tarafından “insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yemler ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar” olarak değiştirilmiştir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

İntestinal ekosistemin fizyolojik dengesi; hastalık, yaşlılık, stres, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerden direkt veya dolaylı olarak etkilenebilir.

İntestinal sistemin dengesinde meydana gelen bu düzensizlikler “disbiosis” olarak adlandırılmaktadır. Faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesine olumlu yönde katkıda bulunmasına “probiyosis”, bu mikroorganizmalara da “probiyotik mikroorganizmalar” denilmektedir. Tedavi amacıyla alınan ilaçların birçoğu faydalı floranın inhibisyonuna neden olmaktadır. Sağlıklı bir yaşam için faydalı etki gösteren mikroorganizmaların intestinal sistemdeki sayısı yeterli değilse mutlaka dışarıdan takviye edilmesi gerekmektedir (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

Probiyotikler bağırsakta B vitaminlerini, β - galaktozidazı ve antimikrobiyal bileşikler salgıladıklarından çok yönlü etkiye sahiptirler. β - galaktozidaz enzimi sütteki laktozu metabolize edemeyen (laktoz-intolerant) insanların laktoz sindirimini olanaklı

kılar (Tunail, 2009). Probiyotik LAB nin sağlık üzerine bazı faydalı etkileri aşağıda verilmiştir.

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

Probiyotik içerikli ürünler özellikle Japonya, Uzakdođu ülkeleri ve Avrupa Birliđi üye ülkelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ABD’de ise son yıllarda probiyotik ürünlere olan ilgi giderek artış göstermiş olup, sağlıklı gıda tüketimi bilincinin gelişmesi sonucu ortaya çıkan tüketici talebi gıda endüstrisinin probiyotiklere olan ilgisini arttırmıştır.

Ağız yoluyla alınan probiyotiklerin yararlı etki gösterebilmeleri için canlı olarak ve çok sayıda bağırsak sistemine ulaşmaları gerekir. Bu nedenle kullanılan suşların mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı dirençli olması gerekir. Bununla birlikte bir diğer önemli kriter de patojenlerle mücadelede bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri antimikrobiyal bileşiklerin üretimidir (Çakır ve Çakmakçı, 2004). Ayrıca; probiyotik bakteriler lizozim gibi ağız boşluğunda bulunan enzimlere karşı dirençli olmalıdır ve mide ve bağırsaklarda sindirim süresince direnç göstermelidir (Chou and Weimer, 1999).

Enterokoklar, laktobasiller ve bifidobakterler bağırsak florasını düzenlemek ve enfeksiyonları önlemek için günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Gürsoy ve Kınık, 2005; Tok ve Aslım, 2007).

LAB nin gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilme kabiliyetleri bunların düşük pH ve/ veya safra tuzları ile geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilme yetileriyle ilgilidir. Taksonomik değerlendirilmelerinde önemli fizyolojik özellikler; karbonhidratları fermentasyon biçimleri, farklı tuz konsantrasyonlarına direnç, farklı besin ortamlarında ve sıcaklıklarda gelişebilme derecesi ve antibiyotiklere direnç olarak sıralanabilmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

LAB nin çiftlik hayvanlarında probiyotik olarak, pratikte kullanım olanaklarını araştırmaya yönelik; rat (Patil et al., 2007), balık (Balkazar et al., 2006; Balkazar et al., 2007), ördek (Borrero et al., 2011), kümes hayvanları (Józefiak et al., 2010; Stern et al., 2006; Nazef, et al. 2007), bıldırcın (Laukova et al., 2004) gibi çeşitli hayvanların sindirim sistemlerinden LAB izole edilmiş ve bunların, bakteriyosin üretim yetenekleri belirlenmiştir.

Domuz, sığır ve kanatlılar gibi çiftlik hayvanlarının yemlerine düşük miktarda (sub-terapötik düzeyde) antibiyotik ilave edilmektedir. Bu işlem verimliliği ve yem yararlılığını arttırmak amacıyla yapılmaktadır. Ayrıca bakteriyal enfeksiyonların tedavisinde ve profilaktik amaçlı olarak yine antibiyotik kullanımı yoğundur. Hayvanların beslenmesinde ve enfeksiyonel hastalıklardan korunmasında alternatif bir yaklaşım da yine probiyotik bakterilerin kullanımıdır. Ayrıca, bakteriyosinlerin dar spektrumlu antimikrobiyal etkisi bu tür uygulamalar için bir avantaj haline de dönüşebilir. Örneğin domuz, sığır ve kanatlılar gibi çiftlik hayvanlarının yemlerine eklenecek probiyotik kültürler, bu hayvanların intestinal bölgelerine yerleşmiş faydalı bakterilere zarar vermeden sadece patojen (*E. coli* O157, *Salmonella* sp. gibi) olan bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterecektir. Yine kanatlılarda bakteriyosin üreten bakterilerin probiyotik olarak kullanımı ile *Salmonella* enfeksiyonları hedef alınmıştır. Bazı çalışmalarda da LAB nin ürettikleri bakteriyosinlerin; rumendeki selülitik bakterilerin dominant hale gelmesine, metan bakterilerinin ise sayısının azalmasına neden olduğu, bunun da selüloz degradasyonunu arttırdığı bildirilmiştir.

Yukarıda verilen amaçlarla probiyotik LAB nin hayvanların beslenmesinde kullanımı da nispeten kolaydır. Çünkü hazırlanan probiyotik kültürler kuru ya da yaş olarak hayvanların yemlerine ya da içtikleri suya katılabilir. Probiyotiklerin hayvanların beslenmesindeki olumlu etkileri ve kullanım kolaylıkları bulunmasına rağmen, bu konuda yapılan çalışma çok fazla değildir (Diez-Gonzalez, 2007).

2.1.2. Doğal gıda koruyucu olarak kullanımı

LAB organik asitler (laktik, asetik asit vb.), hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin adı verilen antimikrobiyal etkili peptitler üreterek çeşitli patojen bakterilere karşı antagonistik etki gösterebilirler (Zhennai, 2000). Bakteriyosinler, protein/peptid tabiatında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakteriye, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip makromoleküllerdir (Jack et al., 1995; Tagg et. al., 1976). Bakteriyosin üretebilen LAB nin gıda kaynaklı çeşitli bakterilere, özellikle de Gram pozitif olanlara bakterisidal etkili olmaları, onların gıda koruma amaçlı olarak kullanım potansiyelleri bulunduğunu göstermektedir. Günümüzde, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin, peynir, et ve içeceklerin üretim sürecinde raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan (1-25 ppm) geniş spektrumlu bir bakteriyosindir. Ancak bakteriyosinlerin çoğunun etki spektrumlarının dar olması (tür ya da strain seviyesinde) kullanım olanaklarını sınırlayan en önemli unsurdur. Bu olumsuzluk karışık kültürlerin kullanımı ile giderilebilir.

2.2. Bakteriyosinler

2.2.1. Tanımı ve tarihçesi

1857’de Pasteur ve asistanı Joubert üründen izole etikleri bir bakteriyle (muhtemel *Escherichia coli*) şarbon basilini aynı ortama ektikten sonra *in vivo* ve *in vitro* olarak şarbon bakterisine karşı inhibe edici etkisinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Böylelikle bakteriler arasındaki ilk antagonistik etki Pasteur ve asistanı Joubert tarafından belirlenmiştir (Riley and Chavan, 2007). Bakteriyosin tanımı ilk kez Jacob

ve ark. (1953) tarafından yapılmıştır. Bu tanım daha çok farklı türler arası antagonistik ilişkileri kapsamaktaydı. Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarda buna benzer çok fazla madde bulununca terimin kapsamı da genişletilmiştir (Eckner, 1992). Böylece bakteriyosinler, mikroorganizmalar tarafından, ribozomal olarak sentezlenen, kısmen dar spektrumda bakterisidal aktivite sergileyen, birincil ya da modifiye ekstraselüler aktif proteinlerdir olarak tanımlanmıştır (Dinçer ve ark., 2010).

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

- Bakteriyosinlerin genel özellikleri şu biçimde özetlenebilir.
 - Protein yapısındadırlar.
 - Duyarlı hücrelerin spesifik hücre duvarı reseptörleri bulunur.
 - Bakterisidal etkiye sahiptirler.
 - Antimikrobiyal spektrumları sınırlıdır ve genellikle Gram pozitif bakterilere etkilidirler.
 - Etki mekanizmaları, hücre membranının çift yönlü geçirgenliğini artırarak, sitoplazmik maddelerin hücre dışına çıkışına neden olmasıdır.
 - Proteolitik enzimlerle inaktive olurlar.

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

2.2.2. Sınıflandırılması

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

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

<u>SINIF I</u> <u>Tip A- lantibiyotik</u> Nisin A Nisin U Laktosin S Epidermin Laktisin 481 Gallidermin Streptin <u>Tip B- lantibiyotik</u> Duramisin Mersasidin Aktogardin Ansovenin Cinnamisin <u>SINIF II</u> <u>Tip IIa</u> Leukosin A/B MesenterisinY105 Diversin V41 Lactococcin <u>Tip IIb</u> Laktokoksin G Plantarisin A Plantaricin S Plantarisin EF Lactocin F Plantarisin JK <u>Tip IIc</u> Asidosin B	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Staphylococcus gallinarum</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptomyces cinnamoneus</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Actinoplanes spp.</i> <i>Actinoplanes spp.</i> <i>Streptomyces cinnamoneus</i> <i>Leuconostoc gelidum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
---	--

Enterosin P	<i>Enterococcus faecium</i>
Enterosin B	<i>Enterococcus faecium</i>
Carnobacteriocin A	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Divergicin A	<i>C. divergens</i>
<u>SINIF III</u>	
Helvetisin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Helvetisin V-1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>

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

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

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

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

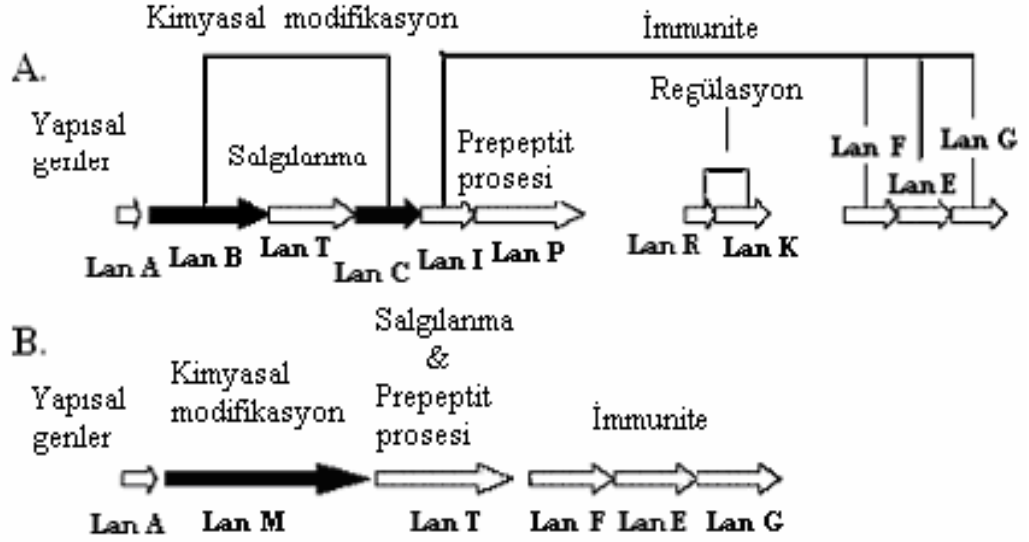
2.2.3. Biyosentezi

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

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

Bir lantibiyotik biyosentezi prelantibiyotik oluşumu, dehidrasyon ve çapraz bağlanma (kimyasal modifikasyon), lider peptidin parçalanması ve salgılanmasını içermektedir. Lantibiyotiklerde 2 tür genetik organizasyon belirlenmiştir (Şekil 2.1.). Nisin, epidermin, subtilin ve Pep 5 lantibiyotikleri LanB ve LanC enzimleri tarafından modifiye edilirken, laktisin 481, laktosin S, sitolisin ve mersasidin, LanM enzimi tarafından modifiye edilmektedir (Kopenon, 2004). Generik isimlendirme bütün lantibiyotikler için kullanılmaktadır. Bunlar prekürsör peptit LanA, spesifik modifikasyonları gerçekleştiren LanB, C ve M enzimleri, lider peptidin uzaklaştırılmasından sorumlu olan LanP proteazı, ABC sistemle peptidin taşınmasını

sağlayan LanT, biyosentezi regüle eden LanR ve K proteinleri ve bağışıklık sağlayan LanI ve LanFEG'dir (Kopenon, 2004; Takala, 2005).



Şekil 2.1. Lantibiyotiklerin gen organizasyonu (Asutay, 2007)

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

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

Hücre mebranında gözenek (por) oluşturan bakteriyosinlere (örneğin nisin ve pediosin) karşı 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 (Asutay, 2007).

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

Bakteriyosin	Üretici suş
<i>Lantibiyotik olanlar</i>	
Sitolisin	<i>Enterococcus faecalis</i>
Laktisin 3147	<i>Lc. lactis</i> DPC3147
Plantarisin W	<i>Lb. plantarum</i> LMG 2379
Stafilokoksin C55	<i>Staphylococcus aureus</i> C55
<i>Lantibiyotik olmayanlar</i>	
ABP-118	<i>Lb. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
Brokhosin-C	<i>Bacillus campestris</i> ATCC 43754
Enterosin 1071	<i>Enterococcus faecalis</i> BFE 1071
Enterosin L50	<i>Enterococcus faecium</i> L50

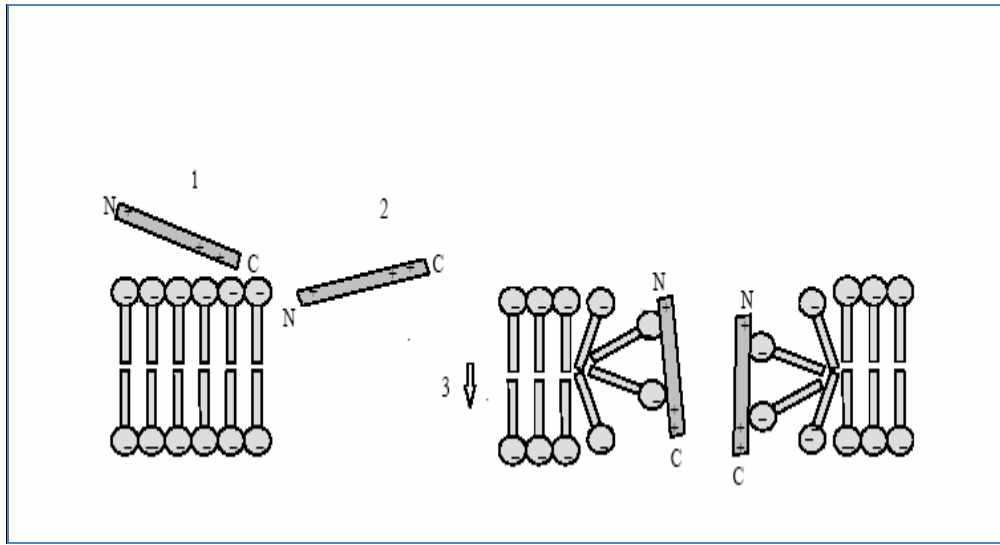
Laktasin F	<i>Lb. johnsonii</i> VPI11088
Laktosin 705	<i>Lb. casei</i> CRL 505
Laktokoksin G	<i>Lc. lactis</i> LMG 2081
Laktokoksin MN	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Leukosin H	<i>Leuconostoc</i> MF215B
Mutasin IV	<i>Streptococcus mutans</i> UA 140
Plantarisin EF	<i>Lb. plantarum</i> C-11
Plantarisin JK	<i>Lb. plantarum</i> C-11
Plantarisin S	<i>Lb. plantarum</i> LPCO10
Termofilin 13	<i>Streptococcus thermophilus</i> SFi13

2.2.4. Antimikrobiyal etki mekanizması

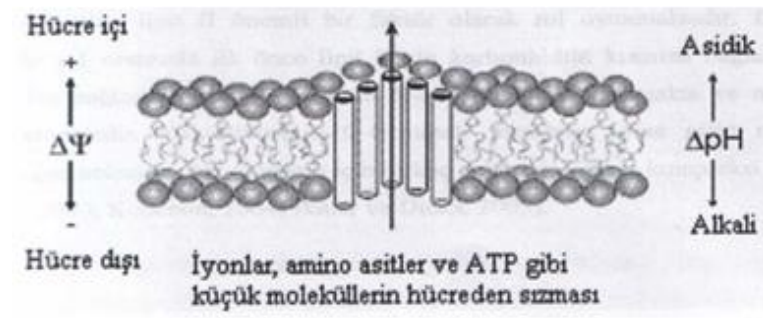
LAB bakteriyosinleri duyarlı bakterilerin membranlarının karalılığını bozarak etki gösteren peptitlerdir. Duyarlı bakterilerin hücre membranlarında iyonik gözenekler oluşturarak potasyum ve inorganik fosfat sızmasına ve buna paralel olarak membran iyonik dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bunun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

Lantibiyotiklerin duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranda por oluşturmalarıyla ilgili olarak öne sürülen modeller “Barrel–Stave”, “Wedge–Model” (Şekil 2.2.) ve “Lipit II Model”dir. Barrel–Stave mekanizması ile por oluşumunda bakteriyosinlerin katyonik yük taşıyan C-terminali fosfolipitlerin baş grupları ile elektrostatik interaksyona girerek bu bölgede membranın incelmeye neden olurlar (Şekil 2.3.). Membran potansiyeli varlığında membran içine girip oligomerize olmakta ve böylece membranda iyonik por oluşturmaktadırlar. Peptitler merkezi kanalın etrafında dizilmekte ve hidrofobik yüzeyler membrana doğru, hidrofilik yüzeyler ise por’un merkezine doğru yönelmektedir (Garneau et al., 2002; Kopenon, 2004; McAuliffe et al.,

2001). Wedge-model’inde lantibiyotiklerin pozitif yüklü C-terminali anyonik fosfolipitlerle iyonik interaksyona girip membran yüzeyine sıkıca tutunmakta ve lipit dinamiğinin bozulmasına neden olmaktadır. Yeterli miktarda potansiyel varlığında (-100 mV), bakteriyosin molekülleri fosfolipitlerle olan interaksyonlarını kaybetmeksizin membran içine girip membranda bükülmelere veya kıvrılmalara ve dolayısıyla porların oluşmasına neden olmaktadır (Bauer and Dicks, 2005; Brötz and Sahl, 2000; Kopenon, 2004).



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



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

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 (Kopenon, 2004).

2.2.5. Antimikrobiyal etki spektrumları

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

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

Fermente gıdalardan izole edilen LAB'nin bakteriyosinleri ile ilgili bir çalışmada *Lactobacillus*, *Carnobacterium* ve *Lactococcus* cinslerine ait bakteriyosinlerin antimikrobiyal etki spektrumları belirlenmiştir. *Lactococcus crispatus* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen bakteriyosinler nisine benzer şekilde geniş aktivite spektrumu göstermişlerdir. *Lactococcus curvatus* ve *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen bakteriyosinler *Brochotrix thermosphacta*, *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Listeria* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp.,

Carnobacterium sp. ve *Streptococcus thermophilus*'u kapsayan farklı çeşitlilikte aktivite spektrumları gösterirken, *Carnobacterium divergens* tarafından üretilen bakteriyosin *Lc. curvatus*, *Listeria* sp., *Enterococcus* sp. ve *S. thermophilus*'u kapsayan sınırlı çeşitlilikte aktivite spektrumu göstermiştir. İncelenen hiçbir bakteriyosin Gram negatif bakteriler ya da mayalara karşı aktivite göstermemiştir (Coventry et al., 1997).

2.2.6. Bakteriyosin üretim, aktivite ve stabilitesini etkileyen faktörler

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

Bakteriyosin üretici suş belirlenmesi ve/veya bakteriyosin üretim koşullarının optimizasyonu, günümüze dek çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Örneğin, Enterosin ON-157 (*E. faecium* NIAI 157) amilaz ve proteolitik enzimlere duyarlı, LAB ve *L. monocytogenes*' e karşı aktif, pH 2-7 bakteri gelişimi ile birlikte üretildiği, 37 °C de MRS besiyerinde maksimum düzeyde üretildiği saptanmıştır. Ayrıca asidik (2-5 pH) koşullarda ısıl işleme (100 °C de 30 dk) dayanıklı olmasına karşın, nötr ortamlarda (6-7 pH) ısıl işleme (100 °C de 30 dk) duyarlı olduğu da belirlenmiştir (Ohmomo et al., 2000).

Peynirden izole edilen *Enterococcus faecium* RZS C5 susunun pH 6,5 ve 20-35 °C inkübasyon sıcaklığında maksimum düzeyde bakteriyosin ürettiği ve bu

bakteriyosinin *Listeria monocytogenes*' e karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Leroy and De Vuyst, 2002).

Leuconostoc mesenteroides E131 gelişimi için optimum sıcaklık (25-30 °C) ile maksimum bakteriyosin aktivitesinin görüldüğü sıcaklık (25 °C) birbirine yakındır. Bu suş için en iyi hücre gelişimi pH 6,5 iken maksimum bakteriyosin aktivitesi pH 5,5'tir (Drosinos et al., 2006).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* A164 tarafından üretilen nisin benzeri bakteriyosinin üretiminin karbon ve azot kaynaklarından fazlaca etkilendiği görülmüştür. A164 suşunun M17 besiyerinde diğer karbon kaynakları yerine laktoz kullanıldığında 4 kat daha fazla bakteriyosin ürettiği gözlenmiştir. % 3 düzeyinde maya ekstraktı ilavesi optimum azot kaynağı olarak bulunmuştur. Söz konusu bakterinin optimum gelişme sıcaklığı 37 °C iken maksimum düzeyde bakteriyosin üretimi için gerekli sıcaklığın 30 °C olduğu gözlenmiştir. Gelişme için optimum pH aralığının 5,5-6,5 arasında değişirken bakteriyosin üretimi için optimum pH'nın 6,0 olduğu belirlenmiştir. Maksimum aktivite M17L broth (% 3 laktoz), 30 °C ve pH 6,0'da erken durgun gelişme fazında gözlemiştir (Chingh et al., 2002).

Lactococcus sp. GM005 inkübasyon koşulları 30 °C ve pH 6,0'da sabit tutularak geliştirildiğinde ürettiği bakteriyosinin aktivitesinin, kontrolsüz pH koşullarına göre 8 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Onda et al., 2003).

