

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

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN
PATOJENE SPESİFİK BAKTERİYOSİNLERİN
KARAKTERİZASYONU VE KOKTEYL OLARAK KULLANIMI**

DOKTORA TEZİ

HALİL İBRAHİM KAYA

DENİZLİ, TEMMUZ - 2019

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN
PATOJENE SPESİFİK BAKTERİYOSİNLERİN
KARAKTERİZASYONU VE KOKTEYL OLARAK KULLANIMI

DOKTORA TEZİ

HALİL İBRAHİM KAYA

DENİZLİ, TEMMUZ - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

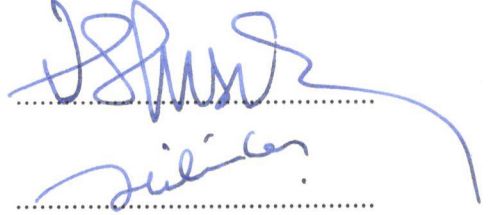
Halil İbrahim KAYA tarafından hazırlanan “**Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Patojene Spesifik Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu ve Kokteyl Olarak Kullanımı**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 26.07.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

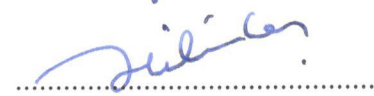
Danışman

Doç.Dr. Ömer ŞİMŞEK



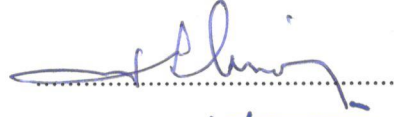
Üye

Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON



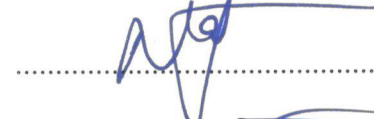
Üye

Prof. Dr. Mehmet İNAN



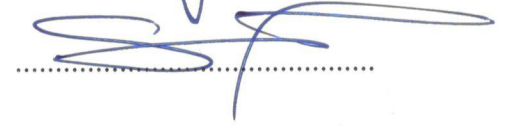
Üye

Prof. Dr. Nazime Mercan DOĞAN

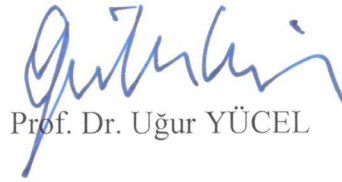


Üye

Prof. Dr. Sebahattin NAS



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/08/2019 tarih ve 33/16-92 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü ✓

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.



HALİL İBRAHİM KAYA

ÖZET

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN PATOJENE
SPESİFİK BAKTERİYOSİNLERİN KARAKTERİZASYONU VE KOKTEYL
OLARAK KULLANIMI
DOKTORA TEZİ
HALİL İBRAHİM KAYA
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ÖMER ŞİMŞEK)
DENİZLİ, TEMMUZ - 2019**

Gıda sistemlerinde patojen bakteriler üzerine antibakteriyel etkili bakteriyosinler önemli doğal koruyuculardan birisidir. Ancak bakteriyosinlerin sınırlı antibakteriyel spektrumları nedeniyle gıda sistemlerinde mutlak güvenlik sağlanamamaktadır. Bu çalışmada gıda sistemlerinde sorun oluşturan patojen bakterilere spesifik antibakteriyel etkili bakteriyosin üreticileri izole edilerek karakterize edilmiş ve bu patojen-spesifik bakteriyosinlerden (PSB) oluşturulan kokteylin süt ortamında patojen bakteriler üzerine etkisi gösterilmiştir. 250 farklı gıda örneğinden PSB üreticileri, her bir patojenin (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*) 5 farklı suşunun karışımına (5×10^5 kob/ml) karşı antibakteriyel etkisi belirlenerek izole edilmiştir. Bu stratejiye göre denenen 50 adet *B. cereus*, 10 adet *L. monocytogenes* ve 10 adet *S. aureus* suşlarının tümü üzerinde inhibisyon etkisi bulunan üç farklı izolat elde edilmiş, bunların 7 adet laktik asit bakterisi (LAB) suşlarına karşı antibakteriyel etkisi bulunmamıştır. 16S rDNA dizi analizine göre üç izolatın sırasıyla *Lactobacillus plantarum* PFC339, *Enterococcus faecalis* PFC340 ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* PFC341 türleri olduğu (%99,86, %100 ve %100 homoloji) belirlenmiştir. Bu üretici suşlardan PSB'ler, biyoreaktör ortamında üretildikten sonra amonyum sülfat çöktürmesi, katı-faz ekstraksiyonu ve UHPLC sistemleri kullanılarak saflaştırılmış, spesifik aktiviteleri sırasıyla 607,59, 1472,39 ve 297,03 AU/mg olarak ölçülmüştür. PSB'lerin antibakteriyel aktivitesi proteolitik enzimler ile muamele edildiğinde kaybolmuştur. Ayrıca PBS'lerin MALDI-TOF ile sırasıyla, 1219.021, 3346.803 ve 4853.768 Da moleküler büyüklüğe sahip oldukları tespit edilmiştir. FE-SEM, PSB'lerin patojenlerin hücre duvar yapısı üzerinde farklı şekilde etkili olduğunu ve hücre duvar geçirgenliğini bozarak veya porlar oluşturarak inhibe ettiğini göstermiştir. Süt ortamına 100 AU/ml ilave edilen PSB'ler etkili olduğu patojenlerin sayısını azaltırken, diğer iki patojen üzerinde etkisi bulunmamıştır. Ancak PSB'lerin kokteyl halinde kullanılması durumunda her üç patojenin de süt ortamında gelişimi durdurulabilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada sadece *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* türlerine spesifik etkili üç farklı bakteriyosin üreticisi izole edilmiş ve bu bakteriyosinlerin gıda sistemlerinde kokteyl şeklinde ilk defa kullanılması ile patojenlerin engellenebileceği gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Laktik asit bakterileri, bakteriyosin, gıda güvenliği, bakteriyosin kokteyli, patojen bakteriler, doğal koruyucu.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF PATHOGEN-SPECIFIC BACTERIOCINS PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA AND THEIR APPLICATION WITHIN COCTAIL

PH. D THESIS

HALIL IBRAHIM KAYA

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. OMER SIMSEK)

DENIZLI, JULY 2019

In food systems, bacteriocins with antibacterial effect on pathogenic bacteria are one of the important natural preservatives. However, due to the limited antibacterial spectra of bacteriocins, absolute safety cannot be achieved in food systems. In this study, bacteriocin producers with specific antibacterial effects against pathogenic bacteria that cause problems in food systems were isolated and identified and the performances of the cocktail formed from these pathogen-specific bacteriocins (PSBs) on the pathogenic bacteria in the milk were determined. From 250 different food samples, PSB producers were isolated by determining the antibacterial effect against a mixture of each pathogens (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) of 5 different strains (5×10^5 cfu / ml). According to this strategy, three different isolates were obtained with the inhibition effect on all 50 strains of *B. cereus*, 10 of *L. monocytogenes* and 10 of *S. aureus* strains and they did not have any antibacterial effect against 7 strains of lactic acid bacteria (LAB). According to the 16S rDNA sequence analysis, three isolates were identified as *Lactobacillus plantarum* PFC339, *Enterococcus faecalis* PFC340 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* PFC341 species (99,86 %, 100 % and 100 % homology). The PSBs were purified using ammonium sulfate precipitation, solid-phase extraction, and UHPLC systems after they were produced in a bioreactor and the specific activities were measured as 607,59, 1472,39 and 297,03 AU / mg, respectively. The antibacterial activity of PSBs was lost when treated with proteolytic enzymes. In addition, PSBs were found to have a molecular size of 1219.021, 3346.803 and 4853.768 Da by MALDI-TOF, respectively. FE-SEM showed that PSBs were distinctly effective on the cell wall structure of pathogens by inhibiting cell wall permeability or by forming pores. PSBs added 100 AU/ml to the milk, reduced the number of pathogens to which it was effective while they had no effect on the other two pathogens. However, when the PSBs were used as cocktails, the growth of all three pathogens in the milk medium could be stopped. In conclusion, in this study, three different bacteriocin producer was isolated with only specific activity to *B. cereus*, *L. monocytogenes* and *S. aureus* species and pathogens were shown to be prevented by using these bacteriocins within cocktails in food systems for first time.

KEYWORDS: Lactic acid bacteria, bacteriocin, food safety, bacteriocin cocktail, pathogenic bacteria, natural preservative.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı	2
1.2 Literatür Özeti	3
1.2.1 Gram Pozitif Bakterilerin Ürettiği Bakteriyosinler	5
1.2.1.1 Grup I.....	6
1.2.1.2 Grup II	8
1.2.1.3 Grup III.....	11
1.2.2 Gram Pozitif Bakteriler Tarafından Üretilen Bakteriosinlerin Etki Mekanizmaları	12
1.2.2.1 Hücre Duvarı Sentezini Engelleyen Bakteriyosinler.....	13
1.2.2.2 Bakteri Membran Bütünlüğünü Bozan Bakteriyosinler	14
1.2.2.3 Septum Oluşumunu İnhibe Eden Bakteriyosinler	16
1.2.3 Gram Pozitif Bakteriler Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Uygulamaları	17
1.2.4 Bakteriyosinlerin Diğer Yöntemlerle Birlikte Uygulamaları	21
1.2.5 Gıdalarda Sorunlara Neden Olan Patojen Bakteriler	23
2. MATERYAL VE METOT	26
2.1 Mikroorganizmalar ve Gelişme Koşulları	26
2.2 Patojen Spesifik Antibakteriyel Etkili LAB Suşlarının İzolasyonu	26
2.3 Patojen Spesifik Antibakteriyel Etkili LAB izolatlarının Antibakteriyel Spektrumlarının Belirlenmesi.....	27
2.4 Patojen Spesifik Antibakteriyel Etkili LAB İzolatlarının 16S rDNA Dizi Analizi	28
2.5 Kültür Üst Sıvılarındaki Patojen Spesifik Antibakteriyel Aktivitenin Enzimlere Karşı Hassasiyetinin Belirlenmesi	29
2.6 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Üretimi ve Saflaştırılması.....	29
2.7 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Molekül Büyüklüğünün MALDI-TOF ile Belirlenmesi.....	31
2.8 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Patojen Bakterilerin Morfolojisi Üzerine Etkisinin FE-SEM ile Belirlenmesi	31
2.9 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Süt Model Sisteminde Patojen Bakteriler Üzerine Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi	32

2.10 İstatistiksel Analizler	33
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
3.1 Patojen Spesifik Antibakteriyel Aktiviteye Sahip LAB'lerin İzolasyonu....	34
3.2 Patojen Spesifik LAB İzolatlarının Antibakteriyel Spektrumu.....	35
3.3 Patojen Spesifik Antibakteriyel Aktiviteye Sahip İzolatların Tür Tanısı.....	37
3.4 İzolat Kültür Üst Sıvılarının Antibakteriyel Aktivitesinin Enzimlere Karşı Hassasiyeti	39
3.5 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Üretimi ve Saflaştırılması.....	40
3.6 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Moleküler Büyüklükleri	47
3.7 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Patojen Bakteriler Üzerine Antibakteriyel Etkisinin FE-SEM Görüntüleri.....	50
3.8 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Süt Model Sisteminde Patojen Bakteriler Üzerine Antibakteriyel Etkisi	52
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
5. KAYNAKLAR.....	60
6. ÖZGEÇMİŞ.....	74

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin antibakteriyel etki mekanizmaları.	13
Şekil 3.1: LAB izolatlarının indikatör patojen bakteri suşlarına (a: <i>B. cereus</i> , b: <i>L. monocytogenes</i> ve c: <i>S. aureus</i>) karşı antibakteriyel etkisi	35
Şekil 3.2: P2Bc1 (a), KtLm1 (b) ve Yo4S1 (c) izolatlarının indikatör patojen bakteri suşlarına (<i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S. aureus</i>) karşı antibakteriyel etkisi	35
Şekil 3.3: P2Bc1 (a), KtLm1 (b) ve Yo4S1 (c) izolatlarının kültür üst sıvılarının indikatör patojen bakteri suşlarına (<i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S. aureus</i>) karşı antibakteriyel etkisi	37
Şekil 3.4: Fermente gıdalardan izole edilen LAB izolatlarından 16S-27F/16S-780R ile 16S-529F/1491R primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan PZR fragmentleri	38
Şekil 3.5: PFC339 izolatının hücre gelişim eğrisi	41
Şekil 3.6: PFC340 izolatının hücre gelişim eğrisi	41
Şekil 3.7: PFC341 izolatının hücre gelişim eğrisi	42
Şekil 3.8: PFC339 izolatının UHPLC kromatogramı ve fraksiyona ait antibakteriyel aktivite	44
Şekil 3.9: PFC340 izolatının UHPLC kromatogramı ve fraksiyona ait antibakteriyel aktivite	45
Şekil 3.10: PFC341 izolatının UHPLC kromatogramı ve fraksiyona ait antibakteriyel aktivite	46
Şekil 3.11: PFC339 bakteriyosini MALDI-TOF kütle spektrometresi spektrumu	48
Şekil 3.12: PFC340 bakteriyosini MALDI-TOF kütle spektrometresi spektrumu	49
Şekil 3.13: PFC341 bakteriyosini MALDI-TOF kütle spektrometresi spektrumu	50
Şekil 3.14: PFC339 bakteriyosini ile muamele edilen <i>B. cereus</i> suşlarının morfolojik görünümü (a: Kontrol b: Örnek)	51
Şekil 3.15: PFC340 bakteriyosini ile muamele edilen <i>L. monocytogenes</i> suşlarının morfolojik görünümü (a: Kontrol b: Örnek)	51
Şekil 3.16: PFC341 bakteriyosini ile muamele edilen <i>S. aureus</i> suşlarının morfolojik görünümü (a: Kontrol b: Örnek)	52
Şekil 3.17: Anti- <i>B. cereus</i> (PSB-Bc) bakteriyosininin <i>B. cereus</i> suşlarının karışımına karşı antibakteriyel etkisi	52
Şekil 3.18: Anti- <i>L. monocytogenes</i> (PSB-Lm) bakteriyosininin <i>L. monocytogenes</i> suşlarının karışımına karşı antibakteriyel etkisi	53
Şekil 3.19: Anti- <i>S. aureus</i> (PSB-Sa) bakteriyosininin <i>S. aureus</i> suşlarının karışımına karşı antibakteriyel etkisi	53
Şekil 3.20: Anti- <i>B. cereus</i> (PSB-Bc) bakteriyosininin bütün indikatör karışımlarına karşı antibakteriyel etkisi	54
Şekil 3.21: Anti- <i>L. monocytogenes</i> (PSB-Lm) bakteriyosininin bütün indikatör karışımlarına karşı antibakteriyel etkisi	54
Şekil 3.22: Anti- <i>S. aureus</i> (PSB-Sa) bakteriyosininin bütün indikatör karışımlarına karşı antibakteriyel etkisi	55
Şekil 3.23: Anti- <i>B. cereus</i> (PSB-Bc), Anti- <i>L. monocytogenes</i> (PSB-Lm) ve Anti- <i>S. aureus</i> (PSB-Sa) bakteriyosin kokteylinin bütün indikatör karışımlarına karşı antibakteriyel etkisi	56

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: P2Bc1, KtLm1 ve Yo4S1 izolatlarının antibakteriyel etki spektrumu	36
Tablo 3.2: Fermente gıdalardan izole edilen LAB izolatlarının 16S rRNA geni dizi analizine göre tanımlama sonuçları ve NCBI ulaşım numaraları.	39
Tablo 3.3: İzolatların kültür üst sıvılarının antibakteriyel aktivitesine çeşitli enzimlerin etkisi	40
Tablo 3.4: Amonyum sülfat konsantrasyonuna karşılık protein konsantrasyonları..	43
Tablo 3.5: PFC339 izolatının saflaştırma basamaklarında bakteriyosin aktiviteleri ve protein miktarları.....	44
Tablo 3.6: PFC340 izolatının saflaştırma basamaklarında bakteriyosin aktiviteleri ve protein miktarları.....	45
Tablo 3.7: PFC341 izolatının saflaştırma basamaklarında bakteriyosin aktiviteleri ve protein miktarları.....	47

SEMBOL LİSTESİ

%	:	Yüzde
<	:	Küçük
>	:	Büyük
°C	:	Santigrat derece
µg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
Da	:	Dalton
dk	:	Dakika
sa	:	Saat
g	:	Gram
kg	:	Kilogram
kob	:	Koloni oluşturan birim
L	:	Litre
log	:	Logaritma
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
mmol	:	Milimol
N	:	Normalite
nm	:	Nanometre
ppm	:	Milyonda bir birim
sn	:	Saniye
α	:	Alfa
AU	:	Arbitrary Unit
rpm	:	Dakikadaki dönüş sayısı

ÖNSÖZ

Bu çalışmada gıda sistemlerinde sorun oluşturan patojen bakterilere spesifik antibakteriyel etkili bakteriyosin üreticileri izole edilerek karakterize edilmiş ve bu patojen-spesifik bakteriyosinlerden oluşturulan kokteylin süt ortamında patojen bakteriler üzerine etkisi gösterilmiştir.

Çalışmalarım sırasında bana her türlü desteği sağlayan beni yönlendiren ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam sayın Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e, bilgilerini benimle paylaşan ve destek olan bölümümüzün öğretim elemanlarına teşekkürlerimi sunarım. Eğitim hayatım boyunca tüm çalışmalarında bana her zaman maddi ve manevi açıdan destek olan varlıklarıyla beni cesaretlendiren başta çok sevdiğim eşim Azimenur YÜKSEL KAYA'ya ve aileme, çalışma arkadaşlarım Burcu KÖRDİKANLIOĞLU ve Duygu ZEHİR ŞENTÜRK'e ve diğer Biolab ekibi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Bakteriyosinler, çeşitli bakteriler tarafından ribozomal sentezlenerek ekstrasellüler olarak ortama salgılanan ve genelde yakın akraba türleri inhibe eden peptid veya protein yapıdaki antibakteriyel metabolitlerdir (Delves-Broughton ve diğ. 1996, Zou ve diğ. 2018). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bakteriyosinlerin gıdalarda önem taşıyan *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* gibi türleri içeren birçok patojen bakteriye karşı önemli seviyede antibakteriyel etkisi tespit edilmiştir (Anastasiadou ve diğ. 2008, Drider ve diğ. 2006). Bakteriyosinler, gerek ribozomal sentezli olması gerekse de sindirim enzimleri ile kolayca parçalanmaları nedeniyle antibiyotiklerden ayrılmakta ve doğal antibakteriyeller olarak kabul edilmektedir (Cotter ve diğ. 2005). Bu özellikleri dolayısıyla; et ve süt ürünleri, konserve ürünler ve hazır çorbalar gibi gıdaların korunmasında, ayrıca medikal alanda terapötik amaçlar doğrultusunda, mevcut koruyuculara alternatif olarak birçok çalışmada önerilmektedir (Delves-Broughton ve diğ. 1996). Laktik asit bakterileri (LAB)'nin bilinen önemli antibakteriyel metabolitlerinden birisi bakteriyosinlerdir (Klaenhammer 1993). Bakteriyosinler, küçük peptid yapısında, membran aktif doğal antibakteriyellerdir. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerden, gıdaların korunması amacıyla ya üretici suşların doğrudan kullanılmasıyla ya da kısmi saflaştırılmış bu peptidlerin ilavesi ile faydalanılmaktadır. Hatta LAB'ce üretilen ilk bakteriyosin olan nisin de FDA tarafından GRAS olarak tanımlanmış, gıdalarda kullanımına izin verilmiş ve ticari olarak gıda koruyucusu şeklinde kullanımı mevcuttur (Delves-Broughton ve diğ. 1996, Cotter ve diğ. 2005).

Her ne kadar, LAB'ler başta olmak üzere birçok bakteri tarafından üretilen çeşitli bakteriyosinler olsa da, bunların gıda sistemlerinde kullanımları ile antibakteriyel performansı yönünde halen çeşitli sorunlar bulunmaktadır (Gálvez ve diğ. 2007). Bu sorunların başında, bakteriyosinlerin spesifik inhibisyon özelliklerinden dolayı antibakteriyel etki spektrumunun dar olması gelmektedir. Kısaca bakteriyosinler hedef hücrenin yüzeyinde bulunan reseptör bölgelere tutunur, daha sonra zarda por oluşturarak hücre içi dengenin bozulmasına ve ölümüne neden

olur (Oscariz ve Pisabarro 2001). Örneğin nisin hedef hücrelerde lipit II molekülüne bağlanır (Wiedemann ve diğ. 2001), pediocin ise mannoz ABC transport proteinine tutunur (Kjos ve diğ. 2009). Bu spesifiklik patojen bakterilerin inhibisyonunda genel antibakteriyel etki mekanizması sağlayamaz. Bakteriyosinlerle ilgili diğer bir sorun ise, bu yapıların hidrofobik karakteridir. Hidrofobisite, bakteriyosinlerin gıda fraksiyonlarına tutunmalarına, dolayısıyla da antibakteriyel performansın önemli ölçüde kaybına neden olur (Silva ve diğ. 2018). Üçüncü sorun ise, ticari kullanımına izin verilmiş nisine karşı artan patojen direncidir. Bakterilerin hücre duvarını modifiye etmeleri neticesinde nisin tutunma bölgeleri ya değiştirilmekte ya da maskelenmektedir (Nawrocki ve diğ. 2014).

Yukarıda sıralanan sorunların çözümü için çalışmamızda bakteriyosinlerin hem biyoteknolojik üretimi hem de antibakteriyel etkilerinin iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada yeni bakteriyosin üreticilerinin tespiti, bu bakterilerden bakteriyosinlerin üretimi, izolasyonu, saflaştırılması ve ileri karakterizasyonu hedeflenmiş, ilaveten geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahip bakteriyosin kokteylinin süt model sisteminde patojen bakteriler üzerinde etkisi tespit edilmiştir.

Çalışmamızda izole edilecek farklı karakterde ve yapıda bakteriyosinleri içeren kokteylin gıda sisteminde maksimum performans sağlanacak şekilde hazırlanması, bakteriyosinlerin gıda uygulamalarındaki önemli sorunlarından birisi olan dar antibakteriyel aktivite sorununun çözülmesi ve bakteriyosin uygulamalarının yaygınlaştırılması açısından özgün nitelik taşımaktadır. Diğer yandan söz konusu bakteriyosin kokteylinin yüksek ticarileşme potansiyelinin bulunması ve gıda sistemlerinde daha önce uygulanmamış olması da önem arz etmektedir.

1.1 Tezin Amacı

Bu çalışmanın temel amacı, gıda sistemlerinde uygulamaya hazır, geniş antibakteriyel spektruma sahip bakteriyosin kokteylinin oluşturulması çatısı altında, patojen spesifik bakteriyosinlerin saflaştırılarak ileri karakterizasyonu ve bakteriyosin kokteylinin süt model sisteminde antibakteriyel etkisinin belirlenmesidir.

Yukarıda belirtilen amaçlar doğrultusunda ulaşılmak istenen hedefler ise maddeler halinde sıralanmıştır.

- 1) Laktik asit bakterileri tarafından üretilen patojen spesifik bakteriyosinlerin izolasyonu, saflaştırılması ve ileri karakterizasyonu yapılarak moleküler düzeyde tanımlanması.
- 2) Bakteriyosinlerin biyoreaktör sistemlerinde üretimi, saflaştırılması ve kokteylin hazırlanması.
- 3) Patojen spesifik antibakteriyel aktiviteye sahip bakteriyosinlerden bir karışım hazırlanarak gıda üretim sistemleri için kullanılabilecek geniş antibakteriyel spektrumlu bakteriyosin kokteylinin üretimi.
- 4) Antibakteriyel etki spektrumu ve mekanizması dikkate alınarak seçilecek bakteriyosin kokteyllerinin süt model sisteminde patojen bakterilerin inhibisyonu için kullanılması, bu kapsamda antibakteriyel etkinin *in vivo* izlenmesi ve performansının artırılmasıdır.