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

Lc. lactis ssp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 ve *E. mundtii* USC-51 tarafından maksimum bakteriyosin üretiminin gelişimlerinin durgun fazında olduğu belirlenmiştir. Tüm bakteriyosinler proteinaz K ile inaktif olmuştur. Tüm

bakteriyosinlerin 100 °C de 60 dakika veya 121 °C de 15 dakika ısıtılma dayanıklı olduğu görülmüştür. *L. monocytogenes*'e karşı olan aktiviteleri suşa bağlı olarak pH 3,5-5,5 veya 3,5-6,5 aralığında devam etmiştir (Campos et al., 2008).

Ekonomik ve bilimsel önemi gereği konu hakkında ülkemizde de çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir.

Bozadan izole edilen 50 adet laktokok suşu arasından 1 adedinin (GYL32) bakteriyosin üreticisi olduğu belirlenmiştir. Bozadan izole edilen bakteriyosin üreticisi GYL32 izolatı fenotipik olarak API sistemi ve genotipik olarak 16S rDNA dizi analizi kullanılarak *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* olarak tanımlanmıştır. Farklı pH, sıcaklık ve enzim uygulamaları sonucu *Lc. lactis* subsp. *lactis* GYL32 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin nisin olduğu belirlenmiştir. GYL32 suşunda bakteriyosin üretimi gelişme fazında başladı ve maksimum bakteriyosin üretimi (5120 AU/mL) bu fazının sonunda ölçülmüştür. Trisin SDS-PAGE analizi sonucunda; kısmi saflaştırması yapılan nisin Z'nin dimer formunda (6.7 kDa) bulunduğu tespit edilmiştir (Koral, 2011).

Pediococcus pentosaceus kültürünün *L. monocytogenes* 1/2a suşu üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *Ped. pentosaceus* kültürünün gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin yapılan çalışmalar sonucunda protein yapıda bakteriyosin benzeri bileşiklerden kaynaklandığı gözlenmiştir. Karakterizasyon amacıyla, bakteriyosin benzeri aktivitenin pH ve ısıtılabilirliği incelenmiş, aktivitenin pH 3 - 6 arasında arttığı, pH 8 - 10 arasında ise azaldığı belirlenmiştir. Isıtılma uygulamasında (30 dakika) ise aktivitenin 100 °C'de %30,86' sının, 80 °C' de % 60,49' unun ve 45 °C' de % 100' ünün korunduğu saptanmıştır (Köseoğlu, 2007).

2.2.7. Saflaştırılması

Bakteriyosinlerin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler bakteriyosinlerin katyonik hidrofobik moleküller olmaları, üreten bakterinin ve diğer Gram pozitif bakterilere adsorbe olabilmeleri ve adsorpsiyonun pH'ya bağlı olması özelliklerine esas alınarak geliştirilmiştir. Saflaştırmanın ilk aşamasında temel amaç hacim azaltması ve istenmeyen bazı protein ve lipid gibi bileşikler uzaklaştırmak olduğundan tuzla

çöktürme, asitle veya diğer organik çözücülerle pıhtılaştırma, diyaliz, ultrafiltrasyon, üretici bakteriye, silikik asit ve çeltik kabuğu külüne adsorpsiyon/desorpsiyon gibi yöntemlerden yararlanılır. İkinci aşamada, besiyerinden ve hücre metabolizmasından kaynaklanan kontamine proteinlerden iyi derecede bir arındırma sağlamak olduğundan jel filtrasyonu, anyon veya katyon değiştirici kromatografisi, hidrofobik interaksiyon kromatografisi gibi kromatografik yöntemler kullanılmaktadır (Coventry et al., 1997; Leer et. al., 1995; Yang and Ray, 1994; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

2.2.7.1. Üretici Organizmaların İzolasyonu ve Seçilmesi

Bakteriyosin üreticisi olan LAB izolatları birçok doğal ortamdan izole edilebilir. Laktobasiller doğada karbonhidratça zengin ortamlarda bulunurlar. Bundan dolayı da insan ya da hayvanların mukozal membranları (ağız içerisindeki yarık ve boşluklar, bağırsak sistemi ve vajina), bitkisel materyaller, gübreler, lağım pisliği ve fermente olan ya da bozulan gıdalar gibi çok geniş bir habitatta bulunabilmektedirler. Çok sayıda bileşiği (sitrat, malat, tartarat, nitrat, nitrit vb.) metabolize edebilirler ve enerji kaynağı ya da elektron akseptörü olarak kullanabilirler.

Günümüze dek yırtıcı kuşlara ilişkin gerçekleştirilen mikrobiyolojik çalışmalarda genellikle sindirim sisteminde bulunan mikrobiyotaya dikkat çekilmiştir. Bunlardan bazıları; sağlıklı 20 akbaba (*Cathartes aura*) bireyinin bağırsaklarında gram negatif bakteri varlığı sorgulanan çalışmada kuşların %15' inde *Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella* ve *Arizona hinshawii* (*Salmonella arizonae*) türlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Winsor, et al., 1981). Yapılan başka bir çalışmada, 12 kızıl akbabanın (*Gyps fulvus*) dışkı ve kusmuklarında başta *E. coli* olmak üzere *Aeromonas salmonicida*, *Proteus* sp., *Escherichia fergusonii*, *Providencia alcalifaciens*, *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Candida* sp., *Rhodotorula rubra* bakteri ve fungus türleri görülmüştür (Kocijan et al., 2009). Benzer şekilde 6 Amerikan karaakbabasının (*Coragyps atratus*) sindirim sisteminde obligat ve fakültatif anaerobik bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Çalışma sonunda *Actinomyces bovis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Micrococcus luteus*, *Neisseria sicca*, *Clostridium bifermentans*,

Enterobacter agglomerans, *Peptostreptococcus* sp., *Sarcina* sp., *Serratia odorifera* ve *Shigella flexneri* izole edilmiştir ve hetero-, izo- ve otoantagonizm görülmüştür. Yapılan bu çalışmalarda akbaba türlerinin dışkı, kusmuk ve bağırsaklarından çeşitli bakteriyal ve fungal mikroorganizmalar izole edilmiştir (Carvalho et al.,2003).

Günümüze kadar gerçekleştirilen pek çok çalışmada, LAB izole etmek için farklı kaynaklar kullanarak, farklı antimikrobiyal spektrumlara sahip bakteriyosinler elde edilebilmiştir. Ancak, yapılan literatür taramasında, izolasyon kaynağı olarak yırtıcı kuşların kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, Kara Akbaba, Şah Kartal, Kızıl Şahin, Atmaca, Delice gibi yırtıcı kuş türlerinin dışkı, ağız boşluğu ve kloak bölgelerinden alınan örneklerden LAB izolasyonu yapılarak bakteriyosin üretim potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. LAB izolasyonu yapılan yırtıcı kuşlar

Bu çalışmada, ilk aşama olarak ülkemizde dağılım gösteren yırtıcı kuş türlerinin ağız, kloak ve/veya dışkılarından konusunda uzman araştırmacılar tarafından arazi ortamında örnekler alınmıştır. Çizelge 3.1’ de Eskişehir çevresinde yaygın olarak bulunan ve örnek alınan yırtıcı kuş türleri sunulmuştur.

Çizelge 3.1. LAB izole etmek amacı ile kullanılan yırtıcı kuş türleri

YAYGIN ADI	TÜR ADI
Kara Akbaba	<i>Aegypius monachus</i>
Şah Kartal	<i>Aquila heliaca</i>
Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>
Şahin	<i>Buteo buteo</i>
Atmaca	<i>Accipiter nisus</i>
Delice	<i>Falco subbuteo</i>

3.1.2. Antimikrobiyal aktivite belirlemede kullanılan test bakterileri

Kuşlardan izole edilen LAB bakterilerinin ürettiği BBM lerin antimikrobiyal aktivitesini belirlemede kullanılan test bakterileri Çizelge 3.2’ de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan test bakterileri

Suş adı	Suş No	Kaynak
<i>Escherichia coli</i> O157	ATCC 35150	American Type Culture Collection, USA.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
<i>Escherichia coli</i>	LMG 8223	Belgian Co-Ordinated Collections of Micro-Organisms. BCCM/LMG, Gent, BELGIUM.
<i>Listeria monocytogenes</i>	LMG 13305	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMG 6395	
<i>Bacillus cereus</i>	LMG 8821	
<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B-744	ARS Culture Collection (Northern Regional Research Laboratory). Microbial Genomics & Bioprocessing Research, USA.
<i>Enterococcus faecalis</i>	NRRL B-29212	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	NRRL B-3252	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	NRRL B-1840	
<i>Lactobacillus lactis. lactis</i>	NRRL B-633	
<i>Lactobacillus lactis. cremoris</i>	NRRL B-634	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NRRL B-4495	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	NRRL B-227	
<i>Micrococcus luteus</i>	NRRL B-1018	
<i>Entrococcus faecium</i>	NRRL B-2354	
<i>Weissella viridescens</i>	NRRL B-1951	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NRRL B-1118	
<i>Vancomycin-resistant Enterococcus (VRE)</i>	Klinik izolat	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, TÜRKİYE
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	Klinik izolat	

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besi ortamları, aksi belirtilmediği sürece, besiyeri içeriğinin distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C’ de 15 dakika steril edilerek hazırlanmıştır.

3.1.3.1. MRS agar (Merck 1.10660)

Pepton	10,0	g
Meat ekstrat	10,0	g
Yeast ekstrat	4,0	g
Glukoz	20,0	g
Tween 80	1,0	g
Di Potasyum hidrojen fosfat	2,0	g
Sodyum asetat	5,0	g
Di-Amonyum hidrojen sitrat	2,0	g
Magnezyum sülfat	0,2	g
Mangan sülfat	0,04	g
Agar	14	g
Distile su	1000	ml

3.1.3.2. MRS broth (Merck 1.10661)

Pepton (from casein)	10,0	g
Meat ekstrat	10,0	g
Yeast ekstrat	4,0	g
Glukoz	20,0	g
Tween 80	1,0	g
Di potasyum hidrojen fosfat	2,0	g
Sodyum asetat	5,0	g
Di amonyum hidrojen sitrat	2,0	g
Magnezyum sülfat	0,2	g
Mangan sülfat	0,04	g
Distile su	1000	ml

3.1.3.3. Beyin kalp infusion (BHI) agar (Merck 1.13825)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 52 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. İndikatör test organizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

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

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 37 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. Makrofungus izolatlarının geliştirilmesinde kullanılmıştır.

3.1.3.5. Nutrient agar Merck (1.05440)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 20 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. Antimirobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.

3.1.3.6. Nutrient broth (Merck 1.05443)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 8 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. İndikatör test organizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

3.1.3.7. Sporulasyon ortamı

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

3.1.3.8. Deoxiribonuclease (DNaz) agar

Tryptose	20,0	g
Sodyum klorür	5,0	g
Deoksiribonükleik asit	2,0	g
Agar	15,0	g

3.1.3.9. Kanlı agara (50 ml/L koyun kanı içeren)

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

Besiyeri içeriği 40,0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında 45-50 °C' a soğutulur, % 5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilir, karıştırılır. Steril petrilere 15 ml dökülmüştür.

3.1.3.10. Jelatin agar

Pepton	5	g
Agar	15	g
Gelatin	4	g
Distile Su	1000	ml

3.1.3.11. Arjinin sıvı besiyeri

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

3.1.3.12. Gliserollü stok besiyeri

1 litre MRS broth içerisine 200 ml gliserol eklendikten sonra otoklavda 121 °C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Steril ependorf tüplerine, MRS brothta tazelenmiş kültürden 0,5 ml ve 1 ml gliserollü besiyeri konulmuştur. Hazırlanan stok kültürler -20 °C de saklanmıştır.

3.1.4. Kullanılan Boyalar ve Çözeltiler

3.1.4.1. Lugol

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

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

3.1.4.2. Safranin

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

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

3.1.4.3. Kristal violet

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

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

3.1.4.4. Malaşit yeşili

Malaşit yeşili	5,0	g
Distile su	100	ml

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

3.1.4.5. Fizyolojik tuzlu su (FTS)

Sodyum klorür	8,5	g
Distile su	1000	ml

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

3.1.4.6. Sodyum fosfat tamponu

Sodyum fosfat	0,7	g
Distile su	100	ml

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

3.1.4.7. Fosfat tamponu

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

KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 ayrı ayrı 100 ml suda çözündükten sonra uygun miktarlarda her iki çözeltiden alınarak pH 6' ya ayarlanmıştır (Temiz, 2000).

3.1.4.8. 1 M NaCl çözeltisi

NaCl	58,44	g
Distile su	1000	ml

NaCl distile suda çözünerek kullanılmıştır (Temiz, 2000).

3.1.4.9. 1M NaOH çözeltisi

NaOH	40,0	g
Distile su	960	ml

NaOH distile su içerisinde çözülerek çözelti hazırlanmıştır.

3.1.4.10. Bradford Reaktifi

25 mg Commassie Brilliant Blue G-250 (Applied Chemistry) boyasına, 12.5 ml etanol (%95) ve 25 ml H_3PO_4 (% 85) eklendikten sonra distile su ile 250 ml'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Kullanmadan önce Whatman No: 1 filtre kâğıdından geçirilip, ışık almayan ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Protein miktar tayininde belirteç olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çeşitli Yırtıcı Kuşların Sindirim Yolunda Kolonize Olan Laktik Asit Bakteri (LAB) Suşlarının İzolasyonu

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu için örneklenerek olan yırtıcı kuş bireyleri doğal ortamlarında örnek alındıktan hemen sonra salınmıştır. Diğer bir yöntem olarak, yerel halk tarafından Eskişehir ilinde görev yapan veterinerlere getirilen yırtıcı kuş bireylerinden de örnek alınmıştır. Kuş örneklerinden örnek alınması için gerekli olan Etik Kurul Raporu Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Etik kurulundan (26.10.201, 235) alınmıştır.

Alınan tüm örnekler, içinde dondurulmuş gliserin kartuşları bulunan kutularda laboratuvara getirilmiş ve izolasyon çalışması en hızlı biçimde gerçekleştirilmiştir. Örnekler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Fungikültür Laboratuvarı'nda LAB izolasyonu için uygun besiyerlerine inoküle edilmiştir. İzolasyon işlemleri tamamlandıktan sonra örnekler % 20' lik gliserole aktararak -20°C' de saklanmıştır.

3.2.1.1. Ağız boşluğu ve kloaktan izolasyon

Ağız boşluğu ve kloak bölgesinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu için steril swablar kullanılarak sürüntü yöntemiyle örnekler alınmıştır (Şekil 3.1.). Örnek

almada kullanılan swablar, öncelikle Nutrient broth ve Brain Heart Infusion (BHI) broth besiyerlerine inoküle edilmiş, 35 °C’ de 48–72 saat, inkübe edilerek ön zenginleştirme yapılmıştır. Daha sonra, sıvı kültürlerden peptonlu su ile hazırlanan ondalıklı dilüsyonlar MRS Agar besiyerinin yüzeyine 0,1 ml olarak inoküle edilmiştir.



Şekil 3.1. Ağız boşluğu ve kloak bölgesinden sürüntü yöntemi ile örnek alınması

3.2.1.2. Dışkı örneklerinden izolasyon

Kuşların taze dışkı örnekleri steril örnek kaplarına alınarak izolasyon amacı ile kullanılmıştır. LAB izolasyonu için alınan dışkı örneklerinden öncelikle peptonlu su ile $10^{-3} - 10^{-4}$ luk dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra MRS Agar yüzeyine 0,1 er ml aktararak yüzeye iyice yayıldıktan sonra inkübasyona bırakılmıştır.

Swab ve dışkı örneklerinden izolasyon amacı ile kullanılan her plaktan en az 5 tipik koloni (beyaz-krem renkli, 1-2 mm çapında, düzgün koloniler) seçilerek ilgili besiyeri plaklarına (MRS besiyerine), tek koloni düşecek şekilde çizgi yöntemi ile ekilmiş ve uygun koşullarda (bir önceki aşamada izole edildiği koşullarda) inkübe edilmiştir. İzolasyonu yapılan muhtemel LAB kültürleri anaerobik (%5 CO₂) inkübatör de (Edmund Bühler) inkübasyonu tamamlandıktan sonra tek düşen koloniler Man Rogosa Sharp (MRS) yatık agarına transfer edilerek saklanmıştır.

Stok kültür halinde saklanan olası LAB izolatlarına, Gram boyama ve katalaz testleri uygulanmıştır. Gram pozitif ve katalaz negatif izolatlar muhtemel LAB olarak

kabul edilmiş ve bakteriyosin benzeri madde (BBM) üretme yeteneği açısından araştırılmıştır.

Çizelge 3.3. Swablardan ve dışkı örneklerinden yapılan mikroorganizma izolasyonları

Besiyeri	Kullanım amacı	Ekim yapılan dilusyon	İnkübasyon koşulları	Koloni morfolojisi
MRS	Laktobasil izolasyonu	$10^{-1} - 10^{-2}$	48-72 saat, 35 °C, anaerobik (%5 CO ₂)	Krem-beyaz renkli, 1-2 mm çapında

3.2.2. LAB izolatlarının Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Potansiyelinin Belirlenmesi

3.2.2.1. Agar sandviç yöntemi

Bu aşamada test mikroorganizmaları olarak materyal bölümünde Çizelge 3.2.’de belirtilen çeşitli gıda kaynaklı patojenik bakteriler ve LAB suşları kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için “agar sandviç” yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla bakteriyosin üretme potansiyeli araştırılacak olan LAB izolatları MRS agar plaklarına ekilmiş ve 37 °C’ de, 24–48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Koloni gelişimi gözlemlendikten sonra, bu plakların yüzeyine bakteri inoküle edilmiş olan ikinci bir yarıkatı besiyeri katmanı dökülmüştür.

Plaklar yüzeyine dökülen yarıkatı besiyeri, test bakterisi türü dikkate alınarak iki farklı şekilde hazırlanmıştır. İndikatör test bakterisi olarak kullanılacak LAB izolatları % 0,8 agarlı (yarıkatı) MRS agar besiyeri, diğer test bakterileri için ise % 0,8 agarlı Brain Heart Infusion Agar besiyeri kullanılmıştır. Yarıkatı besiyerleri 45–50 °C’ lik su banyosunda bekletilerek sıvı olarak kalması sağlanmıştır. Test bakterilerinin 24 saatlik sıvı kültürlerinin yoğunluğu, fizyolojik tuzlu su (% 0,85 NaCl; FTS) ile seyreltilerek,

Mac Farland standardı 1 yoğunluğuna göre spektrofotometrik olarak ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanan bu test kültürlerinden 0,5 ml alınarak 7 ml yarı katı BHI/MRS besiyerine eklenmiş ve LAB izolatlarının geliştiği plakların yüzeyine ikinci kat olarak dökülmüştür. Besiyeri katılaştıktan sonra petrilere test bakterilerinin optimum gelişme sıcaklıklarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, yarıkatı besiyerinde inhibisyon zonu oluşup oluşmadığı incelenmiş ve oluşan zonlar digital kumpas yardımı ile ölçülmüştür. Test bakterilerinin en az birine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.2.2.2. Agar kuyu yöntemi

Bu aşamada, sadece agar sandviç yöntemi ile “antimikrobiyal madde üreticisi” olarak ayrılan izolatlar kullanılmıştır. İndikatör test bakterilerine karşı antimikrobiyal etki göstermiş olan izolatlar kullanılarak, bunlardan kültür supernatanları elde edilmiştir. Bu amaçla; %20 lik gliserol içeren MRS brotlarda saklanan stok LAB kültürlerinden inokulum düzeyi % 1 (v/v) olacak şekilde MRS broth besiyerine ekimler yapılmış ve 37°C’ de 18-24 saat geliştirilerek aktive edilmiştir. LAB ikinci kez aynı koşullarda aktive edildikten sonra, MRS broth içeren vida kapaklı şişelere % 1 (v/v) oranında inoküle edilmiştir. Kültürlerin aynı koşullarda inkübasyonundan sonra MRS kültürleri santrifüj tüplerine alınmıştır. 5000 rpm’ de 10 dakika santrifüj işlemine (Universal 32R, Hettich, Almanya) tabi tutularak süpernatantlar elde edilmiştir (Yamato et. al. 2003). Süpernatantların pH ayarlaması yapılmış (1 N NaOH ile pH: 6,5) ve 0.22 µm por çapına sahip membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Süpernatantların seçilmiş test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyu yöntemi ile onaylanmıştır. Süpernatantların antimikrobiyal aktiviteleri, bir önceki bölümde (Bölüm 3) kullanılan test bakterilerinden en hassas olanlarına karşı denenmiştir.

Agar kuyu yöntemi kısaca şu şekilde uygulanmıştır. Petrilere 15’ er ml test bakterisi ekilmiş MRS (LAB için) yada BHI (patojenler için) agar dökülerek dondurulmuştur. Daha sonra steril disk çıkarıcılar yardımıyla bu plaklarda 10 mm

apında kuyucuklar açılmıştır. Açılan bu kuyucukların her birine farklı bir LAB izolatından elde edilmiş olan süpernatant (85 µl) aktarılmıştır. Süpernatantın besiyerine difüzyonu için petriler 4 °C’de 2 saat bekletilmiş ve daha sonra test organizması için uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, kuyucukların çevresinde inhibisyon zonu varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Oluşan zonlar dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

3.2.2.3. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Antimikrobiyal Aktivitesinin Onaylanması

LAB lar geliştikleri ortamda bakteriyosinlerin yanısıra inhibitör özellikte olan çeşitli organik asitler ve H₂O₂ gibi metabolitler üretebilirler. İndikatör test bakterilerinin gelişiminin, organik asit üretiminden kaynaklanan düşük ortam pH’ı ya da H₂O₂ gibi metabolitler tarafından engellenmediğini belirlemek gerekmektedir. Bu amaçla LAB izolatları MRS broth besiyerinde uygun koşullarda üretilmiş, 5000 rpm de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatantların pH ları 1 N NaOH ile 6.5 ye ayarlanmıştır. Daha sonra süpernatant içinde bulunması olası H₂O₂ in giderimi için ortama 1 mg/ml lik katalaz enzim çözeltisi ilave edilerek 37 °C de 2 saat süre inkübe edilmiştir (Ammor et al., 2006). Bu şekilde nötralize edilen ve muhtemel H₂O₂ varlığı giderilen süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu yöntemi ile tekrar denenmiş ve inhibisyon zonları ölçülmüştür. Bu işlemlerden sonra antimikrobiyal aktivitesi değişmeyen (inhibisyon zonu oluşturmaya devam eden) süpernatantların elde edildiği LAB izolatları sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamalarına bu izolatlar ile devam edilmiştir.

3.2.3. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten LAB İzolatlarının Karakterizasyonu ve Tanılanması

3.2.3.1. Bakteriosin Benzeri Madde Üreten LAB İzolatlarının Karakterizasyonu

3.2.3.1.1. Virulans Faktörlerinin Belirlenmesi

3.2.3.1.1.1. DNaz Testi

LAB izolatlarının saf kültüründen bir koloni Deoxiribonuclease (DNaz) agar besiyerine ekilmiş ve uygun süre inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plağın yüzeyi 1N HCl ile kaplanmıştır. Bu işlem sonrasında koloniler çevresinde şeffaf zon varlığı, deoxiribonuclease aktivitesinin varlığı olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark, 1989).

3.2.3.1.1.2. Hemoliz Testi

LAB izolatlarının saf kültürleri 50 ml/L koyun kanı içeren kanlı agar besiyerine inoküle edilmiş ve uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilmiştir. Gelişen koloniler çevresinde eritrositlerin lizisini ifade eden şeffaf bir zon oluşumu aranmıştır. Koloni çevresinde yeşilimsi renk oluşması, eritrositlerin kısmi hidrolizini (α -hemoliz), şeffaf zon oluşumu ise tam hidrolizi (β -hemoliz) işaret etmektedir. Eğer izolat hemolizine sahip değilse, eritrositleri parçalayamayacaktır ve bu durum da γ -hemoliz olarak ifade edilmiştir (Tamer ve ark, 1989).

3.2.3.1.1.3. Jelatinaz Testi

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

3.2.3.1.1.4. Koagülaz Testi

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

3.2.3.2. BBM Üreten LAB izolatlarının tanılanması

3.2.3.2.1. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler

3.2.3.2.1.1. Gram Boyama

Saflığı sağlanan izolatların aktif kültürleri, MRS agar da 18–24 saat aralığında geliştirilmiş ve Gram boyama işleminde bu genç kültürler kullanılmıştır. Kültürden, öze yardımı ile yaklaşık bir toplu iğne başı kadar alınmış, lam üzerindeki bir damla distile su içerisinde yüzeye yayılmıştır. Lam havada kuruduktan sonra örneklerin üzerine metanol damlatılarak fikse edilmiştir. Metanol kuruduktan sonra preparat ilk önce kristal violet ile boyanarak 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra iyot-lugol çözeltisi ile boyanır ve 1 dakika bekletilmiştir. Metanolle (%95) 10 saniye muamele edilmiş ve distile su ile yıkanmıştır. Son olarakta preparatlar safranin ile 30 saniye muamele edilmiş ve distile su ile yıkandıktan sonra mikroskobun 100' lük objektifinde immersiyon yağı ortamında incelenmiştir. Mavi-mor renkli koloniler Gram pozitif, kırmızı-pembe renkli koloniler ise Gram negatif olarak kabul edilmiştir (Temiz, 2000, Tamer ve ark., 1989).

3.2.3.2.1.2. Spor Boyama

MRS agar ve sporulasyon ortamında geliştirilen izolatlardan preparat hazırlandıktan sonra havada kurutularak metanol ile fiksasyon işlemi yapılmıştır. Lam üzerine malaşit yeşili (%5) dökülmüş ve alttan ısıtılarak 5 dakika boyanmıştır. Preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra safranin ile 30 saniye boyanmış ve tekrar distile su ile yıkanmıştır. Malaşit yeşili boyasını alanlar endospor pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000).

3.2.3.2.1.3. Katalaz Testi

Laktik asit bakterileri sıvı besiyerinde geliştikten sonra katı besiyerine inoküle edilerek anaerobik koşullarda 24 saat aktive edilmiştir. Bu aktif kültürler üzerine %3 hidrojen peroksit damlatılarak gaz kabarcıkları çıkıp çıkmadığı gözlenmiştir. Gaz kabarcığı görülecek olan kültürler için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen kültürler için ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Bu testler sonucunda Gram pozitif, katalaz negatif ve spor oluşturmayan izolatlar muhtemel LAB olarak değerlendirilmiş ve %20 lik gliserol içeren MRS brothlarda -20 °C de ve MRS yatık agarlarda 4 °C de saklanmıştır.

Geleneksel yöntemlere göre morfolojik ve fizyolojik özellikleri belirlenen izolatlardan LAB olduğu onaylanan izolat ile çalışmanın diğer aşamalarında devam edilmiştir.

3.2.3.2.1.4. Anaerobik koşullarda büyüme

Bütün laktik asit bakterileri anaerobik koşullar altında gelişebilmektedir. Aynı zamanda oksijen varlığında da gelişim göstermektedirler. Bu yüzden aerotolerant anaerob olarak adlandırılmaktadır. Çalışmamızda LAB izolatı MRS broth besiyerine ekim yapılmış ve anaerobik (%5 CO₂) inkübatör de (Edmund Bühler) inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sıvı besiyerinden katı besiyerine ekim yapılmış kolonilerin morfolojileri incelenerek değerlendirilmiştir.

3.2.3.2.1.5. 0,01'lik TTC' de büyüme

MRS agar besiyeri içeriğine %0,01 oranında Triphenyltetrazolium klorür (TTC) eklenmesi ile hazırlanmıştır. Steril edilerek petrilere dökülen besiyeri 5 µl aktif kültür ile inoküle edilmiş, 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda pembe koloniler gözlemlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Manero and Blanch, 1999).

3.2.3.2.1.6. Telluritte büyüme yöntemi

MRS agar besiyeri içeriğine % 0,04 oranında egg yolk tellurite eklenmiştir. Steril besiyeri 5 µl aktif kültür ile inoküle edilmiş ve 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda büyümenin siyah koloniler şeklinde gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Manero and Blanch, 1999).

3.2.3.2.1.7. Nişasta hidrolizi

MRS' de aktifleştirilmiş 5 µl LAB kültürü nişastalı nutrient agar yüzeyine ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra büyüme çevresine lugol damlatılarak renk değişimi olup olmadığı gözlenmiştir. Koloni çevresindeki zonun mavi renge boyanması bakterinin nişastayı hidrolize edememesi, mavi renk oluşmaması ise nişastanın hidrolize uğraması olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.2.1.8. Ekzopolisakkarit üretimi

Ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin olup olmadığını belirlemek amacı ile MRS agar besiyeri içeriğine karbon kaynağı olarak glukoz yerine sukroz kullanılmıştır. Besiyeri steril petrilere dökülmüş ve 5 µl aktif LAB kültürleri ile inoküle edilerek 37

°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloniler etrafında ipliksi yaygın varlığı incelenmiş ve EPS üretiminin (yapıştırıcı (slime) yapı) olup olmadığı belirlenmiştir (Kıran, 2006).

3.2.3.2.1.9. Voges – Proskauer (VP) Testi

Bazı bakteriler, glikozu parçalayarak nötral bir ürün olan asetoin (asetil metil karbinol) oluşturur. Asetoin, potasyum hidroksit (KOH) varlığında okside olarak diasetil meydana getirir. Bu ürün ise alfa naftol ile reaksiyona girdiğinde kırmızı renk oluşturur. Aktifleştirilmiş taze kültürler MR – VP broth tüplerine ekilmiş ve 37 °C’ de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üzerine, 1ml %40’ lık KOH, daha sonra 3ml %5’ lik alfa naftol ilave edilmiştir. Besiyeri çalkalandıktan sonra 10-15 dakika içinde kırmızı renk oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Hemraj et al., 2013).

3.2.3.2.1.10. Sorbitol fermentasyonu

MRS broth besiyeri içeriğine glukoz yerine %1 sorbitol eklenmiş ve besiyerine 0,018 g/L fenol red ilave edilmiştir. Besiyeri steril edildikten sonra pH’ ı 7,4 olarak ayarlanmıştır. Tüplere dağıtılan besiyerine %2 oranında kültür inoküle edilerek 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Sarı renk oluşumu pozitif, pembe renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Manero and Blanch, 1999).

3.2.3.2.1.11. Farklı tuz konsantrasyonlarında büyüme

İzolatin, farklı tuz konsantrasyonlarında büyüme yeteneğinin belirlenmesi için yapılan çalışmada, % 4, 6,5 ve 18 oranında NaCl içeren MRS brotlara aktif LAB kültürü ekilmiştir. 37 °C de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda büyüme olup olmadığı gözlenmiştir.

3.2.3.2.1.12. Metilen mavili sütte büyüme

UHT süte % 0,1 ve %0,3 metilen mavisi eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri tüplere dağıtılıp aktif kültürlerden %2 oranında ekim yapılarak 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası mavi rengin beyaza dönüşümü ve pıhtı oluşumu belirlenerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Başyiğit, 2004).

3.2.3.2.1.13. Litmus milk' te büyüme

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

3.2.3.2.1.14. Arjininden amonyak oluşumu

Besiyeri bileşenleri distile suda çözündürülüp pH 7,2 ye ayarlanmıştır. Besiyeri otoklavlandıktan sonra tüplere dağıtılıp tüpler dik olacak şekilde dondurulmuştur. 24 saatlik aktif kültürler iğne özeyle besiyerine daldırılarak ekim yapılmıştır ve 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mor renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Mor renk amonyak oluşumunu, sarı renk ise asit oluşumunu göstermektedir (Harrigan, 1998).

3.2.3.2.1.15. Kazein hidrolizi

Nutrient agara %10 oranında skim milk eklenerek hazırlanan besiyeri otoklavlandıktan sonra steril petrilere dökülmüştür (Harrigan, 1998). Petrilere 24 saatlik aktif LAB kültürleri 5 µl ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. LAB kolonileri etrafında zon oluşumu sütte ki kazeinin hidrolize olduğunu (pozitif sonuç) ifade eder. Negatif sonuçlarda ise koloni etrafında opaklaşma görülmektedir (Aydın, 2004) .

3.2.3.2.1.16. pH gelişme aralığı

İzolatın asidik pH' ya karşı dirençli olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada pH'sı 1, 2 ve 3' e ayarlanmış MRS broth besiyerine aktif kültürden ekim yapılarak 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Ekim yapılan MRS brothlardan 2, 4 ve 6. saatlerde örnek alınarak MRS agar plaklarına ekim yapılmış ve bu plaklar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plaklarda büyüme olup olmadığına bakılarak LAB' nin zamana bağlı hangi pH' da canlı kalabildiği belirlenmiştir.

3.2.3.2.2. Moleküler yöntemler

Bakteriyosin üretimi doğrulan ve virulent olmadığı belirlenen izolatın moleküler tanımlanması Biyoeksen firmasından (İstanbul) hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2.2.1. DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Biospeedy DNA İzolasyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır.

Bir mikrofij tüpüne 600 µl Parçalama Tamponu (%2 CTAB - hexadecyltrimethylammonium bromide, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) eklenmiş, daha sonra katı besi yerinden alınan yaklaşık 200 mg bakteri kolonisi tamponun içine bırakılmıştır. Numunenin homojenizatörde 2 dk, 6000 rpm'de homojenizasyonundan sonra 95°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.

Tüp 14000 RPM'de 1 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen üst sıvı yeni bir tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen üst sıvı hacmi kadar isopropanol, üst sıvı hacminin 2 katı kadar Bağlama Tamponu (6,75M Guanidinium thiocyanate, 15mM Tris-Cl pH 8,0) eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır. Karışım DNA Kolonu'na eklenmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edildikten sonra alt sıvı atılmıştır. Kolona 500 µl İnhibitör Eleme

Tamponu (5 M thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6, %40 EtOH) eklenmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Kolona 500 µl Yıkama Tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5; 80% v/v Ethanol) eklenmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Bu adım iki defa daha tekrarlanmıştır. Kolun 14000 RPM de 1 dk boş santrifüj edildikten sonra steril yeni bir mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiş, 100 µl Çözücü Tampon eklenmiş, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve DNA izolatu elde edilmiştir. Elde edilen DNA -20°C’de saklanmıştır.

3.2.3.2.2. Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR)

Q-PCR için Biospeedy Bakteriyel Çeşitlilik Çalışma Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit bakteri 16S rRNA’sının, *Escherichia coli* numaralandırmasıyla 8-1522 bazları arasını hedefleyen 5’-AGAGTTTGATC(CA)TGGCTCAG-3’ ve geri 5’-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3’ primerlerini içermektedir. Bütün reaksiyonlarda Roche Light Cycler Nano (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Reaksiyon 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x EvaGreen, 5 ng/µl kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 µM içermektedir. Q-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 55 °C – 95 °C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Q-PCR dataları Roche Light Cycler Nano Software 1.0’ da analiz edilmiştir.

3.2.3.2.3. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

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

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

3.2.4. Aktif İzolatın Gelişme Fazının BBM Üretimine Etkisi

Bu çalışmada, LAB izolatının BBM' yi gelişme fazının hangi saatinde en iyi ürettiği belirlenmiştir. LAB izolatu %2 oranında inoküle edildikten sonra inkübasyona bırakılmış ve 24 saat boyunca 2 saatte örneklemeler yapılarak antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.5. Antimikrobiyal Aktiviteden Sorumlu Maddenin Karakterizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında üretilen BBM' nin sıcaklık, pH, proteolitik enzimler, organik çözücüler, bazı deterjan ve kimyasal maddelere direnç seviyesi araştırılmıştır. Ayrıca BBM' nin depolama sıcaklık ve süresine bağlı olarak aktivitesinin korunma durumu da incelenmiştir.

3.2.5.1. Isıl stabilite

Bu aşamada LAB izolatının büyütülmesi ile elde edilen ve BBM içeren süpernatantlara 5 farklı sıcaklık derecesinde ısıtma işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla süpernatantlara 45, 60 ve 90°C için su banyosunda, 100°C için elektrikli ısıtıcıda ve 121°C için otoklavda 15 ve 30'ar dakikalık ısıtma işlemi uygulanmıştır. Sıcaklık ölçümleri etkinliğine bakılmayacak olan ayrı tüpteki süpernatanta civalı termometrenin daldırılması ile yapılmıştır. İşlem görmüş ve görmemiş süpernatantların aktivitesi agar kuyu yöntemiyle test edilmiştir ve aktiviteleri yüzde olarak belirlenmiştir.

3.2.5.2. pH stabilitesi

Süpernatantların pH ları 6 N NaOH ve 6 N HCl ile 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11 olarak ayarlanmıştır. Süpernatantlar pH ayarlamasının ardından 4°C de 0, 6, 12, 18 ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası işlem görmüş ve görmemiş süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu yöntemiyle test edilmiş ve aktiviteleri yüzde aktivite olarak ifade edilmiştir.

3.2.5.3. Proteolitik enzimlere direnç

Bu test için LAB izolatları MRS broth a uygun koşullarda üretilecek, 5000 rpm de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatantlar tüplere 1 er ml dağıtılmıştır. Pepsin (0,05 M Na₂HPO₄, pH:7), tripsin (0,05 M Na₂HPO₄, pH:7), proteaz, proteinase K, α-kemotripsin enzimlerinin sodyum fosfat tampon çözeltisinde (0,05 M Na₂HPO₄, pH:6) 1 mg/ml'lik çözeltileri hazırlanmıştır (Xiraphi et. al., 2008). Her biri filtre ile steril edilmiş olan enzim çözeltilerinden 25 µl alınmış 250 µl süpernatant ile karıştırılarak 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır (Lash, et. al., 2005). İnkübasyon sonrasında süpernatantların test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Deney sonunda proteolitik enzim uygulamasında antimikrobiyal aktivitesini yitirmiş olan, proteolitik enzimlerle hidrolize olan antimikrobiyal maddeler “bakteriyosin benzeri madde” (BBM) olarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak sadece süpernatant ve enzim + tampon çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.5.4. Organik çözücülere direnç

Organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kloroform (% 10), propanol (% 10), metanol (% 10), etil alkol (% 10), aseton(%10), hekzan (% 25) ve etil eter (% 25) çözücülerini kullanılmıştır. Kullanılan çözücüler, hazırlanan süpernatant içerisine %10 oranında ilave edilip 25 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemin ardından örneklerin antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir.

Organik çözücü içermeyen süpernatant örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır (Asutay, 2000).

3.2.5.5. Bazı deterjanlara ve kimyasal maddelere direnç

Bakteriyosinin bazı deterjan ve kimyasal maddelere direncinin belirlenmesi için, %10 oranında çözeltileri hazırlanan sodyum dodesil sülfat (SDS), tween 80, üre, triton X-100 ve EDTA kullanılmıştır. Bu çözeltiler, hazırlanan süpernatant içerisine %1 oranında ilave edilmiş ve 37°C'de 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Deterjan ve kimyasal içermeyen süpernatant örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır (Asutay, 2007).

3.2.6. Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Bakteriyosin Benzeri Maddenin Aktivitesine Etkisi

Bu aşamada, LAB izolatu tarafından üretilen BBM' nin depolama sıcaklığı ve zamanına bağlı olarak aktivitesini koruyup korumadığı sorgulanmıştır. Bu amaçla hazırlanan süpernatant örnekleri liyofilize edilmiş ve 4 ve 25 °C de depolanmıştır. Liyofilizasyon işlemi -76 °C de 0,0010 mbar (Christ) basınç altında gerçekleştirilmiştir. Toplam 75 günlük depolama süresinde 15 gün aralıklarla örnekler alınarak test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir (Yıldırım and Johnson, 1998).

3.2.7. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Kısmi Saflaştırılması

BBM' nin kısmi saflaştırılmasında ilk olarak kültür sıvısı santrifüj (5000 g'de 10 dk) edilerek hücre uzaklaştırılmış ve süpernatant elde edilmiştir. Süpernatant içerisine kademeli olarak % 80 oranında amonyum sülfat ilave edilmiş ve 4 °C'de bir gece çalkamalı etüvde bırakılmıştır. Elde edilen karışım santrifüj edilmiştir (3000 g/ 30 dk). Santrifüj sonrası elde edilen pellet kısmı 10mM pH:6 fosfat tamponunda çözümüştür.

Çökelti, önceden hazırlanan diyaliz tüplerinde (Sigma Aldrich, 12400 MWCO, Size: 23 m*15mm) fosfat tamponuna karşı 4 °C de diyalize bırakılmıştır. Diyaliz sonrası elde edilen kısmen saflaştırılmış ve konsantre edilmiş BBM -20 °C de muhafaza edilmiştir (Lee, et al., 1999; Koral, 2011).

3.2.8. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Molekül Büyüklüğünün Tayini

Bakteriyosin benzeri madde kısmen saflaştırılmış ve konsantre edildikten sonra SDS-PAGE (BIORAD Mini-PROTEAN Tetra Cell System) kullanılarak molekül büyüklüğü saptanmaya çalışılmıştır. Uygulanan yöntemde %15' lik ayırma, %5' lik yükleme jelleri kullanılmıştır. Jeller dökülüp örnek yüklendikten sonra sisteme; yükleme jeli için 35 mA, ayırıcı jel için 50 mA elektrik akımı uygulanmıştır. BBM' nin elektroforetik ayrımından sonra jeller iki kısma bölünmüştür. Bir kısmı marker ile hızlı gümüş boyamaya tabi tutulmuştur, diğer kısmı ise antimikrobiyal aktivite tayini için yıkama solüsyonlarına ayrılmıştır. Antimikrobiyal aktivite için ayrılan jeller fiksasyona bırakılmış, daha sonra SDS nin uzaklaştırılması için TritonX-100 ile yıkanmıştır. Distile su ile yıkanan jeller 10 ml Nütrient agar bulunan petri içerisine yerleştirilmiştir. Üzerine, patojen test bakterilerinin eklendiği yarıkatı nütrient agar (7ml) ilave edilmiş ve 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Marker ile hızlı gümüş boyamaya tabi tutulan jeller ise boyanarak bantlar elde edilmiştir. Sigma molekül marker standart proteinlerden oluşmaktadır. Belirlenen miktarda saf su ile çözdürüldükten sonra elektroforeze yüklenmek için hazır hale gelmektedir. Marker, elektroforezde yürütülen proteinin eşit ve iyi tanımlanmış grupların dağılımını elde etmek amacı ile formüle edilmiştir (Sigma). Elde edilen bantlar ile antimikrobiyal aktivite çalışmasından alınan zonlar karşılaştırılarak aktiviteden sorumlu molekülün büyüklüğü belirlenmiştir (Deraz, et al., 2005; Koral, 2011; Ugras, et al., 2012; Tübitak MAM, 2011).

3.2.9. Bakteriyosin Benzeri Madde Üretiminin Optimize Edilmesi

Çalışmanın bu aşamasında üretilen BBM' nin en verimli üretimi sağlamak amacı ile çevresel faktör olarak sıcaklık ve pH, besinsel faktör olarak karbon kaynağı tercihleri araştırılmıştır.

Bakteriosin aktivitesi ise Jiang ve ark. (2004) tarafından önerilen aşağıdaki formül aracılığı ile belirlenmiş ve her mililitre süpernatantın sahip olduğu arbitrary unit (AU/ml) olarak ifade edilmiştir

$$\text{AU/ml} = (\text{Dfi})^{-1} \cdot 1000 \cdot V^{-1}$$

AU= Arbitrary Unit

Dfi= zon oluşumunun gözlendiği en yüksek dilüsyon

V= plaklardaki oyuklara aktarılan hacim (ml) (Wu et al. 2004; Köseoğlu, 2007).

3.2.9.1. pH Tercihi

Başlangıç pH'sı 4, 5, 6, 7, 8 ve 9' a ayarlanan MRS sıvı besiyerine % 2 oranında inoküle edildikten sonra inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu agar kuyu yöntemiyle antimikrobiyal aktivite testi yapılmış ve elde edilen sonuç AU/ml olarak ifade edilmiştir

3.2.9.2. Sıcaklık Tercihi

İzolatin bakteriyosin üretimi için en uygun sıcaklık tercihi, % 2 oranında inoküle edilen besiyerinin 8 farklı sıcaklıkta (15, 20, 25, 30, 33, 35, 37, 40°C) inkübasyonu sonucu agar kuyu yöntemiyle antimikrobiyal aktivite testi yapılmış ve elde edilen sonuç AU/ml olarak ifade edilmiştir.

3.2.9.3. Karbon Kaynağı Tercihi

İzolatan bakteriyosin üretimini arttırmak için besinsel faktörlerin belirlenmesi aşamasında MRS Broth besiyerinin içeriğinde bulunan karbon kaynağının değiştirilerek denenmesi planlanmıştır. MRS Broth besiyerinde kullanılacak karbon kaynaklarının seçilmesi işlemi ise biolog test sistemi (GEN III) ile gerçekleştirilmiştir. Biolog testi ile 23 karbon kaynağı, 5 azot kaynağı, 6 mineral tuz ve 2 pH değeri çalışılmıştır. Karbon kaynağı tercihinin belirlenmesi aşamasında, önceki aşamalarda belirlenmiş optimum pH ve sıcaklık değerleri kullanılmıştır. Her besiyeri için 3 erlen kullanılmış olup, her erlen için agar kuyu yöntemiyle antimikrobiyal aktivite testi yapılmış ve elde edilen sonuç AU/ml olarak ifade edilmiştir.