1.2 Literatür Özeti

Tüm canlı varlıklar, antibakteriyel proteinler üretmektedirler ve birçoğu da küçük moleküler kütleleri nedeniyle antibakteriyel peptidler olarak adlandırılırlar (Chikindas ve diğ. 2018). Bakteriyosinler, çeşitli bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenerek ekstrasellüler olarak ortama salgılanan ve genelde yakın akraba türleri inhibe eden peptid veya protein yapıdaki antibakteriyel metabolitlerdir (Delves-Broughton ve diğ. 1996, Zou ve diğ. 2018). Gram pozitif, Gram negatif bakteriler ve hatta arke bakterilerin de bakteriyosin ürettikleri tespit edilmiştir (Juturu ve Wu. 2018). Bakteriyosinler, prokaryot mikroorganizmaların gelişimini engelleyerek veya durdurarak etki ederken, patojen özellikli antibiyotik dirençli bakterilere karşı da etkilidirler (Zou ve diğ. 2018). Birçok farklı bakteri tarafından üretilen bakteriyosinlerin, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) ve vankomisin dirençli enterokokları (VRE) da içine alan insan ve hayvan patojenlerine karşı etkili olduğu ve toksisite göstermedikleri bildirilmiştir (Ahmad ve diğ. 2017, Zou ve diğ. 2018). Bakteriyosinler aynı zamanda yararlı bakteriyel popülasyonların oluşmasında da rol oynamaktadırlar (Balciunas ve diğ. 2013). İlk tespit edilen bakteriyosin, 1925 yılında Gratia tarafından yapılan çalışmada *Escherichia coli* tarafından üretilen antibakteriyel protein olan colicin'dir (Balciunas ve diğ. 2013, Cavera ve diğ. 2015, Juturu ve Wu. 2018).

Bakteriyosinler, üretici mikroorganizma türü, aminoasit kompozisyonu, post translasyonel modifikasyon varlığı, moleküler kütlesi, ısı stabilitesi, etki mekanizması ve antibakteriyel spektrumları gibi birçok farklı özelliklerine göre sınıflandırılabilirler (Juturu ve Wu. 2018, Zou ve diğ. 2018). Bakteriyosinlerin sınıflandırılması ilk olarak Klaenhammer (1993) tarafından LAB'nin ürettiği bakteriyosinler için gerçekleştirilmiştir. Bu sınıflandırma daha sonra Cotter ve diğ. (2005) ve Heng ve Tag (2006) tarafından modifiye edilerek güncellenmiştir. 2016 yılında Alvarez-Sieiro ve diğ. tarafından bakteriyosinlerin sınıflandırılması revize edilmiştir. Son olarak Varella Coelho ve diğ. (2017) bakteriyosinleri kimyasal yapıları ve moleküler kütlelerine göre beş farklı grupta sınıflandırmışlardır (Zou ve diğ. 2018, Vasilchenko ve Valyshev 2018).

Laktik asit bakterileri, düşük G+C oranına sahip, Gram pozitif, fakültatif anaerob, sporsuz ve asit tolerant olan türleri içeren heterojen bir gruptur. Karbohidratları heterofermentatif veya homofermentatif yolla laktik aside indirgerler. Heterofermentatif türleri yan ürün olarak asetik asit, formik asit, etanol ve karbondioksit oluşturabilmektedir. Bitkisel ve hayvansal hammaddelerin fermentasyonunda endüstriyel starter kültür olarak kullanılan bu bakteriler; *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* olarak adlandırılan 12 cins içermektedir. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* cinsi üyeleri, fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (De Vuyst ve Leroy 2007). LAB fermente gıda ürünlerindeki yapısal ve aromatik özelliklerin iyileştirilmesi yönündeki katkılarının yanında, ürettikleri çeşitli antibakteriyel metabolitler aracılığıyla ürünü mikrobiyal bozulmalara veya oluşabilecek mikrobiyal hastalık risklerine karşı korumaktadır. Yapılan çalışmalarda LAB'nin laktik asit, H₂O₂, diasetil ve en önemlisi bakteriyosin üretimiyle antibakteriyel niteliğe sahip oldukları rapor edilmiştir (Gálvez ve diğ., 2007). LAB'nin bilinen en önemli antibakteriyel metabolitleri bakteriyosinlerdir. 1933 yılında, Whitehead, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen bakteriyosini nisin olarak adlandırmıştır (Juturu ve Wu. 2018). LAB tarafından üretilen bakteriyosinler özellikle gıda endüstrisinde daha çok kullanım alanı bulmuştur. Bunun nedeni ise; ilk olarak, fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılmaları ve birçoğunun genel olarak güvenli (GRAS) ve güvenli

olarak nitelendirilmiş (QPS) statüde yer almaları, ikinci olarak, LAB bakteriyosinlerinin birçok bozulma etmeni ve patojen bakteriye karşı nanomolar konsantrasyonda öldürücü etkili olmaları ve son olarak da gıdaların duyuşal özelliklerine etki etmemeleridir (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016, Field ve diğ. 2018). Nisin, 1988 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından krem peynirlerde kullanılması amacıyla onaylanmıştır (Juturu ve Wu. 2018, Zou ve diğ. 2018). *L. lactis* tarafından üretilen nisin Amerika ve Kanada dahil 48 farklı ülkede, *Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen pediocin ve *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 tarafından üretilen üç bakteriyosinin (lactococcin A, carnobacteriocin BM1 ve piscicolin 126) kombinasyonundan oluşan micocin yine Amerika ve Kanada’da ticari amaçla kullanılmaktadır (Zou ve diğ. 2018).

Bütün bu bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerden, gıdaların korunması amacıyla ya üretici suşların doğrudan kullanılmasıyla ya da kısmi saflaştırılmış bu peptidlerin ilavesi ile faydalanılmaktadır (O’Shea ve diğ. 2013). Bunun yanında bakteriyosin üreten LAB’yi içeren ticari preparatların biyokoruyucu starter kültür olarak kullanımı da mevcuttur.

Bu bölümde ilk olarak bakteriyosinler hakkında genel bilgiler paylaşılacak ve ardından yeni nesil bakteriyosinlerden bahsedilerek, sınıflandırılmaları hakkında bilgi verilecektir. Ardından bakteriyosinlerin etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılacak, gıda sistemlerinde kullanımlarına yönelik uygulamalardan bahsedilecek ve patojenlerin gıdalarda meydana getirdiği sorunlar ele alınacaktır.

1.2.1 Gram Pozitif Bakterilerin Ürettiği Bakteriyosinler

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, biyosentez mekanizmaları ve biyolojik aktiviteleri göz önünde bulundurularak üç ana gruba ayrılmıştır (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016). İlk grup, ribozomal olarak sentezlenen ve posttranslasyonel olarak modifiye edilen peptidleri (< 10 kDa), ikinci grup modifiye olmamış bakteriyosinleri (< 10 kDa) ve son olarak üçüncü grup 10 kDa üzerinde moleküler kütleyle sahip modifiye olmamış bakteriyosinleri içermektedir.

1.2.1.1 Grup I

Birinci grup, enzimatik modifikasyonlar sonucu biyosentezlenen, sıradışı aminoasitler, glikosile olmuş birimler ve siklik yapıda peptidler içeren bakteriyosinlerden oluşmaktadır (Vasilchenko ve Valyshev 2018).

Grup Ia veya lantipeptidler olarak adlandırılan grup, yapılarında bilinen aminoasitler dışında lanthionin (Lan) ve beta metil lanthionin (MeLan) türevlerini içermektedirler (Arnison ve diğ. 2013). Lantipeptidler posttranslasyonel olarak modifiye edilirler ve bu nedenle dört farklı tipleri mevcuttur. Fakat bunlardan sadece tip I ve tip II olanlar lantibiyotikler olarak adlandırılırlar (Cotter ve diğ. 2005, Wiley ve Vander 2007, Heng ve diğ. 2007). Tip I lantibiyotikler net pozitif yük ve hidrofobik polipeptid yapısına sahiptir. Hedef hücrelerde membranda porlar oluşturmak suretiyle antibakteriyel etki göstermektedirler. Tip I lantibiyotikler kendi arasında Ia ve IIa olarak iki gruba ayrılırlar. Bu ayrım modifikasyon enzimleri ve biyosentetik yol farkına göre yapılmaktadır (Pag ve Sahl 2002). Tip II lantibiyotikler de yüksüz veya negatif yüklüdürler ve globüler peptid yapıdadırlar. Antibakteriyel aktivitelerini, spesifik enzimleri inhibe etmek suretiyle gösterirler (Twomey ve diğ. 2002). LAB tarafından çok sayıda farklı lantibiyotik üretilmektedir. Tip I lantibiyotiklerin en bilinen örneği, fazlaca çalışılmış ve pekçok ülkede gıda koruyucusu olarak kullanılmasına izin verilmiş olan nisin (Nes ve diğ. 2007). İki farklı nisin varyantı (nisin A ve nisin Z), *L. lactis* tarafından, Nisin U olarak adlandırılan diğer varyant ise *Streptococcus uberis* tarafından üretilmektedir, Nisin U, Nisin A ile % 78 oranında benzerdir (Wirawan ve diğ. 2006). Bir diğer lantibiyotik ise en iyi çalışılmış tip II lantibiyotik olan yine *L. lactis* tarafından üretilen lacticin 3247'dir. Birçok lantibiyotik etki mekanizması hücre duvar yapısında yer alan lipid II molekülünü hedef almaktadır. Bu gruptaki diğer önemli bakteriyosinler ise lacticin 481, mutacin A ve duramycindir (Siegers ve diğ. 1996, Oscariz ve Pisabarro 2001).

Grup Ib, bakteriyosinlerinin N- teminal ve C- terminal uçları peptid bağı ile birbirine bağlanmıştır. Bu nedenle halkasal bir molekül yapısına sahiptirler. Bütün üyeleri alfa heliks bölümlerden oluşmaktadır. Bu bakteriyosinler de ribozomal olarak sentezlenmekte ve bu sebeple gramicidin-S ve microsubtilin gibi enzimatik yollarla sentez edilen siklik antibakteriyel peptidlerden net bir şekilde farklıdırlar. (Mogi ve Kita 2009). Bu bakteriyosinler, N ve C terminalleri halkasal yapı meydana getirmek

için kovalent bağlanan bakteriyosinlerdir. X-ray ve NMR analizleri *Enterococcus faecalis* tarafından üretilen enterocin AS-48 ve lactococcin A bakteriyosinlerinin bu grupta yer aldığını göstermiştir (Kawulka ve diğ. 2003, Jimenez ve diğ. 2005, Martin-Visscher ve diğ. 2009, Van Belkum ve diğ. 2011). Bu peptidler genel olarak ısı stabiliteye sahip, proteolitik enzimlere karşı dirençli ve antilisteriyal aktiviteye sahiptirler. Günümüze kadar tanımlanan halkasal bakteriyosinlerden altı tanesi LAB orijinli olup (enterocin AS-48, enterocin 4, gassericin A, lactococcin A, lactocyclicin Q, reutericin 6), diğer ikisi *Butyrivibrio fibrisolvens* tarafından üretilen butyrivibriocin AR10 ve *Clostridium beijerinckii* tarafından üretilen circularin A'dır (Cotter ve diğ. 2005, Martin-Visscher ve diğ. 2009, Rea ve diğ. 2011). Halkasal bakteriyosinlerin benzer yapılarına rağmen, iki farklı etki mekanizması bulunmaktadır. Lactococcin A, proton motive gücün kaybedilmesine bağımlı olarak bakteriyel membranda por oluştururken, enterocin AS-48, bakteriyel membran üzerinde dimer oluşturarak yapının değişmesine neden olmaktadır.

Grup Ic, diğer adıyla saktibiyotikler sülfür-alfa karbon atomu ihtiva eden peptidlerdir. Bu grupta subtilosin A, thuricin CD ve H bakteriyosinleri yer almaktadır. *Bacillus subtilis* tarafından üretilen subtilosin A, negatif yüke sahip, siklik bir bakteriyosindir. Buna rağmen post-translasyonel modifikasyon içermesi sebebiyle bu grupta yer almaktadır (Marx ve diğ. 2001, Kawulka ve diğ. 2003, Martin-Visscher ve diğ. 2009). Grup üyelerinden iki peptidli bakteriyosin, *Bacillus thuringiensis* 6431 tarafından üretilen thuricin CD, sistein residüleri arasında alfa karbon köprüleri ihtiva etmektedir ve *Clostridium difficile*'e karşı antibakteriyel etkiye sahiptir (Rea ve diğ. 2011). Yine *B. thuringiensis* tarafından üretilen thuricin H tek peptidli 4S-alfa karbon bağları içeren bir bakteriyosindir. Subtilosin A hücre membranını hedef alıp geçici porlar oluşturarak etki gösterirken, thuricin H hücre membran geçirgenliği üzerinde etki etmemektedir.

Grup Id, lineer azol içeren peptidlerdir (LAPs). LAPs, ATP bağımlı siklodehidrasyon ve sonrasında flavin mononükleotid bağımlı dehidrogenasyon ile oluşan sistein, serin ve treonin türevli tio-azol ve metiloksazol heterosiklik halkasal yapılarının farklı kombinasyonlarını içermektedirler. *Streptococcus pyogenes* tarafından üretilen streptolysin S bu grupta yer alan bakteriyosinlerdendir (Molloy ve diğ. 2015).

Grup Ie, Glycocinler olarak adlandırılmaktadır ve glikolize olmuş rezidüler içermektedir. *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen glycocin F, LAB tarafından üretilen ve tanımlanmış olan ilk glycocindir. Glycocin F, disülfid bağları ile birbirine bağlanmış iki adet alfa heliksten oluşmaktadır (Acedo ve diğ. 2018, Amso ve diğ. 2018).

Grup If, lasso peptidler olarak bilinmektedir. Lasso peptidler, core peptid zincirlerinde yer alan ilk aminoasitlerinde amid bağı ve polipeptidin C-terminal lineer bölümünü halkasal yapı ile saran negatif yüklü residüler içermektedir. Lasso peptidler antibakteriyel, antiviral ve antikanser gibi çok çeşitli aktiviteler göstermektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda LAB tarafından üretilen bir lasso peptid bildirilmemiştir (Acedo ve diğ. 2018, Mesa-Pereira ve diğ. 2018).

1.2.1.2 Grup II

İkinci grup, sıradışı modifikasyonları içermeyen ve 10 kDa'nın altında moleküler kütleyle sahip bakteriyosinleri içermektedir (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016). Grup II bakteriyosinleri modifiye olmamış türlerdir. Ribozomal olarak sentezlenen antibakteriyel peptidlerin çoğunluğunun oluşturduğu, küçük, ısıya dayanıklı bakteriyosinleri kapsamaktadır. Grup II bakteriyosinler post-transyonel modifikasyon ihtiva etmemeleri, bakteriyosin, immunité ve transport genlerine sahip olmaları nedeniyle yapıları lantibiyotiklerden daha basittir. Bu grup bakteriyosinler 4 alt gruba ayrılmaktadır. Grup IIa; pediocin benzeri güçlü antilisteriyal bakteriyosinleri, Grup IIb; iki peptid bakteriyosinleri, Grup IIc; öncü grup içermeyen bakteriyosinleri ve Grup IId ise pediocin benzeri olmayan diğer lineer bakteriyosinleri kapsamaktadır (Rea ve diğ. 2011, Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016).

Grup II bakteriyosinlerinin en geniş grubunu Grup IIa bakteriyosinleri oluşturmaktadır. *Listeria* inhibe eden pediocin benzeri bakteriyosinler olarak bilinmektedirler (Ennahar ve diğ. 1999, Drider ve diğ. 2006). Farklı aminoasit içeriklerine sahip, 10 kDa'dan küçük, yüksek sıcaklıklara ve ekstrem pH derecelerine dayanıklı bakteriyosinlerdir. Çeşitli LAB tarafından üretilen 30'a yakın pediocin benzeri bakteriyosin tanımlanmıştır (Nissen-Meyer ve diğ. 2009). *Pediococcus* cinsi üyelerinin pediocin benzeri bakteriyosinleri üretebildikleri tespit edilmiştir. Bu cins

içerisinde pediocin ürettiği rapor edilen türler; *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* ve *P. damnosus*'tur. Bu grupta tanımlanmış ve karakterize edilmiş bakteriyosinler enterocin A, leucocin A-UAL 187, mesentericin Y105, curvacin A, pediocin PA-1 ve sakacin P'dir (Hastings ve diğ. 1991, Hechard ve diğ. 1992, Henderson ve diğ. 1992, Tichaczek ve diğ. 1992, Aymerich ve diğ. 1996, Drider ve diğ. 2006, Nieto-Lozano ve diğ. 2010). Bu grubun üyeleri, aminoasit dizi benzerliği içermekte ve korunmuş amino terminal dizisi ile amino terminal ucunda sistein disülfid köprüsü ihtiva etmeleri nedeniyle farklıdırlar. Grup II bakteriyosinlerinin etki mekanizması üç temel basamaktan oluşmaktadır (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016). Pediocin, şeker taşıyıcı mannoz fosfotransferaz sistemi (Man-PTS) reseptörlerine bağlanır, stoplazmik membran içerisinden geçer ve son olarak da por kompleksini oluşturur. Antilisteriyal etkileri bulunan ve Gram pozitif bakterilere bakteriosidal etkili olan pediocin benzeri bakteriyosinler muhtemelen, hücre zarını hedef almakta ve spesifik bağlanma bölgesine bağlanarak etki etmektedirler. Grup IIa bakteriyosinlerinin sahip oldukları YGNGV aminoasit dizisi bu diziyi tanıyan spesifik bir zar reseptörüne bağlanmaktadır (Papagianni 2003). Grup IIa bakteriyosin mutantları ve analogları ile yapılan çalışmalar, tüm dizinin ve üç boyutlu yapının etkileşimde önemli olduğunu göstermiştir. Üç boyutlu yapı hücre zarı üzerinde özellikle, özel bölgelere bağlanmak suretiyle etki eden bakteriyosinler için son derece önemli olmakta ve bakteriyosinler hücre duvarından geçebilmektedir. Hücre duvarından geçen bakteriyosinler sitoplazmik zarla temas sonucunda zarın fonksiyonunu bozmaktadırlar. Bunun neticesinde, zar taşıma mekanizması ve proton itici kuvvet (PMF) bozulmaktadır. En nihayetinde hücre lizisi meydana gelmektedir. Tüm bu olaylar enerji üretimini engellemekte ve nükleik asit, protein gibi temel yapı taşlarının biyosentezinin durmasına neden olmaktadır (Hill ve diğ. 2011). Pediocinler genellikle dar antibakteriyel spektruma sahiptir. Pediocinler özellikle *Listeria*'ya karşı yüksek inhibitif etkili olarak bilinirler. Ancak bu bakteriyosinlerin diğer Gram pozitif bakteriler üzerinde de çeşitli seviyelerde antibakteriyel etkisinin olduğu saptanmıştır. Yapılan spektrum çalışmalarında pediocinlerin *Listeria* dışında *Clostridium sporogones*, *Clostridium thiaminolyticum* ilaveten *B. cereus*, *E. faecalis*, *Staphylococcus carnosus* gibi bakterilere karşı orta ve düşük seviyelerde antibakteriyel etkili oldukları belirlenmiştir (Drider ve diğ. 2006, Anastasiadou ve diğ. 2008).

Grup IIB iki peptidli bakteriyosinlerdir. İki peptidli bakteriyosinler de üç temel kriter esastır. İlk olarak; iki peptid birlikte daha yüksek antibakteriyel aktiviteye sahiptir, fakat tek başlarına da aktivite gösterirler (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016). Bunun yanı sıra bir immunité proteinini içerirler. Ayrıca genetik organizasyonlarında immunité genini takip eden iki bakteriyosin yapısal genleri bir arada bulunmaktadır (Nes ve diğ. 2007). Bu zamana kadar 16 farklı iki peptidli ve modifiye olmamış bakteriyosin tanımlanmıştır (Nissen-Meyer ve diğ. 2009). İki peptidli bakteriyosinlerin üç boyutlu olarak Grup IIA ve Grup IID tek peptidli bakteriyosinleriyle benzer fonksiyonlara sahip oldukları tespit edilmiştir (Rea ve diğ. 2011). *L. lactis* tarafından üretilen lactococcin G aktivite için iki peptide de ihtiyaç duyarken, *Streptococcus thermophilus* tarafından üretilen thermophilin 13'ün tek bir peptidi aktivite gösterirken, iki peptid birlikte iken ise aktivitesi artış göstermektedir. Lactococcin G, membranı penetre eden heliks yapısı hassas bakterilerin membranlarında yer alan reseptörlere tutunarak sızıntıya sebep olarak etki göstermektedir (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016).

Grup IIC, lider peptid içermeyen bakteriyosinlerdir. Bakteriyosinin salgılanmasında ve modifiye edilmesinde tanınma bölgesi olarak rol alan ve üretici hücre içerisinde inaktive olarak kalmasını sağlayan N-terminal lider peptid içermeyen sentezlenmektedirler. Enterocin L50, üzerinde çok çalışılmış ve iyi karakterize edilmiş plazmit kodlu iki peptidli lider peptid içermeyen bakteriyosinlerdendir (Perez ve diğ. 2018, Towle ve Vederas 2017).

Grup IID diğerlerinden farklı bakteriyosinlerdir. Bu bakteriyosinler diğer gruplara dahil olmayan, modifiye olmamış, lineer ve pediocin benzeri olmayan bakteriyosinleri içerir (Cotter ve diğ. 2005, Nissen-Meyer ve diğ. 2009). Grup IID bakteriyosinleri farklı kaynaklardan izole edilen antibakteriyel peptidleri içermektedir. İlk izole edilen bakteriyosin Lactococcin A'dır. Lactococcin A homolog bir diziye sahip değildir (Nissen-Meyer ve diğ. 2009). *Propionibacterium* spp. tarafından üretilen bakteriyosinler de bu gruba dahil edilmektedir (Heng ve diğ. 2007). Lactococcin 972 ısıya duyarlı, pH stabil olan bir bakteriyosindir. Hücre membranında yer alan lipid II molekülüne bağlanarak etki göstermektedir. Lactococcin A ise man-PTS sistemi reseptörlerine bağlanarak hücre membranını hedef almakta ve etki göstermektedir (Martinez ve diğ. 2000, Martinez ve diğ. 2008, Daba ve diğ. 2018).

1.2.1.3 Grup III

Üçüncü grup, 10 kDa üstünde moleküler kütleyle sahip, modifiye olmamış, bakteriyolitik ve bakteriyolitik olmayan etki mekanizmasına sahip bakteriyosinleri ihtiva etmektedir. Grup III bakteriyosinler bakteriyolizinler olarak adlandırılan, ısıl stabilitesi olmayan büyük moleküler kütleyle sahip antibakteriyel peptidlerdir. Bu grupta yer alan bakteriyosinler farklı domainlere sahiptirler. *Lactobacillus helveticus* tarafından üretilen helveticin J, *Streptococcus zooepidermicus* tarafından üretilen zoocin A, *E. faecalis* tarafından üretilen enterolysin A, *Streptococcus milleri* tarafından üretilen millericin B, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* W2580 tarafından üretilen dysgalacticin, *Brevibacterium linens* tarafından üretilen linocin M18 bu gruba dahil edilmektedir (Joerger ve Klaenhammer 1986, Valdes-Stauber ve Scherer 1994, Simmonds ve diğ. 1997, Beukes ve diğ. 2000). Bakteriyolitik bakteriyosinlerden enterolysin A ve benzer şekilde zoocin A N-terminalinde endopeptidaz domaini içerirken, C-terminalinde substrat tanıma domaini içermektedir (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016, Balciunas ve diğ. 2013). Hedef hücre duvar yapısında yer alan peptidoglikan tabakaya bağlanmak suretiyle antibakteriyel aktivite göstermektedirler. Bakteriyolitik olmayanlar ise, hücre lizisine sebep olmadan etki etmektedirler. Bu grupta yer alan dysgalacticinin, glukoz ve/veya Man-PTS sistemine bağlanması neticesinde, şeker alımı engellenir ve hücre içerisinde yer alan küçük moleküllerin membrandan sızmasına da neden olmaktadır (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016, Ahmad ve diğ. 2017). Yine bu grupta yer alan *Lactobacillus casei* tarafından üretilen caseicin ise farklı bir mekanizmayla, protein ve DNA biyosentez mekanizmalarını inhibe ederek etki etmektedir (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016). LAB dışında üretilen proteinlerden lisostaphin de yine bu gruba dahil edilmektedir (Bastos ve diğ. 2010, Rea ve diğ. 2011).