GEN III MicroPlate™											
A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-Raffinose	B2 α-D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β-Methyl-D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	B7 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α-D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 3-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Arabitol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-PO4	D7 D-Fructose-6-PO4	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troleandomycin	D11 Rifamycin SV	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyrogutamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Niaproof 4
F1 Pectin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Gluconic Acid	F5 D-Glucuronic Acid	F6 Glucuronamide	F7 Mucic Acid	F8 Quinic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium Violet	F12 Tetrazolium Blue
G1 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 L-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α-Keto-Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo-Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ-Amino-Butyric Acid	H3 α-Hydroxy-Butyric Acid	H4 β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	H5 α-Keto-Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

Şekil 3.2. Biolog testinde çalışılan parametreler

3.2.10. Derin Kültür Koşullarında Bakteriyosin Benzeri Madde Üretimi

3.2.10.1. Erlen ölçeğinde üretim

Erlen ölçeğinde, optimize edilmemiş ve edilmiş MRS Broth besiyerleri karşılaştırılmıştır. Bu aşamada inceleme parametresi olarak canlı hücre sayımları, antimikrobiyal aktivite ve besiyeri pH sı değerleri izlenmiştir. Canlı hücre sayısı MRS besiyerinde kültürel sayım yöntemi ile ve antimikrobiyal aktivite değerleri (AU/ml) agar kuyu yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.10.2. Karıştırılmalı Tank Reaktör (KTR) ölçeğinde üretim

Bu aşamada, büyük ölçekte bakteriyosin üretimi sağlamak için, erlen ölçeğinde elde edilen optimum koşulları KTR (New Brunswick, Bioflo 110) koşullarına uygulanarak ölçek büyütme çalışması gerçekleştirilmiştir. Büyüme koşulları olarak 30 °C inkübasyon sıcaklığı ve 75 rpm karıştırma hızı kullanılmıştır. Zaman aralıklarında alınan örneklerde canlı hücre sayısı ve antimikrobiyal aktivite verileri erlen ölçeğindeki yöntemler ile belirlenmiştir.

Optimize edilmemiş ve edilmiş koşullarda erlen ölçeğinde ve optimize edilmiş koşullarda KTR ölçeğinde gerçekleştirilen çalışmalarda üretilen zamana bağlı biyomas (X) miktarının izlenmesi ile

$$\text{spesifik büyüme hızı, } \mu = \frac{d \ln X}{dt} \quad (1/d)$$

değeri hesaplanarak organizmanın büyüme kinetiği incelenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Çeşitli Yırtıcı Kuşların Sindirim Yolunda Kolonize Olan Laktik Asit Bakteri (LAB) Suşlarının İzolasyonu

Bu çalışmada, ülkemizde dağılım gösteren Kara Akbaba, Şah Kartal, Kızıl Şahin, Atmaca ve Delice gibi önemli yırtıcı kuş türlerinin ağız, kloak ve dışkılarından örnekler alınmış ve BBM üreten bakterilerin izolasyonu amacıyla incelenmiştir. Bu aşamada 7 adet Kara Akbaba (6 adet yavru ve 1 adet ergin birey), 1 adet Şah Kartal (ergin birey), 5 adet Kızıl Şahin (ergin birey), 1 adet Şahin (ergin birey) ve 1 adet Atmaca (ergin birey) kuşlarından bakteri izolasyonu yapılmıştır. Bu kuşlardan 2 adet Kara Akbaba' nın (yavru birey) dışkı örneği dışında diğer örnekler ağız ve kloak bölgelerinden temin edilmiştir. Bu örneklerden toplam 45 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. İzolasyonu yapılan bakterilere uygulanan testler sonucu Delice kuşundan izole edilen muhtemel 5 adet LAB nin; Gram pozitif, katalaz negatif ve endospor oluşturmadığı belirlenmiştir. Diğer kuşlardan alınan örneklerin, geleneksel yöntemlerle yapılan testlerde istenilen morfolojiye sahip olmadığı belirlenmiştir. İzolasyonu yapılan muhtemel laktik asit bakterileri %20 lik gliserol içeren MRS brothlarda -20 °C de ve MRS yatık agarlarda 4 °C de saklanmıştır.

4.2. LAB izolatlarının Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Potansiyelinin Belirlenmesi

Delice kuşundan elde edilen ve belirtilen özellikleri ile muhtemel LAB olduğu düşünülen toplam 5 adet bakteri izolatu, öncelikle agar sandviç ve agar kuyu yöntemleri kullanılarak antimikrobiyal aktivitelerinin varlığı belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen antimikrobiyal aktivitenin organik asit ya da H₂O₂ üretiminden kaynaklanıp kaynaklanmadığı sorgulanmıştır.

4.2.1. Agar sandviç yöntemi

Delice kuşundan izole edilen 5 adet LAB izolatının, kullanılan test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. İzolatların agar sandviç yöntemiyle test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

Test organizmaları	İzolat No									
	16-1		16-2		16-6		16-16		16-17	
	Koloni çapı	Zon çapı	Koloni çapı	Zon çapı	Koloni çapı	Zon çapı	Koloni çapı	Zon çapı	Koloni çapı	Zon çapı
<i>B.cereus</i>	8	>44	8	>44	7	>44	10	>44	7	>44
<i>B.subtilis</i>	8	>44	8	>44	8	>44	8	>44	8	>44
<i>E. faecalis</i>	9	>44	8	>44	8	28	9	33	9	>44
<i>E.faecium</i>	8	20	8	21	8	19	8	18	8	21
<i>E.coli</i>	10	>44	10	>44	9	>44	9	>44	9	>44
<i>E.coli O157</i>	7	34	8	44	7	37	8	32	7	23
<i>MRSA</i>	7	21	7	22	7	21	7	21	7	22
<i>M. luteus</i>	7	>44	7	>44	7	>44	7	>44	7	>44
<i>L. plantarum</i>	7	20	8	21	8	21	8	20	8	20
<i>L. acidophilus</i>	7	19	7	18	7	21	7	20	7	21
<i>L. lactis. lactis</i>	7	>44	7	17	7	21	7	>44	7	>44
<i>L. lactis cremoris</i>	8	20	8	20	7	20	8	20	6	17
<i>L. pentosus</i>	7	21	7	19	7	19	7	21	7	21

<i>L. fermentum</i>	11	24	12	23	10	21	13	21	10	20
<i>L. mesenteroides</i>	12	20	13	20	12	20	13	22	9	19
<i>L. mesenteroides subsp. cremoris.</i>	8	20	8	21	8	20	8	20	8	19
<i>L.monocytogenes</i>	8	>44	8	>44	8	>44	8	>44	8	>44
<i>P. aeruginosa</i>	7	>44	7	>44	7	>44	7	>44	7	>44
<i>S. aureus</i>	6	30	7	25	7	29	8	33	8	32
VRE	7	22	7	20	7	22	7	21	7	21
<i>W. viridescens</i>	7	24	7	22	7	21	7	18	7	18

4.2.2. Agar kuyu yöntemi

Delice kuşundan izole edilen 5 adet LAB izolatından elde edilen süpernatanın kullanılan test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu yöntemi ile de belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. İzolatların agar kuyu yöntemiyle test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (Kuyu çapı 10 mm olup inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

Test organizmaları	İzolat No				
	16-1	16-2	16-6	16-16	16-17
<i>B.cereus</i>	-	-	-	-	-
<i>B.subtilis</i>	15	16	10	10	17
<i>E. faecalis</i>	18	18	19	20	17
<i>E.faecium</i>	13	12	15	15	12
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-

<i>E.coli</i> O157	-	-	-	-	-
MRSA	16	15	17	16	15
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	-	-	-	-	-
<i>L. lactis. lactis</i>	-	-	-	-	-
<i>L. lactis cremoris</i>	14	14	15	15	13
<i>L. pentosus</i>	13	14	14	13	13
<i>L. fermentum</i>	13	13	13	12	13
<i>L. mesenteroides</i>	-	-	-	-	-
<i>L. mesenteroides subsp. cremoris.</i>	-	-	-	-	-
<i>L.monocytogenes</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	18	19	18	17	17
VRE	19	20	17	16	15
<i>W. viridescens</i>	-	-	-	-	-

- : Aktivite belirlenmedi

4.2.3. LAB İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Onaylanması

İndikatör test bakterilerinin gelişiminin organik asit üretiminden kaynaklanan düşük ortam pH'ı ve H₂O₂ gibi metabolitler tarafından engellenmediğini göstermek gerekmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilen nötralizasyon ve katalaz muamelesi sonucunda antimikrobiyal aktivitenin korunduğu onaylanmıştır (Çizelge 4.3.)

Çizelge 4.3. LAB lere ait kültür süpernatantlarının katalaz enzimi ve nötralizasyon işlemi sonrası antimikrobiyal aktiviteleri (%)

Deneme Grubu	İzolat No				
	16-1	16-2	16-6	16-16	16-17
İşlem görmemiş kültür sıvısı	100	100	100	100	100
Katalaz enzimi ile işlem görmüş kültür sıvısı (H ₂ O ₂ etkisi)	100	100	100	100	100
Nötralize edilmiş kültür sıvısı (Organik asit etkisi)	100	100	100	100	100

4.3. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten LAB İzolatlarının Karakterizasyonu ve Tanılanması

4.3.1. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten LAB İzolatlarının Karakterizasyonu

4.3.1.1. Virulans Faktörlerinin Belirlenmesi

İzolasyonu yapılan ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenen LAB izolatları, çeşitli virulans faktörleri açısından araştırılmıştır. Yapılan testlerde ise hemoliz, DNaz, jelatinaz ve koagülaz negatif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4.)

Çizelge 4.4. LAB izolatlarının virulans faktörlerinin belirlenmesi

Test adı	İzolat No				
	16-1	16-2	16-6	16-16	16-17
DNaz	-	-	-	-	-
Hemoliz	-	-	-	-	-
Jelatinaz	-	-	-	-	-
Koagülaz	-	-	-	-	-

- : Negatif sonuç

Çalışmanın bu aşamasında elde edilen tüm sonuçların birlikte değerlendirilmesi sonucunda malzeme, işgücü ve zamandan kazanabilmek amacı ile çalışmaya sadece 16-1 kodlu izolat ile devam edilmesi uygun görülmüştür.

4.3.2. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten LAB İzolatlarının Tanılanması

4.3.2.1. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler

Bakteriyosin benzeri madde ürettiği belirlenen ve saf kültürü hazırlanan 16-1 izolatını cins seviyesinde tanılayabilmek için ilk olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri sorgulanmıştır. Bu testler sonucunda elde edilen veriler çizelge 4.5. te toplu olarak sunulmuştur. Analizler sonucunda izole edilen 16-1 izolatının; Gram pozitif, tek, ikili ve kısa zincirler halinde kok ve sporsuz olduğu gözlenmiştir. Bakterinin katalaz negatif olduğu ve endospor oluşturma özelliğine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca TTC ve nişasta testleri negatif, tellurit ve sorbitol, testleri pozitif olarak belirlenmiştir. Arjininden amonyak oluşumu, kazein hidrolizi, ekzopolisakkarit üretimi ve Voges Proskauer aktivitesinin olduğu saptanmıştır. Bakterinin %4 ve 6,5 NaCl konsantrasyonlarında gelişebildiği fakat %18,5 NaCl konsantrasyonunda gelişemediği belirlenmiştir. Ayrıca bakterinin %0,1 konsantrasyonunda metilen mavili sütte gelişebildiği, %0,3 konsantrasyonunda gelişemediği belirlenmiştir. Litmus katılmış sütte gelişen bakterinin gelişirken laktozu ayırtmış ve sütle laktozun ayrışması sonucu asit meydana gelmesi, litmus'un renginin pembeleşmesine ve aynı zamanda sütün pıhtılaşmasına neden olmuştur. Bakterinin pH gelişme aralığını belirlemek amacı ile pH 1, 2 ve 3 te 2, 4 ve 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu pH 1 ve 2 de 2. saat ten sonra bakterinin gelişmediği görülmüştür. pH 3 te ise 4. saatte de gelişimini devam ettirdiği ancak 6. saatte gelişemediği belirlenmiştir (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. 16-1 izolatının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

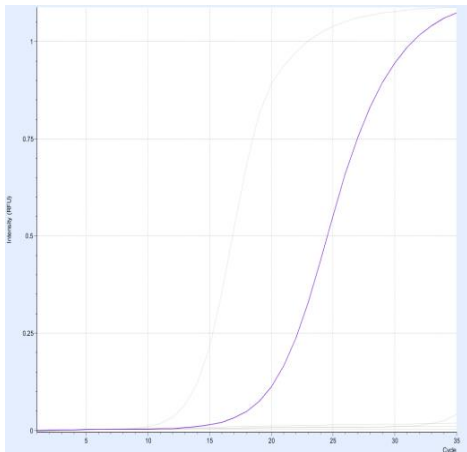
Analiz		Sonuç
Gram reaksiyonu		+
Hücre şekli		Kok
Endospor varlığı		-
Katalaz testi		-
Anaerobik koşullarda büyüme		+
TTC de büyüme		-
Telluritte büyüme		+
Nişasta hidrolizi		-
EPS üretimi		+
Voges - Proskauer (VP) testi		+
Sorbitol fermentasyonu		+
Farklı NaCl konsantrasyonlarında büyüme;		
% 4		+
% 6,5		+
% 18,5		-
Metilen Mavili Sütte Büyüme		
% 0,1		+
% 0,3		-
Litmus Milk' te Büyüme		
Beyaz renk		+
Pembe renk		+
Çökelme		+
Arjininden Amonyak Oluşumu		+
Kazein Hidrolizi		+
pH Gelişme Aralığı		
pH 1	2. saat	+
	4. saat	-
	6. saat	-
pH2	2. saat	+
	4. saat	-
	6. saat	-
pH3	2. saat	+
	4. saat	+
	6. saat	-

+ : Pozitif sonuç; - : Negatif sonuç

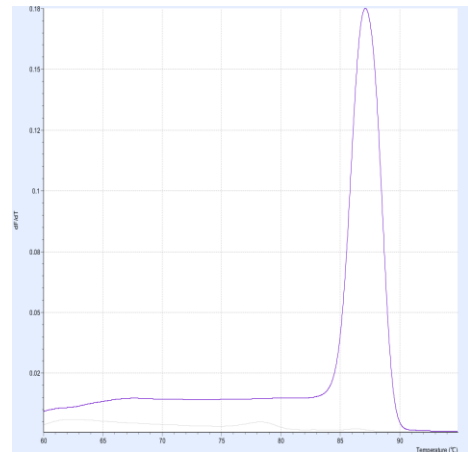
4.3.2.2. Moleküler yöntemler

4.3.2.2.1. Q-PCR Sonuçları

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



Şekil 4.1. LAB izolatının çoğalma eğrisi



Şekil 4.2. LAB izolatının erime eğrisi

4.3.2.2.2. Dizi Analizi Sonuçları

İzolatomuzun elde edilen dizi analizi sonuçları, Fasta formatında aşağıda verilmiştir.

>16 İleri Okuma

```
GGGTGCTATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTC
AATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACC
```

CATCAGAGGGGGATAAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTT
TATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGAT
GGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC
GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAA
AGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAA
CTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACG
GTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA

>16 Geri Okuma

GGCTACTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTATCCACCTTAGGCGGCTGG
CTCCAAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTG
ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATC
CGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCC
GAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTC
GTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT
GATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAG
AGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG
GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCT
GTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGT
CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCAC
CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTAC
TCCCC

Elde edilen dizilerin biyoinformatik analiz sonuçları Çizelge 4.6.' da özetlenmiştir.

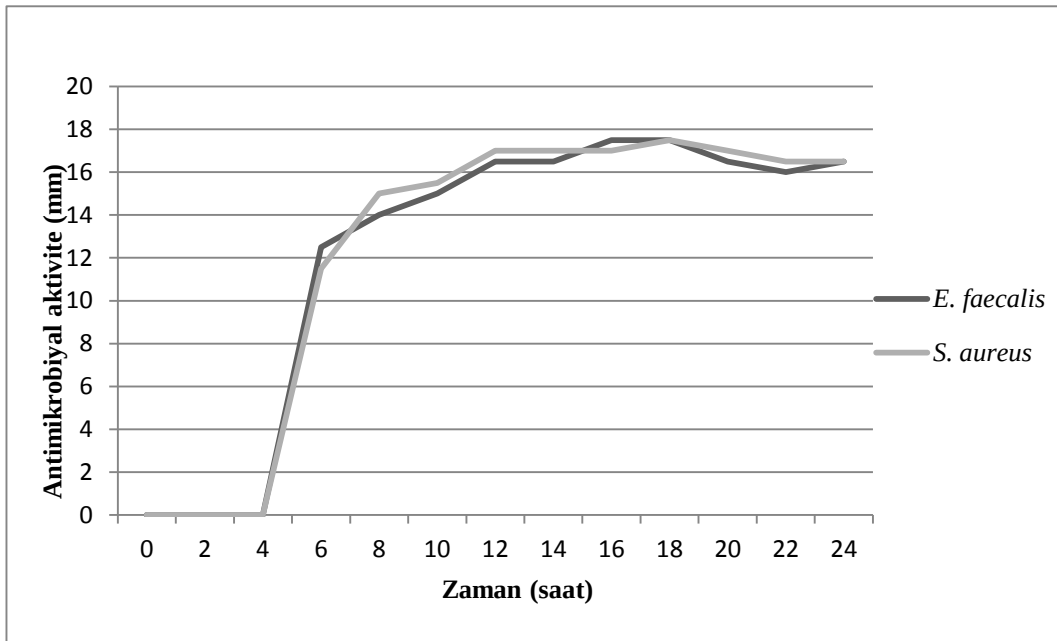
Çizelge 4.6. LAB izolatının Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Numune Adı	Ham datada değerlendirilen kısım	16S rRNA'da eşleşen bazların pozisyon numaraları	DNA Databank No	Organizma	Benzerlik
İleri Okuma	11-701	5-696	JX437938.1	<i>Enterococcus faecium</i>	691/691 (100%)
Geri Okuma	9-636	1519-896	JX437938.1		624/624 (100%)

Bu veriler ışığında izolatımızın ait olduğu tür *Enterococcus faecium* olarak belirlenmiştir.

4.4. *Enterococcus faecium* 16-1 İzolatının Gelişme Fazının BBM Üretimine Etkisi

Yapılan çalışmada *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının BBM yi gelişme fazının 18. saatinde maksimum seviyede ürettiği belirlenmiştir. 24 saat boyunca 2 saate bir alınan örneklemelerde 18-20. saatten sonra aktivitenin sabit kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.3.). Bundan sonra ki yapılan çalışmalarda inkübasyon süresi olarak 18. saat seçilmiştir.

Şekil 4.3. *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının gelişme fazında BBM üretimi

4.5. Antimikrobiyal Aktiviteden Sorumlu Maddenin Karakterizasyonu

4.5.1. Isıl stabilite

Enterococcus faecium 16-1 in sahip olduğu antimikrobiyal etkinin BBM’ den kaynaklandığını belirlemek ve bu BBM’ yi karakterize etmek amacı ile ısıl stabilitesi belirlenmiştir. BBM’ nin ısıl işlemlerde yüksek oranda stabil kaldığı görülmüştür (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Farklı ısıl işlem ve süre uygulamalarının BBM ‘nin antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkisi (%)

İşlem sıcaklığı (°C)	Süresi (dk)	Antimikrobiyal aktivite (%)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Kontrol	15	100	100
	30	100	100
45	15	100	100
	30	100	100
60	15	100	100
	30	100	100
90	15	100	98
	30	0	0
100	15	100	98
	30	0	0
121	15	0	0
	30	0	0

4.5.2. pH stabilitesi

Bu çalışmada, BBM' yi karakterize etmek amacı ile pH stabilitesi belirlenmiştir. BBM' nin pH stabilitesi çalışmasında zamana karşı geniş pH aralığında yüksek oranda stabil kaldığı görülmüştür (Çizelge 4.8. - 4.9.).

Çizelge 4.8. Farklı pH derece ve süre uygulamalarının *Staphylococcus aureus'* a karşı antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi (%)

pH	Deneme Zaman (saat)	Antimikrobiyal aktivite (%)			
		0	6	18	24
	Kontrol	100	100	100	100
2	Nötralize	100	100	100	97
	Nötralize olmayan	119	124	131	106
3	Nötralize	100	100	100	100
	Nötralize olmayan	100	118	120	103
4	Nötralize	100	100	100	100
	Nötralize olmayan	97	106	97	97
5	Nötralize	100	100	97	94
	Nötralize olmayan	92	97	103	97
6	Nötralize	100	100	100	94
	Nötralize olmayan	92	100	103	100
7	Nötralize	92	100	100	97
	Nötralize olmayan	89	109	108	100
8	Nötralize	86	100	100	100
	Nötralize olmayan	86	109	94	103
9	Nötralize	86	100	89	100
	Nötralize olmayan	83	97	94	100
10	Nötralize	83	97	81	100
	Nötralize olmayan	78	91	86	97
11	Nötralize	78	94	86	100
	Nötralize olmayan	75	82	89	103

Çizelge 4.9. Farklı pH derece ve süre uygulamalarının *Enterococcus faecalis*' e karşı antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi (%)

pH	Deneme Zaman (saat)	Antimikrobiyal aktivite (%)			
		0	6	18	24
	Kontrol	100	100	100	100
2	Nötralize	100	100	100	100
	Nötralize olmayan	131	140	163	88
3	Nötralize	100	100	100	100
	Nötralize olmayan	119	129	154	94
4	Nötralize	100	100	100	100
	Nötralize olmayan	97	100	117	100
5	Nötralize	100	100	100	100
	Nötralize olmayan	97	97	106	103
6	Nötralize	100	100	100	100
	Nötralize olmayan	100	103	114	97
7	Nötralize	100	100	100	97
	Nötralize olmayan	103	111	114	94
8	Nötralize	100	100	100	100
	Nötralize olmayan	97	97	106	91
9	Nötralize	100	100	86	97
	Nötralize olmayan	94	91	86	94
10	Nötralize	91	89	86	94
	Nötralize olmayan	0	94	91	100
11	Nötralize	88	86	91	91
	Nötralize olmayan	0	89	94	100

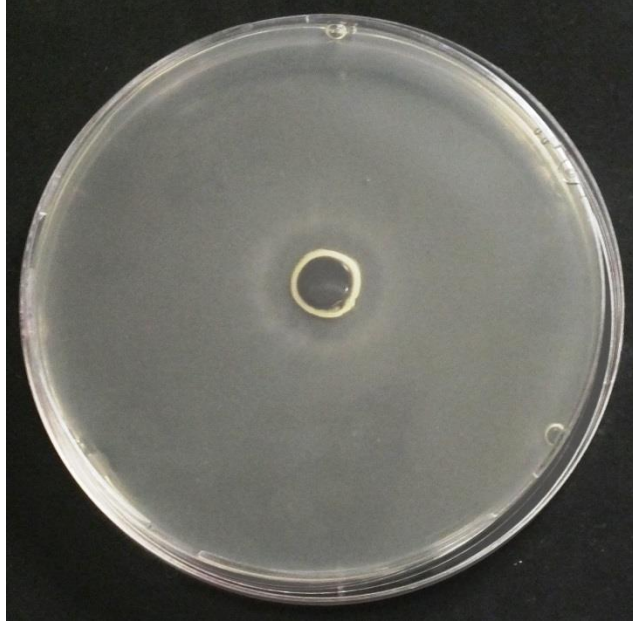
4.5.3. Proteolitik enzimlere direnç

Proteolitik enzimler ile muamele edilen süpernatant test organizmalarına karşı aktiviteleri denenmiş ve üretilen metabolit proteolitik enzimler ile aktivitesini yitirmiştir (Çizelge 4.10.). Süpernatantın sahip olduğu aktivitenin proteinaz K enzimine duyarlılığına ilişkin görsel veriler Şekil 4.4 - 4.6' da sunulmuştur. Bu sonuca dayanarak *Enterococcus faecium* 16-1 tarafından üretilen metabolitin protein karakterinde olduğu belirlenmiştir.