Tüm bu bilgiler ışığında LAB tarafından sentezlenen bakteriyosinlerin temel karakteristikleri şöyle özetlenebilir;

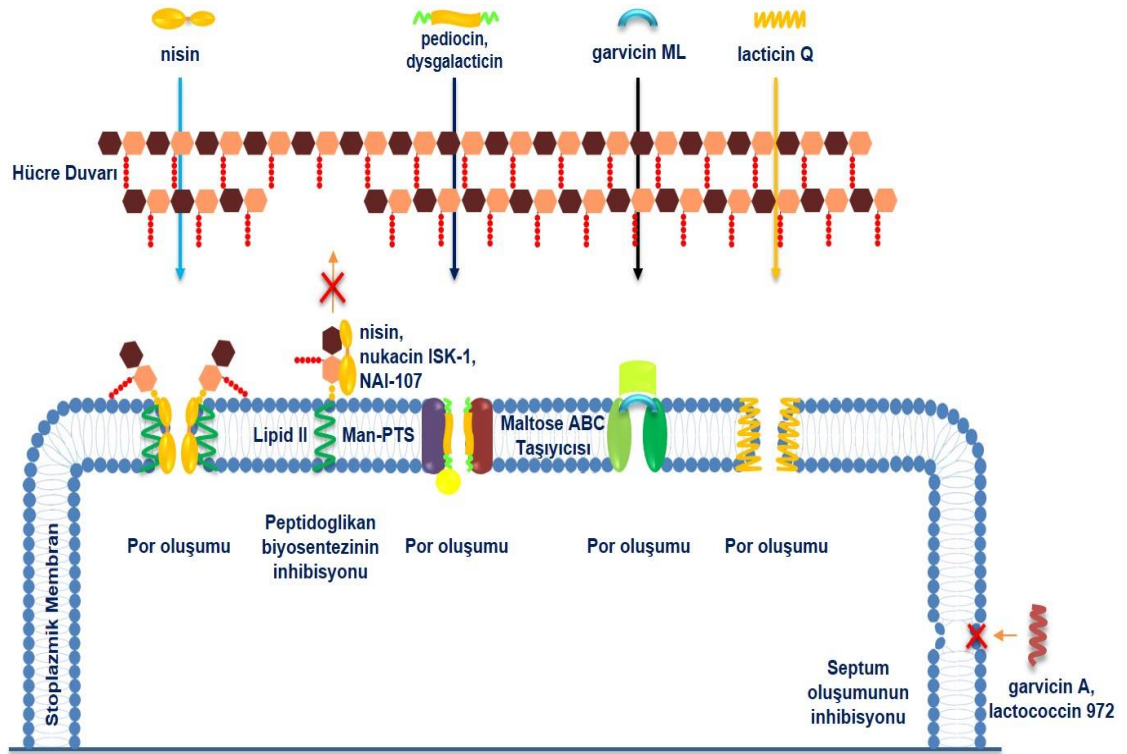
- 1) İnhibitör etki spektrumu hedef mikroorganizmaya spesifiktir.
- 2) İnhibitör etki, hücreye spesifik reseptörler ile ilgilidir.
- 3) Bakteriyosin üretimi ve üretici hücrenin bakteriyosin immunitesinin genetik belirleyicisi genellikle plazmid DNA kaynaklıdır. Bazı türlerde bakteriyosin

üretiminin kromozomal DNA kaynaklı olduğu da ifade edilmektedir (Barefoot ve Klaenhammer, 1983; Hastings ve diğ. 1991, Juven ve diğ. 1991).

1.2.2 Gram Pozitif Bakteriler Tarafından Üretilen Bakteriosinlerin Etki Mekanizmaları

Birçok farklı bakteri tarafından üretilen bakteriyosinler, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkilerini çok çeşitli mekanizmalarla göstermektedir. Bakteriyosinler, canlı hücreler için yaşamsal öneme sahip, transkripsiyon, translasyon, replikasyon ve hücre duvar biyosentezi gibi fonksiyonlar üzerine etki etmektedirler (Oscariz ve Pisabarro 2001, Cavaera ve diğ. 2015). Bakteriyosinlerin etki mekanizmalarındaki bu farklılıklar kimyasal yapılarındaki farklılıklardan dolayı meydana gelmektedir. Bu mekanizmalar esas olarak, hücre duvar yapısının bütünlüğünün bozulması, protein ve nükleik asit sentez mekanizmalarının inhibisyonu şeklinde gerçekleşmektedir (Ahmad ve diğ. 2017).

Bakteriyosinler genel olarak aktivitelerini yakın akraba türlere karşı göstermektedirler. Bu tip biyoaktiviteye sahip bakteriyosinler, dar spektrumlu olarak adlandırılmaktadırlar. Son dönemlerde, birçok bakteriyosinin çok sayıda cinsi içeren çeşitli bakterilere karşı aktivite gösterdikleri ve bu bakteriyosinlerin de geniş spektrumlu bakteriyosinler olarak adlandırıldığı belirtilmiştir. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler etki mekanizmaları bakımından sınıflandırıldığında, hücre duvar sentezini inhibe edenler, hücre membran yapısını bozanlar ve septum oluşumunu engelleyenler olarak gruplandırmak mümkündür (Şekil 1.1) (Cavaera ve diğ. 2015).



Şekil 1.1: Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin antibakteriyel etki mekanizmaları.

1.2.2.1 Hücre Duvarı Sentezini Engelleyen Bakteriyosinler

Hücre duvarı bakterilerin canlılığını sürdürmeleri adına çok önemli bir hücresel kısımdır. Öyle ki, hücresel bütünlüğün sağlanması, hücre morfolojisinin oluşması ve hücre içi ozmotik basıncın düzenlenmesi gibi hayati öneme sahip işlevleri bulunmaktadır. Bu nedenle hücre duvar biyosentezinin engellenmesi kritik bir hedeftir (Cavera ve diğ. 2015).

L. lactis tarafından üretilen nisin A, hücre duvar biyosentezini hedef alan bir lantibiyotiktir. Nisin A, membran bağlanma prekürsörü olup, peptidoglikan alt birimlerini sitoplazmadan, hücre duvarına taşıyan lipid II molekülüne bağlanarak hücre duvar biyosentezini inhibe etmektedir (Perez ve diğ. 2018). Nisin lipid II molekülünde yer alan fosfat gruplarına bağlanmaktadır (Guilhelmelli ve diğ. 2013). Nisin-lipid II kompleksi, daha yüksek konsantrasyonlarda bakteri hücre membranında por oluşturmak suretiyle etki göstermektedir.

Benzer şekilde *Staphylococcus warneri* tarafından üretilen, nukacin ISK-1 hücre duvarı biyosentezini lipid II molekülüne bağlanarak inhibe etmektedir.

Nukacinin farklı konsantrasyonlarının hücre membranında por oluşturmadığı bildirilmiştir. Bu bakteriyosinin metisilin dirençli *S. aureus* biofilmlere karşı etkili olduğu belirtilmiştir. Bakteriyosinin lipid II molekülüne bağlanmasında nisin yapısının A halkasının sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Cavera ve diğ. 2015).

Microbispora sp. türü ATCC-PTA-5024 bakterisinin ürettiği lantibiyotik, NAI-107 bakteriyosini, hücre membranında yer alan lipid II molekülüne bağlanarak, vankomisin dirençli enterokoklar ve metisilin dirençli stafilokokların gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Münch ve diğ. 2014, Thomsen ve diğ. 2016).

Lantibiyotikler içerisinde yer alan ve *L. lactis* tarafından üretilen lacticin 481 bakteriyosini ise, lipid II bağlanma motifi içermesine rağmen, penisilin bağlanma proteini tarafından katalize edilen peptidoglikan oluşumunu inhibe ederek etki göstermektedir (Dimov ve diğ. 2005, Silva ve diğ. 2018).

1.2.2.2 Bakteri Membran Bütünlüğünü Bozan Bakteriyosinler

Bakteriyosinlerin hedef hücrelerin membranı üzerinde temelde iki etki mekanizması mevcuttur. Söz konusu etki mekanizmaların ilki, spesifik bağlanma noktası gerektirmeksizin, sadece kütle etkisine bağlı olarak hücre membranının yapısını tahrip etmek suretiyle gerçekleşen inhibisyon şeklidir. Bu etki mekanizması bakteriyosinlerin yüksek konsantrasyonda bulunması durumunda meydana gelir. Bakteriyosinleri önemli kılan diğer etki mekanizması ise, özellikle hedef hücrelerin antilisteriyal bakteriyosinlerde görülen ve spesifik bağlanma bölgesine ihtiyaç duyan inhibisyon şeklidir.

Membran bütünlüğünü hedef alan birçok bakteriyosin, bağlanma bölgesi olarak lipid II molekülünü kullanmaktadır. Bunlar içerisinde en iyi bilineni nisindir. Nitekim nisin hücre yüzeyinde bu moleküle tutunduktan sonra sitoplazmik membrana transloke olmaktadır. Bakteriyosinlerin sahip olduğu bu antibakteriyel etki sonucunda proton itici kuvvetin bozulması ve çeşitli iyon kayıpları ile hücresel elektrolitin düşüşü ortaya çıkmaktadır. Oluşan porlardan, aminoasitler, potasyum iyonları ile ATP hücre içinden dışına sızmaktadır (Jack ve diğ. 1995, Cuesta ve diğ. 2000, Sullivan ve Nord 2005, Guilhelmelli ve diğ. 2013). Bu şekilde etki eden, nisin dışında, plantaricin, epidermin ve geobacillin gibi birçok bakteriyosin yer almaktadır.

Bac-GM17, *Bacillus clausii* GM17 tarafından üretilen, pH (pH 3-9) ve ısı stabilitesi olan bir bakteriyosindir. Birçok Gram pozitif ve negatif bakteriye karşı bakterisidal ve *Candida tropicalis* R2 CIP203 mayasına karşı ise antifungal aktiviteye sahiptir. *Staphylococcus epidermidis* 5 bakterisi tarafından üretilen Pep5 ve *S. epidermidis* Tu3298 tarafından üretilen epidermin, bakteriyosinleri, silikon kateterlerde *S. epidermidis* gelişimini inhibe etmektedir. Geobacillin I, *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 tarafından üretilen yapısal ve fonksiyonel olarak nisinle benzer bir bakteriyosindir. Benzer şekilde plantaricin E, F, J ve K, *L. plantarum* tarafından üretilen dört farklı bakteriyosin anticandida aktivitesine sahiptirler ve bu aktiviteyi lipid II molekülüne bağlanmak suretiyle gerçekleştirmektedirler (Cavera ve diğ. 2015).

Membran bütünlüğünü bozmak suretiyle antibakteriyel etki gösteren bütün bakteriyosinler, bu etkiyi lipid II molekülüne bağlanmak suretiyle gerçekleştirmektedirler. *S. dysgalatiae* subsp. *equimilis* W2580 tarafından üretilen dysgalacticin membrana bağlı glukoz molekülüne ve/veya man-PTS sistemine bağlanmaktadır. Man-PTS sistemine bağlanan dysgalacticin, stoplazmik membran yapısını bozarak potasyum iyonlarının dışarı sızmasına neden olmakta ve bu nedenle de membran artık işlevselliğini kaybetmektedir. Lactococcin A ve B ile pediocin ve pediocin benzeri bakteriyosinler de aktiviteleri için man-PTS sistemine bağlanmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi Grup IIa içerisinde değerlendirilen pediocinler katyonik peptidler olup benzer primer yapıya sahiptir. Pediocinlerin iki önemli yapısal bölgesi bulunmaktadır. Bunlar yüksek korunmuş olan ve -YGNGV-konsensus motifini içeren N-terminal ile daha az korunmuş olan C-terminal bölgeleridir. Her iki ayrı bölge de özellikleri dolayısıyla pediocinlerin antibakteriyel mekanizmasıyla doğrudan etkilidir. Pediocin yapısında pozitif yüklü rezidüer genellikle hidrofilik N-terminal kısımdadır. Dolayısıyla bu bölgenin elektrostatik intereaksiyonu pediocinlerin fosfolipit yapıya bağlanmasını sağlamaktadır. Pediocinlerin C-terminali ise hedef hücrenin belirlenmesinde önem taşımaktadır. (Quadri ve diğ. 1997; Chen ve diğ. 1997; Miller ve diğ. 1998; Uteng ve diğ. 2003; Drider ve diğ. 2006).

Lacticin Q, *L. lactis* QU 5 tarafından üretilen bakteriyosin, stoplazmik membranda yer alan lipidlerin yer değiştirmesi sonucunda toroidal porlar oluşturmaktadır. Oluşan toroidal porlar neticesinde, hücre içi proteinlerin hücre dışına

sızması ile spesifik bir reseptöre ihtiyaç duymadan hücre ölümü gerçekleşmektedir (Zendo 2013, Iwatani ve diğ. 2016).

Lactococcus garvieae tarafından üretilen garvicin ML bakteriyosinin hücre yüzeyinde yer alan maltoz ABC taşıyıcı sistemi ile yüksek hassasiyetle etkileşime girdiği ve bu bakteriyosin için bir hedef reseptör bölge olduğu belirtilmiştir. Garvicin ML bakteriyosini maltoz ABC taşıyıcı sistemini reseptör olarak tanımakta ve por oluşturmak suretiyle etki etmektedir (Gabrielsen ve diğ. 2014).

E. faecalis tarafından üretilen enterocin AS48, hedef hücre membranında suda çözünür halde dimer oluşturmaktadır. Suda çözünen halde oluşan dimer daha sonra, membrana bağlı hale geçmektedir. Bu sayede oluşan yapı hücre içine girebilmesine imkan tanımaktadır. Enterocin AS48 por oluşum mekanizmasında herhangi bir özel reseptöre ihtiyaç duymamaktadır. Bu nedenle etkisini direkt olarak lipid bilayer tabakayla etkileşime girerek göstermektedir (Burgos ve diğ. 2014). Benzer şekilde özel bir reseptöre ihtiyaç duymadan direkt lipid bilayer tabaka ile etkileşime girerek iyon-spesifik porlar oluşmasına neden olan carnocyclin A, *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 tarafından üretilmektedir (Martin-Visscher ve diğ. 2009).

1.2.2.3 Septum Oluşumunu İnhibe Eden Bakteriyosinler

Bakteriyosinler, genel olarak canlı hücreler için yaşamsal öneme sahip, transkripsiyon, translasyon, replikasyon ve hücre duvar biyosentezi gibi fonksiyonlar üzerine etki etmektedirler (Oscariz ve Pisabarro 2001). Bakteriyosinler için yeni hedeflerin keşfedilmesi, patojenler ile mücadelede onları daha etkili kılacaktır. Her geçen gün bakteriyosinlerle alakalı yeni etki mekanizmaları ve dolayısıyla yeni hücrel hedefler tanımlanmaktadır. Garvicin A ve lactococcin 972, yakın akraba türlerinde septum oluşumunu inhibe ederek antibakteriyel etki göstermektedirler. Garvicin A, *L. garvieae* tarafından üretilmektedir ve diğer *L. garvieae* türlerine karşı etkilidir. Lactococcin 972 *L. lactis* tarafından üretilmekte olup, sadece yakın akraba olan *Lactococcus* türleri üzerinde etkili olmaktadır. Lactococcin 972, etki mekanizması septum oluşumunun bloke edilmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Martinez ve diğ. 2008, Madera ve diğ. 2009, Maldonado-Barragán ve diğ. 2013).

1.2.3 Gram Pozitif Bakteriler Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Uygulamaları

Son yıllarda tüketiciler tarafından minimum işlem görmüş gıdalara artan talep sonucunda, bakteriyosinler gıdaların muhafazasında çokça tercih edilmeye başlamıştır. Bakteriyosinlerin antibakteriyel aktivitelerinin yanı sıra, doğal süreçler sonucu üretilmeleri, gıdaların tat, koku ve tekstüründe değişikliğe meydan vermemeleri nedeniyle yaygın olarak kullanımları söz konusudur. Peptid veya protein tabiatında olmaları nedeniyle, proteolitik enzimler ve mide salgıları tarafından parçalanabildiklerini ve insanlar tarafından sindirilebilir olduklarını göstermektedir. Bunun yanı sıra bazı bakteriyosinlerin ısıya karşı stabil olmaları ve hatta otoklav sıcaklıklarında bile stabil kalmaları nedeniyle yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliklerini arttırmaktadır. Dolayısıyla bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok farklı gıda maddesinde kullanımları mümkündür. Gıdalarda bakteriyosinler farklı şekillerde kullanılabilirler. Doğrudan gıdalara ilave edilebildikleri gibi, bakteriyosin üretici koruyucu kültürlerin gıdaya ilavesiyle veya koruyucu ambalaj materyaline immobilize edilerek de kullanılabilirler (Zacharof ve Lovitt 2012, O'Shea ve diğ. 2013).

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler içerisinde, dikkati üzerine çeken grup LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. Bunun nedeni ise, LAB fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılmaları, birçoğunun genel olarak güvenli (GRAS) ve güvenli olarak nitelendirilmiş (QPS) statüde yer almaları, LAB bakteriyosinlerinin birçok bozulma etmeni ve patojen bakteriye karşı nanomolar konsantrasyonda öldürücü etkili olmaları ve son olarak da gıdaların duyu özelliklerine etki etmemeleridir (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016, Field ve diğ. 2018). Şu ana kadar gıdalarda kullanımına izin verilmiş olan LAB bakteriyosinleri, nisin ve pediocin olmasına karşılık, yapılan çalışmalarda bazı diğer LAB bakteriyosinlerinin de gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanılmak üzere umut vaat edici sonuçlar verdiği ve çeşitli avantajlar sunduğu belirtilmektedir (Alvarez-Sieiro ve diğ. 2016).

Bakteriyosinler gıda sistemlerinde farklı şekillerde kullanılabilirler. Gıdalara saflaştırılmış olarak direkt ilave edilmek suretiyle uygulanabilmektedir. Nisine ait saf ya da yarı saf preparatlar çeşitli ülkelerde farklı ticari isimlerle üretilmekte ve dünyanın pekçok yerinde gıdalara doğrudan ilave edilerek

kullanılmaktadır. Bakteriyosinlerin diğ er bir kullanım Őekli, bakteriyosin içeren fermentasyon ürününün konsantre edilmesi sonucu elde edilen fermentatın kullanılması Şeklinde olmaktadır. Yine bu Şekilde pediocin üretici fermentasyon ürününün kullanıldığı örnekler mevcuttur. Son olarak, bakteriyosin üretici kültürler starter kültür, ilave kültür ya da koruyucu kültür olarak gıdalara ilave edilebilirler. Tüm bu uygulamaların dışında, bakteriyosinlerin gıdaların ambalajlanması basamağında ambalaj materyal yapısına dahil edilerek de kullanımları söz konusudur.

LAB tarafından üretildiği tespit edilmiş birçok bakteriyosin olmasına rağmen, en çok uygulama alanı bulan bakteriyosin, gıdalarda kullanımına izin verilmiş olan nisindir. Nisin, lantibiyotikler grubuna dahil olan ve *L. lactis* tarafından üretildiği tespit edilen ilk bakteriyosindir. Nisinin geniş etki spektrumu nedeniyle gıda sanayiinde koruyucu, sağlık alanında terapötik olarak kullanımı mevcuttur. Nisin FDA tarafından GRAS (Genel olarak güvenli) statüsünde tanımlanmış ve EFSA tarafından belgelendirilerek (E234) kullanımına izin verilmiştir (Field ve diğ. 2015). Nisin halen 50'den çok ülkede süt ürünleri, konserve gıdalar ve hazır çorbalarda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bunun yanısıra diŐ macunu ve sargı bezleri gibi birçok sağlık ürününde de kullanılmaktadır (Delves-Broughton ve diğ. 1996, Zou ve diğ. 2018). Nisin, peynirlerde *L. monocytogenes* inhibisyonu için ve et ürünlerinde ise *Clostridium botulinum* gelişiminin engellenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Nitekim Mitra ve diğ. (2010) tarafından yapılan çalışmada, nisin pastörize süt içerisine ilave edilmiş ve pastörizasyon sonrasında canlılığını koruyan ve bozulmaya neden olan bakterilerin tespit edilemez düzeylere kadar inhibe edildiği bildirilmiştir. Böylece pastörize sütün raf ömrü buzdolabı koşullarında 2 aya kadar uzatılabilmiŐtir. Dal Bello ve diğ. (2012)'nin yaptığı çalışmada çeşitli İtalyan fermente gıdalarından izole edilen bakteriyosin üreticisi suşlar kullanılmıştır. Nisin A, nisin Z ve lacticin 481 üreticisi suşların süzme peynirlere starter kültür olarak ilave edilmesi sonucu *L. monocytogenes* ve diğ er patojen bakterilerin gelişiminin başarılı bir Şekilde kontrol altına alındığı bildirilmiştir. Nisinin geniş etki spektrumu aynı zamanda starter kültür olarak da kullanılan LAB'de hedef almaktadır. Özelikle süt ürünlerinde ve diğ er fermente gıdalarda nisin kullanımı sınırlıdır (Silva ve diğ. 2018). Bu nedenle, farklı izolasyon stratejileri ile yeni bakteriyosinlerin tespit edilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu bakteriyosinlerin, hedefe yönelik ve daha dar spektrumlu olmaları,

farklı gıda sistemlerinde stabilitesini korumaları, LAB'a karşı etkili olmamaları ve ısı işlemlere karşı dayanıklı olmaları beklenen belli başlı özellikleri olabilecektir.

Lacticinler, *L. lactis* türleri tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. Bu grupta iki bakteriyosin yer almaktadır. Bunlar lacticin 3147 ve lacticin 481'dir. Toz halinde olan lacticin 3147, bebek sütü, cottage peyniri ve yoğurda ilave edilmiş ve *Listeria* ve *Bacillus* bakterilerinin kontrol altına alınmasında başarılı olduğu bildirilmiştir. Lacticin 481, orta derecede etki spektrumuna sahip ve *Clostridium tyrobutyricum* ve *L. monocytogenes* patojenlerine karşı etkili bir bakteriyosindir. Kısmi saflaştırılmış lacticin 481 preperatı, buzdolabı koşullarında muhafaza edilen taze peynirlerde *L. monocytogenes* sayısını 3-7 gün içerisinde 3 logaritma düşürdüğü tespit edilmiştir (Silva ve diğ. 2018). Sarika ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmada *L. lactis* PSY2 suşunun ürettiği PSY2 bakteriyosininin 1,600 AU/ml'lik solüsyonundan *Epinephelus diacanthus* balığı fletolarına 2 ml sprey halinde püskürtülmüş, paketlenmiş ve 4 °C'de depolanmıştır. Bakteriyosinle muamele edilen örneklerin kontrol örneklerine göre muhafaza süresinin 7 gün uzadığı tespit edilmiştir. 14 günlük depolama süresince bozulmaya neden olan bakteri sayısında kontrol örneğine kıyasla 2,5 logaritmalık bir azalma tespit edilmiştir.

Lactobacillus reuteri tarafından üretilen reutericyclin, düşük moleküler kütleyle sahip, hedef hücrelerin stoplazmik membranlarını hedef alan ve birçok Gram pozitif ve negatif bakteriye ve hatta bazı maya ve küflere karşı etkili olan bir bakteriyosindir. Patojen bakterilerden, *S. aureus*, *Listeria innocua* ve *Enterococcus faecium* reutericyclin tarafından hedef alınan mikroorganizmalardandır. Reutericyclin için minimum inhibe edici konsantrasyon 0,06-2,5 mg/L arasında değişmektedir (Bharti ve diğ. 2015).

Benzer şekilde farklı *Pediococcus* türleri tarafından üretilen pediocinlerde umut vaat edici şekilde gıdalarda bulunan patojenlere karşı etkili olmaktadır. Peynirler, et ve et ürünleri ve çeşitli fermente gıdalarda özellikle *L. monocytogenes*'in sebep olduğu problemlerin önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Pediocinler, antilisteriyal ya da listeria aktif bakteriyosinler olarak da adlandırılırlar. Pediocinin, gıda kaynaklı patojenler *L. monocytogenes*, *S. aureus* ile Gram negatif *Pseudomonas* cinsine ait üyeler ve *E. coli* bakterilerine karşı nisinden daha etkili olduğu bildirilmiştir. Nitekim cottage peyniri, krema ve peynir soslarında 10² kob/ml oranında *L. monocytogenes* sayısının kontrol altında tutulması amacıyla pediocin

ilave edilen bu ürünlerde başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, peynir altı suyu ortamında üretilen pediocinin kısmi saflaştırılması sonucunda elde edilen preperatın bufalo sütünden fermente peynir üretiminde kullanılması neticesinde, *S. aureus* sayısının düşürülmesinde etkili olduğu ve raf ömrünü uzattığı tespit edilmiştir (Silva ve diğ. 2018).

Enterocinler, enterokoklar tarafından üretilen ve *L. monocytogenes*, *Clostridium* türleri, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *S. aureus* ve *B. cereus* gibi farklı patojen ve gıdalarda bozulmalara sebep olan bakterilere karşı etkili bakteriyosinlerdir. Enterocin üreticisi *E. faecium*, fermente et ve et ürünlerinde starter kültür olarak kullanılmaktadır. İspanyol tipi sosislerin üretiminde, *E. faecium* RZS C13 ve *E. faecium* CCM 4231 starter kültür olarak kullanılmaktadır. *E. faecalis* tarafından üretilen bir enterocin olan enterocin AS-48 enterotoksik *S. aureus* ile *Bacillus* ve *Clostridium* türleri üzerinde etkili olmaktadır (Bharti ve diğ. 2015, Silva ve diğ. 2018). Yıldırım ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada, *E. faecalis* KP tarafından üretilen enterocin KP, farklı konsantrasyonlarda *L. monocytogenes* ihtiva eden yağsız, yarım yağlı ve tam yağlı sütlere, farklı konsantrasyonlarda ilave edilmiş ve yüksek antilisteriyal etki göstermiştir. Fakat yüksek antilisteriyal etkinin yağ oranı ve inoküle edilen bakteri konsantrasyonunun artışı ile birlikte azaldığı belirtilmiştir.