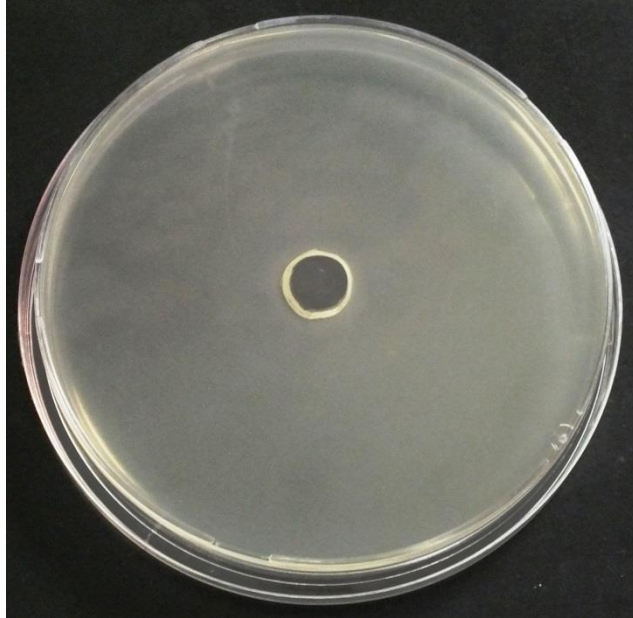
Laktik asit bakterileri, sütte bulunan ana protein kazeinin parçalanmasından gelişimini için zorunlu olan aminoasitleri sağlayabilmektedir.

Çizelge 4.10. Proteolitik enzimlerin BBM' nin antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkisi

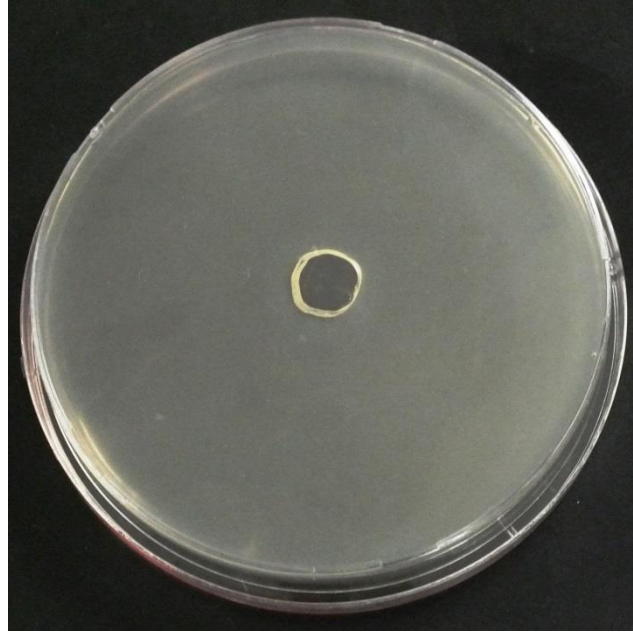
Enzimler (1 mg/ml)	Antimikrobiyal aktivite (%)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Süpernatant	100	100
Pepsin	98	96
Pepsin + tampon	0	0
Tripsin	94	100
Tripsin + tampon	0	0
α -Kemotripsin	0	0
α -Kemotripsin + tampon	0	0
Proteaz	0	0
Proteaz + tampon	0	0
Proteinaz K	0	0
Proteinaz K + tampon	0	0



Şekil 4.4. BBM' nin *E. faecalis*' e karşı aktivitesi



Şekil 4.5. Proteinaz K ile işlem görmüş BBM nin *E. faecalis*' e karşı aktivitesi



Şekil 4.6. Proteinaz K + tampon çözeltisinin *E. faecalis* ' e karşı aktivitesi

4.5.4. Organik çözücülere direnç

Enterococcus faecium 16-1 in sentezlediği BBM denemeye alınan organik çözücülerden etkilenmediği belirlenmiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. BBM'nin antimikrobiyal aktivitesi üzerine 25°C de 1 saat uygulanan organik çözücülerin etkisi (%)

Organik çözücüler / Konsantrasyonları	Antimikrobiyal aktivite (%)
Süpernatant	100
Kloroform (%10)	100
Propanol (%10)	100
Metanol (%10)	100
Etanol (%10)	100
Hekzan (%25)	100
Eter (%25)	100
Aseton (%10)	100

* Antimikrobiyal aktivite *S. aureus* ve *E. faecalis* test organizmaları ile belirlenmiştir

4.5.5. Bazı deterjanlara ve kimyasal maddeye direnç

BBM nin aktivitesi üzerine bazı deterjanlar ve kimyasal maddelerin etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12.).

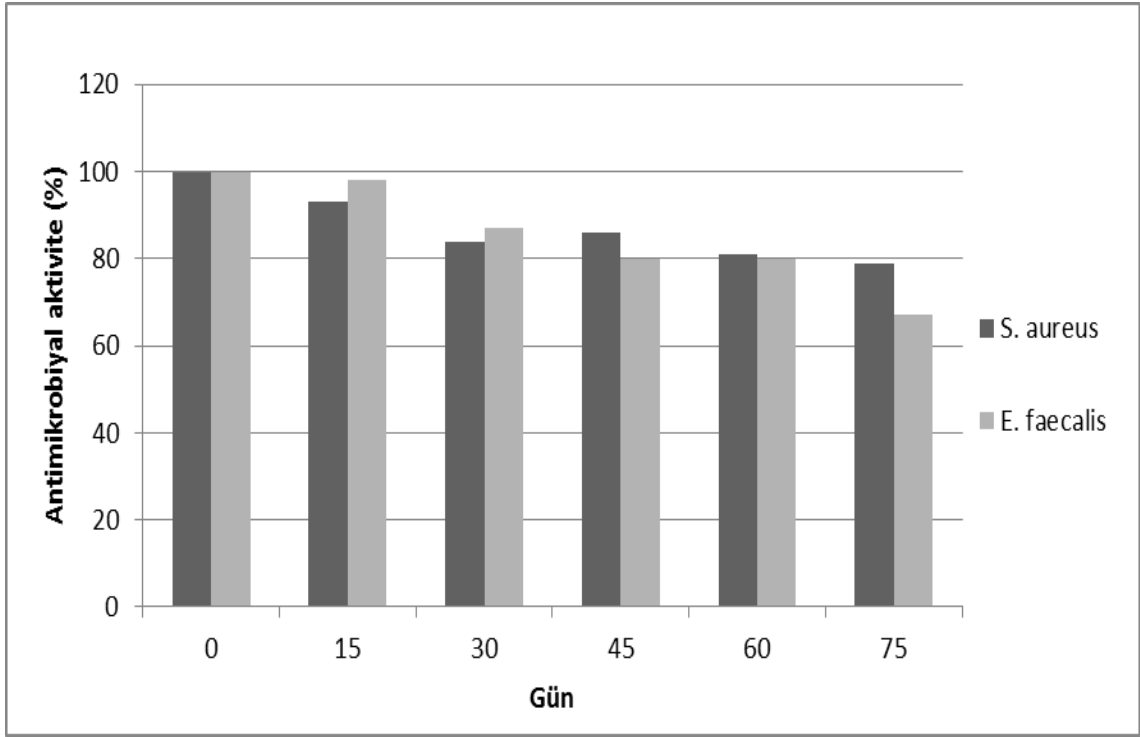
Çizelge 4.12. BBM'nin antimikrobiyal aktivitesi üzerine 37°C de 5 saat uygulanan deterjan ve kimyasal maddelerin etkisi (%)

Deterjanlar / Konsantrasyonları	Antimikrobiyal aktivite (%)
Süpernatant	100
SDS (%10)	100
Tween 80 (%10)	100
TritonX-100 (%10)	100
Üre (%10)	100
EDTA (%10)	100

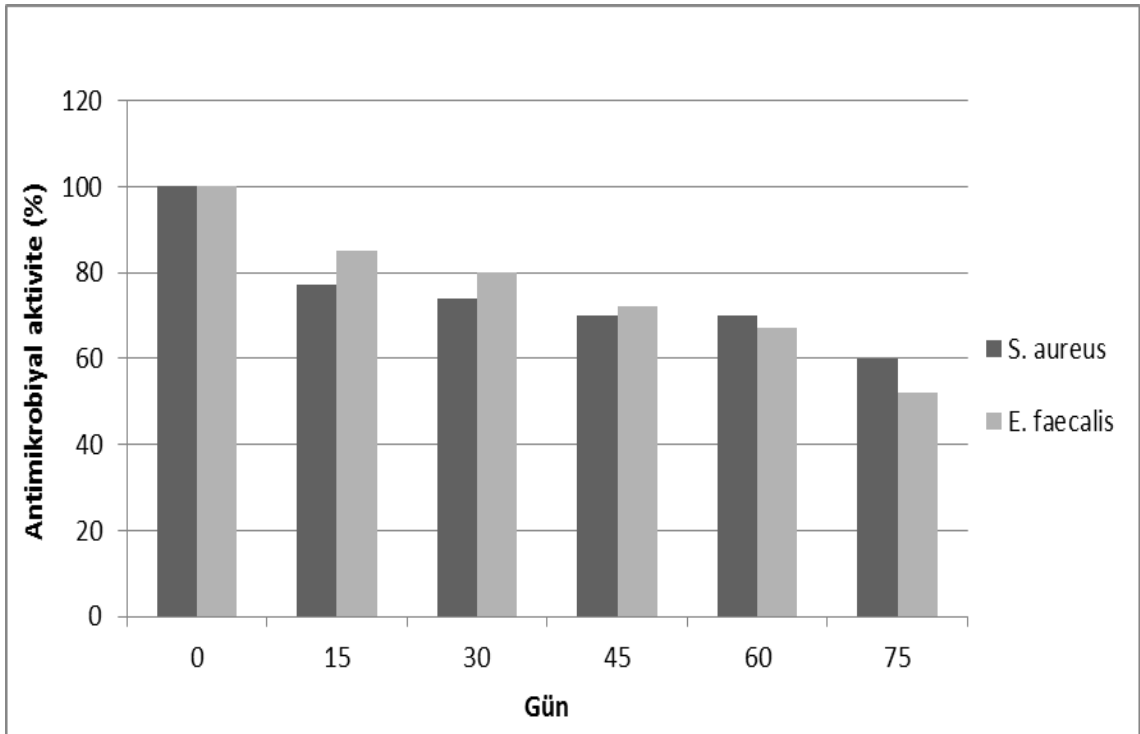
* Antimikrobiyal aktivite *S. aureus* ve *E. faecalis* test organizmaları ile belirlenmiştir.

4.6. Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Bakteriyosin Benzeri Maddenin Aktivitesine Etkisi

Bakteriyosinler gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır. *Enterococcus faecium* 16-1 in sentezlediği BBM nin de aynı amaçla kullanılabilmesi için yapılan çalışmada aktivitenin denemeye alınan sıcaklıklarda 2,5 ay süre devam ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.7.- 4.8.).



Şekil 4.7. BBM aktivitesinin 4 °C de depolama süresine bağlı değişimi



Şekil 4.8. BBM aktivitesinin 25 °C de depolama süresine bağlı değişimi

4.7. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Kısmi Saflaştırılması

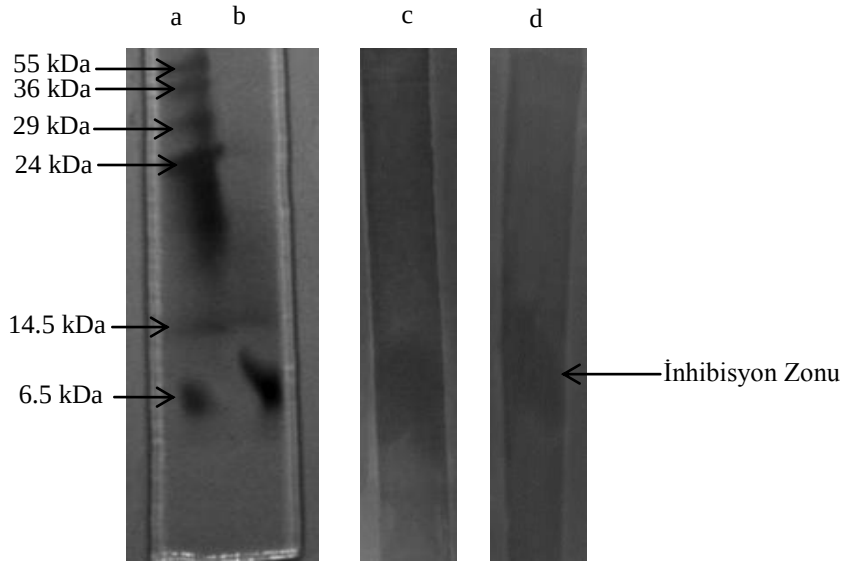
BBM nin kısmi olarak saflaştırılıp karakterize edilmesi amacı ile konsantre edilmiş ve konsantre süpernatant ve normal olarak hazırlanan süpernatantın karşılaştırılmıştır. Bradford yöntemi ile protein içerikleri belirlenmiş ve yüzde antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir (Çizelge 4.13.). Elde edilen konsantre BBM nin molekül büyüklüğü tayini çalışması yapılmıştır.

Çizelge 4.13. Konsantre BBM nin aktivitesi ve protein içeriği

Deneme grupları	Antimikrobiyal Aktivite (%)		Protein (mg / ml)
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	
Süpernatant	100	100	0,18
Konsantre kültür sıvısı	125	119,4	6,88

4.8. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Molekül Büyüklüğünün Tayini

BBM amonyum sülfat ile çöktürölüp diyaliz yapılmış sonra konsantre olarak elde edilen süpernatant SDS-Page elektroforezde yürütölmüştür. Yürütölen jellere uygulanan hızlı gümüş boyama ile hem marker hemde BBM nin bantları belirlenmiştir. Elde edilen bantların, BBM olduğunu teyit etmek için *S. aureus* ve *E. faecalis* test organizmalarına karşı denenmiş ve aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.9.).



- a. Moleküler ağırlığı dağılımı Sigma marker
- b. Amonyum sülfat ve diyaliz ile konsantre edilmiş örnek
- c. *S. aureus* test organizmasına karşı antimikrobiyal aktivite
- d. *E. faecalis* test organizmasına karşı antimikrobiyal aktivite

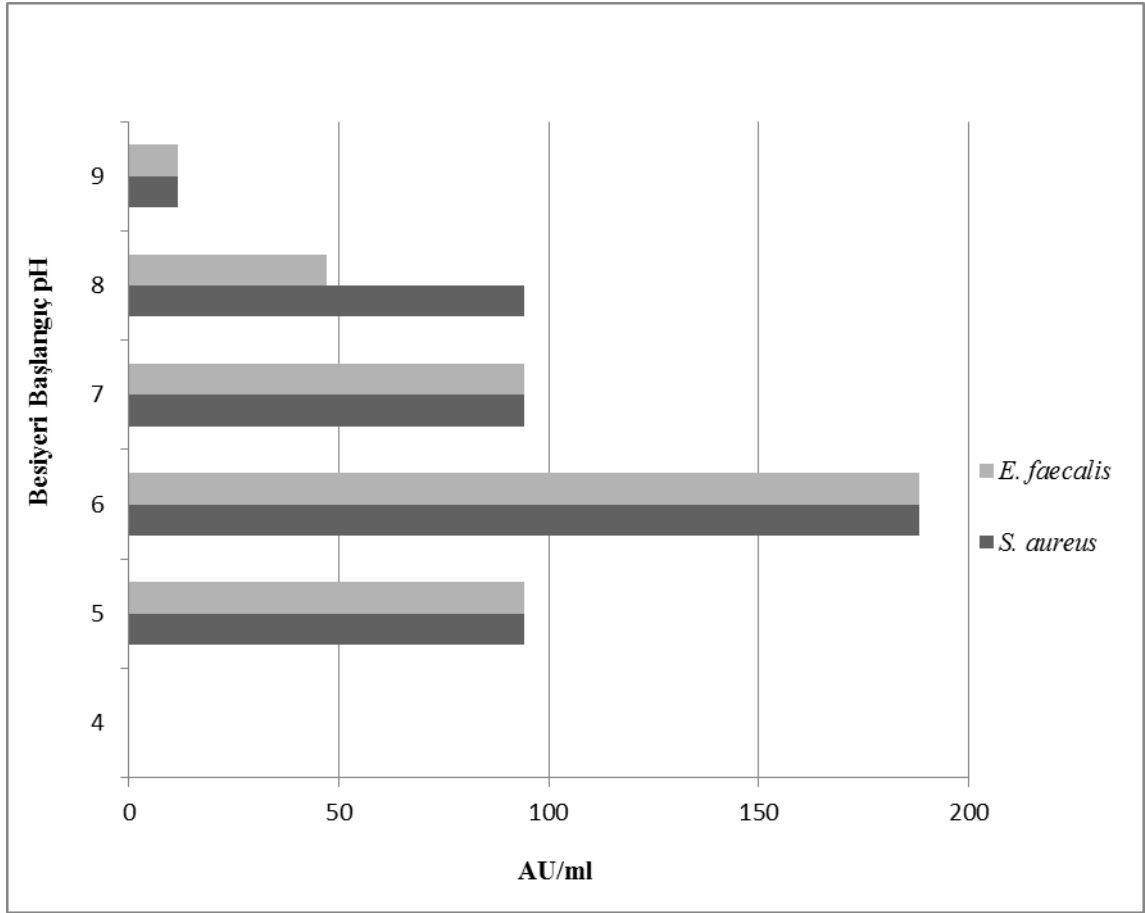
Şekil 4.9. BBM' nin molekül büyüklüğünün ve elde edilen bantaların aktivitesinin belirlenmesi

4.9. Bakteriyosin Benzeri Madde Üretiminin Optimize Edilmesi

Enterococcus faecium 16-1 izolatının BBM yi en verimli üretimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmalarında antimikrobiyal aktivite Arbitrary Unit (AU/ml) olarak hesaplanmıştır.

4.9.1. pH Tercihi

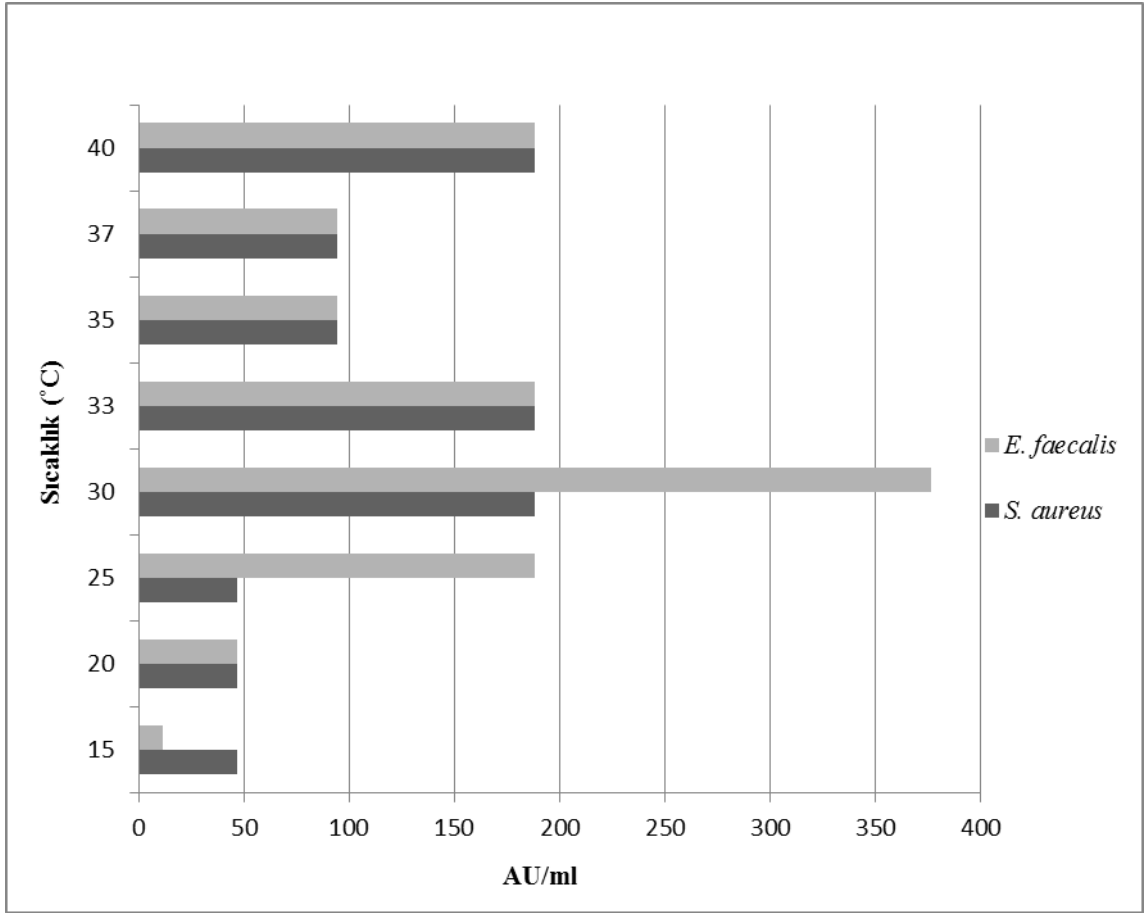
Bir zamanda bir faktör olarak çalışılan optimizasyon çalışmalarında denemeye alınan 6 farklı besiyeri başlangıç pH değerinden *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının pH 6 da BBM' yi en verimli ürettiği belirlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. *Enterococcus faecium*' un BBM üretiminde besiyeri pH tercihi

4.9.2. Sıcaklık Tercihi

Denemeye alınan 8 farklı sıcaklık değerinden, *Enterococcus faecium* izolatının BBM yi en verimli ürettiği inkübasyon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. *Enterococcus faecium*' un BBM üretiminde inkübasyon sıcaklığı tercihi

4.9.3. Karbon Kaynağı Tercihi

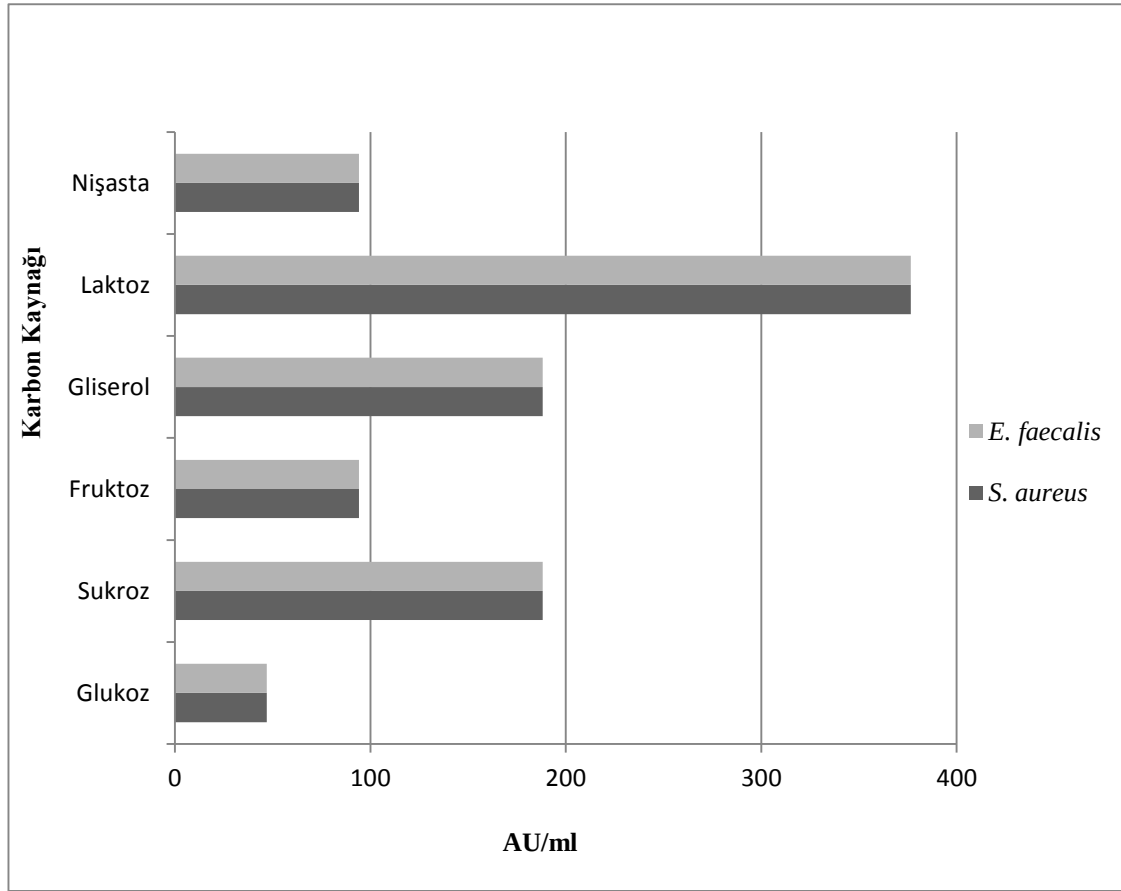
Bu aşamada öncelikle biolog test sisteminden alınan veriler değerlendirilmiştir. Denemeye alınan karbon kaynakları, biolog testinin sonucunda organizmanın normal ve sınır seviyede kullanabildiği karbon kaynakları (Glukoz, Sukroz, Fruktoz, Gliserol, Laktoz, Nişasta) belirlenerek çalışılmıştır (Şekil 4.12.). Denemeye alınan karbon kaynaklarından Laktoz lu besiyerinde BBM üretiminin optimum olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13.).

Well Color Values												
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	157	< 218	{ 189	< 218	{ 184	< 224	< 262	< 248	{ 206	< 226	< 231	< 240
B	154	{ 206	{ 198	{ 202	{ 210 -	{ 195	{ 209	< 240	{ 197	< 238	< 219	< 234
C	170	< 223	< 224	< 237	< 229	< 214	{ 211	< 217	< 235 -	{ 211	68	{ 144 +
D	{ 185	{ 190	{ 194	< 241	< 258	< 248	< 247	{ 212	{ 209 -	71	{ 217 -	68
E	138	{ 182	{ 189	{ 200	{ 208	< 215	159	{ 210	{ 209	73	{ 192 -	64
F	{ 175	{ 200	{ 184	< 233	{ 208	{ 192	{ 204	{ 194	{ 202	82	< 218	133
G	125	< 216	{ 202	{ 190	< 256	{ 207	{ 211	< 250	< 254	< 218	103 +	< 229
H	< 219 -	{ 198	{ 188	{ 208	< 242	< 242	< 231	< 231	{ 210	< 229	< 232	< 254

<x: pozitif, x: negatif, <x-: yalancı pozitif, x+: yalancı negatif, {x: sınır seviye

Şekil 4.12. *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının biyolog testi sonucu

Biyolog testi sonucunda *Enterococcus faecium* 16-1 izolatı Glukoz, Sukroz, Gliserol ve Fruktöz karbon kaynağını normal seviyede kullandığı, Nişasta ve Laktoz karbon kaynaklarını ise sınır seviyede kullandığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının kullanabildiği ve sınır seviyede kullandığı karbon kaynakları ile karbon kaynağı tercihi çalışılmıştır.



Şekil 4.13. *Enterococcus faecium*' un BBM üretiminde karbon kaynağı tercihi

Optimize çalışmaları ile *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının BBM üretimini en verimli gerçekleştirdiği koşullar belirlenmiş ve bundan sonra ki aşamada bu koşullar kullanılmıştır (Çizelge 4.14.).

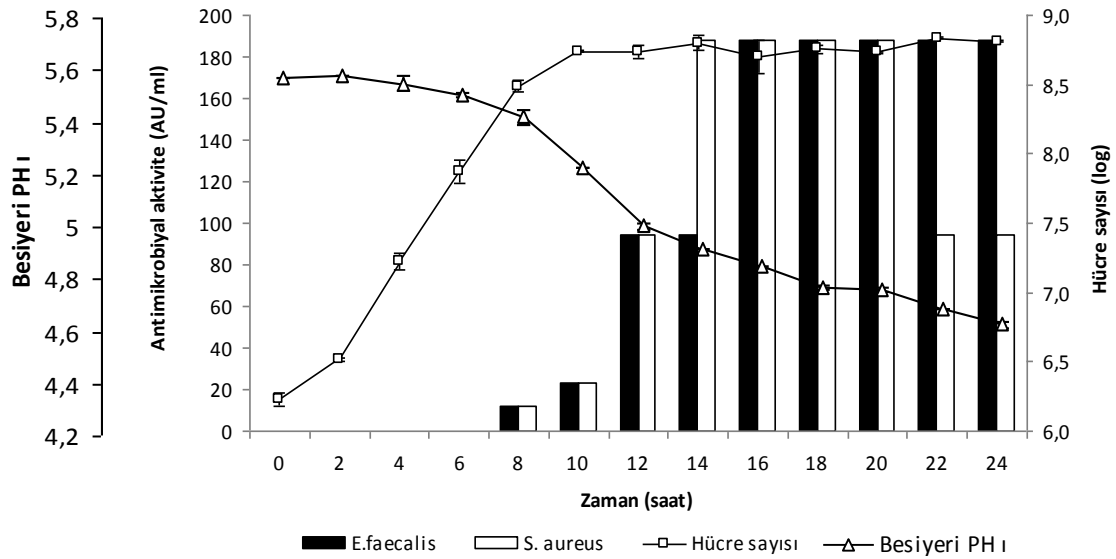
Çizelge 4.14. *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının BBM üretimi için optimum koşullar

Faktörler	Optimum koşullar	Antimikrobiyal aktivite (AU/ml)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
pH	6	188,24	188,24
Sıcaklık (°C)	30	188,24	376,47
Karbon kaynağı	Laktoz	376,47	376,47

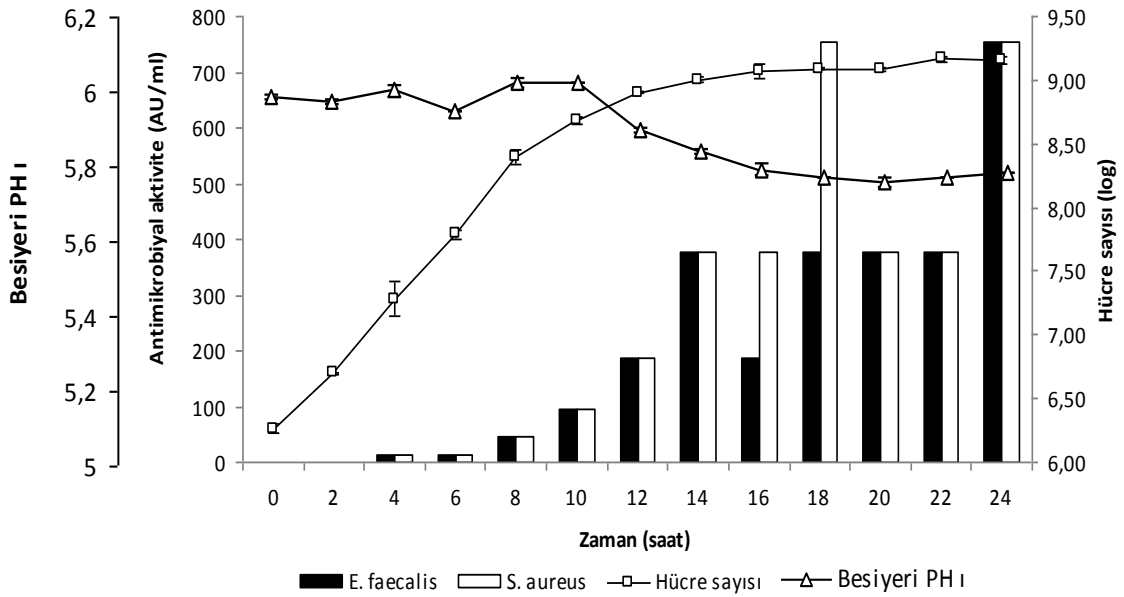
4.10. Derin Kültür Koşullarında Bakteriyosin Üretimi

4.10.1. Erlen ölçeğinde üretim

Enterococcus faecium 16-1 izolatının BBM üretiminin erlen ölçeğinde üretiminde optimize olmayan (MRS broth) ve optimize (Çizelge 4.14.) olan besiyerleri kullanılmıştır. İzolatın bu besiyerlerinde zamana bağlı büyüme özellikleri ve antimikrobiyal aktiviteleri Şekil 4.14. ve 4.15. te sunulmuştur.



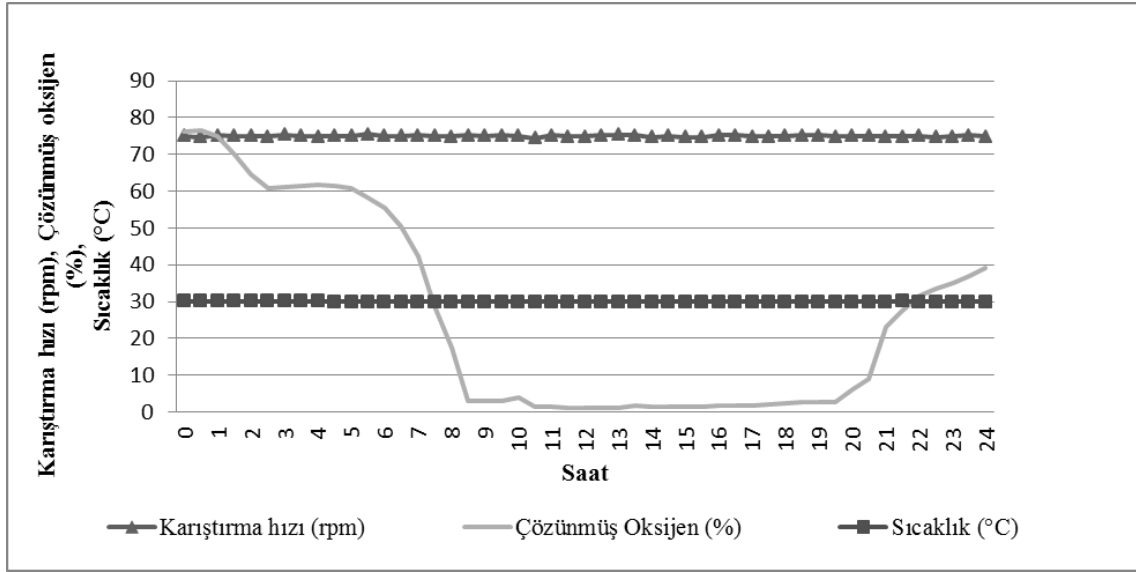
Şekil 4.14. *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının optimize olmayan besiyerinde erlen ölçeğinde zamana bağlı büyüme özellikleri ve antimikrobiyal aktivitesi



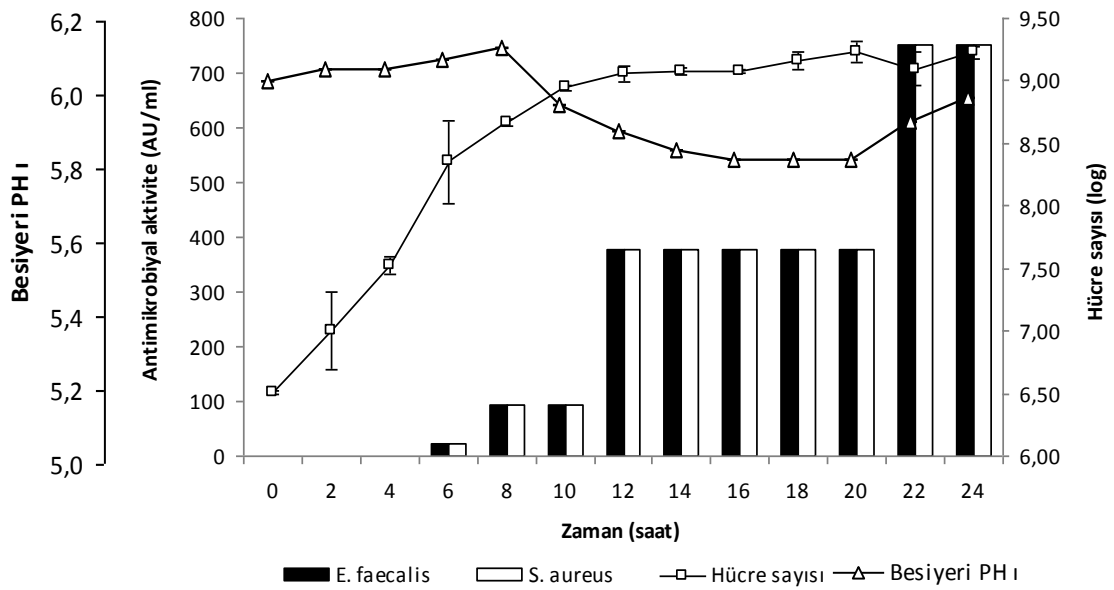
Şekil 4.15. *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının optimize besiyerinde erlen ölçeğinde zamana bağlı büyüme özellikleri ve antimikrobiyal aktivitesi

4.10.2. Karıştırmalı Tank Reaktör (Stirred Tank Reactor-STR) ölçeğinde üretim

Enterococcus faecium 16-1 izolatının BBM üretiminin erlen ölçeğinde yapılan çalışmalara paralel olarak optimize koşullar için ölçek büyütürerek reaktör ölçeğinde araştırılmıştır. Karıştırmalı Tank Reaktör (KTR) çalışmasında fermentörden elde edilen sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karıştırma hızı verileri büyümenin gerçekleşmesine olanak sağlayacak biçimde stabil ve uygun olarak gerçekleştiğini onaylamaktadır (Şekil 4.16.). Yapılan çalışmada alınan sonuçlar bakteri büyümesi ile reaktör verileri ve aktivite sonuçlarının paralel gittiği ve ölçek büyütme çalışmasının başarılı biçimde gerçekleştirildiği görülmüştür. (Şekil 4.17.).



Şekil 4.16. Optimize Reaktörün zamana bağlı çalışma verileri



Şekil 4.17. Enterococcus faecium 16-1 izolatının optimize besiyerinde reaktör ölçeğinde zamana bağlı büyüme özellikleri ve antimikrobiyal aktivitesi

Optimize edilmemiş ve edilmiş koşullarda erlen ölçeğinde ve optimize edilmiş koşullarda KTR ölçeğinde gerçekleştirilen çalışmalarda organizmanın spesifik büyüme hızı değerleri sırası ile 0,68, 0,65 ve 0,78 olarak belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Çeşitli Yırtıcı Kuşların Sindirim Yolunda Kolonize Olan Laktik Asit Bakteri Suşlarının İzolasyonu

Çalışmanın bu aşamasında yırtıcı kuşların ağız boşluğu, kloak ve dışkı örneklerinden izole edilen LAB' nin yeni ve etkili bakteriyosin üretimi için araştırılmıştır. İzolasyonu yapılan 45 adet muhtemel LAB nin geleneksel yöntemler kullanılarak özellikleri belirlenerek Gram pozitif, katalaz negatif ve endospor oluşturmayan 5 adet muhtemel LAB si elde edilmiş ve elde edilen izolatların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

Bu çalışma; bugüne kadar birçok çalışmacıya konu olmuş bakteriyosin üretimi, LAB' nin izolasyon kaynağı açısından diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir.

Günümüze dek gerçekleştirilen çalışmalarda LAB izolasyonu amacı ile peynir çeşitleri (beyaz ve tulum peyniri) (Karagül, 2010;), boza (Asutay, 2007; Koral, 2011), insan (Pascual et al., 2008; Uymaz, 2009), süt (Özkalp, 2006) gibi kaynaklar kullanılmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmaların baskın çoğunlukla süt, boza, tulum peyniri, beyaz peynir gibi kaynaklara yönelindiği görülmektedir. Bunun yanı sıra az sayıda kanatlı hayvan kökenli çalışmaya karşın yırtıcı kuşların izolasyon kaynağı olarak değerlendirildiği çalışmalar sınırlı sayıdadır (Winsor et al., 1981; Kocijan et al., 2009; Carvalho et al., 2003).

Daha önceden LAB izolasyon ilgili yapılmış çalışmalarda; kümes hayvanlarının dışkılarından 45 adet LAB izole edilmiş ve yapılan testler sonucu *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinse ait bakteriler olduğu belirlenmiştir. İzolasyonu yapılan *Lactobacillus reuteri* bakterisinin sadece anti-*Campylobacter* aktivitesi belirlenmiştir (Nazef et al., 2008). Yapılan diğer bir çalışmada ise bıldırcınların sindirim sisteminden

LAB izolasyonu yapılmış ve bunların antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir (Afdora et al., 2010).

Bu çalışmada ise BBM üretimi için izolasyonu yapılan bakteriler çeşitli testlerden geçirilmiş ve morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olarak muhtemel LAB olan suşlar çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmıştır.

5.2. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Potansiyelinin Belirlenmesi

Delice yırtıcı kuşundan izolasyonu yapılan ve özellikleri belirlenen 5 adet muhtemel LAB izolatının öncelikle agar sandviç ve agar kuyu yöntemleri ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

Muhtemel LAB' lerin antimikrobiyal aktivitesinin BBM' lerden kaynaklandığının onaylanması için yapılan çalışmada süpernatanın pH' ı 6.5' a ayarlanmış ve katalaz enzimi ile muamele edildikten sonra aktivitesi belirlenmiştir.

5.2.1. Agar sandviç yöntemi

Agar sandviç yönteminde, muhtemel LAB leri Çizelge 3.3' te belirtilen test bakterilerine karşı aktivitesi denenmiştir. Elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.1.) LAB ların aktivite açısından patojen suşlara karşı ve yakın akraba türlere karşı oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir. Oldukça geniş spektrumlu antibakteriyal aktiviteye sahip olmasının yanı sıra *E.coli* O157 ve antibiyotik dirençli MRSA ve VRE gibi bakterilere yüksek etkiye sahip olması, *Enterococcus faecium* 16-1 izolatı tarafından üretilen BBM nin yüksek potansiyelini ifade eden önemli verilerdir.

5.2.2. Agar kuyu yöntemi

Muhtemel LAB lerinin süpernatantları ile çalışılan bu yöntemde test bakterilerine karşı aktiviteleri belirlenmiştir. İzole edilen 5 adet muhtemel LAB nin agar kuyu yönteminde aynı test bakterilerine karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu bakterilerin aynı kuştan izole edilmeleri ve klasik identifikasyon testlerinden benzer sonuçlar sunmaları nedenleri ile izolasyonu yapılan bakterilerin aynı türe ait oldukları kanısına varılmıştır. Bu nedenle çalışmanın diğer aşamalarında sadece bir bakteri izolatu ile devam edilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteler ise agar sandviç ve agar kuyu yöntemlerinde en yüksek duyarlılık gösteren test bakterileri ile belirlenmiştir.

Agar kuyu yöntemi ile elde edilen inhibisyon zon çaplarının agar sandviç yöntemi ile elde edilenlerden daha düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca agar sandviç yöntemi ile inhibisyon elde edilen bazı test bakterilerine karşı agar kuyu yöntemi ile inhibisyon zonu elde edilememiştir. Bu durum agar kuyu yönteminin aktif maddelerin difüzyonunu zorlaştıran uygulamasından kaynaklandığı ve bu nedenle az miktarda üretilen ya da zayıf antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolitlerin belirlenmesi amacı ile uygun olmadığı düşünülmektedir. Yine de agar kuyu yöntemi ile elde edilen veriler de *Enterococcus faecium* 16-1 izolatu tarafından üretilen BBM nin yüksek potansiyelini doğrulamaktadır.