L. plantarum türüne ait birçok suşun çeşitli bakteriyosinleri üretebildiği bilinmektedir. Bu bakteriyosinler plantaricinler olarak adlandırılmaktadır. Plantaricinler, *L. monocytogenes*, *L. innocua* ve *Listeria ivanovii* türlerine karşı antibakteriyel etkiye sahiptirler. Bakteriyosin üreticisi *L. plantarum* AMA-K ve *L. innocua* içeren bir model sistemde *L. innocua* sayısının 12 sa sonunda $3,4 \times 10^4$ kob/ml seviyesinden 7×10^2 kob/ml seviyesine, 24 sa sonunda ise tespit edilemeyecek seviyeye kadar azaldığı bildirilmiştir (Todorov 2009). Diğer bir bakteriyosin üreticisi, *L. plantarum* TN635 tarafından üretilen BacTN635'in patojen *Salmonella* türlerini ve hatta patojen bir maya olan *Candida tropicalis* R2 CIP203'ü bile inhibe ettiği bildirilmiştir (Chalon ve diğ. 2012).

Nakamura ve arkadaşlarının (2013) *L. gasseri* LA39 tarafından üretilen gassericin A'yı koyu kremaya ilave ederek yaptıkları çalışmada, hacimce % 0,5 glisin ve % 5 gassericin A içeren örnekte, *B. cereus* AK1124 ve *L. lactis* subsp. *lactis* AK1155 suşlarının tamamen inhibe oldukları bildirilmiştir.

Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımına ilişkin diğer bir yöntemde bakteriyosin üreticilerinin gıdalara inokulasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, peynir ortamında bakteriyosin üreticisi *L. plantarum* LMG P-26358 suşunun *L. innocua* türünü inhibe edebildiği rapor edilmiştir (Mills ve diğ., 2011). Benzer şekilde De Vuyst ve Leroy (2007) tarafından yapılan bir çalışma da Belçika'ya has fermente bir sosis ortamında bakteriosin üreticisi *L. curvatus* LTH 1174 suşunun *L. innocua* LMG 13568 türünü inhibe ettiği bildirilmiştir.

Son yıllarda gıdalarda sorunlara neden olan patojenlerin kontrol altına alınması amacıyla, bakteriyosinlerin gıda sistemlerinde tek tek kullanılması yerine kokteyl haline getirilerek kullanılması yönünde fikirler öne sürülmektedir. Nitekim Hockett ve diğ. (2017), patojenlerin kontrol altına alınması amacıyla bakteriyosinlerin kombine edilerek veya kokteyl haline getirilerek kullanılmalarının başarılı sonuçlar alınmasına olanak sağlayacağını ifade etmiştir. Yine başka bir çalışmada gelecekte bakteriyosinlerin kokteyl haline getirilip kullanılacağı ve bu neticede direnç kazanmış olan patojenler ile olan mücadelenin daha etkili olabileceği belirtilmiştir (Hols ve diğ. 2019). Bakteriyosinlerin karışım halinde kullanıldığı tek çalışmada, sosislerde *L. monocytogenes*'e karşı etkili bakteriyosinler tek tek kullanıldığında antibakteriyel etkinin yetersiz kaldığı ve *L. monocytogenes*'e karşı etkili üç farklı bakteriyosinin karışım haline getirilerek kullanıldığında ise başarılı sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (Vijayakumar ve Muriana 2017).

1.2.4 Bakteriyosinlerin Diğer Yöntemlerle Birlikte Uygulamaları

Bakteriyosinlerin etki spektrumlarının sadece yakın akraba türleri kapsadığı düşünüldüğünde Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, Gram pozitif bakterilere, Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerde, Gram negatif bakterilere etki etmektedirler. Bakteriyosinlerin etki spektrumlarını bu anlamda genişletmek adına farklı muhafaza yöntemleri için kullanılan organik asitler, kimyasal katkı maddeleri, çeşitli ısı işlemler ve yüksek basınç vb. gibi engeller teknolojisinde de tercih edilen muhafaza yöntemleriyle birlikte kullanımları söz konusudur (Chalon ve diğ. 2012, O'Connor ve diğ. 2015, Silva ve diğ. 2018). Bu sayede oluşan sinejistik etki ile birlikte antibakteriyel etki artmakta ve aynı zamanda

hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olabilmektedirler. Bu sebeple engeller teknolojisinde bakteriyosinlerin de bulunması ve diğer uygulamalarla etkisinin artırılması daha başarılı sonuçlar alınmasına neden olmaktadır.

Gıdalarda bulunan bozulma etmeni ya da patojen Gram negatif bakterilerin inhibe edilmesi adına en çok tercih edilen yöntem EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) ile bakteriyosinlerin birlikte kullanıldığı uygulamalardır. EDTA Gram negatif hücre membranında yer alan lipopolisakkarit tabaka ile etkileşime girerek dış membran geçirgenliğini arttırmaktadır. Bakteriyosinlerle birlikte kullanımıyla, Gram negatif bakteriler, *Salmonella* türleri, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Arcobacter butzleri* gibi geniş bir spektrumda etkili oldukları bildirilmiştir (Prudencio ve diğ. 2015, Silva ve diğ. 2018). Lactococcin A bakteriyosini normal şartlarda *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Salmonella* Typhimurium bakterilerine karşı antibakteriyel etkiye sahip değilken, 40 mM EDTA ile birlikte kombine edilerek test edildiğinde, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerini inhibe ettiği bildirilmiştir. Benzer şekilde 40 mM EDTA ile nisin kombine edilerek bu aktivitenin artırılabilceği tespit edilmiştir (O'Connor ve diğ. 2015).

Yüksek basınç uygulamaları, oda sıcaklığında gıda maddelerinde bulunan mikroorganizmaların inaktivasyonu ile gıda maddesinin dayandırılmasını hedef almaktadır. Bu uygulama tek başına bütün mikroorganizmaları inaktive etmek için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle bakteriyosinler gibi diğer muhafaza yöntemleri ile birlikte kullanıldığı takdirde daha etkili olmaktadır. Etki mekanizması olarak EDTA'ya benzer mekanizmaya sahiptir. Özellikle Gram negatif hücrelerin dış membranlarının yapısını bozarak, bakteriyosinlerin bu hücreler üzerinde etkisini arttırmaktadır (Prudencio ve diğ. 2015). Birçok çalışmada yüksek basınç ve nisin uygulamasının sinerjistik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Peynir üretiminde bakteriyosin üretici LAB ve ilave olarak azaltılmış yüksek basınç uygulaması ile birlikte mikrobiyolojik olarak kalitenin arttığı bildirilmiştir (Silva ve diğ. 2018).

Sıcaklık uygulamaları ile bakteriyosinlerin sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle düşük sıcaklık uygulamalarının ardından bakteriyosinlerin gıda maddelerine ilavesi şeklinde uygulandığı bilinmektedir. Sıcaklık uygulaması ile birlikte bakteriyosinlere karşı dirençli olan bakterilerde letal doz altında stres

koşullarının olduğu ve nisin ve pediocin uygulamalarının etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin ise özellikle gıdalarda kullanılan bakteriyosinlere karşı hassas olmayan Gram negatif bakterilerde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulaması bakteriyel hücre dışı membranında değişikliklere neden olmakta ve akabinde geçirgenliği değişen hücre membranından uygulanan nisin geçerek *S. Typhimurium* ve *E. coli* bakterilerine karşı buzdolabı sıcaklıklarında etkili olmaktadır (Prudencio ve diğ. 2015, Silva ve diğ. 2018).

Bakteriyosinlerin kombine edildiği doğal antibakteriyel sistemlerden bir tanesi laktoperoksidaz sistemidir. Laktoperoksidaz sistemi çiğ sütte bulunan antimikrobiyal etkisi olan bir sistemdir. Nisin ile birlikte uygulamasının yapıldığı bir çalışmada, yağsız sütte *L. monocytogenes* sayısını kontrol örneğine göre 5-6 logaritma azalttığı tespit edilmiştir (Silva ve diğ. 2018). Yine yapılan başka bir çalışmada, toz haline getirilmiş bebek sütünde tespit edilen ve bebeklerde menenjit, sepsisemi ve enterokolite sebep olan Gram negatif patojen *Cronobacter sakazakii* bakterisini, nisin veya lacticin 3147'nin laktoperoksidaz sistemi ile kombine edilmesi sonucunda 8 sa içerisinde inhibe ettiği tespit edilmiştir (O'Connor ve diğ. 2015).

1.2.5 Gıdalarda Sorunlara Neden Olan Patojen Bakteriler

Bakteriyosinlerin, bugüne kadar yapılan çalışmalarda gıdalarda önem taşıyan *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* gibi türleri içeren birçok patojen bakteriye karşı önemli seviyede antibakteriyel etkili oldukları tespit edilmiştir. *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gıdalarda bozulmaya sebep olan en önemli gıda kaynaklı patojenlerdir. *B. cereus* yaygın bir toprak saprofiti olup fırsatçı patojen olarak artan bir öneme sahiptir. Gıdalarda intoksikasyon oluşturan *Bacillaceae* familyasının *Bacillus* genusuna ait aerobik, spor oluşturan bir bakteri olup toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Toprak kökenli olması nedeniyle tarla ve bahçe ürünlerine rahatlıkla bulaşabilmektedir. Gıdayla taşınan bir patojen olarak dikkate alınan *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi gıda kaynaklı enfeksiyonlara, gıda zehirlenmesine ve gıda bozulmalarına neden olabilmektedir (Tewari ve Abdullah 2015). Zehirlenme tehlikesini elimine etmek amacıyla kontamine olmuş gıdaya genellikle ısıtma işlemi uygulaması etkili bir çözüm yöntemi değildir.

Çünkü işlem sonrası canlılığını koruyan sporlar daha sonra çimlenebilmektedir. Özellikle bazı gıda ürünleri *B. cereus* kontaminasyonu açısından daha büyük risk taşımaktadır. Bunlar arasında, işlenmemiş tahıllar, nişasta ihtiva eden gıda maddeleri, et ve süt ürünleri, kuru gıdalar ile baharatlar yer almaktadır (Elicevik ve diğ., 2008). *B. cereus*, süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri, pastörize edilmiş sıvı yumurta, pilav, yemeye hazır sebzeler ve baharatlar gibi çok çeşitli gıdadan izole edilmiştir (Griffiths ve Schraft 2017).

L. monocytogenes, insanlar ve hayvanlarda hastalığa neden olan önemli gıda kaynaklı patojenlerden birisidir. *L. monocytogenes* buzdolabı koşullarında gelişebilir ve çoğalabilmesi sebebiyle, özellikle tüketime hazır gıdalarda sorun oluşturmaktadır. *L. monocytogenes* ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucunda listeriozis vakaları meydana gelmektedir. Gram pozitif, fakültatif anaerobik ve sporsuz bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 35-37 °C olup, 1- 45 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında da gelişebilmektedir. Yüksek konsantrasyonlardaki NaCl (% 10-12) varlığında çoğalabilir ve minimum su aktivitesi 0,92 olarak belirlenmiştir. *L. monocytogenes* geniş pH aralığında (4.1-9.6) çoğalabilmekte, optimum gelişim için ise pH 6.0- 8.0 arasında olmalıdır. *Listeria* cinsi 6 tür içermektedir. Bunlar; *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* ve *L. grayi*'dir. Bunlardan sadece *L. monocytogenes* insanlara karşı patojen özelliktedir (Yavuz ve Korukluoğlu, 2010). *L. monocytogenes*, hamile kadınlar, yenidoğanlar, 65 yaş ve üzeri yetişkinler ile zayıf bağışıklık sistemi olan özellikle savunmasız kişilerde listeriozis enfeksiyonuna neden olmaktadır (Tabit 2018). *L. monocytogenes* dünya genelinde, yüksek oranda hastahanede tedavi edilmesi gereken ve ölümlü sonuçlanan birçok gıda kaynaklı salgına sebep olmaktadır (Rodríguez-López ve diğ. 2018). *L. monocytogenes* doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve toprak, bitki örtüsü, kanalizasyon, su, hayvan yemi, taze ve donmuş et, mezbaha atıkları ve sağlıklı hayvanların dışkılarından izole edilmiştir. Bu nedenle insanlarda enfeksiyona ve gıdaların bozulmasına neden olan *L. monocytogenes* için çiftlik hayvanları ve doğal çevresi en önemli bulaşma kaynaklarını oluşturmaktadır (Jemmi ve Stephan 2006). *L. monocytogenes* varlığı ve tespiti özellikle tüketime hazır gıdalar da önem arz etmektedir. Çünkü bu tür gıdalarda üretim ve tüketim arasında herhangi bir şekilde ısıtma işlemi veya başka bir antibakteriyel kullanımı söz konusu değildir. Bu nedenle *L. monocytogenes*'in tespit edilmesi ve

kontrol altında tutulması gıda endüstrisi ve halk sağığı açısından çok önemlidir (Jordan ve McAuliffe 2018).

S. aureus, insanlarda gıda kaynaklı hastalıkların en önemli etkenlerinden birisidir. *S. aureus* başta ısıt işlem olmak üzere mikroorganizmaların indirgenmesine yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek bir duyarlılık göstermesine rağmen, insanlarda hastalığa neden olan ve yüksek derecede ısı stabilitesi gösteren protein yapısında 5 tip toksin üretmektedir. Bazı suşları yüksek konsantrasyonda tuza ve bazı antibiyotiklere de dirençlidirler. Ortam şartlarına dayanıklı olduklarından dolayı doğada çok yaygındırlar. Gıda zehirlenmelerine neden olan *S. aureus* 'un gıdaya bulaşmasındaki en önemli etkenin insan olduğı saptanmıştır. İnsanlar taşıyıcı olarak bu bakteriyi diğer insanlara ve gıdalara bulaştırırlar. Doğal olarak en fazla burun ve boğaz boşluğunda, insan ve hayvan dışkılarında, ciltte apseli yaralarda ve sivilcelerde yoğun olarak bulunurlar. Gıdalarda ve gıda işletmelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Le Loir ve diğ. 2003; Gülbandılar, 2009; Kadariya ve diğ. 2014; Xu ve diğ. 2016). Genellikle protein miktarı yüksek, nişastaca zengin gıdalarda gelişme gösteren *S. aureus*, et ve süt ürünleri ile balık, patates, makarna ve benzeri ürünlerden sıklıkla izole edilmektedir (Küçükçetin ve Milci 2008).

2. MATERİYAL VE METOT

2.1 Mikroorganizmalar ve Gelişme Koşulları

Çalışmada kullanılan gıda kaynaklı indikatör patojen bakterilerden *B. cereus* suşları (50 adet) Eskişehir Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden (Güven ve Mutlu 2008), *S. aureus* suşları (10 adet) İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesinden (Aydın ve diğ. 2011) ve *L. monocytogenes* suşları (10 adet) ise Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Kültür Koleksiyonunda (PUFECC-Pamukkale University Food Engineering Culture Collection) saklanan ve de DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) ve ATCC (American Type Culture Collection) kültür koleksiyonlarından temin edilmiştir. LAB suşları ise PUFECC'ten sağlanmıştır. Çalışma boyunca tüm suşlar son konsantrasyonu % 30 gliserol içerisinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir. *B. cereus*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* suşları Brain Heart Infusion (BHI, Merck, Almanya) besiyerinde, *S. aureus* 37 °C'de, diğerleri ise 30 °C'de 18 sa inkübe edilerek geliştirilmiştir. LAB suşlarından laktobasiller de-Mann, Rogosa ve Sharpe (MRS, Merck, Almanya) 30 °C'de, laktokoklar ise % 0,5 glukoz ilave edilen M17 Glukoz (M17G, % 0,5 Merck, Almanya) ortamında çoğaltılmıştır.

2.2 Patojen Spesifik Antibakteriyel Etkili LAB Suşlarının İzolasyonu

Patojen spesifik antibakteriyel etkili LAB'lerin izolasyonu amacıyla farklı fermente gıdalar (sucuk (10 adet), yoğurt (20 adet), peynir (30 adet), tereyağı (10 adet), ekşi hamur (20 adet), tarhana (20 adet), turşu (25 adet), zeytin (20 adet), şalgam (10 adet), salamura asma yaprağı (5 adet)), çiğ süt ((İnek (30 adet), koyun (9 adet), keçi (8 adet), deve (3 adet)), taze sebzeler ((biber (10 adet), lahana (10 adet)) ve ham zeytin (10 adet) örnekleri kullanılmıştır. Gıda örneklerinden laktokok ve streptokokların izolasyonu amacıyla M17 Glukoz (M17G, % 0,5 Glukoz) agar (Merck, Almanya), laktobasillerin izolasyonu için ise MRS agar (Merck, Almanya) besiyerleri kullanılmıştır. Uygun dilasyonlardan MRS ve M17G agar besiyerlerine yayma ekim yapılmış ve 30 °C'de 48 sa inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra yaklaşık 30-40

koloni içeren petrilere üzerine her bir patojen bakterinin (*B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*) beş farklı suşunu içeren bakteri süspansiyonundan (Son konsantrasyonu 5×10^5 kob/ml) inoküle edilmiş yumuşak agar besiyeri yavaşça dökülmüştür. Bakteri süspansiyonunun hazırlanması için 18 sa geliştirilen her bir bakterinin ml'sindeki canlı sayısı üç kez tekrar edilerek belirlenmiş, bundan sonraki çalışmalar için ortalama canlı sayısı (kob/ml) referans alınmıştır. Buna göre her seferinde 10^5 kob/ml olacak şekilde *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'un 5 farklı suşları karıştırılmıştır. Daha sonra *S. aureus* içeren petrilere 37 °C'de, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* içerenler ise 30 °C'de 24 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon neticesinde etrafında berrak zon oluşturan koloniler steril öze yardımıyla alınarak MRS ve M17G sıvı besiyeri ortamlarında 30 °C'de 48 sa geliştirilmiş ve son konsantrasyonu % 30 olan gliserol içerisinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.3 Patojen Spesifik Antibakteriyel Etkili LAB izolatlarının Antibakteriyel Spektrumlarının Belirlenmesi

Farklı fermente gıdalardan izole edilerek en yüksek patojen spesifik antibakteriyel aktivitesi teyit edilen 3 adet LAB izolatlarının 50 adet *B. cereus*, 10 adet *L. monocytogenes*, 10 adet *S. aureus* ve 7 farklı LAB türlerine karşı antibakteriyel etkinliği kuyu difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir (Tagg ve McGiven 1971). Besiyeri ortamında 30 °C'de 18 sa geliştirilen LAB izolatları, 6000 g 15 dk süreyle santrifüj (Hettich Universal 30 RF, Almanya) işlemine tabi tutulmuştur. Üst sıvı, çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek yeni tüplere aktarılmış, 6N NaOH kullanılarak pH 6'ya ayarlanmış ve 0,45 µm por çaplı membran filtreden (Millex, Millipore, Amerika Birleşik Devletleri) geçirilmiştir. Aynı bir şekilde BHI sıvı ortamında geliştirilen indikatör bakteri süspansiyonları, % 0,7 oranında agar içeren 7 ml yumuşak BHI agar ortamına inoküle edilerek Nutrient agar (Merck, Almanya) içeren plaklarının üzerine ikinci bir tabaka halinde, homojen şekilde dökülmüştür. LAB türlerine karşı denemelerde yumuşak MRS veya M17G agar kullanılmıştır. Agarın katılaşmasını takiben steril cam pastör pipeti kullanılarak 5 mm çapında kuyucuklar açılmış, filtreden geçirilen bakteri üst sıvıları kuyucuklara 100 µL olacak şekilde doldurulmuştur. İnkübasyon süreleri sonunda kuyucukların etrafında inhibisyon zonu oluşumu incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.4 Patojen Spesifik Antibakteriyel Etkili LAB İzolatlarının 16S rDNA Dizi Analizi

Patojen spesifik bakteriyosin ürettiği tespit edilen izolatların tanımlanması için öncelikle genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için -20 °C’de bulunan stoklardan izolatlar sıvı besiyerinde geliştirilmiş ve uygun besiyerlerine çizim yapılarak, 30 °C’de 24 sa inkübe edilmiştir. Tek düşen koloniler seçilerek MRS veya M17G sıvı ortamına inokülasyon yapılmıştır. 10⁹ kob/ml oranında hücreler alınarak genomik DNA saflaştırma kitinin (Invitrogen, Amerika Birleşik Devletleri) protokolü doğrultusunda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen ve saflaştırılan genomik DNA’ların saflık kontrolleri spektrofotometre’de (PG Instruments, Birleşik Krallık) 260/280 nm alınan absorbans oranı ve % 1’lik agaroz jel (Sigma-Amerika Birleşik Devletleri) üzerinde elektroforez sisteminde (Thermo, Amerika Birleşik Devletleri) yürütülüp ardından DNA görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) belirlenmiştir.

LAB izolatlarının tanımlanması için 16S rRNA geninin 1464 bazlık bölümü iki farklı primer çifti (27F-780R ve 529F-1491R) kullanılarak PZR (Polimerize Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılmıştır. PZR karışımı 5 µl tampon, 2 µl dNTP karışımı (Thermo, Amerika Birleşik Devletleri), 1’er µl (529F 5’ GTGCCAGCMGCCGCGG 3’-1491R 5’ ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3’ ve 27F 5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’-780R 5’TACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3’) primer, 1µl Hi-Fi Taq DNA polimeraz (Thermo, Amerika Birleşik Devletleri) ve 2 µl genomik DNA’dan oluşturulmuş ve toplam hacim 50 µl’ye steril ultra saf su ile tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tüplere PZR (Techne, UK) cihazında 95 °C 3 dk başlangıç denatürasyonunu takiben 30 döngü 95 °C’de 30 sn, 57 °C’de 30 sn, 72 °C’de 1 dk ve son aşamada ise 72 °C’de 5 dk içeren bir program uygulanmıştır.

PZR ile çoğaltılan fragmentlerin doğruluğu ve saflık kontrolü % 1 agaroz jelde (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) yürütülerek izlenmiştir. Doğru büyüklükte ve saflıktaki PZR fragmentlerin PZR saflaştırma kiti (Thermo-Amerika Birleşik Devletleri) ile temizliği yapıldıktan sonra, BM-Labosis firması (Ankara, Türkiye) tarafından hizmet alımı karşılığında DNA dizi analizi yapılmıştır. Çalışmada bakterilerden elde edilen fragmentlerin DNA dizileri, NCBI (National Center for

Biotechnology Information) veri tabanında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) taranarak nihai olarak tanımlanmış ve bu kütüphaneye kayıtları yapılmıştır.

2.5 Kültür Üst Sıvılarındaki Patojen Spesifik Antibakteriyel Aktivitenin Enzimlere Karşı Hassasiyetinin Belirlenmesi

Patojen spesifik antibakteriyel aktivitesi bulunan LAB izolatlarının kültür üst sıvısındaki antibakteriyel aktivitenin protein tabiatındaki bir etkenden kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit edebilmek için, 3 farklı LAB izolatından elde edilen kültür üst sıvılarına son konsantrasyonunda 1 mg/ml olacak şekilde tripsin (pH 7,0 Sigma, Amerika Birleşik Devletleri), α -kemotripsin (pH 7,0 Sigma, Amerika Birleşik Devletleri), proteinaz K (pH 7,0 Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) ve pepsin (pH 3,0 Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) enzimleri ilave edilerek, 37 °C’de 2 sa inkübasyona bırakılmıştır. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla da katalaz (pH 7,0 Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) enzimi kullanılmıştır. Enzim aktiviteleri, 95 °C’de 5 dakika ısıtma işlemi ile sonlandırılmıştır. Söz konusu kültür üst sıvılarında antibakteriyel aktivitenin varlığı kuyu difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir (Tagg ve McGiven 1971)

2.6 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Üretimi ve Saflaştırılması

LAB suşları tarafından üretilen patojen spesifik bakteriyosinler, üzerinde pH (WTW, Almanya), sıcaklık ve karıştırma hızı kontrol ünitelerinin bulunduğu fermentörde (Minifors, İsviçre) 2 L hacimde üretilmiştir. Söz konusu sistem kurulup sterilize edildikten sonra ısıtma ve karıştırma sistemleri açılarak ortamın 30 °C sıcaklığa ulaşması sağlanmıştır. Ardından patojen spesifik bakteriyosin üreticisi LAB suşları fermentör ortamına % 1 oranında ilave edilmiş, 5N NaOH ve 5N HCl ilave edilerek pH 6’da ve karıştırıcı ile de hız 100 rpm’de sabit tutulmuştur. Fermentör bu şartlarda 24 sa kesikli sistemde çalıştırılmıştır. Fermentasyon sürecinde saat başı örnekleme yapılmış hücre gelişimi; sıvı içerisinde hücre optik yoğunluğu 600 nm’de spektrofotometre’de (PG Instruments, İngiltere) ölçülerek saptanmıştır.

Fermentörden alınan sıvı besiyerinde gelişen bakteriler 9000 g'de 30 dk santrifüj (Hettich Universal 30 RF, Almanya) işlemine tabi tutulmuş; çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek kültür üst sıvısı steril bir erlen içerisinde toplanmıştır. Bu kültür üst sıvısının 100 mililitresine son konsantrasyonu % 40-80 arasında olacak şekilde amonyum sülfat ilavesi yapılmış ve bakteriyosinin çökmesini sağlayan optimum amonyum sülfat konsantrasyonu belirlenmiştir. Takiben en verimli amonyum sülfat konsantrasyonu kültür üst sıvısına ilave edilmiş + 4°C'de bir gece karıştırılmıştır (WiseShake SHO-1D, Birleşik Krallık). Bu sürenin sonunda örnekler +4 °C'de 14000 g'de bir saat süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitiminde üst faz dökülmüş ve çökelti 0,005 M Sodyum fosfat (pH 6,0) tamponu içerisinde çözölmüştür (Moreno ve diğ. 2003).

Bu çözelti içindeki bakteriyosinlerin geri kazanımı için Strata C18-E SPE (Phenomenex, 5g, 20 ml, Amerika Birleşik Devletleri) kolonları kullanılmıştır. Öncelikle söz konusu kolonlar % 100 etanol ile şartlandırılmış ardından kolondan 0.005 M Sodyum fosfat (pH 6,0) tamponu geçirilmiştir. Sırasıyla bakteriyosin içeren çözelti kolona yüklenmiş ve daha sonra % 30 etanol ile iyice yıkanmıştır. Bakteriyosinler kolondan % 70 izopropanol ve % 0,1 TFA(Trifloroasetik Asit) ile geri kazanılmıştır (Mills ve diğ. 2011). Sonra izopropanol rotari evaporatör (BUCHI Rotavapor R-114, İsviçre) ile uzaklaştırılmıştır. Bu işlemler safsızlıkların tamamen giderilmesi adına, her bir bakteriyosin için üç defa gerçekleştirilmiştir.

Son aşamada bakteriyosin içeren ekstrakt ters faz UHPLC sisteminden (Thermo Scientific, UHPLC 3000, Almanya) geçirilerek ileri düzeyde saflaştırılmıştır. Bu sistemde bakteriyosin çözeltisi UHPLC üzerinde takılı olan C18 (Nükleosil, Supelco, Amerika Birleşik Devletleri) kolonundan gradient koşullarda geçirilmiştir. Sistemde mobil faz olarak % 0,1 TFA içeren ultra saf su (Solvent A) ve % 0,1 TFA içeren % 100 Asetonitril (Solvent B) kullanılmıştır. UHPLC sisteminde 0,5 ml akış hızı ve 0-5. dk % 70 A, 5-40. dk % 70 B, 40-50. dk % 100 B, 50-60. dk % 100 A programı uygulanmıştır. 220 nm'de DAD (Thermo Scientific, UHPLC 3000, Almanya) dedektör kullanılarak okuma gerçekleştirilmiştir (Simha ve diğ. 2012).

Yukarıda sıralanan saflaştırma basamaklarının her aşamasında mutlaka antibakteriyel aktivite taraması yapılmıştır. Ayrıca bakteriyosin örneklerinin UHPLC sisteminden geçirilmesi esnasında pikler fraksiyonlar halinde toplanmış ve kuyu

difüzyon yöntemi esasına göre hedef patojenler üzerine antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Bakteriyosin aktiviteleri kritik dilüsyon yöntemine göre, inhibisyon zonu alınan en yüksek dilüsyon oranının, 1000/aktarılan miktar ile çarpımından elde edilen Arbitrary Unite (AU) cinsinden hesaplanmıştır (Franz ve diğ. 1997). Bunun yanısıra fraksiyonların içerdiği toplam protein miktarları Pierce BCA yöntemiyle belirlenmiştir (Thermo, Amerika Birleşik Devletleri).

2.7 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Molekül Büyüklüğünün MALDI-TOF ile Belirlenmesi

Patojen spesifik bakteriyosinler UHPLC (Thermo Scientific, UHPLC 3000, Almanya) sisteminden geçirilmiş ve saflaştırma sonucunda toplanan fraksiyonların mobil fazı rotary evaporatörde (BUCHI Rotavapor R-114, İsviçre) uzaklaştırılmıştır. Mobil fazın uzaklaştırılması sonrası kalan fraksiyonlar liyofilize (Thermo Savant Modulyo, Amerika Birleşik Devletleri) edilmiş ve sonrasında antibakteriyel aktivite tespiti amacıyla agar spot testi uygulanmıştır. Antibakteriyel aktivite tespit edilen fraksiyonların moleküler büyüklüğü MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Microflex LT, ABD) cihazında, Nitrojen UV lazer (337 nm) ile pozitif iyon modu ve lineer spektrum taraması yapılarak belirlenmiştir. Matris olarak, α -Cyano-4-hydroxycinnamic asit ve 2,5-Dihydroxybenzoic asit (10 mg/ml, H₂O:Asetonitril: TFA, 50:50:0.1, h:h:h) bakteriyosinler ile 1:10 (h/h) oranında karıştırılarak kullanılmıştır.

2.8 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Patojen Bakterilerin Morfolojisi Üzerine Etkisinin FE-SEM ile Belirlenmesi

Patojen spesifik bakteriyosinlerin, patojen bakteri hücreleri üzerinde meydana getirdikleri morfolojik değişimler Alan Emisyon – Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ile belirlenmiştir. Bunun için 5 ml PBS kullanılarak daha önce saflaştırılan bakteriyosinlerden 100 AU/ml ve ayrı ayrı *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* suşlarından 5×10^5 kob/ml ilave edilerek 3 adet süspansiyon hazırlanmış, 37 °C’de 30 dk muamele edilmiştir. Kontrol örneklerinde bakteriyosin yerine dH₂O kullanılmıştır. Daha sonra örnekler 6000 g’de 15 dk çöktürme işlemi uygulanmış, hücre çöktürmeleri

iki kez PBS tamponu ile iyice yıkanmıştır. Ardından % 50-100 oranında etanol ile dehidrasyon yapılmıştır (Jiang ve diğ 2018). Dehidrasyon işlemi sonrasında hücreler 6000 g'de 15 dk santrifüj ile toplanmış, liyofilize edilerek kurutulmuş ve kurutulan hücreler, Quorum Q150 R ES cihazı (Quorum Teknoloji, Birleşik Krallık) kullanılarak Altın-Palladyum (% 80-20) ile kaplanmıştır. Hücre morfolojileri FE-SEM (Zeiss supra 40 VP, Almanya) cihazında, 20-25 kV voltaj ve 15000, 25000 ve 50000 kX büyütme gücünde görüntülenmiştir.

2.9 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Süt Model Sisteminde Patojen Bakteriler Üzerine Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

Patojen spesifik bakteriyosinlerin patojenlere karşı spesifik antibakteriyel etkinliğini izlemek için yarım yağlı UHT süte (Pınar Süt Mamülleri A.Ş., İzmir, Üretim Tarihi: 03.11.2017) bakteriyosinler 100 AU/ml, patojen bakteriler ise 5×10^5 kob/ml olacak şekilde ilave edilerek, üç farklı deneme deseni kullanılarak belirlenmiştir.

Birinci deneme deseninde bakteriyosinlerin patojen bakteriler üzerine süt ortamında etkisini belirlemek amacıyla süte bir bakteriyosin ve bir patojenin 5 farklı türünün ilavesi gerçekleştirilmiştir. İkinci deneme deseninde ise süte bir bakteriyosin ve üç patojen türün karışımı ilave edilmiştir. Üçüncü denemede ise bakteriyosinlerin süt ortamında patojen bakterilerin engellenmesi yönündeki başarısını kanıtlamak amacıyla süte tüm üç bakteriyosin ve üç patojen türün karışımı birlikte ilave edilmiştir. Tüm deneme desenlerinde kontrol olarak bakteriyosin içermeyen ancak patojen türleri içeren süt örnekleri de hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tüm süt örnekleri +4 °C'de 7 gün depolanmıştır. Depolamanın 0., 1., 3., 5. ve 7. günlerinde örnekler alınarak *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* sayımları gerçekleştirilmiştir.

Süt örneklerindeki *S. aureus* sayısı Baird Parker Agar (BPA) (Merck, Almanya) ortamında 37 °C'de 24 sa inkübasyon sonunda tespit edilmiştir. *B. cereus* sayımı Chromogenic Bacillus Cereus Supplement (Oxoid, Amerika Birleşik Devletleri) ilavesi yapılan Chromogenic Bacillus Cereus Agar (Oxoid, Amerika Birleşik Devletleri) ortamında 30 °C'de 48 sa inkübasyon sonunda agar üzerinde gelişen mavi-yeşil kolonilerin sayımı ile yapılmıştır. *L. monocytogenes* PALCAM

Selektif Supplement (Merck, Almanya) ilavesi yapılmış PALCAM Agar (Merck, Almanya) ortamında 35 °C'de 24-48 sa inkübasyon sonunda sayılmıştır.

2.10 İstatistiksel Analizler

MINITAB (14.0, Birleşik Krallık) hazır paket programı kullanılarak, PSB aşılanmış süt örneklerinin antibakteriyel aktiviteleri arasındaki farkı karşılaştırmak için Kruskal Wallis Analizi kullanılmıştır. Farklılıklar $p < 0,05$ 'de anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ortalama değerler standart sapma ($\pm$ SD) ile birlikte verilmiştir. Tüm analizler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

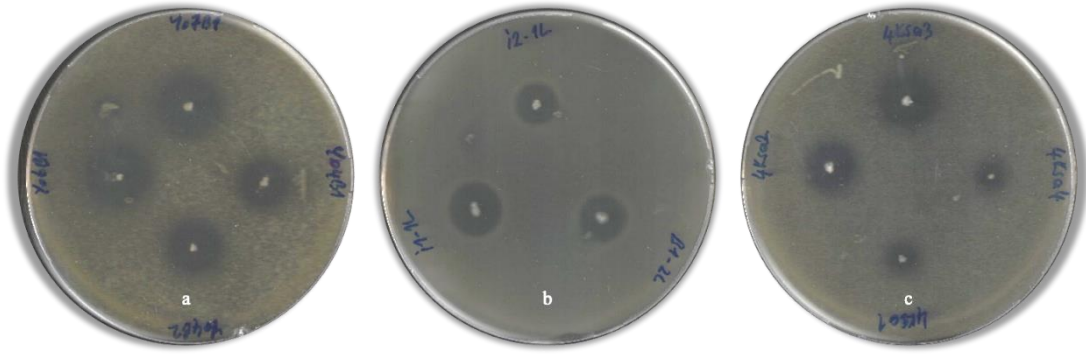


3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Patojen Spesifik Antibakteriyel Aktiviteye Sahip LAB'lerin İzolasyonu

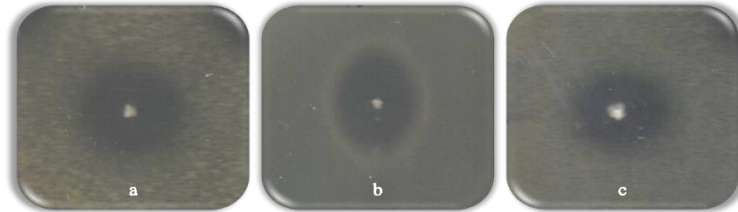
Çalışmanın en önemli hedefi patojen spesifik bakteriyosinlere ulaşmak olduğu için, bu çalışmada benzer bakteriyosin üreticisi seçim yöntemlerinden farklı olarak hedef patojen bakterilerin 5 suşu kullanılarak karışımlar indikatör olarak kullanılmıştır. *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* için ayrı ayrı hazırlanan karışımlar çeşitli fermente gıdalar kullanılarak geliştirilen muhtemel LAB kolonilerin üzerine ikinci katman olarak dökülerek spesifik antibakteriyel aktiviteye ulaşılmaya çalışılmıştır. Mevcut izolasyon yönteminde (Harris ve diğ 1989, Van Belkum ve diğ. 1989) yapılan bu modifikasyon ile bakteriyosin-hedef bakteri spesifikliği artırılmıştır.

250 farklı gıda maddesinden yapılan izolasyon sonucunda her bir M17G ve MRS besiyeri içeren petride yaklaşık 30 koloni tespit edilmiş, izolasyonda 3 farklı patojen karışımı kullanıldığından ve bu amaçla her bir patojen için en az üç petride antibakteriyel aktivite tespiti yapıldığından, her bir patojen için yaklaşık 30 bin civarında muhtemel LAB kolonisinin taraması gerçekleştirilmiş ve bunlar arasından yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip izolatların seçimi yapılmıştır. Bu nedenle çalışmanın ilk ve önemli bir basamağı olan izolasyon basamağı mevcut izolasyon yönteminden farklı bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Kurgulanan strateji doğrultusunda fermente gıdalar kullanılarak MRS ve M17G ortamında yapılan taramalarda *B. cereus*'a karşı 21 adet, *L. monocytogenes*'e karşı 50 adet, *S. aureus*'a karşı 34 adet izolat toplanmıştır (Şekil 3.1). Toplam 250 fermente gıda örneği kaynak olarak kullanıldığı dikkate alındığında, kurgulanan yöntemle patojen spesifik antibakteriyel aktiviteye sahip izolat sayısı düşüktür. Beklenen bu sonuç her bir patojen türün birden fazla suşunun karışımının kullanılmasıyla pozitif suş sayısı olasılığı azalmıştır. Tabi ki bu durum yöntemin spesifik antibakteriyel etkili izolatlara ulaşmayı sağladığına da işaret etmektedir.



Şekil 3.1: LAB izolatlarının indikatör patojen bakteri suşlarına (a: *B. cereus*, b: *L. monocytogenes* ve c: *S. aureus*) karşı antibakteriyel etkisi

Toplanan izolatların antibakteriyel aktivitesinin teyiti amacıyla tekrar analiz edilmiştir. Buna göre *B. cereus*'un beş farklı suşuna karşı en yüksek etkili izolatın peynirden izole edilen P2Bc1, *L. monocytogenes*'in beş farklı suşuna karşı en yüksek etkili izolatın karın tereyağından izole edilen KtLm1 ve *S. aureus*'un beş farklı suşuna karşı en yüksek etkili izolatın süzme yoğurtdan izole edilen Yo4S1 olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlar seçilerek diğer çalışmalar için muhafaza edilmiştir. Bu izolatların hedef patojenlere agar üzerindeki antibakteriyel etkisi Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: P2Bc1 (a), KtLm1 (b) ve Yo4S1 (c) izolatlarının indikatör patojen bakteri suşlarına (*B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*) karşı antibakteriyel etkisi

3.2 Patojen Spesifik LAB İzolatlarının Antibakteriyel Spektrumu

Çeşitli gıdalardan izole edilen P2Bc1, KtLm1 ve Yo4S1 izolatlarının 50 adet *B. cereus*, 10 adet *L. monocytogenes*, 10 adet *S. aureus* ile 7 adet LAB türlerine karşı antibakteriyel etki spektrumları Tablo 3.1'de verilmiştir.

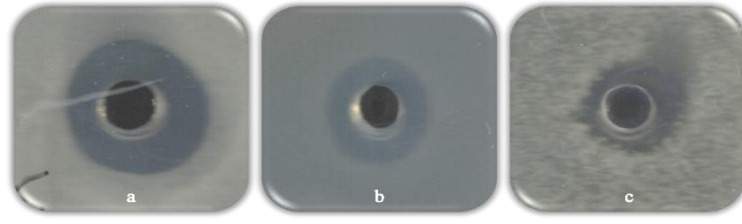
Tablo 3.1: P2Bc1, KtLm1 ve Yo4S1 izolatlarının antibakteriyel etki spektrumu

İndikatör Suşlar	İndikatör Sayısı (n)	LAB İzolatları		
		P2Bc1	KtLm1	Yo4S1
<i>B. cereus</i>	50	50/50*	5/50	0/50
<i>L. monocytogenes</i>	10	3/10	10/10	0/10
<i>S. aureus</i>	10	4/10	0/10	10/10
<i>Lactobacillus casei shirota</i> PSC7	1	0/1	0/1	0/1
<i>Lactococcus lactis</i> PSC10	1	0/1	0/1	0/1
<i>Pediococcus acidilactici</i> PFC69	1	0/1	0/1	0/1
<i>Lactobacillus plantarum</i> PFC72	1	0/1	0/1	0/1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PFC73	1	0/1	0/1	0/1
<i>Lactobacillus brevis</i> PFC80	1	0/1	0/1	0/1
<i>Lactobacillus pentosus</i> PFC87	1	0/1	0/1	0/1
*Aktivite tespit edilen izolat sayısı/Toplam izolat Sayısı				

Peynirden izole edilen P2Bc1 izolatı denenen 50 adet *B. cereus* suşlarının tamamını inhibe etmeyi başarmıştır. Bu suşun *B. cereus* suşları üzerinde inhibisyon aktivitesi orta ve yukarısı olarak tespit edilmiştir. P2Bc1 izolatının *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve LAB türleri üzerinde önemli bir antibakteriyel etkisi bulunamamıştır. P2Bc1 izolatının *B.cereus*'a karşı kuyu difüzyon yöntemine göre antibakteriyel aktivite görüntüsü Şekil 3.3'te verilmiştir.

Karın tereyağından izole edilen KtLm1 izolatı denenen 10 adet *L. monocytogenes* suşlarının tümünün üzerinde antibakteriyel etkili olduğu bulunmuş ve LAB türleri üzerinde önemli bir antibakteriyel etkisi bulunamamıştır. Aynı şekilde bu suşun kültür üst sıvısının *L. monocytogenes*'e karşı kuyu difüzyon yöntemine göre antibakteriyel aktivite görüntüsü Şekil 3.3'de verilmiştir.

Süzme yoğurttan izole edilen Yo4S1 izolatı denenen 10 adet *S. aureus* suşlarının tümünün üzerinde antibakteriyel etkili olduğu bulunmuş ve LAB türleri üzerinde önemli bir antibakteriyel etkisi bulunamamıştır. Aynı şekilde bu suşun kültür üst sıvısının *S. aureus*'a karşı kuyu difüzyon yöntemine göre antibakteriyel aktivite görüntüsü Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.3: P2Bc1 (a), KtLm1 (b) ve Yo4S1 (c) izolatlarının kültür üst sıvılarının indikatör patojen bakteri suşlarına (*B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*) karşı antibakteriyel etkisi

Farklı kaynaklardan izole edilen LAB'lerinin ürettikleri çeşitli metabolitler (laktik asit, H_2O_2 , diasetil ve bakteriyosin) nedeniyle çeşitli seviyelerde antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları birçok çalışmada belirtilmiştir (De Vuyst ve Leroy, 2007). Ancak LAB'lerde antibakteriyel etkinliği ayıran en temel metabolit bakteriyosinlerdir (Chen ve Hoover 2003; Hassan ve diğ. 2012) Dolayısıyla bugüne kadar yapılan çalışmalarda LAB tarafından üretilen birçok bakteriyosin ve üreticisi rapor edilmiştir. Diğer taraftan, laktik suşlarca üretilen bakteriyosinlerin çeşitliliğine bağlı olarak antibakteriyel spektrumu farklılık göstermektedir. Bu durum özellikle bakteriyosinlerin etki mekanizmasına bağlı olarak suş spesifik özellik göstermesinden kaynaklanmaktadır (Dobson ve diğ. 2012)

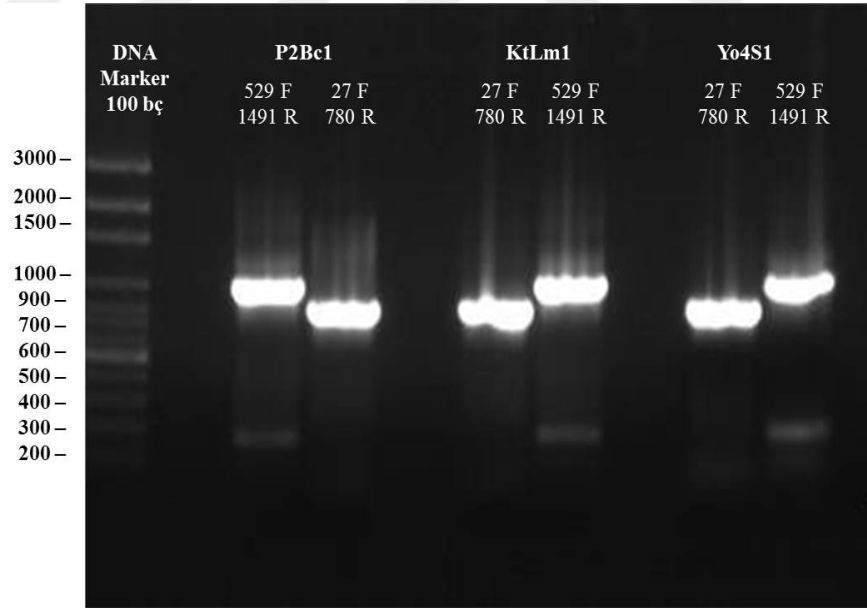
Çalışmamızda izole edilen LAB'ler gıda kaynaklı *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterilerinin beş farklı suşunu içeren indikatör karışımına karşı antibakteriyel etkili bulunmuştur. Bu nedenle literatürde yer alan bakteriyosin üreticisi LAB'den bu yönüyle farklılık göstermektedirler. İzole edilen LAB'nin tamamının indikatör karışımına karşı orta seviyede antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir.

3.3 Patojen Spesifik Antibakteriyel Aktiviteye Sahip İzolatların Tür Tanısı

Çalışma kapsamında 3 LAB izolatının tür seviyesindeki nihai tanısı 16S rRNA geninin büyük kısmının nükleotit dizisi belirlenerek gerçekleştirilmiştir. Buna göre gıda örneklerinden izole edilen patojen spesifik 3 adet LAB izolatlarının genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılan 16S rRNA genine ait fragmentler Şekil 3.4'de gösterilmiştir. 16S-27F/16S-780R primer çifti kullanıldığında her bir LAB izolatından

753 bp uzunluğunda bir adet, 16S-529F/1491R primer çifti ile de 962 bp uzunluğunda bir adet DNA fragmentinin çoğaltıldığı agaroz jel üzerinde tespit edilmiştir. Bu sonuç LAB izolatlarından doğru bölge ve büyüklükte çoğaltma yapıldığına işaret etmiştir. Bu aşamadan sonra LAB izolatlarının genomik DNA'sından çoğaltılan DNA fragmentlerinin temizlendikten sonra DNA dizisi çıkartılmıştır.

NCBI veri tabanı kullanılarak yapılan karşılaştırma sonucunda LAB izolatların tür düzeyindeki tanımlanma sonuçları ve yüzdeleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Buna göre peynirden izole edilen LAB izolatı P2Bc1, *L. plantarum* türleri ile % 99 karın tereyağından izole edilen LAB izolatı KtLm1, *E. faecalis* türleri ile % 100 ve süzme yoğurttan izole edilen LAB izolatı Yo4S1 ise, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* türleri ile % 100 oranında benzer bulunmuştur. Bu aşamadan itibaren söz konusu suşlar PUFECC koleksiyonuna eklenmiş ve *L. plantarum* PFC339, *E. faecalis* PFC340 ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* PFC341 olarak kaydedilmiştir. Ayrıca bu suşların 16S rRNA gen dizileri de NCBI veri tabanına girilerek ulaşım numarası (Tablo 3.2) ile kaydedilmiştir.



Şekil 3.4: Fermente gıdalardan izole edilen LAB izolatlarından 16S-27F/16S-780R ile 16S-529F/1491R primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan PZR fragmentleri

Tablo 3.2: Fermente gıdalardan izole edilen LAB izolatlarının 16S rRNA geni dizi analizine göre tanımlama sonuçları ve NCBI ulaşım numaraları.