5.2.3. LAB İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Onaylanması

Denemeye alınan test bakterileri gelişiminin BBM maddeler tarafından inhibe edildiğinin onaylanması gerekmektedir. Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktiviteleri aktif protein molekülünden ileri gelmektedir. Ancak LAB antimikrobiyal aktivite gösteren sentezlediği farklı metabolitler (organik asit, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, reuterin) de sentezleyebilmektedir. Bu etkenleri elimine etmek amacı ile yapılan çalışmada, LAB izolatları tarafından organik asit üretiminin antimikrobiyal aktiviteye katkısını belirlemek için süpernatanın pH 6,5 ye ayarlanmıştır. Ayrıca büyüme ortamındaki hidrojen peroksit' in aktiviteye katkısını sorgulamak için süpernatant katalaz enzimi ile muamele edilmiştir. Yapılan antimikrobiyal aktivite

çalışmasında pH 6,5' a ayarlanan ve katalaz enzimi ile muamele edilen kültür sıvısının aktivitesinin işlem görmemiş kültür sıvısı ile aynı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3.). Bu sonuç test bakterilerinin gelişiminin, LAB nin sentezlediği BBM nin antimikrobiyal aktivitesi ile engellendiğini vurgulamaktadır.

5.3. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten LAB İzolatlarının Karakterizasyonu ve Tanılanması

5.3.1. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten LAB İzolatlarının Virulans Faktörlerinin Belirlenmesi

Elde edilecek olan BBM nin gıda koruyucu olarak kullanılması amaçlandığı için, BBM üretici bakterinin virulent bir bakteri olmaması beklenmektedir. Bu nedenle BBM üreten LAB izolatları öncelikle hemolitik aktivite, koagülaz, jelatinaz ve DNAaz enzim üretimi gibi virulans faktörleri açısından araştırılmıştır. Sonuç olarak Delice kuşundan izole edilen 5 adet muhtemel LAB nin virulent özellikte olmadığı belirlenmiştir. Bu durum, elde edilen izolatlar ile BBM üretimi konusundaki çalışmalara olanak sağladığı gibi izolatların probiyotik özelliklerinin araştırılması için de ümit verici görülmektedir.

5.3.2. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Tanılanması

İzolasyonu yapılan bakteriler geleneksel morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler ve moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır. Geleneksel yöntemlere göre yapılan çalışmalarda LAB lerin gram boyamaları, mikroskopik görüntülenmesi yapılmıştır. İzolatların gram pozitif ve kok morfolojisinde olduğu belirlenmiştir. Gram reaksiyonları belirlenen izolatlara katalaz testi yapılmış, hidrojen peroksit ile muamele edilen bakterilerin katalaz negatif olduğu belirlenmiştir. Daha sonraki aşamalarda karakterizasyon ve tanımlama testlerinden alınan başarılı sonuçlara bakılarak,

antimikrobiyal aktivite sonuçlarından alınan benzer sonuçlar tek bir bakteri ile devam edilmesi konusunda fikir vermiştir. Bundan sonraki aşamalara da Delice kuşundan izole edilen 5 adet bakteriden bir tanesi ile (16-1 kodlu izolat), antimikrobiyal aktiviteler için test organizması olarak ise *S. aureus* ve *E. faecalis* ile devam edilmiştir.

Bakteriler biyokimyasal yöntemler ile cins seviyesinde tanımlanmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda; TTC ve nişasta testleri negatif; tellurite, sorbitol, pozitif olarak belirlenmiş, arjininden amonyak oluşumu, kazein hidrolizi, EPS ve Voges Proskauer aktivitesinin olduğu saptanmıştır. Bakterinin %4 ve 6,5 NaCl konsantrasyonlarında gelişebildiği fakat %18,5 NaCl konsantrasyonunda gelişemediği belirlenmiştir. Ayrıca bakterinin %0,1 konsantrasyonunda metilen mavili sütte gelişebildiği, %0,3 konsantrasyonunda gelişemediği belirlenmiştir. Litmus katılmış sütte gelişen bakterinin gelişirken laktozu ayrıştırmış ve sütle laktozun ayrışması sonucu asit meydana gelmesi, litmus'un renginin pembeleşmesine ve aynı zamanda süütün pıhtılaşmasına neden olmuştur. Bakterinin pH gelişme aralığını belirlemek amacı ile pH 1, pH 2 ve pH 3 te 2, 4 ve 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu pH 1 ve 2 de 2. saat ten sonra bakterinin gelişmediği görülmüştür. pH 3 te ise 4. saatte de gelişimini devam ettirdiği ancak 6. saatte gelişmediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda bakterinin *Enterococcus* olduğu belirlenmiştir.

Bu aşamalardan sonra bakteri moleküler düzeyde tanımlanma çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda DNA dizi analizi yapılmış elde edilen sonuçlar, NCBI BLAST DNA data bankası kullanılarak karşılaştırılmıştır. İzolasyonu yapılan bakterinin JX437938.1 numara ile kaydedilmiş *Enterococcus faecium* suşuna ileri ve geri okumalar ile benzerlik seviyesinin % 100 olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak geleneksel testler ile moleküler çalışmaların sonuçları birbirini doğrulamıştır. Bu nedenle 16-1 kodlu izolatımızın *Enterococcus faecium* türüne ait olduğu belirlenmiştir.

5.4. *Enterococcus faecium* 16-1 İzolatının Gelişme Fazının BBM Üretimine Etkisi

Enterococcus faecium 16-1 izolatının BBM üretiminin hangi fazında en verimli ürettiği araştırılmıştır. Bu çalışmada izolatın gelişme fazının 18. saatinde bakteriyosini maksimum seviyede ürettiği belirlenmiştir. Çalışılan test bakterilerinin sonuçlarında benzerlik göstermiştir. 18. saatten sonra aktivite canlı hücre sayısına bağlı olarak sabit kalmış ve/veya düşüş yaşanmıştır. Bundan sonra ki çalışmalarda inkübasyon süresi olarak 18. saat çalışılmıştır.

5.5. Antimikrobiyal Aktiviteden Sorumlu Maddenin Karakterizasyonu

Bu aşamada geleneksel ve moleküler olarak tanımlanan *Enterococcus faecium* 16-1' in sentezlediği ve antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolitin BBM olduğunun onaylanması çalışılmıştır. Çalışmalar birbirinden bağımsız ve çok paralelli olarak çalışılmıştır.

5.5.1. Isıl stabilite

Bakteriyosinler yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilme yeteneğindedir. Yapılan stabilite çalışmasında *Enterococcus faecium* 16-1 suşunun sentezlediği BBM' nin 15 dk bekleme süresinde 100 °C ye kadar stabil kaldığı belirlenmiştir.

Yapılan diğer çalışmada ise aynı sıcaklıklar kullanılmış ve bekleme süre 30 dk ya çıkarılmıştır. 30 dk lık bekleme süresinde 45 ve 60 °C de stabil kaldığı, ancak 90, 100 ve 121 °C de aktivitesini yitirildiği belirlenmiştir. BBM nin yüksek sıcaklıklarda dahi stabil kalması yapısında ikincil ve üçüncül yapıların olmadığını göstermektedir. Bu sonuçta BBM nin daha çok globüler yapıda olduğunu göstermektedir.

Bakteriyosin H-559 (*L. lactis* spp. *lactis* H-559)'nin 100°C'de 10 dk uygulanan ısı işleme karşı aktivitesini koruduğu, ancak 121°C'de 20 dk'da aktivitesini büyük oranda kaybettiği (Lee et al., 1999), Laktis B14 (*L. lactis* subsp. *lactis* B14)'ün ısı

işleme duyarlı olduğu, 80°C’de 10 dk uygulanan ısıt işleminde kısmen, 100°C’de 10 dk’da tamamen inaktif (Ivanova et al., 2000) ve garviesin L1-5 (*L. garvica*)’in 100°C’de 15 dk uygulanan ısıt işleminde aktivitesinin %75’ini, 121°C’de 15 dk ise aktivitesinin tamamını kaybettiği belirlenmiştir (Villani et al., 2001).

5.5.2. pH stabilitesi

Bakteriyosinler ısıt stabilitede olduğu gibi geniş pH aralığında stabil kalma yeteneğine sahiptir. Tanımlamasını yaptığımız *Enterococcus faecium* 16-1 suşunun sentezlediği BBM’ nin pH 2-11 arasında zamana bağlı stabil kaldığı belirlenmiştir. Bazı aktivitelerin pH a bağlı yüksek olduğu görülmüş olsa bile nötralize edilmiş süpernatantlar ile aktivitenin pH tan kaynaklanmadığı belirlenmiştir. Aktivitelerin yüzde olarak hesaplandığı çalışmada zamana bağlı aktivitede düşüş yaşanmış olsa da 24. saatin sonunda da BBM nin aktivitesinin bütün pH larda devam ettiği belirlenmiştir.

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* Bn1 (Bt-Bn1) izolatından elde edilen bakteriyosinin pH 6-8 arasında stabil kaldığı asidik ve bazik değerlerde aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Ugras, et al., 2013). Bozadan izole edilen *L. lactis* spp. *lactis* suşunun ürettiği bakteriyosinin pH 2-9 arasında asidik ve nötral pH’ lara karşı aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar gösteriyorki *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının ürettiği BBM’ nin zamana bağlı pH’ a karşı daha dayanıklı olduğu anlaşılmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* B14’in ürettiği laktis B14’ün pH 3,0-10,0 aralığında *Enterococcus faecium* 16-1 izolatı gibi aktivitesini yitirmediği belirlenmiştir (Ivanova et al., 2000).

5.5.3. Proteolitik enzimlere direnç

Bakteriyosinlerin proteolitik aktiviteleri ise tek bir ana protein yapıdan kaynaklanmaktadır. Bu protein yapısı denemeye alınan proteolitik enzimlerle parçalandığı takdirde aktivitesini yitirmektedir. Ancak bütün proteolitik enzimler aynı

etkiyi göstermektedir. Bunun nedeni ise aktivitenin LAB nini sentezlediği başka metabolitten kaynaklanabileceğini göstermektedir (Koral, 2011; Özkalp, 2006).

BBM' nin protein yapısında olduğunun onaylanması açısından yapılan çalışmada süpernatant proteolitik enzimler; Pepsin, Tripsin, α -Kemotripsin, Proteaz ve Proteinaz K ile muamele edilmiştir. Çalışmada kontrol olarak enzim katılmamış süpernatant kullanılmış ve aktiviteleri %100 olarak belirlenmiştir. Diğer bir kontrol grubu olarak enzim + tampon çözeltisi kullanılmıştır ve bu gruplarda aktivite olmadığı belirlenmiştir. Böylece aktivite belirlenen örneklerde aktivitenin tampon ya da enzim kökenli olmadığı anlaşılmıştır.

İnkübasyon sonrası aktiviteleri denenmiş ve Pepsin ve Tripsin dışındaki enzimler ile işlem gören süpernatantlarda aktivite olmadığı belirlenmiştir. Aktivite gözlenen enzimlerde ise test bakterilerine göre farklılık göstermektedir. *S. aureus* e karşı Pepsin ile muamele sonrası %98, Tripsin ile muamele sonrası %94 aktivite gösterirken, *E. faecalis* e karşı Pepsin ile muamele sonrası %96, Tripsin ile muamele sonrası %100 aktivite göstermiştir. Bu durum BBM' nin pepsin ve tripsin enzimlerine dirençli olduğunu göstermektedir. Bakteriyosinler insan sindirim sistemindeki protezlarla indirgenmesine karşı bazı enzimlere karşı direnç gösterebilmektedirler.

Leuconostoc mesenteroides E131 suşunun ürettiği bakteriyosin tripsin, α -kemotripsin, α -amilaz, proteaz, proteinaz K ve pepsin enzimleri ile 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesini kaybetmiş ancak lipaz enzimi ile muamele edilen bakteriyosin 4 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin yitirmiştir. Renin enzimi ile yapılan çalışmada ise 24 saatlik inkübasyon sonucunda aktivitenin kaybolduğu belirlenmiştir (Xiraphi, et al., 2008).

BBM' nin papain, tripsin, α -kemotripsin ve pronaz enzimleri ile muamele edilmesi sonucu aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir. Pepsin uygulaması sonrasında ise aktivitenin % 74,15'inin korunduğu gözlenmiştir (Köseoğlu, 2007).

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* Bn1 (Bt-Bn1) izolatı ile yapılan çalışmada da Proteinaz K enzimli ile muamele bakteriyosinin 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesini yitirdiği belirlenmiştir (Uğras, et al., 2013).

Proteolitik enzimlere direnç çalışmalarında çalışılan proteine ve enzime göre aktiviteler inaktif olmuş ya da daha uzun inkübasyon süre sonunda aktivitesinin

kaybetmiştir. Literatürde rastlanılan çoğu çalışmada denemeye alınan proteolitik enzimlerin en az birine direnç gösterebildiği de belirlenmiştir.

5.5.4. Organik çözücülere direnç

Denemeye alınan 7 adet organik çözücü ile muamele edilen süpernatanın aktivitesinin değişmediği belirlenmiştir. BBM' nin organik çözücülerden etkilenmemesi inhibitör aktivitesinden sorumlu olan bölgede karbonhidrat ya da lipit türevli bileşenlerin olmadığını göstermektedir (Asutay, 2007).

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* Bn1 (Bt-Bn1) izolatından elde edilen bakteriyosinin aktivitesinin denemeye alınan organik çözücülerden etkilenmediği belirlenmiştir (Ugras, et al., 2013). Aynı şekilde Laktokoksin BO'nun aktivitesinin de organik çözücülerden etkilenmediği belirlenmiştir (Asutay, 2007). Daha önce yapılan çoğu çalışmada da bakteriyosinlerin organik çözücülere karşı dayanıklı olduğu bulunmuştur (Yildirim and Johnson, 1998).

5.5.5. Bazı deterjanlara ve kimyasal maddeye direnç

BBM nin denemeye alınan deterjan ve kimyasal maddelere karşı aktivitesinin yitirmediği belirlenmiştir. Anyonik deterjanlar, hidrofobik yapıya sahip proteinlerle birleşerek 3 boyutlu yapısının bozulmasını sağlamaktadır. Bu şekilde de protein yapısındaki bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitelerini etkilemektedir. BBM nin aktivitesinde bir kayıp meydana gelmesi, kısmi denatürasyonu ya da aktivitesi üzerinde etkisi olan diğer moleküllerle birlikteliğinin bozulmasından kaynaklanmaktadır (Ivanova et al., 2000). EDTA, BBM nin aktivitesinde rol oynayan divalent katyonlarla kompleks oluşturarak bakteriyosin aktivitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Aynı zamanda hücre membranına zarar vererek bakteriyosinin etkisini kolaylaştırabilmektedir.

Yapılan çalışmada BBM nin protein yapısının etkilenmediği ve antimikrobiyal aktivitesinin değişmediği belirlenmiştir. Günümüze kadar yapılan bazı çalışmalarda ise;

pediosin ST18, laktisin B14 ve laktokoksin R' nin Tween-20, SDS, β -merkaptotanol, Tween-80, Üre, Triton X-100 ve EDTA ile muamele edildikten sonra aktivitelerinde herhangi bir kayıp olmadığı ortaya konmuştur (Yildirim and Johnson, 1998; Ivanova et al., 2000).

5.6. Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Bakteriyosin Benzeri Maddenin Aktivitesine Etkisi

Bakteriyosinler günümüzde de ticari olarak satılan ve hali hazırda gıdalarda kimyasallara en güçlü alternatif koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bu açıdan, çalışmada elde edilen BBM nin hem kimyasal koruyuculara alternatif hem de kullanılmakta olan bakteriyosinlere karşı rekabet edebilmesi gerekmektedir.

Çalışmada iki farklı depolama sıcaklığının BBM nin zamana bağlı antimikrobiyal aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada liyofilize edilmiş kuru süpernatantlar 4 – 25 °C de 75 gün boyunca saklanmıştır. Bu süre içerisinde 0. günden başlanarak 15 gün aralıklarla öreklemeler yapılmıştır. Alınan örnekler *S. aureus* ve *E. faecalis* test organizmalarına karşı aktivitesi belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında 4 °C de muhafaza edilen liyofilize süpernatant örnekleri, 25 °C de muhafaza edilen örneklerle göre aktivitesini daha fazla korumuştur. Aktivite belirlemek amacı ile çalışılan test organizmalarında ise depolama sıcaklıklarına bağlı olarak *E. faecalis*' e göre *S. aureus* ta aktivitesini genellikle daha fazla gösterebildiği belirlenmiştir.

Çalışmadan alınan sonuçlar doğrultusunda *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının ürettiği BBM nin liyofilize şekilde 4 °C de saklanması depolama ömrü açısından daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

Laktisin B14'ün sıvı formda 4 °C'de muhafaza edildiğinde 2 aydan, dondurulmuş formda muhafaza edildiğinde ise 6 aydan daha fazla süre aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir (Ivanova et al., 2000), laktokoksin R (Yildirim and Johnson, 1998) liyofilizasyon işleminden etkilenmediği ve düşük derecelerde depolama koşullarında (-20 ve -80 °C) aktivitesini uzun süre muhafaza ettiği belirtilmektedir.

5.7. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Kısmi Saflaştırılması

Enterococcus faecium 16-1 izolatının ürettiği BBM nin kısmi olarak saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış tuzların uzaklaştırılması amacı ile de diyaliz yapılmış ve konsantre bir süpernatant elde edilmiştir. BBM madde %80 oranında bir kez çöktürme ile doygunluğa ulaşmıştır. Konsantre edildikten sonra antimikrobiyal aktivitesi denenmiş ve test bakterilerine karşı normal olarak hazırlanan süpernatandan daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Konsantre süpernatanın kontrol ile karşılaştırılmasında içerdiği protein miktarının da daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Leuconostoc mesenteroides E131 izolatında elde edilen süpernatant % 50 amonyum sülfat ile çöktürülmüş, bir gece diyalize bırakılmış ve elde edilen konsantre süpernatant kolondan (Resource RPC kolon (iç çapı, 6,4 mm; uzunluğu, 10 mm)) geçirilerek saflaştırılmıştır (Xiraphi, et al., 2008).

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* Bn1 (Bt-Bn1) izolatından elde edilen bakteriyosinin % 50 amonyum sülfat çöktürmesi ile konsantre edilmiş ve 2560 AU/ml aktivite belirlenmiştir. Konsantre süpernatanın içerdiği protein içeriği 0,716 mg/ml, total protein içeriği ise 17,9 mg/ml olarak belirlenmiştir (Ugras, et al., 2013).

5.8. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Molekül Büyüklüğünün Tayini

Konsantre edilen BBM nin molekül ağırlığının belirlenmesi amacı ile SDS-PAGE elektroforezde yürütülmüştür. Yürütülen jeller aktivite için ve bantların görülmesi için iki gruba ayrılmıştır. Aktivite çalışması yapılacak olan jeller öncelikle aktiviteye etkisinin olmaması açısından TritonX-100 ile yıkanmış ve SDS uzaklaştırılmıştır. Yıkanan jellerin aktivitesi belirlenmiş ve SDS-PAGE de yürütülen örneğin *Enterococcus faecium* 16-1 in ürettiği BBM olduğu onaylanmıştır. Marker ile yürütülen jeller ise bant almak için hızlı gümüş boyama tekniği ile boyanmış, marker da ve markerın karşılında BBM nin de bantları belirlenmiştir.

Jelde belirlenen bantlar ile aktivite elde edilen zonların jelde bölgeleri karşılaştırıldığında proteinin aynı RF değerinde sonuç verdiği belirlenmiştir. Aktivite

çalışmanın diğer aşamalarında olduğu gibi *S. aureus* ve *E. faecalis* e karşı denemiştir. Kullanılan her iki test organizmasında da aynı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında elektroforezde yürüttüğümüz BBM nin protein yapısında olduğu doğrulanmış ve bu proteinin *Enterococcus faecium* 16-1 in ürettiği BBM nin olduğu aktiviteler ile onaylanmıştır.

Enterococcus faecium 16-1 in ürettiği BBM nin SDS-PAGE elektroforezde yürütülmesi ile marker ın karşılığında tek bantlar elde edilmiştir. Bu sonuca dayanarak BBM nin, bakteriyosin grupları içinde iki protein yapısına sahip bakteriyosinlerden olmadığı belirlenmiştir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda; boza izolatı *L. lactis* subsp. *lactis* B14'in ürettiği laktis B14'ün molekül ağırlığının SDS-PAGE ile 5000, aminoasit dizisi analizi ile 6000 Da (Ivanova et al., 2000), *L. lactis* NK 24 tarafından sentezlenen laktisin NK'nın molekül ağırlığının 3,0-3,5 kDa (Lee and Paik, 2001), *L. lactis* subsp. *cremoris* R'in ürettiği lactokoksin R'in molekül ağırlığının 2,5 kDa (Yildirim and Johnson, 1998).

5.9. Bakteriyosin Benzeri Madde Üretiminin Optimize Edilmesi

Çalışmanın bu aşamasında *Enterococcus faecium* 16-1 in BBM yi en verimli şekilde üretebilmesi için ortam koşulları optimize edilmiştir. Optimize edilen koşullarda üretilen BBM miktarının hesaplanması için Arbitrary Unit (AU/ml) kullanılmıştır. Çalışmalar bir zamanda bir faktör olarak çalışılmıştır.

Çalışmada çevresel olarak pH ve sıcaklık faktörleri incelenmiştir. pH çalışmasında, denemeye alınan 6 pH değerinde (4-9) *Enterococcus faecium* 16-1 pH 6 da BBM yi antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre en verimli ürettiği belirlenmiştir. Kullanılan test bakterilerine karşı 188,24 AU/ml sonuç alınmıştır.

Enterococcus faecium 16-1 izolatının BBM üretimini en verimli şekilde gerçekleştirmek için inkübasyon sıcaklığı tercihi 30 °C olarak belirlenmiştir. Bakteri ekim yapıldıktan sonra 8 farklı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. 30 °C de üretilen BBM nin AU/ml olarak pH çalışması ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu görülmüştür.

Antimikrobiyal aktivite için denemeye alınan iki test organizmasında *E. faecalis* için 376,47 AU/ml belirlenirken *S. aureus* için 188,24 AU/ml olarak belirlenmiştir.

Çevresel koşulların optimizasyonundan alınan sonuçlar ile denemeye alınan 6 karbon kaynağı ile besinsel olarak optimum seviyeye getirilmeye çalışılmıştır. Çalışmada karbon kaynakları 3 er paralel şeklinde iki test organizmasına karşı antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış ve sonuçların ortalamaları alınmıştır. Besiyerine karbon kaynağı olarak laktoz katılan besiyerinden alınan örneklerin antimikrobiyal aktivitesi hem *S. aureus* hem de *E. faecalis* için 376,47 AU/ml belirlenmiştir.