İzolat Kodu	PUFECC Suş Kodu	İzolasyon Kaynağı	Tür	Tanımlanma Yüzdesi (%)	NCBI Ulaşım Numaraları
P2Bc1	PFC339	Peynir	<i>L. plantarum</i>	99	MK784815
KtLm1	PFC340	Karın Tereyağı	<i>E. faecalis</i>	100	MK784812
Yo4S1	PFC341	Süzme Yoğurt	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	100	MK784814

Fermente gıdaların florasında bulunan laktik asit bakterileri önemli oranda bakteriyosin üretebilmektedir. Özellikle *Lactobacillus* olmak üzere *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinsi LAB'ne ait pek çok türün bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Zacharof ve Lovitt 2012, Woraprayote ve diğ. 2016). Buna göre çalışmada tanımlanan *L. plantarum* PFC339 ve *E. faecalis* PFC340 suşları daha önce de birçok çalışmada bakteriyosin üreticisi olarak rapor edilmiştir (Balla ve diğ. 2000, Zhu ve diğ. 2014, Wen ve diğ. 2016, Abanoz ve Kunduhoğlu 2018). Bu iki türün plantaricin ve enterocin ürettikleri iyi bilinmektedir (Zacharof ve Lovitt 2012, Zou ve diğ. 2018). Lakin *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'in bakteriyosin ürettiğine dair bilgi sınırlıdır (Borris ve diğ. 2001).

3.4 İzolat Kültür Üst Sıvılarının Antibakteriyel Aktivitesinin Enzimlere Karşı Hassasiyeti

Farklı gıda örneklerinden izolasyonu gerçekleştirilen LAB'lerin kültür üst sıvılarının, antibakteriyel aktivitesinin enzimlere gösterdiği hassasiyet Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Proteolitik enzimler ile yapılan uygulama sonucunda üç izolat kültür üst sıvısında antibakteriyel etkinin kültürlerin kontrol üst sıvılarının antibakteriyel etkisine göre kıyas edildiğinde kaybolduğu tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar proteolitik enzim uygulamaları sonucu kaybolan antibakteriyel etkinin, izolatların antibakteriyel etkili bileşenlerinin peptid ya da protein tabiatında olduğunu göstermektedir. Üç bakteriden elde edilen kültür üst sıvıdaki antibakteriyel aktivite pepsin hariç diğer proteolitik enzimler tarafından inaktive olmuştur. Kültür üst sıvıların enzimlere karşı hassasiyetlerinde farklılık tespit edilmemiştir. Bunun yanında izolatların kültür üst sıvılarının katalaz enzimiyle muamelesi sonucunda aktivite kaybolmamıştır.

Tablo 3.3: İzolatların kültür üst sıvılarının antibakteriyel aktivitesine çeşitli enzimlerin etkisi

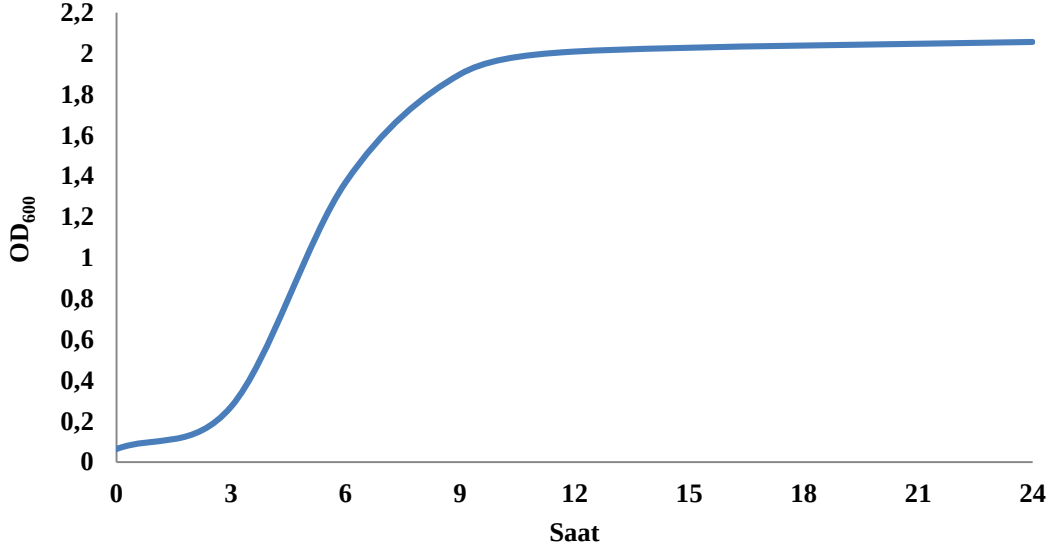
Uygulama→	Kontrol	α Kemotripsin	Pepsin	Proteinaz K	Tripsin	Katalaz
İzolat ↓						
P2Bc1	++	-	+	-	-	++
KtLm1	++	-	+	-	-	++
Yo4S1	++	-	+	-	-	++
Antibakteriyel Zon Çapları: - = < 1mm (Etkisiz) + = 1-5 mm (Düşük Etkili) ++ = 5-15 mm (Orta Etkili) +++ = >15 mm (Yüksek Etkili)						

Çeşitli çalışmalarda bakteriyosin karakterizasyon basamaklarında bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere karşı hassas oldukları ve özellikle proteolitik enzimlerle muamele edildiklerinde antibakteriyel aktivitede azalmanın olduğu ve hatta aktivitenin kaybolduğu bildirilmiştir (Lü ve diğ. 2014a, Lü ve diğ. 2014b, Zhu ve diğ. 2014, Woraprayote ve diğ. 2015, Hu ve diğ. 2017). Nisinin proteolitik enzimlere karşı hassasiyetinin belirlendiği çalışmada, proteinaz K ve α kemotripsin enzimlerine karşı hassas olduğu ve muamele sonucunda antibakteriyel aktivitenin kaybolduğu belirlenmiştir. Pepsin ve tripsin enzimleri ile muamele sonucunda nisin aktivitesinin kısmen de olsa var olduğu ve tamamen yok olmadığı tespit edilmiştir (Moreno ve diğ. 2000). Pediocinlerin, α kemotripsin, pepsin ve tripsin enzimleri ile muamele edilmeleri neticesinde antibakteriyel aktivitenin bazılarında kaybolmadığı bu nedenle de bazı pediocinlerin bu enzimlere karşı hassas olmadıkları, fakat tüm pediocinlerin proteinaz K enzimi ile muamele edildiklerinde aktivitenin kaybolduğu yani pediocinlerin proteinaz K enzimine karşı hassas olduğu belirtilmiştir (Papagianni ve Anastasiadou 2009). Sonuçlar literatür verileriyle birlikte değerlendirildiğinde, elde edilen kültür üst sıvılarında yer alan metabolitlerin peptid ya da protein tabiatında olan bakteriyosinler olduğunu göstermiştir.

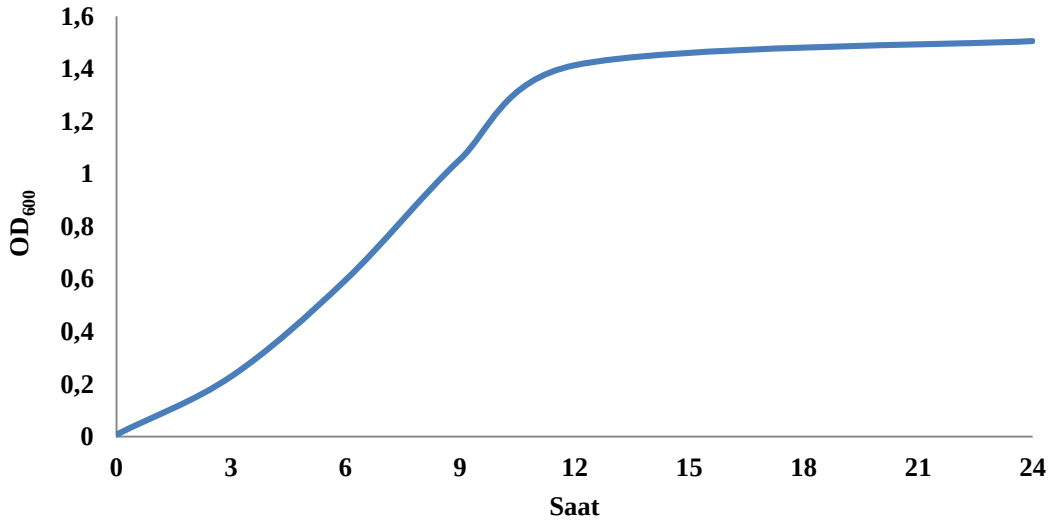
3.5 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Üretimi ve Saflaştırılması

LAB suşları tarafından üretilen patojen spesifik bakteriyosinler, pH, sıcaklık ve karıştırma hızı sabit tutularak biyoreaktörde üretilmiştir. Sistem sterilize edildikten sonra, ortamın 30°C sıcaklığa ulaşması sağlanmış ve patojen spesifik bakteriyosin üreticisi LAB suşları fermentör ortamına % 1 oranında inoküle edilmiştir. Ortam pH'sı

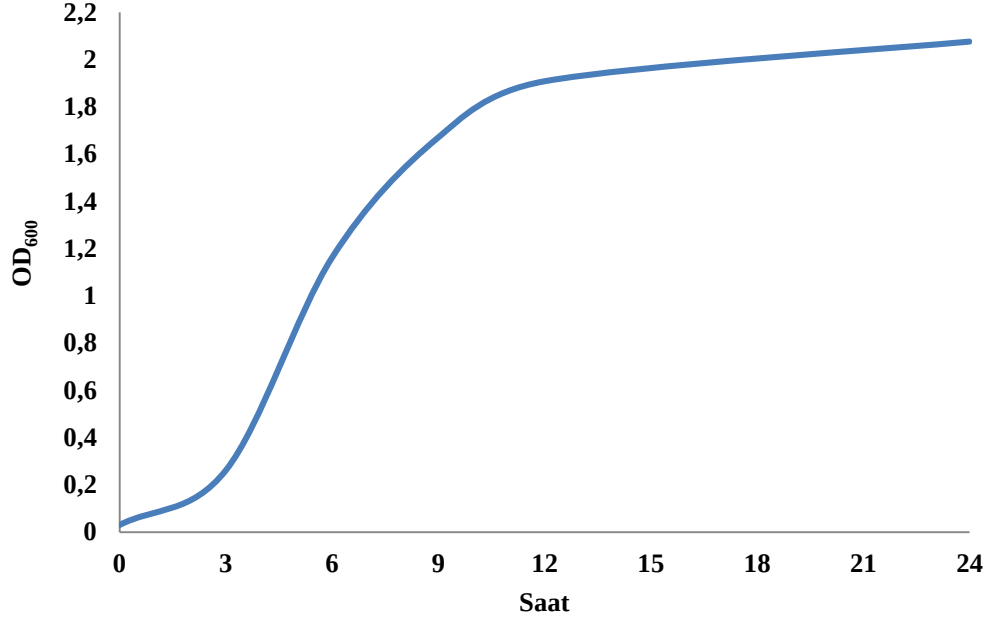
6’da ve karıştırıcı hızı ise 100 rpm’de sabit tutulmuştur. Fermentör bu şartlarda 24 sa kesikli sistemde çalıştırılmıştır. Fermentasyon sürecinde saat başı örnekleme yapılmış ve PFC339, PFC340 ve PFC341 bakteriyosinlerine ait hücre gelişimi; sıvı içerisinde hücre optik yoğunluğu ölçülerek tespit edilmiştir (Şekil 3.5, 3.6 ve 3.7).



Şekil 3.5: PFC339 izolatının hücre gelişim eğrisi



Şekil 3.6: PFC340 izolatının hücre gelişim eğrisi



Şekil 3.7: PFC341 izolatının hücre gelişim eğrisi

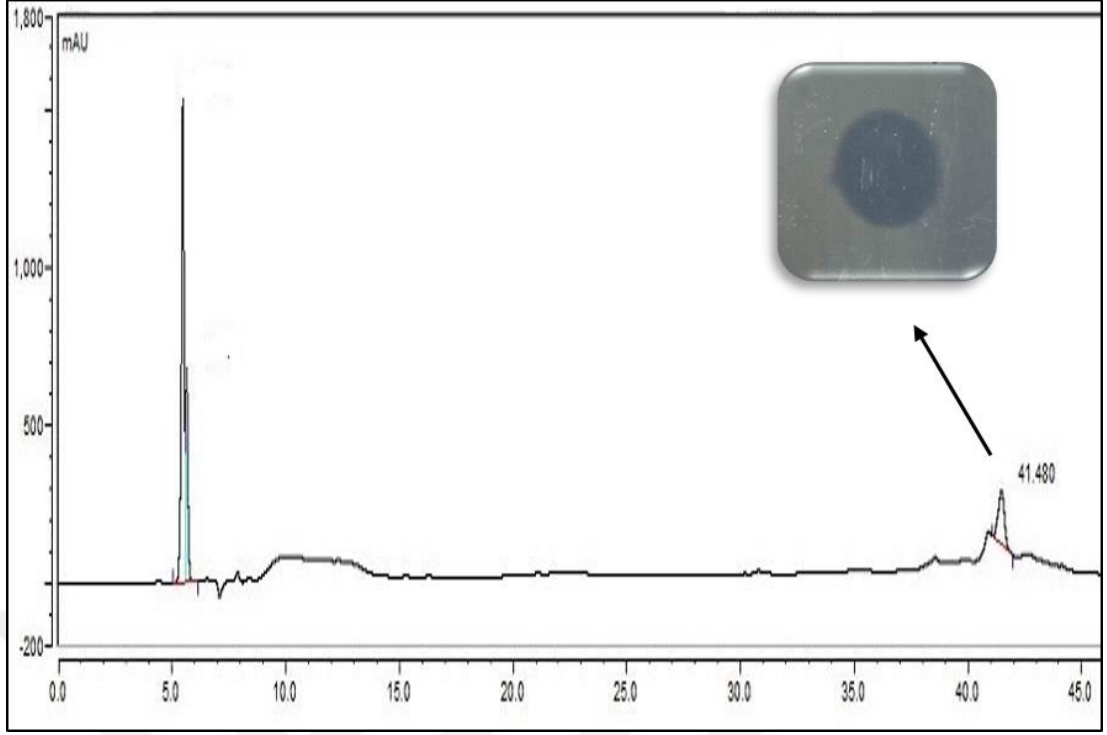
Çeşitli fermente gıdalardan izole edilen LAB'nin kültür üst sıvılarından ilişkili bakteriyosinlerin ileri derecede karakterizasyon çalışmaları amacıyla saflaştırılması, üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Buna göre kültür üst sıvısındaki protein fraksiyonu % 60 oranında amonyum sülfat ile çöktürülerek toplanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi aşamasında amonyum sülfat oranının belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlar denenmiş ve en iyi konsantrasyon, protein miktarının tespiti ve antibakteriyel aktivite tayini ile belirlenmiştir (Tablo 3.4). Ardından protein çökeltisi katı faz ekstraksiyon kolonundan geçirilmiş ve safsızlıkların önemli bir kısmı uzaklaştırılmıştır. Son aşamada ise kolondan toplanan eluent UHPLC sisteminden geçirilmiş ve tespit edilen pikler ayrı ayrı toplanarak antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Amonyum sülfat, katı faz ekstraksiyonu ve UHPLC bakteriyosinlerin saflaştırılmasında sıklıkla kullanılan ve verimli çalışan sistemlerdir. Söz konusu sistemlerin kullanılmasıyla birçok yeni bakteriyosin veri tabanına (BAGEL, <http://bagel.molgenrug.nl>) kazandırılmıştır (Saavedra ve Sesma, 2011). Amonyum sülfat çöktürmesi amacıyla genellikle % 40-60 arasında konsantrasyonlar kullanılabilir. Kullanılacak konsantrasyon belirlenirken farklı aralıklarda denemelerin yapılması çöktürme veriminin her bir bakteriyosin için farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Todorov ve diğ. (2011) tarafından yapılan çalışmada *Lactobacillus sakei* R1333 bakterisinin ürettiği bakteriyosinin saflaştırılmasında

amonyum sülfat çöktürmesi % 60 konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise *Lactobacillus casei* TN-2 bakteriyosininin saflaştırılmasında % 20, 40, 80 ve 100 oranında amonyum sülfat konsantrasyonları tercih edilmiştir (Lü ve diğ. 2014a). Konsantrasyon farklılıkları amonyum sülfat çöktürmesinde her bir yeni bakteriyosin için farklı oranların denenerek en yüksek verimin alındığı amonyum sülfat oranının tercih edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Tablo 3.4: Amonyum sülfat konsantrasyonuna karşılık protein konsantrasyonları

Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%)	Toplam Protein (mg/100 ml)		
	PFC339	PFC340	PFC341
40	788,47	685,67	599,78
50	876,45	812,45	689,32
60	928,23	868,12	831,56
70	902,34	802,34	786,34

Kültür üst sıvılarından saflaştırılan bakteriyosinlere ait UHPLC kromatogramları ve antibakteriyel aktivite görüntüleri Şekil 3.8, 3.9 ve 3.10'da, saflaştırma basamaklarında tespit edilen protein miktarları, hacimleri ve aktivite değerleri Tablo 3.5, 3.6 ve 3.7'de verilmiştir.



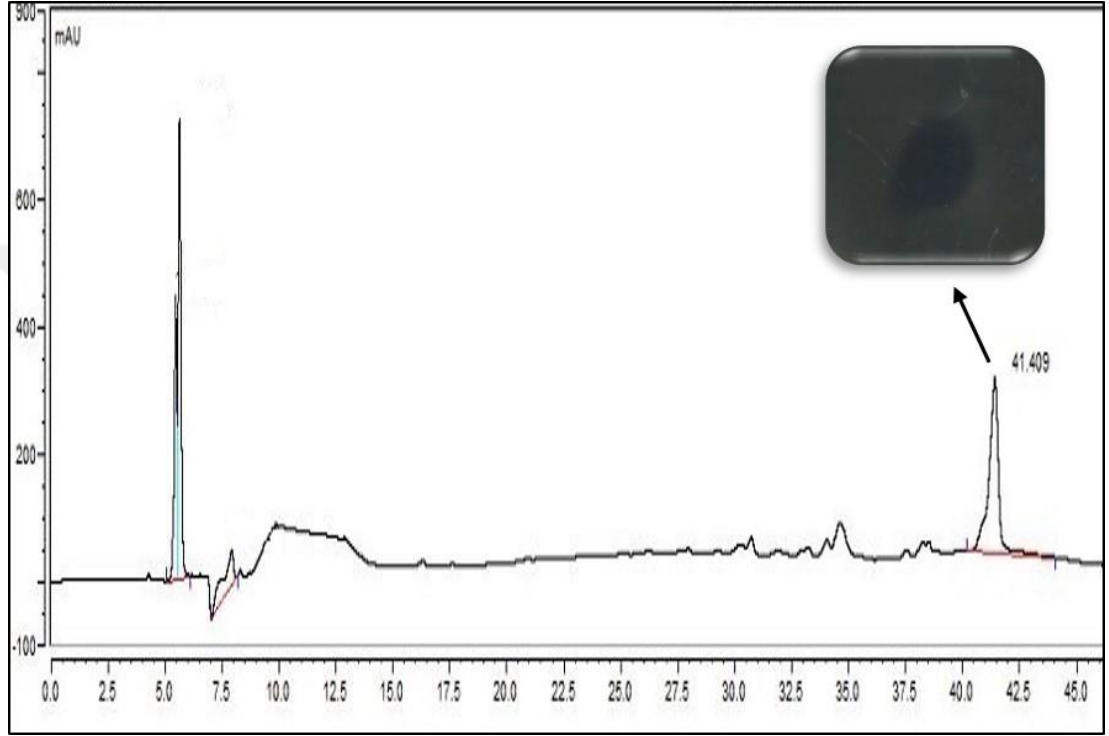
Şekil 3.8: PFC339 izolatının UHPLC kromotogramı ve fraksiyona ait antibakteriyel aktivite

Tablo 3.5: PFC339 izolatının saflaştırma basamaklarında bakteriyosin aktiviteleri ve protein miktarları

İzolat	Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Antibakteriyel Aktivite (AU/ml)	Antibakteriyel Aktivite (Toplam AU)	Spesifik Aktivite (AU/mg)	Spesifik Aktivite Artışı
PFC 339	CFS	2000	94890	320	640000	6,74	1,00
	ASÇ	30	278,52	320	9600	34,47	5,11
	SPE	5	11,44	400	2000	174,83	25,94
	UHPLC	3	3,95	800	2400	607,59	90,15
CFS: Kültür üst sıvısı, ASÇ: Amonyum sülfat çöktürmesi, SPE: Katı faz ekstraksiyonu, UHPLC: Sıvı kromatografisi							

PFC339 bakteriyosini kültür üst sıvısında spesifik bakteriyosin aktivitesi 6,74 AU/mg olarak tespit edilmiş ve saflaştırmanın son basamağında UHPLC kromotogramında 41. dk'da yer alan pikde antibakteriyel aktivite tespit edilmiş ve spesifik aktivite 607,59 AU/mg'ye ulaşmıştır. Üç basamaklı saflaştırma sonunda, 90,15 katlık bir spesifik aktivite artış oranına ulaşılmıştır. PFC339 bakteriyosini için saflaştırma basamaklarına karşılık protein miktarlarına bakıldığında saflaştırma işleminin olağan bir şekilde gerçekleştiği söylenebilir. Protein konsantrasyonu saflaştırma basamaklarıyla birlikte azalırken, spesifik aktivitenin arttığı belirlenmiştir.

Saflaştırma basamaklarında her ne kadar protein kaybı gözükse de antibakteriyel aktivite artışı saflaştırma işleminin gerçekleştirildiğini göstermektedir. UHPLC sonunda elde edilen antibakteriyel aktivite ve protein miktarına karşılık yüksek bir spesifik aktivite değeri tespit edilmiştir. Nitekim yapılan çalışmalarda da bakteriyosinlerin saflaştırma basamaklarında benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Zhu ve diğ. 2014, Woraprayotea ve diğ. 2015, Hu ve diğ. 2017).



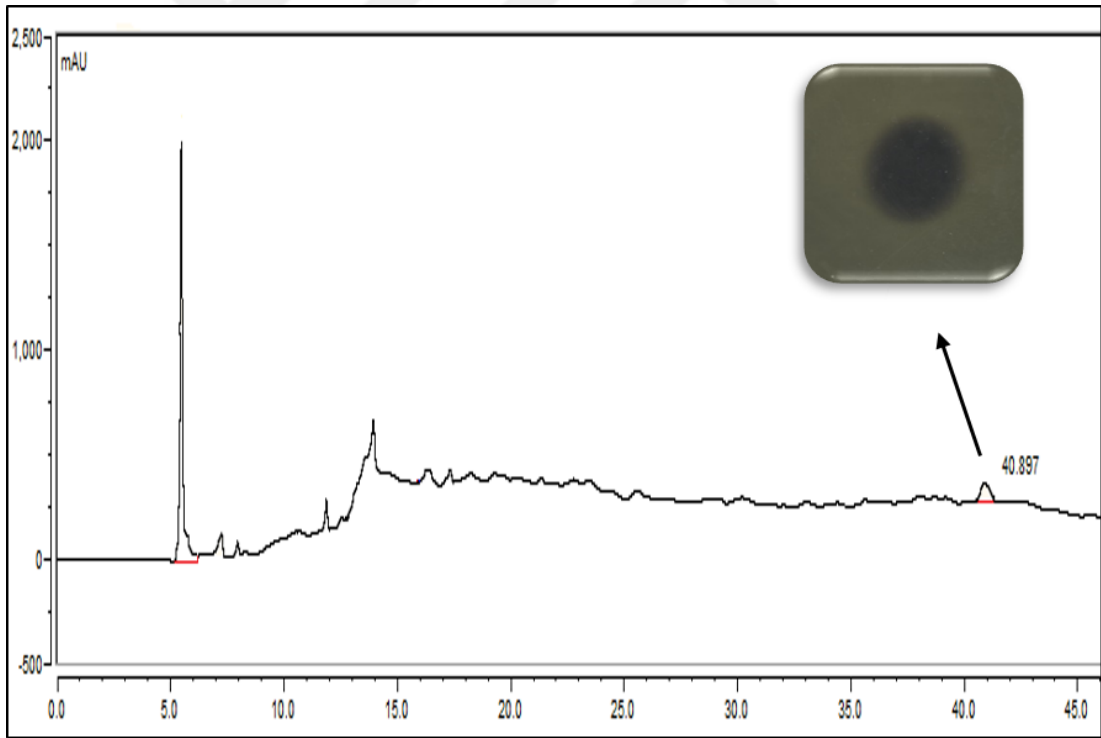
Şekil 3.9: PFC340 izolatının UHPLC kromatogramı ve fraksiyona ait antibakteriyel aktivite

Tablo 3.6: PFC340 izolatının saflaştırma basamaklarında bakteriyosin aktiviteleri ve protein miktarları

İzolat	Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Antibakteriyel Aktivite (AU/ml)	Antibakteriyel Aktivite (Toplam AU)	Spesifik Aktivite (AU/mg)	Spesifik Aktivite Artışı
PFC 340	CFS	2000	63030	320	640000	10,15	1,00
	ASÇ	30	264,84	320	9600	36,25	3,57
	SPE	5	4,47	640	3200	715,88	70,53
	UHPLC	3	1,63	800	2400	1472,39	145,06
CFS: Kültür üst sıvısı, ASÇ: Amonyum sülfat çöktürmesi, SPE: Katı faz ekstraksiyonu, UHPLC: Sıvı kromatografisi							

PFC340 bakteriyosini kültür üst sıvısının spesifik aktivitesi 10,15 AU/mg olarak belirlenmiş, UHPLC saflaştırma basamağında 41. dk'da toplanan pikde

antibakteriyel aktivite tespit edilmiş ve spesifik aktivitesi 1472,39 AU/mg olarak belirlenmiştir. Saflaştırma basamakları sonunda 145,06 katlık bir spesifik aktivite artış oranına ulaşılmıştır. PFC340 bakteriyosini için de protein konsantrasyonunun saflaştırma basamaklarıyla birlikte azaldığı ve spesifik aktivitenin de arttığı belirlenmiştir. Saflaştırma basamaklarında protein kayıpları gerçekleşmiş olsa da spesifik aktivitede ki artışın saflaştırma işleminin uygun şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. UHPLC sonunda elde edilen antibakteriyel aktivite ve protein miktarına karşılık yine yüksek bir spesifik aktivite değeri tespit edilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda saflaştırma basamaklarında meydana gelen protein kayıplarının olağan olduğu ve buna karşılık da antibakteriyel aktivitede artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak saflaştırma ile birlikte özellikle spesifik aktivitede artış meydana geldiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Pei ve diğ. 2013, Dündar ve diğ. 2014, Elayarajal ve diğ. 2014, Zommiti ve diğ. 2016, An ve diğ. 2017). Çalışmamızda da saflaştırma basamaklarında literatür verilerine benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.10: PFC341 izolatının UHPLC kromotogramı ve fraksiyona ait antibakteriyel aktivite

Tablo 3.7: PFC341 izolatının saflaştırma basamaklarında bakteriyosin aktiviteleri ve protein miktarları

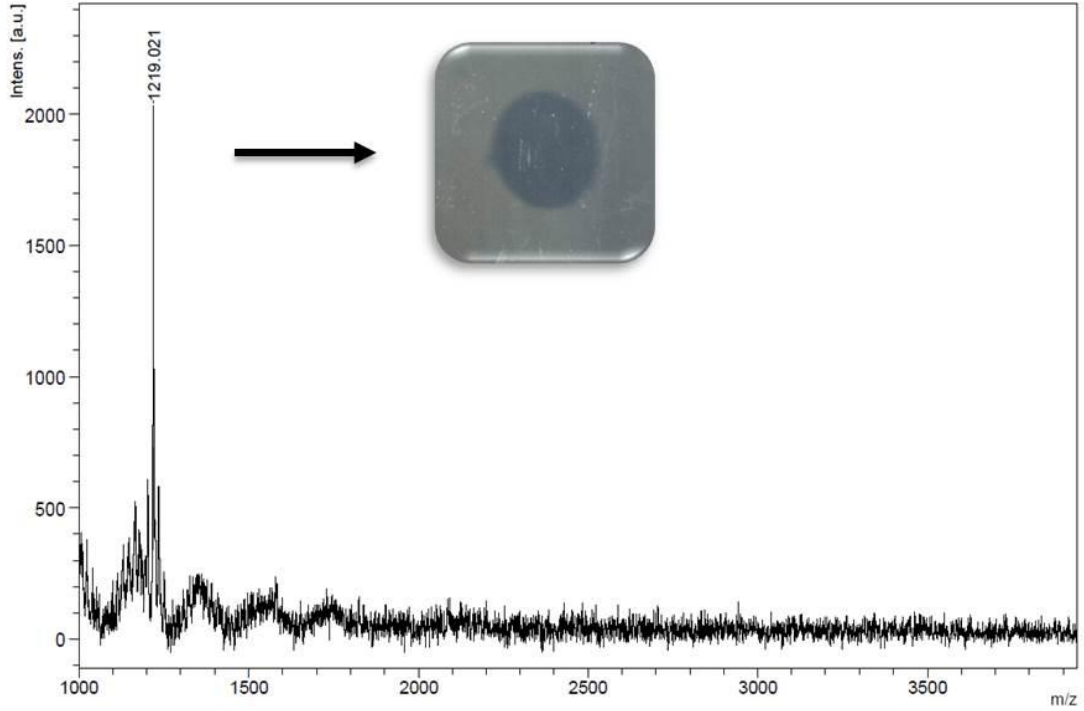
İzolat	Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Antibakteriyel Aktivite (AU/ml)	Antibakteriyel Aktivite (Toplam AU)	Spesifik Aktivite (AU/mg)	Spesifik Aktivite Artışı
PFC 341	CFS	2000	50040	160	320000	6,39	1,00
	ASÇ	30	252,99	160	4800	18,97	2,97
	SPE	5	8,57	200	1000	116,69	18,26
	UHPLC	3	2,02	200	600	297,03	46,48
CFS: Kültür üst sıvısı, ASÇ: Amonyum sülfat çöktürmesi, SPE: Katı faz ekstraksiyonu, UHPLC: Sıvı kromatografisi							

PFC341 bakteriyosinin kültür üst sıvısı spesifik aktivitesi 6,39 AU/mg olarak tespit edilmiştir. UHPLC kromotogramında antibakteriyel aktivite tespit edilen 40. dakikada toplanan pikde spesifik aktivite 297,03 AU/mg'ye ulaşmıştır. Saflaştırma işlemleri sonucunda 46,48 kat spesifik aktivite artış oranına oranına erişilmiştir. PFC341 bakteriyosini için de protein konsantrasyonunun saflaştırma basamaklarıyla birlikte azaldığı ve spesifik aktivitenin de arttığı belirlenmiştir. Saflaştırma basamaklarında protein kayıpları gerçekleşmiş ve buna karşılık spesifik aktivitede artış meydana gelmiştir. Bu da saflaştırma işleminin uygun şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. UHPLC sonunda elde edilen antibakteriyel aktivite ve protein miktarına karşılık yine yüksek bir spesifik aktivite değeri tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda saflaştırma basamaklarında protein kayıplarının meydana geldiği ve buna karşılık da antibakteriyel aktivitede artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Saflaştırma ile birlikte özellikle spesifik aktivitede artış meydana geldiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Zhu ve diğ. 2014, Zommiti ve diğ. 2016, An ve diğ. 2017). Çalışmamızda da saflaştırma basamaklarında yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

3.6 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Moleküler Büyüklükleri

Patojen spesifik bakteriyosinlerin UHPLC sisteminden geçirildikten sonra saflaştırılması neticesinde fraksiyonlar liyofilize edilmiş ve sonrasında antibakteriyel aktivite kontrolü yapıldıktan sonra moleküler büyüklüklerinin tespiti amacıyla MALDI-TOF cihazı (Bruker Daltonics, Microflex LT, ABD) kullanılmıştır.

Lactobacillus plantarum PFC339 tarafından üretilen bakteriyosinin molekül kütlesi 1219.021 Da olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.11). Bu bakteriyosinin molekül kütlesi karşılaştırma yapılan plantaricinlerin molekül kütlelerinden farklıdır (Zhu ve diğ. 2014, Wen ve diğ. 2016). Bu sonuç PFC339 bakteriyosinin yeni bir plantaricin olabileceğine işaret etmektedir.

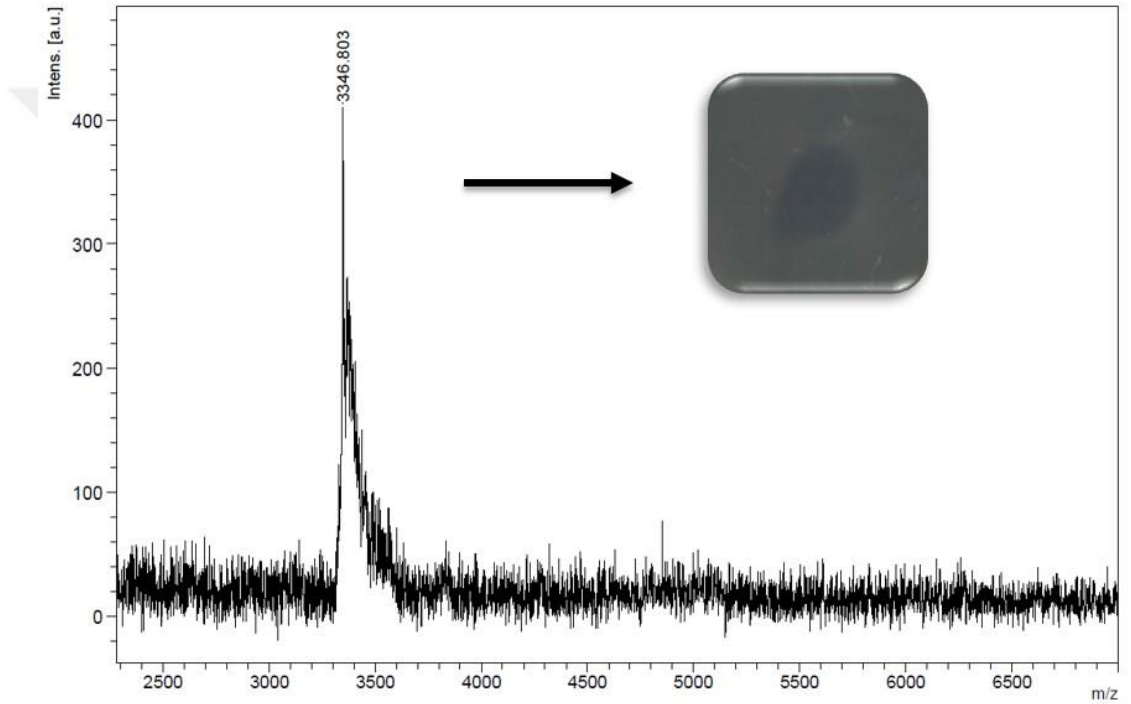


Şekil 3.11: PFC339 bakteriyosini MALDI-TOF kütle spektrometresi spektrumu

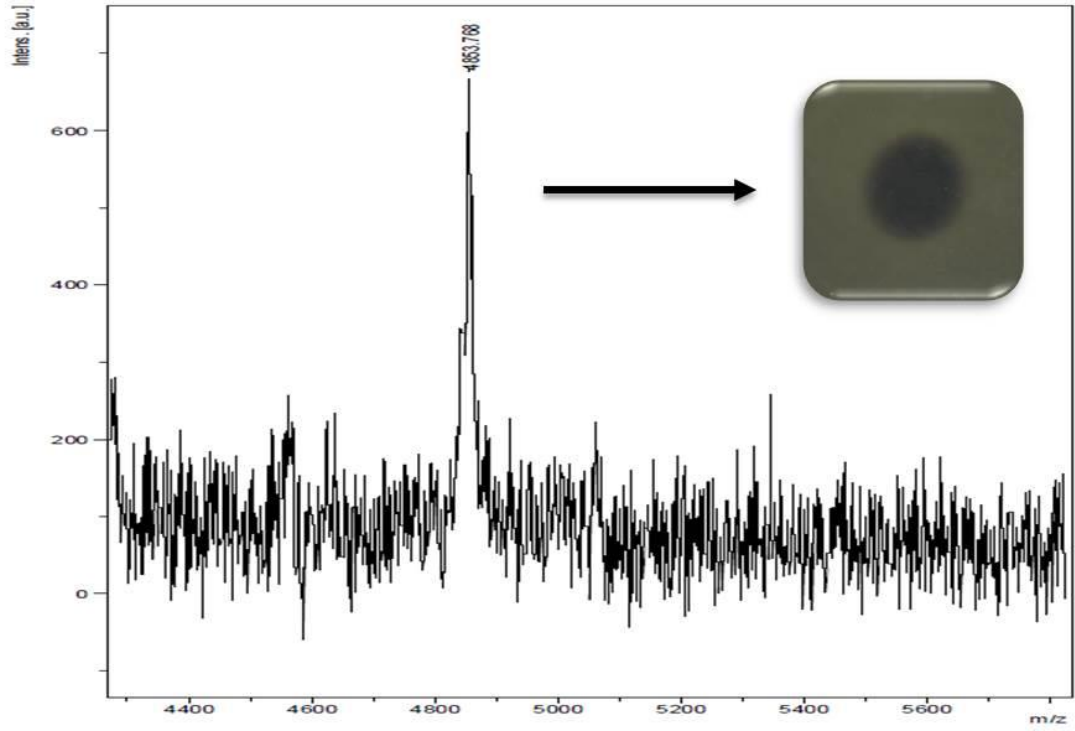
Enterococcus faecalis PFC340 ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* PFC341 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin molekül büyüklüğü sırasıyla 3346.803 ve 4853.768 Da olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.12, 3.13). Çeşitli bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* suşları tarafından üretilen enterocinler için rapor edilen molekül kütlelerinin, 3,5 kDa ile 6 kDa arasında değiştiği bildirilmiştir (Balla ve diğ. 2000, Abanoz ve Kunduhoğlu 2018). Ayrıca, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* tarafından üretilen bakteriyosin üzerinde yapılan tek çalışmada molekül büyüklük 6 kDa olarak belirlenmiştir (Borris ve diğ. 2001). Bakteriyosinlerin molekül büyüklüğünün tespitinde bugüne kadar tricine SDS-PAGE yöntemi kullanılmaktaydı. Bu yöntemlerde molekülün yaklaşık boyutu öğrenilebilmekteydi. Buna göre PFC340 tarafından üretilen enterocin mevcut bilgilere oldukça yakın iken, *L. delbrueckii* subsp.

lactis PFC341 tarafından üretilen bakteriyosinin oldukça farklıdır. Bu sonuç PFC341'in ürettiği bakteriosinin yeni ve farklı olabileceğine işaret etmektedir.

Son yıllarda yeni bakteriyosinlerin tespitinde kütle spektrometresi ile moleküler büyüklüğün belirlenmesinin yanı sıra bakteriyosinlerin aminoasit sekans analizinde gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızda saflaştırdığımız bakteriyosinlerin aminoasit sekanslarının da yapılarak mevcut veritabanlarında yer alan sekanslar ile karşılaştırılması ve bunun sonucunda yeni birer bakteriyosin olup olmadığı konusunda sonuçlarımızı destekleyici verilerin elde edilmesi de faydalı olacaktır.



Şekil 3.12: PFC340 bakteriyosini MALDI-TOF kütle spektrometresi spektrumu



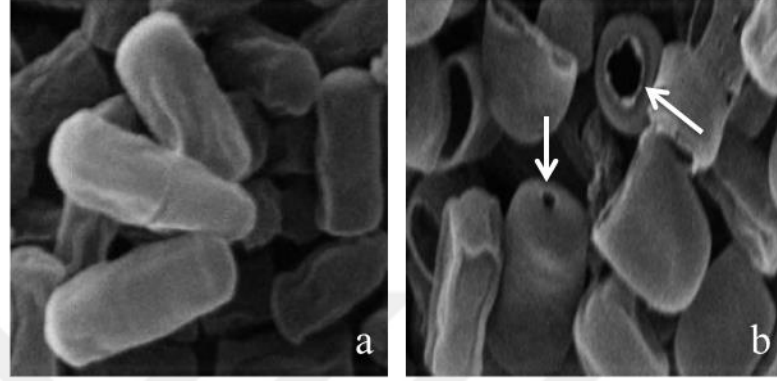
Şekil 3.13: PFC341bakteriyosini MALDI-TOF kütle spektrometresi spektrumu

3.7 Patojen Spesifik Bakteriyosinlerin Patojen Bakteriler Üzerine Antibakteriyel Etkisinin FE-SEM Görüntüleri

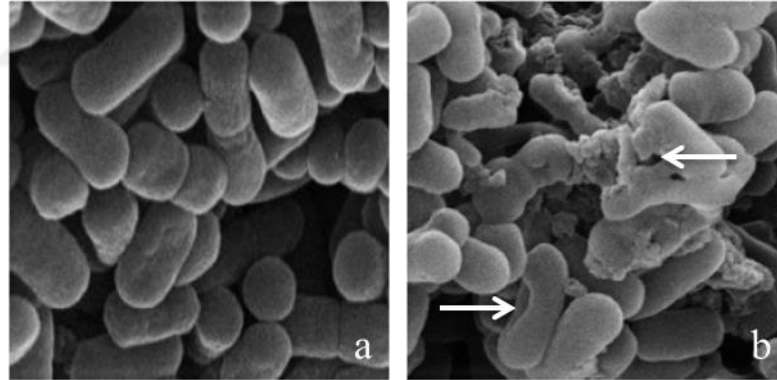
Patojenlere spesifik bakteriyosin kültür üst sıvılarının indikatör bakteri karışımı hücreleri üzerinde antibakteriyel aktiviteleri sonucunda oluşan hücrelerin morfolojik değişimleri Şekil 3.14, 3.15 ve 3.16’da gösterilmiştir.

PFC339, PFC340 ve PFC341 bakteriosinleri ile muamele edilen ve edilmeyen kontrol *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* suşlarının FE-SEM görüntüleri incelendiğinde, PFC339 ve PFC341 bakteriosinlerinin hücrelerin baş kısımlarında porlar oluşturdukları dikkati çekmektedir. PFC340 bakteriyosini ise düzgün hücre yüzeyinin bozulmasına neden olarak hücre içi sıvısının kaybına ve büzüşmelere neden olmaktadır. Görüntülerden anlaşıldığı kadarıyla, PFC339 ve PFC341 bakteriyosinlerinin indikatör hücreler üzerinde benzer, PFC340 bakteriyosinin ise iki bakteriyosinden farklı bir etki mekanizmasına sahip olduğu düşünülmektedir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde literatürde yer alan çalışmalarla benzer şekilde, bakteriyosinle muamele edilen hücrelerin kontrol hücrelerine göre hücre

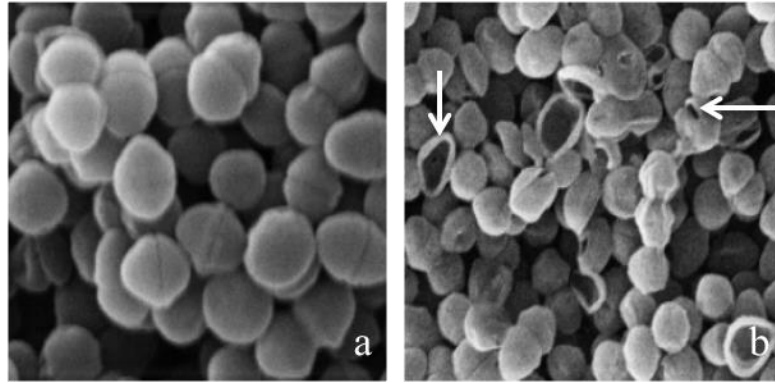
yapılarında ve morfolojilerinde değişiklikler meydana geldiği görülmektedir. Hücre yüzey yapıları değişmiş, porlar meydana gelmiş ve hücre duvarı geçirgenliğinde meydana gelen değişimler sonucunda oluşan porlardan hücre içi sıvının hücre dışına taşmasına ve hücrelerin ölümüne neden olmuştur (L  ve diğ. 2014b, Wang ve diğ. 2014).



şekil 3.14: PFC339 bakteriyosini ile muamele edilen *B. cereus* suşlarının morfolojik görünümü (a: Kontrol b:  rnek)



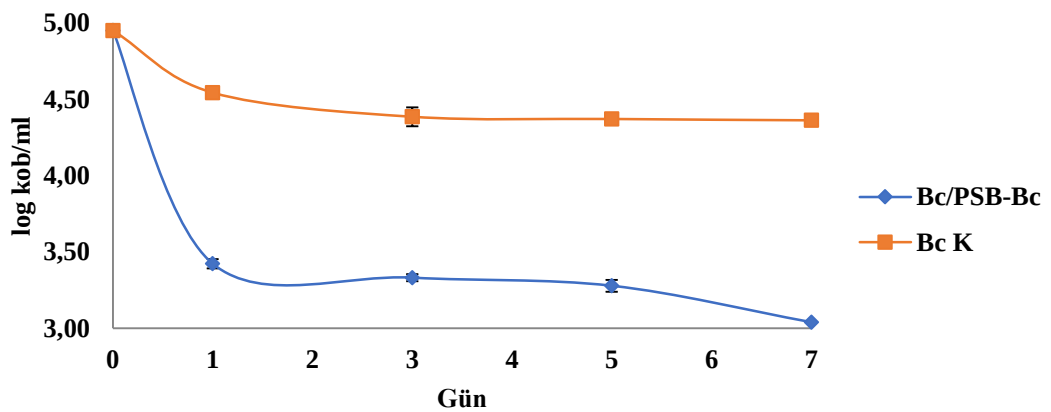
şekil 3.15: PFC340 bakteriyosini ile muamele edilen *L. monocytogenes* suşlarının morfolojik görünümü (a: Kontrol b:  rnek)



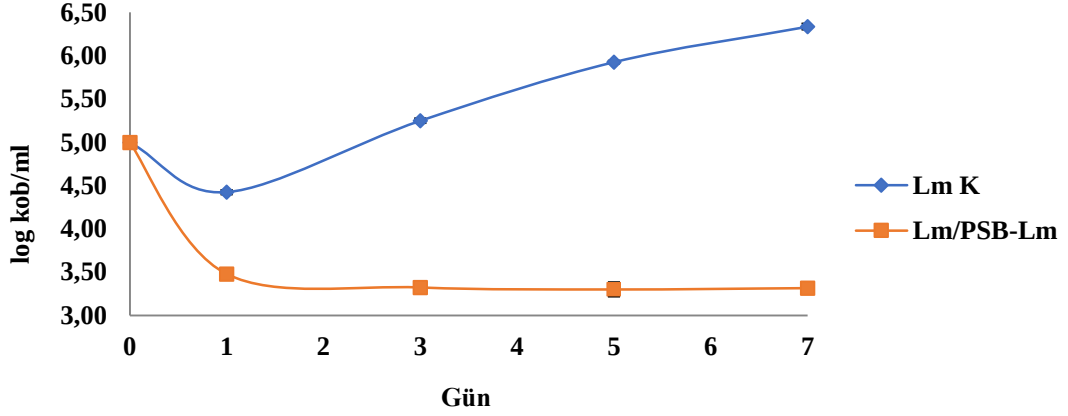
Şekil 3.16: PFC341 bakteriyosini ile muamele edilen *S. aureus* suşlarının morfolojik görünümü (a: Kontrol b: Örnek)

3.8 Patogen Spesifik Bakteriyosinlerin Süt Model Sisteminde Patogen Bakteriler Üzerine Antibakteriyel Etkisi

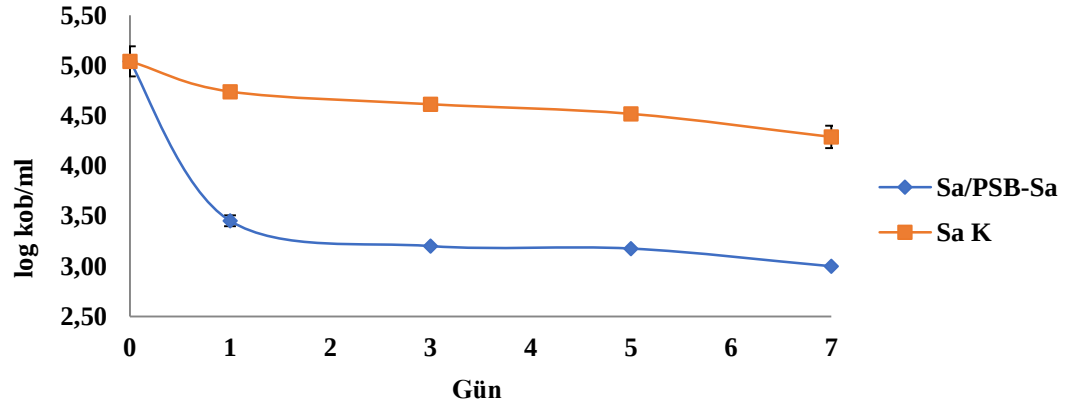
Bakteriyosinler ile patojen bakterilerin tek tek ilave edildiği süt örneklerinde bir haftalık depolama sonunda *B. cereus* sayısı yaklaşık 1,5 log kob/ml, *L. monocytogenes* sayısı 3 log kob/ml, *S. aureus* sayısı 1,5 log kob/ml azalmıştır (Şekil 3.17, 3.18 ve 3.19). Kontrol gruplarıyla kıyaslama yapıldığında bakteriyosinlerin süt ortamında hedef patojenler üzerinde antibakteriyel etkili olduğu anlaşılmıştır ($P < 0,05$).