Bir önceki çalışmalarda da bahsedildiği gibi bir zamanda bir faktör çalışılan optimizasyon çalışmalarında önceki aşamaların sonuçlarında çalışmaya dahil edilmiş ve bir önce ki çalışmadan kullanılan iki test organizmasına karşıda daha fazla aktivite olduğu belirlenmiştir.

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).

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).

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 (Asutay, 2007).

5.10. Derin Kültür Koşullarında Bakteriyosin Üretimi

Çalışmanın bu aşamasında *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının BBM üretim koşullarının optimize edilmesi ile optimum koşulların ölçek büyütülerek uygulanması amaçlanmıştır. Bu çalışma ile laboratuvar koşullarında üretimi sağlanan ve aktivitesi arttırılan BBM nin KTR koşullarında ölçek büyütülerek üretilmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Üretim esnasında reaktörde bakterinin alt kısımlara çökmemesi ve reaktör parçalarına yapışmaması amaçlanarak daha önce çalışılmamış olan karıştırma hızı eklenmiştir (75 rpm). Sonuçların birbiri ile karşılaştırılacağı düşünülerek ve daha önce çalışılmadığı için koşulların değişmemesi açısından erlenler de çalkamaları (75 rpm) etüvde inkübe edilmiştir.

Öncelikle yapılan optimizasyon çalışmasının optimum olmayan besiyeri erlen düzeyinde karşılaştırılarak başarılı olduğu onaylanmıştır. İnkübasyon sonunda optimum koşullarda (Çizelge 4.15.) üretilen BBM nin canlı hücre sayısı ve antimikrobiyal aktivite bakımından optimum olmayan besiyerine oranla iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Optimum besiyerinde her iki test organizmasına karşı antimikrobiyal aktivitenin inkübasyonun 4. saatinde başlamasına karşın, optimum olmayan besiyerinde ilk aktivite inkübasyonun 8. saatinde belirlenmiştir. Bu durum optimize koşullarda daha hızlı üreme ve BBM üretimini doğrulayan bir veridir. Optimum olmayan besiyerinde gözlenen antimikrobiyal aktivite hem *S. aureus* hem de *E. faecalis* için 188,24 AU/ml olarak hesaplanmıştır. Ancak optimum besiyerinde inkübasyonun 18. saatinde *E. faecalis* için 376,47 AU/ml ve *S. aureus* için 752,94 AU/ml olarak belirlenmiş, inkübasyonun 24. saatinde ise her iki test organizması için 752,94 AU/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.1.).

BBM nin karıştırmalı tank reaktör ölçeğinde üretimi belirlenen optimum koşullar ile gerçekleştirilmiştir. Reaktör koşullarında elde edilen canlı hücre sayısı ve antimikrobiyal aktivite verileri ilişkilendirilmiştir. Eldeki sonuçlara göre reaktörde çözünmüş oksijen miktarı canlı hücre sayısı ile ters orantılı olarak kaydedilmiştir. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarının da bu veriler ile anlamlı bir ilişki içinde olduğu görülmektedir. Aktivite sonuçları kullanılan iki test organizması için 22. ve 24. saatler için 752,94 AU/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.1.).

Aynı zamanda optimum erlen ile reaktör sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında, aynı koşullar farklı ölçeklerde üretimi yapılan BBM nin her iki ölçekte de yaklaşık aynı sonuçların hesaplandığı belirlenmiştir.

Çizelge 5.1. *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının optimizasyon verileri

Deneme Grupları	Canlı hücre sayısı (log)/Saat	Antimikrobiyal aktivite (AU/ml)		Besiyeri koşulları		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	pH	Sıcaklık(°C)	Karbon kaynağı
Optimize olmayan koşullar(Erlen)	8,84 / 22	188,24	188,24	5,58	37	Glikoz
Optimize koşullar (Erlen)	9,17 / 22	752,94	752,94	6	30	Laktoz
Optimize koşullar (Reaktör)	9,23 / 24	752,94	752,94	6	30	Laktoz

Optimizasyon çalışmaları ve bu çalışmaları optimum olmayan koşullar ve farklı ölçekler ile karşılaştırılması sonucu *Enterococcus faecium* 16-1 izolatının ürettiği BBM nin optimum koşullarda daha verimli sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında, ölçek büyütüldüğünde (reaktör koşullarında) hücre sayısının daha fazla olduğu ve uzun süre canlılığını koruyabildiği belirlenmiştir.

Optimize edilmemiş ve edilmiş koşullarda erlen ölçeğinde ve optimize edilmiş koşullarda KTR ölçeğinde gerçekleştirilen çalışmalarda belirlenen spesifik büyüme hızı (μ) değerleri de (sırası ile 0,68, 0,65 ve 0,78) Çizelge 5.1. de sunulan verileri doğrular niteliktedir. Organizmanın reaktör koşullarında daha hızlı büyüdüğü, buna bağlı olarak üretilen BBM miktarının arttığı ve daha yüksek antimikrobiyal aktivite değeri sunduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışma ile günümüze kadar gerçekleştirilen pek çok çalışmada, LAB izole etmek için farklı kaynaklar kullanarak, farklı antimikrobiyal spektrumlara sahip bakteriyosinler elde edilebilmiştir. Ancak, yapılan literatür taramasında, izolasyon kaynağı olarak yırtıcı kuşların kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, Kara Akbaba, Şah Kartal, Kızıl Şahin, Atmaca, Delice gibi yırtıcı kuş türlerinin dışkı, ağız boşluğu ve kloak bölgelerinden alınan örneklerden LAB izolasyonu yapılarak bakteriyosin üretim potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla ilk olarak kuşlardan LAB izolasyonu yapılmıştır. Bu bakterilerin morfolojik ve fizyolojik testler ile tanımlaması yapılmıştır. Bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Aktiviteleri iyi olan izolatlar seçilmiş ve virülans faktörleri taranmıştır. Virülans faktörü olmayan izolatlar ile diğer aşamalara geçilmiş ve

izolatların ürettiği metabolitin BBM madde olduğu yapılan testler ile onaylanmıştır. İzolatların sonuçları karşılaştırılmış benzer bakteriler olduğu öngörülmüş ve diğer aşamalarda malzeme israfından kaçınmak için belirlenen 16-1 izolatı ile diğer çalışmalar yapılmıştır. Geleneksel yöntemler ile morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olarak *Enterococcus* tanımlanan bakteri moleküler yöntemler tanımlanmış ve %100 *Enterococcus faecium* olarak belirlenmiştir

Daha sonra *Enterococcus faecium* 16-1 sentezlediği BBM nin kısmi karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu aşamada antimikrobiyal aktiviteye sahip BBM nin protein yapısında olduğu onaylanmış, bu aktivitenin BBM den kaynaklandığı onaylanmış ve bu metabolitin bakteriyosin olabilme ihtimaline karşı bakteriyosinlere özel stabilite çalışmaları yapılmıştır. Bu metabolitin molekül ağırlığının belirlenmesi için metabolit konsantre edilmiş ve elektroforez çalışması yapılmıştır.

İzolasyonu yapılan bakterinin *Enterococcus faecium* olduğu onaylanmış ve bu bakterinin antimikrobiyal aktivitesinin BBM den kaynaklandığı belirlenmiştir. Bundan sonra ki aşamalarda bu metaboliti bakteriye optimum koşullarda en verimli üretimi belirlenmiştir. *Enterococcus faecium* 16-1' in BBM yi maksimum seviyede üretmesi için bir zamanda bir faktör olarak optimizasyon çalışması yapılmış ve pH 6, sıcaklık 30 °C, karbon kaynağı olarakta Laktoz belirlenmiştir. Bu koşulların onaylanması amacı ile optimum olmayan (MRS broth) ile optimum besiyeri karşılaştırılmıştır. Bu aşamada MRS broth besiyerinde en fazla 94,11-188,24 AU/ml aktivite belirlenirken, optimum besiyerinde 376.47 AU/ml aktivite belirlenmiştir. Bu koşulları ölçek büyülterek reaktör koşullarında çalışıldığında 752.94 AU/ml aktiviteye çıkarılmıştır.

Enterococcus faecium olarak belirlenen 16-1 izolatının sentezlediği BBM yi antimikrobiyal aktivite açısından optimum seviyeye taşınmıştır. Önce ki aşamalarda yapılan çalışmada depolama ömründe 2.5 ay boyunca aktivitesinde bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak BBM nin bundan sonra karakterize edilerek hangi bakteriyosin olduğu onaylanırsa günümüzde var olan ve ticari olarak satılan bakteriyosinlere alternatif bir bakteriyosin olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aasen, I., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L. and Storro, I., 2000, Influence of complex nutrients, tempereture and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687, Applied Microbiology and Biotechnology, 53, 265-271.
- Afdora, T., P., Ardiyati, T., Sjoftjan, O., Kalsum, U., 2010, Potential Antibacterials Compounds of Lactic Acid Bacteria (LAB) from Quail Intestine (*Coturnix japonica*) in Inhibition Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Journal of Tropical Life Science, Vol.1, No. 1.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I., 2006, Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control 17, 454–461.
- Asutay D., 2007, Yöresel bir gıdadan izole edilen bakteriyosin üreten bakterinin teşhisi ve bakteriyosin karakterizasyonu, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 89s.
- Aydın, M., 2004, Bakteri İdentifikasyonunda kullanılan standart, biyokimyasal ve fizyolojik testler, Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji, 11, 91-110.
- Balcazar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Evora, M.D., Muzquiz, J.L., 2006, Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. Microbial Ecology in Health and Disease. 18, 61-63.
- Balcazar, J.L.; Vendrell, D.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Muzquiz, J.L.; Girones, O., 2008, Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture, 278:1-4, 188-191.
- Banwart, G.J., 1981, Basic Food Microbiology AVI Publishing Company Westport Connecticut. 268 p.

- Başığit, G., 2004, Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanılma Özellikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Bauer, R. and Dicks, L.M.T., 2005, Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 201-16.
- Borrero, J., Brede, D.A., Skaugen, M., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernandez, P.E., 2011, Characterization of garvicin ml, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard Ducks (*Anas platyrhynchos*). *Applied and Environmental Microbiology*. 1(77), 369–373.
- Brötz H. and Sahl H.G., 2000, New insights into the mechanism of action of lantibiotics—diverse biological effects by binding to the same molecular target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 714-719.
- Bruno, M.E.C. and Montville, T.J., 1993, Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 3003-3010.
- Camilla O., Per Ronge, Per Eugen K. and Jon N.M., 2010, Structure analysis of the two-peptide bacteriocin lactococcin G by introducing D-amino acid residues, Department of Molecular Biosciences, University of Oslo, PO Box 1041 Blindern, 0316 Oslo, Norway, 156, 1883-1889.
- Campos, C.A., Rodriguez, O., Mata, P.C., Prado, M. and Velazquez, J.B., 2008, Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*), *Food Research International*, 7, 432-441.
- Carvalho, L. R., Farias, L. M., Nicoli, J. R., Silva, M. C. F., Corsino, A. T. S. M., Lima, L. A., Redondo, R. A. F., Ferreira, P. C. P., Pinto, M. E. B. M., 2003, Dominant Culturable Bacterial Microbiota in the Digestive Tract of the American Black Vulture (*Coragyps atratus* Bechstein 1793) and search for antagonistic substances, *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:218-224 ISSN 1517-8382.

- Chen, H. and Hoover D.G., 2003, Bacteriocins and Their Food Application, Compre. Review Food Science Food Safety, 100 p.
- 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. Journal of Biotechnology, 95, 225-35.
- Chou, L. and Weimer, B., 1999, "Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*", Dairy science, 82, 23-31p.
- Cleveland, J., Montville., J.T., Nes, F.I. and Chikidas, L.M., 2001, Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Microbiology, 71, 1- 20.
- Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2007, Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. Microbiology, 153, 291–299.
- 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. Journal of Applied Microbiology, 83, 248-258.
- Çakır, İ. ve Çakmakçı, M.L., 2004, "Probiyotikler: Tanımı, etki mekanizması, seçim ve güvenilirlik kriterleri", Gıda Teknolojisi Derneği, 29(6), 427-434s.
- Çon, A.H. ve Gökalp, H.Y., 2000, Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 30 (3-4) 180-190.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H. and Dicks L.M.T., 2005, Characterization of a 3 944 Dalton bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology, 419- 425.

- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P., 2006, Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Journal International Dairy*, 1058-1071.
- Deraz, F. S., Karlsson, N. E., Hedström, M., Andersson, M. M., Mattiasson, B., 2005, Purification and characterization of acidocin D20079, bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology*, 117, 343-354.
- Diez-Gonzalez, F., 2007, Applications of Bacteriocins in Livestock. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8: 15-24. *Current Issues in Intestinal Microbiology (CIIM)*.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., 2010, Karaca, H., Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler, *Journal of Food*, 35, 55-62.
- Drosinos, E.H., 2006, Mataragas, M. and Metaxopoulos, J., Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131, *Meat Science*. 74, 690-696.
- Dubois M., Gillis K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956, Colorimetric method for determination of sugar and related substance, *Analytical Chemistry* 28, 350-6.
- Eckner, K. F., 1992, Bacteriocins and Food Applications. *Dairy Food Environment Sanitation*, 204–209.
- Ennahar, S., Sashihara, T. and Sonomoto, K., Ishizaki, A., 2000, Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85-106.
- Garneau, S., Martin and N. I., Vederas, J.C., 2002, Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84, 557-592.
- Geisen, R., Lucke, K.K., Krockel, L., 1992, Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch*, 72, 874-898.

- Guerra, N.P., Rua, M.L. and Pastrana, L., 2001, Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 267-281.
- Gürsoy, O. ve Kınık, Ö., 2005, “Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyelleri”, *Pamukkale Üniv. Mühendislik Bilimleri Derg.*, 11(3), 361-371s.
- Harrigan, W., F., 1998, *Laboratory Methods in Food Microbiology*, Elsevier Science Publishing Co Inc, United States, 490s.
- Hauben, K.J.A., Wuytack, E.Y., Sonntjens, C. C. F. and MichieIs, C. W., 1996, High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *Journal of Food Protection*, 59, 350-355.
- Howard, B.J., Keiser, J.F., Smith, T.F., Weissfeld, A.S. and Tilton, R.C., 1993, *Clinical and Pathogenic Microbiology*. 2nd Edition. A.C.V. Mosby. Imprint Of Mosby-Year Book Inc. St. Louis., 383-423.
- 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.
- Ishizaki, A., Ennahar, S., Sonomoto, K., 1999, Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Biological Engineering*, 87, 705-716.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray B., 1995, Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59, 169-200.
- Józefiak, D., Sip, A., Kaczmarek, S., Rutkowski, A., 2010, The effects of *Carnobacterium divergens* AS7 bacteriocin on gastrointestinal microflora in

vitro and on nutrient retention in broiler chickens. Journal of Animal and Feed Sciences, 19, 460–467.

Kaiser, D., Jack, R.W. and Jung, G., 1998, Lantibiotics and microcins: novel post translational modifications of polypeptides. Pure and Applied Chemistry, 70, 154-160.

Karagül, B., 2010, Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Yetenekleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 101s.

Karthikeyan, V. , Santosh, S. W., 2009, Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. African Journal of Microbiology Research, 3 (5), 233-239.

Kıran, F., 2006, Hücre Duvarı Protein Profilleri ve Pilazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

Klaenhammer, T.R., 1993, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 12, 39-86.

Kocijan, I., Radovic E. P., Beck, R., Galov, A., Marinculic, A., Susic, G., 2009, Microflora and internal parasites of the digestive tract of Eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus*) in Croatia, European Journal of Wildlife Research 55:71–74.

Koponen, O., 2004, Studies of producer self–protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*, Doctoral Dissertation, Institute of Biotech., Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, 69 p.

Koral, G., 2011, Bozadan İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. Lactis GYL-32 Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

- Köseoğlu, V.K., 2007, Model Sistemlerde Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Patojenler Üzerine Antibakteriyel Etkilerinin İncelenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Lash, B.W., Mysliwiec, T.H. ve Gourama, H., 2005, Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). Food Microbiology, 22, 199-204.
- Laukova, A., Guba, P., Nemcova, N., Marekova, M., 2004, Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Dusseldorf by enterocin A in gnotobiotic *Japanese quails*. Vet. Med. – Czech, 49, (2): 47–51.
- Lee, N.K. and Paik, H.D., 2001, Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. Journal of Food Microbiology, 17-24.
- Lee, J.H., Joo, J.Y., Park, S. C., Kim, H. S., Hwang, K. I., Ahn, S. J. and Mheen, I. T., 1999, Purification and Characterization of a bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 Isolated from Kimchi. Journal of Bioscience and Bioengineering, 88, 2, 153-159.
- Leer, R.J., Van Der Vossen, J.M.B.M., Van Giezen, M., van Noort, J.M., and Pouwels, P. H., 1995, Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Journal Microbiology, 114, 1629-1635.
- Leroy, F. and De Vuyst, L., 2002, Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. International Journal of Food Microbiology, 72, 158-164.
- Liu, W., Hansen and J.N., 1990, Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 7, 551-558.
- Lowry, O. H., Rosebrough, A.L. Farr, N. J., and Randall, R. J., 1951, Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

- McAuliffe, O., Ross, R.P., and Hill, C., 2001, Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiology Reviews, 25, 285-308.
- Miller K., Schamber R., Osmanagaoglu O., and Ray B., 1998, Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. Applied and Environmental Microbiology, 64, 1997-2005.
- Manero, A. and Blanch, A., 1999, Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key, Applied and Environmental Microbiology, 4425–4430.
- Montville, T. J. and Winskowski, K., 1997, Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In “Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers”, M. P. Doyle, L.R. Beuchat & T. J. Montville (Eds.) ASM, Washington D.C., 557, 577 p.
- Mumcu, Z.N., 1997, Kefirden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve plazmit DNA’larının incelenmesi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 112 s.
- Nazef, L., Belguesmia, Y., Tani, A., Prévost H., Drider, D., 2008, Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. Poultry Science 87, 329-334.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., and Holo, H., 1996, Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70, 113-128.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M. and Nakanishi, K., 2000, Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. Journal of Food Microbiology, 88, 81-89.
- Okereke, A. and Montville, T.J., 1991, Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria, Journal of Food Protection, 54, 349-353.

- Onda, T., Yanagida, F., Tsuji, M., Shinohara, T., Yokotsuka, K., 2003, Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from miso-paste., International Journal of Food Microbiology, 87(1-2),153-159.
- Özkalp, B., 2006, Doğal Tip *Lactococcus Lactis* Suşlarının Endüstriyel Starter Kültür Potansiyellerinin Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 115 s.
- Papagianni, M., 2003, Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications, Biotechnology Advances, 21, 465-499.
- Pascual, M., L., Daniele, B., M., Ruiz, F., Giordano, W., Pajaro, C., Barberis, L., 2008, *Lactobacillus rhamnosus* L60 a potential probiotic isolated from the human vagina, The Journal of General and Applied Microbiology, 54, 141-148.
- Patil, M., Pal, A., Pal, V., Yaddula, R.K., 2006-2007, Isolation of bacteriocinogenic lactic acid bacteria from rat intestine. Journal of Culture Collections, 5,58-63.
- Plackett, R.L., Burman, J.P., 1946, The Design of Optimum Multifactorial Experiments, Biometrika 33 (4), 305-25.
- Riley M.A. and Chavan, 2007, Bacteriocins: Ecology and Evolution, Springer Verlag, Inc., 150 p.
- Savadogo, A., Ouattara C. A.T., Bassole, I.H.N. and Traore, S.A., 2006, Bacteriocins and lactic acid bacteria, African Journal of Biotechnology, 678-683.
- Schved, F., Henis, Y., Juven, B.J., 1994, Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. International Journal of Food Microbiology, 21, 311-314.

- Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Seal, B.S., 2006, Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:9, 3111–3116.
- Takala, T.M., 2005, Nisin Immunity And Food Grade Trasformation In Lactic Acid Bacteria. Academic Dissertation In Microbiology (Ph.D), University of Helsinki. Finland, 61 p.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ, Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R., 1989, Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, TC Anadolu Üniv. Eğitim, Sağlık ve Bilimsel araştırma çalışmaları Vakfı Yayınları, No: 74, 260s, Eskişehir.
- Temiz, A., 2000, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. III. Baskı. Hatipoğlu Yayınevi. Ankara.
- 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.
- Tok, E. ve Aslım, B., 2007, “Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg.*, 37(1), 62-68s.
- Tunail, N., 2009, “Mikrobiyoloji”, Danone Enstitüsü Derneği, Ankara, 434s.
- Tübitak Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, 2011, Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler, XIII. Uygulamalı Eğitim Kursu Kitapçığı, 11-15 Temmuz.
- Twomey D. , Ross R.P., Ryan M. and Meany B., Hill C., 2002, Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and application. *Antonie van Leewenhoek*, 82, 165-185.
- Ugras, S., Sezen, K., Kati, H. and Demirbağ, Z., 2013, Purification and Characterization of the Bacteriocin Thuricin Bn1 Produced by *Bacillus thuringiensis* subsp.

kurstaki Bn1 Isolated from a Hazelnut Pest. Journal of Microbiology and Biotechnology, 23 (2), 167-176.

Uymaz, B., 2009, Probiyotik Özellik Taşıyan Gıda ve İnsan Kaynaklı Laktobasillerin İzolasyonu Tanımlanması ve Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Karakterizasyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, 157s.

Van Kraaij, C., de Vos, W.M., Siezen, R. J. and Kuipers, O. P., 1999, Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. Natural Product Reports, 16, 575-587.

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.

Yang, R. and Ray, B., 1994, Factors Influencing Production of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria, Food Microbiology, 11(4), 281-291.

Yang, R., Johnson, M.C., Ray, B., 1992, Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol. 58,3355–3359.

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

Yıldırım Z. ve Yıldırım M., 2000, Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Tebliği Kitabı, 16, 247-253.

Zhennai, Y., 2000, Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation, University of Helsinki, 120 p.

- Van Reenen C.A., Dicks, L.M.T., Chikindas, M.L., 1998, Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*, J. Appl. Microbiol. 84 1131–1137.
- Winsor, D. K., Bloebaum, A. P. and Mathewson, J. J., 1981, Gram-negative, aerobic, enteric pathogens among intestinal microflora of wild Turkey Vultures (*Cathartes aura*) in West Central Texas, Applied and Environmental Microbiology, Dec. 1981, p. 1123-1124, Vol. 42, No. 6.
- Wu, C.W., Yin, L.J., Jiang, S.T., 2004, Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 1146-1151.
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., Drosinos, E., H., 2008, Purification and characterization of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* E131, Meat Science, 80, 194-203.