Şekil 3.17: Anti-*B. cereus* (PSB-Bc) bakteriyosininin *B. cereus* suşlarının karışımına karşı antibakteriyel etkisi

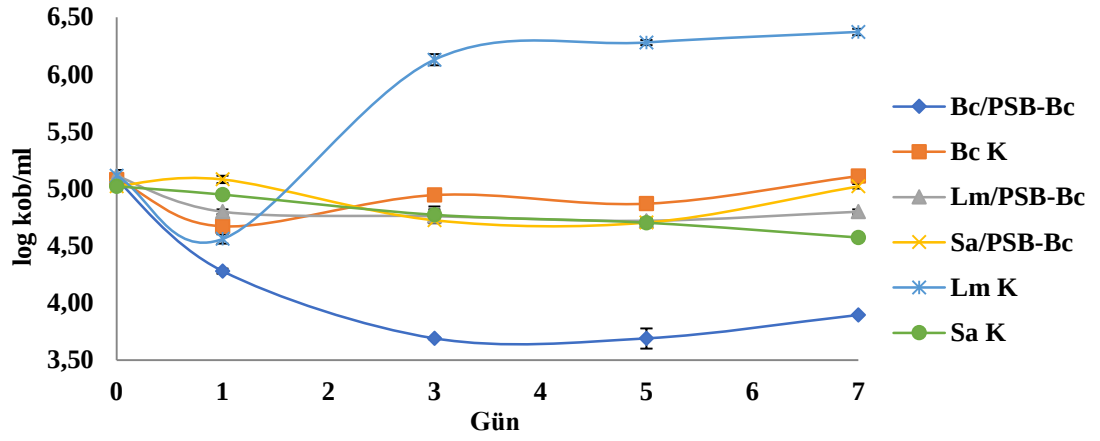


Şekil 3.18: Anti-*L. monocytogenes* (PSB-Lm) bakteriyosininin *L. monocytogenes* suşlarının karışımına karşı antibakteriyel etkisi

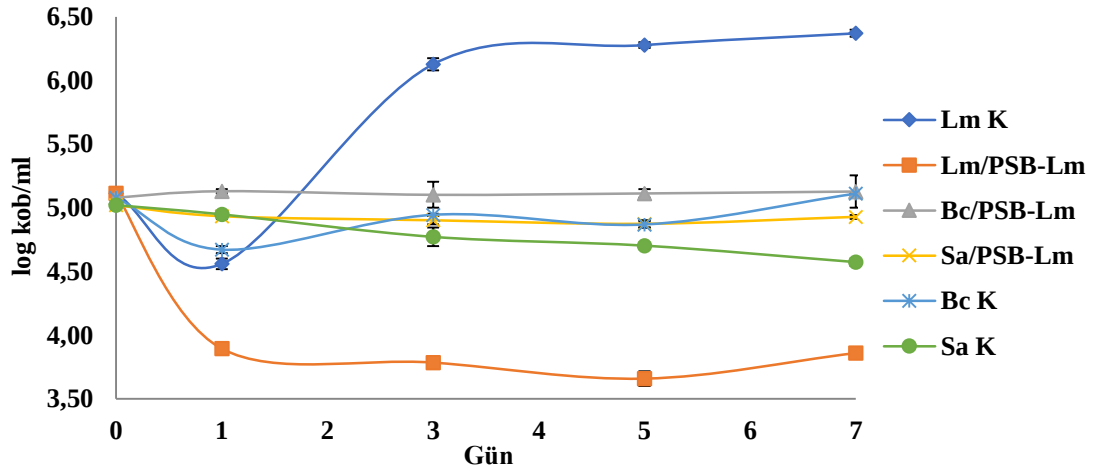


Şekil 3.19: Anti-*S. aureus* (PSB-Sa) bakteriyosininin *S. aureus* suşlarının karışımına karşı antibakteriyel etkisi

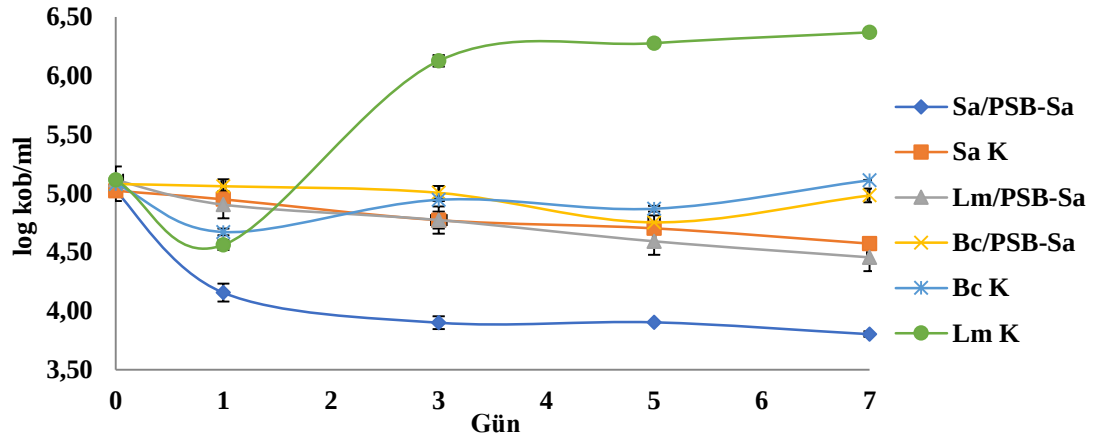
Tek bakteriyosin ile tüm patojen bakterilerin birlikte bulunduğu süt örneklerinde *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* sayıları sırasıyla 1,5, 2,5 ve 1 log kob/ml azalmıştır (Şekil 3.20, 3.21 ve 3.22). Süte ilave edilen patojen-spesifik bakteriyosinler hedef patojen bakteri üzerinde antibakteriyel etkili olurken, diğer iki patojen üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Bu sonuç denenen bakteriyosinlerin oldukça patojen spesifik antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca hiçbir bakteriyosin içermeyen ve üç patojen bakteriyi içeren süt örneklerinde ise depolama ile birlikte *L. monocytogenes* hariç hücre sayısı değişmemiştir. Lakin *L. monocytogenes* sayısı ise depolama ile birlikte artmıştır ($P < 0,05$).



Şekil 3.20: Anti-*B. cereus* (PSB-Bc) bakteriyosininin bütün indikatör karışımlarına karşı antibakteriyel etkisi

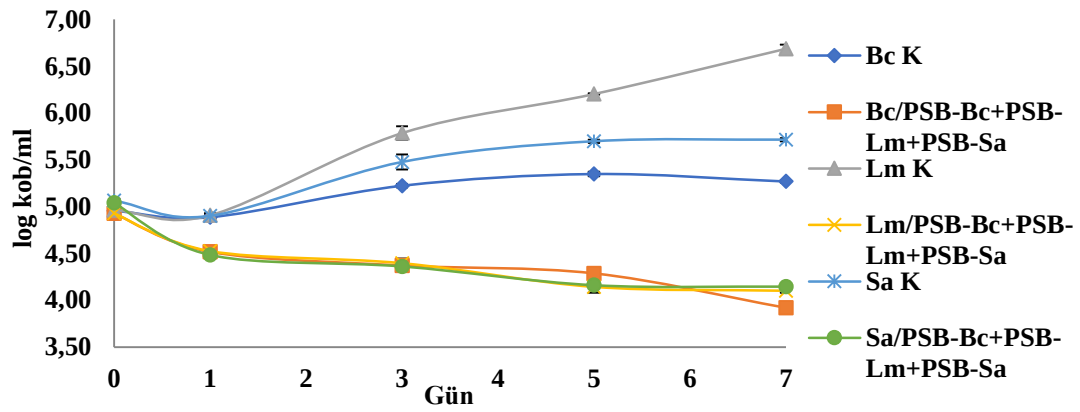


Şekil 3.21: Anti-*L. monocytogenes* (PSB-Lm) bakteriyosininin bütün indikatör karışımlarına karşı antibakteriyel etkisi



Şekil 3.22: Anti-*S. aureus* (PSB-Sa) bakteriyosinin bütün indikatör karışımlarına karşı antibakteriyel etkisi

Patojenleri markaja almak ve gıda güvenliğini garanti etmek için, söz konusu bakteriyosinler süt ortamına her birisinden 100 AU/ml olacak şekilde kokteyl olarak ilave edilmiş ve 5 log kob/ml inoküle edilen *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* suşlarına karşı spesifik antibakteriyel etkinlik tespit edilmiştir. Şekil 3.23 incelendiğinde süt içerisinde bir hafta depolama sonunda *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* sayılarında sırasıyla 1,5, 3 ve 2 log kob/ml azalma gerçekleşmiştir. Buna karşın bakteriyosin içermeyen kontrol gruplarında inoküle edilen patojen bakterilerin sayısında kısmi artış gözlenmiştir ($P < 0,05$). Bu sonuçlar gıda sistemlerinde hedef patojen bakterilere karşı spesifik aktivitesi bulunan bakteriyosinlerin kokteyl formunda kullanılması durumunda patojen bakterileri başarıyla durdurabildiğini göstermiştir. Çeşitli gıda sistemlerinde bakteriyosin kullanılmasının patojen bakterilerin gelişimini engellediği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Munoz ve diğ. 2004, Arques ve diğ. 2011, Alves ve diğ. 2016). Ancak bu çalışmalarda gıda sistemlerine ilave edilen bakteriyosinlerin belirli bir spektrumunun bulunması nedeniyle gıda güvenliği riski bulunmaktadır. Patojenler üzerine spesifik etkili bakteriyosinlerin kokteyl formunda uygulanması patojenlerin kontrol edilmesi ve durdurulması için kullanılabilecek yeni bir gıda muhafaza yöntemi yaklaşımıdır.



Şekil 3.23: Anti-*B. cereus* (PSB-Bc), Anti-*L. monocytogenes* (PSB-Lm) ve Anti-*S. aureus* (PSB-Sa) bakteriyosin kokteylinin bütün indikatör karışımlarına karşı antibakteriyel etkisi

Türk Gıda Kodeksi, Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği Ek 1'e (2013) göre nisin için kullanım limitleri farklı gıdalar için 3 mg/L-kg ile 25 mg/L-kg arasında değişmektedir. Çeşitli ülkelerde nisin gıdalarda kullanım limitleri değişkenlik göstermektedir. Buna göre, Avustralya, Birleşik Krallık ve Fransa'da, peynir, peynir tozu ve konserve gıdalar için herhangi bir limit bulunmamaktadır. Rusya'da diyet peynirler ve konserve sebzeler için kullanım limiti maksimum 8000 IU/g iken, Amerika'da, pastörize süttten üretilen peynirlerde maksimum 10000 IU/g nisin kullanımına izin verilmektedir (Gharsallaoui ve diğ. 2015). Nisin çeşitli gıdalarda, farklı bakteriler için kullanım dozları da çeşitli çalışmalar da verilmiştir. Buna göre, pastörize çorba, hamburger ekmeği gibi gıda maddelerinde *B. cereus* için kullanılması gereken nisin miktarı 100-250 IU/g-ml, çeşitli peynirlerde *L. monocytogenes* için kullanılması gereken nisin miktarı 100-2000 IU/g-ml olarak belirlenmiştir (Gharsallaoui ve diğ. 2015).

Ruiz Martinez ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada, yarım yağlı süte *B. cereus* 5 log kob/ml ve *L. monocytogenes* 4 log kob/ml oranında ilave edilmiştir. Sütlere 0,5-1 mg/L nisin (Nisaplin, Danisco, Birleşik Krallık) ilavesi yapılmış ve 21 gün boyunca 6 °C 'de depolanmıştır. 0,5 mg/L nisin ve *B. cereus* ihtiva eden sütte *B. cereus* sayısı 6. gün sonunda 3 log kob/ml civarında, 1 mg/L nisin ve *L. monocytogenes* ilaveli sütte *L. monocytogenes* 6. gün sonunda 1 log kob/ml civarında tespit edilmiştir. Yine 400 ve 500 IU/mL nisin (Nisaplin, Danisco, Brezilya) ilave edilen minas frescal peynirlerinde *S. aureus* sayısının kontrol örneğinde 4 °C'de, 30 günlük depolama

sonunda 7 log kob/g olarak tespit edilmiştir. 400 IU/g nisin ilave edilen örnekte bu sayı 6,5 log kob/g, 500IU/g nisin ilave edilen örnekte ise 6 log kob/g olarak tespit edilmiştir (Felicio ve diğ. 2015).

Verma ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışmada çiğ buffalo sütüne % 1, 5 ve 10 oranında kısmi saflaştırılmış pediocin PA-1 ilave edilmiştir. Süte aynı zamanda 10^5 kob/ml *S. aureus* ilave edilmiştir. 6 sa sonunda kontrol örneğinde *S. aureus* sayısı 9 log kob/ml'ye yükselmiş ve % 1, 5 ve 10 oranında pediocin PA-1 içeren örneklerde bu sayı sırasıyla, 5, 4 ve 3 log kob/ml olarak tespit edilmiştir.

Ribeiro ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışmada *E. faecalis* L3B1K3 suşu tarafından üretilen kısmi saflaştırılmış enterocin taze peynir örneklerine, 134, 268 ve 536 µg/g olarak ilave edilmiş, peynirler 4 °C'de, 4 gün boyunca depolanmış ve süte başlangıçta 10^5 kob/ml ilave edilen *L. monocytogenes* ATCC 7644 sayımları gerçekleştirilmiştir. Üçüncü günün sonunda *L. monocytogenes* sayısı kontrol örneğinde 7 log kob/g, 134 µg/g enterocin ilave edilen örnekte 6 log kob/g, 268 µg/g enterocin ilave edilen örnekte 4 log kob/g olarak tespit edilmiş ve 536 µg/g enterocin ilave edilen örnekte *L. monocytogenes* tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda tercih edilen bakteriyosin konsantrasyonunun ülkemizde ve bazı dış ülkelerde belirlenen limitler ile kıyaslandığında düşük olduğu tespit edilmiş, fakat tercih edilen dozun süt model sisteminde patojenlere karşı spesifik olarak başarılı bir şekilde uygulaması gerçekleştirilmiştir. Yine yapılan çalışmalarda kullanılan nisin, pediocin ve enterocin gibi bakteriyosin miktarları ile yaklaşık olarak benzer oranlarda bakteriyosinin süt model sisteminde kullanıldığı tespit edilmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada çeşitli fermente gıdalardan izole edilen ve üç farklı patojen karışımına karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip üç farklı laktik suşun bakteriyosin üretimi izlenmiş ve bu bakteriyosinlerin belirtilen patojen bakteri karışımları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda bakteriyosin üreticisi laktik suşlar kullanılarak süt model sisteminde *in vivo* koşullarda bakteriyosin üretimleri tespit edilmiş ve üretilen bakteriyosinlerin patojen bakterilerin gelişiminin spesifik olarak engellenmesi yönündeki başarısı tespit edilmiştir.

B. cereus, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterilerine ait beş farklı suştan oluşan üç farklı karışıma karşı antibakteriyel aktiviteye sahip üç farklı laktik suş izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriyosin üreticisi bu suşların ürettiği bakteriyosinler saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve moleküler büyüklükleri tespit edilmiştir. Kısmi saflaştırılan bakteriyosinler, süt model sisteminde patojen bakteri suş karışımlarına karşı tek tek ve kokteyl halinde denenmiştir. Yapılan *in vivo* çalışma sonucunda bakteriyosinlerin hedefe yönelik olarak etkili oldukları ve patojenlere spesifik olarak antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Çalışmamız sonucunda, mevcut izolasyon yönteminden farklı olarak patojen bakterilerin belirli bir türüne ait suşlarının karışımının bakteriyosin üreticisi seçimi doğrultusunda indikatör olarak kullanılması, spesifik antibakteriyel aktiviteye sahip yeni bakteriyosin üreticilerin tespitine imkan tanımıştır. Böylece mevcut çalışmalarda izole edilenlerin aksine patojen türlerin birçok suşuna karşı antibakteriyel etkili bakteriyosin üreticisi LAB izolatlarına ulaşılmıştır. Bu doğrultuda, çalışmada *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* türlerinin suşlarına karşı spesifik etkisi bulunan ve yeni bakteriyosinleri ürettiği tespit edilen *L. plantarum*, *E. faecalis* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* suşları tanımlanmıştır. Yeni izolasyon tekniği ile bir patojen suşa spesifik etkili ve diğer suşlara karşı etkisiz yada kısmen etkisi bulunan ve de LAB'ye karşı antibakteriyel etkisi bulunmayan bakteriyosin üreticileri hedeflendiği şekilde başarılı bir şekilde izole edilmiştir.

Bakteriyosinlerin gıdalarda sorunlara yol açan patojenlere karşı dar spektruma sahip olmaları gıda sistemlerinde kullanımlarını sınırlı hale getirmektedir. Bakteriyosinlerin kokteyl haline getirilerek kullanılması neticesinde bu sorunun

ortadan kalkacağı çalışmamız neticesinde başarılmıştır. Farklı gıda patojenlerine karşı spesifik etkili bakteriyosinlerin gıdalarda kokteyl haline getirilerek geniş antibakteriyel spektrumlu kullanımları, gıdaların bu doğal koruyucular ile güvenli hale getirilmesine imkan tanıyacaktır. Çalışmamızda saflaştırılan bakteriyosinlerin kokteyl formunda sütte başarılı bir şekilde uygulaması ve patojenler üzerine antibakteriyel etkisi gıda muhafazası açısından yeni bir yaklaşımı ortaya çıkarmıştır. Bu strateji ile gıda sistemlerinde farklı patojen bakterilerin varlığı riski en aza indirilebilecektir. Neticede doğal koruyucular olan bakteriyosinlerin kokteyl halinde kullanımı ile daha sağlıklı ve güvenli gıdaların tüketimi mümkün hale gelecektir.

B. cereus, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gıdalarda bozulmaya sebep olan ve insanlarda çeşitli hastalıklara neden olan en önemli gıda kaynaklı patojenlerdir. Ülkemizde ve dünyada patojenler vasıtasıyla gıdalar bozulmakta ve gıda kaynaklı patojenler nedeniyle insanlar hastalanmakta, tedavi altına alınmakta ve hatta bir kısmı da ölümle sonuçlanmaktadır. Gıdaların bozulması ve insanların tedavi süreçleri neticesinde ciddi ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Çalışmamız neticesinde gıda sistemlerinde kullanıma hazır bakteriyosinler ve bakteriyosin kokteyli ile ekonomik kayıplar en aza indirgenebilecek ve sağlıklı gıda tüketimi mümkün hale gelecektir.

Sonuç olarak, *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* türlerinin suşlarına karşı, üç spesifik bakteriyosin üreticisi izole edilmiştir. Bu bakteriyosin üreticisi suşların sırasıyla *L. plantarum*, *E. faecalis* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* olduğu belirlenmiş ve bu bakteriyosinlerin sırasıyla *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* türlerinin suşlarına karşı spesifik etkilerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Çalışmamız da bu bakteriyosinlerin kokteyl halinde süt model sisteminde kullanılması sonucunda gıdalarda sorun oluşturan patojenlerin engellenebileceği ve bu sonucunda bakteriyosinlerin kokteyl halinde kullanılması neticesinde başarıldığı sonucuna ulaşılmıştır.

5. KAYNAKLAR

Abanoz, H.S. and Kunduhoglu, B. “Antimicrobial Activity of a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* KT11 against Some Pathogens and Antibiotic-Resistant Bacteria”, *Korean J. Food Sci. An.*, 38,(5),1064-1079, (2018).

Acedo, J. Z., Chiorean, S., Vederas, J. C. and van Belkum, M. J. “The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 42,6,805-828, (2018).

Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Karaawi, M.A.A. and Siddiqui, M.U. “Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation”, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 49,1–11 (2017).

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. and Kuipers, O.P. “Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100,2939–2951, (2016).

Alves, F.C.B., Barbosa, L.N., Andrade, B.F.M.T., Albano, M., Furtado, F.B., Pereira, A.F.M., Rall, V.L.M. and Júnior, A.F. “Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk”, *J. Dairy Sci.*, 99,1–6, (2016).

Amso, Z. Bisset, S.W Yang, S-H. Harris, P.W.R. Wright, T.H. Navo, C.D. Patchett, M.L. Norrisbc, G.L. and Brimble, M.A. “Total chemical synthesis of glycocin F and analogues: S-glycosylation confers improved antimicrobial activity”, *Chem. Sci.*, 9,1686–1691, (2018).

An, Y., Wang, Y., Liang, X., Yi, H., Zuo, Z., Xu, X., Zhang, D., Yu, C. and Han, X. “Purification and partial characterization of M1-UVs300, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented sausage”, *Food Control*, 81,211-217, (2017).

Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I. and Koidis, P. “Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization”, *Bioresour. Technol.*, 99,5384–5390, (2008).

Arnison, P. G., Bibb, M. J. and Bierbaum, G. “Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature”, *Nat. Prod. Rep.*, 30(1), 108–160, (2013).

Arqués, J.L., Rodríguez, E., Nuñez, M. and Medina, M. “Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk”, *Food Control*, 22,457-461, (2011).

Aydin, A. Sudagidan, M. and Muratoglu, K. “Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey”, *Int. J.Food Microbiol.*, 148,99–106, (2011).

Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I.F., “Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62,1676-1682, (1996).

Balciunas, E.M. Martinez, F.A.C. Todorov, S.D. Franco, B.D.G.M. Converti, A. and Oliveira, R.P.S. “Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review”, *Food Control*, 32,134-142, (2013).

Balla, E., Dicks, L.M.T., Toit, M.D., Van Der Merwe, M.J. and Holzapfel, W.H. “Characterization and Cloning of the Genes Encoding Enterocin 1071A and Enterocin 1071B, Two Antimicrobial Peptides Produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66,(4),1298–1304, (2000).

Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. “Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45,1808-1815, (1983).

Bastos, M.C.F. Coutinho, B.G. and Varella-Coelho, M.L. “Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications”, *Pharmaceuticals*, 3,1139-1161, (2010).

Beukes, M., Bierbaum, G., Sahl, H.G. and Hastings, J.W. “Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66,23-28, (2000).

Bharti, V., Mahta, A., Singh, S., Jain, N., Hirwal, L. and Mehta, S. “Bacteriocin: A Novel Approach for preservation of Food”, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 7,(9),20-29, (2015).

Boris, S., Jimenez-Diaz, R., Caso, J.L. and Barbes, C. “Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO004, an intestinal isolate with probiotic potential”, *J. Appl. Microbiol.*, 91,328-333, (2001).

- Burgos, M.J.G., Pulido, R.P., Aguayo, M.C.L., Gálvez, A. and Lucas, R. “The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications”, *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 22706–22727, (2014).
- Cavera, V.L., Arthura, T.D., Kashtanov, D. and Chikindas, M.L. “Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics”, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 46, 494–501, (2015).
- Chalón, M.C. Acuña, L. Morero, R.D. Minahk, C.J. and Bellomio, A. “Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods: Are they the definite hurdle?”, *Food. Res. Int.*, 45, 735–744, (2012).
- Chen, H. and Hoover, D.G. “Bacteriocins and their food applications”, *Comp. Review in Food Sci. and Food Safe.*, 2, 82–100, (2003).
- Chen, Y., Ludescher, R.D. and Montville, T.J. “Electrostatic Interactions, but Not the YGNGV Consensus Motif, Govern the Binding of Pediocin PA-1 and Its Fragments to Phospholipid Vesicles”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 4770–4777, (1997).
- Chikindas, M.L. Weeks, R. Drider, D. Chistyakov, V.A. and Dicks, L.M.T. “Functions and emerging applications of bacteriocins”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 49, 23–28, (2018).
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. “Bacteriocins: developing innate immunity for food”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 777–788, (2005).
- Cuesta, M.C.M., Kok, J., Herranz, E., Pelaez, C., Requena, T. and Buist, G. “Requirement of Autolytic activity for bacteriocin induced lysis”, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 69, 3174–3179, (2000).
- Daba, G.B. Ishibashi, N. Gong, X. Taki, H. Yamashiro, K. Lim, Y.Y. Zendo, T. and Sonomoto, K. “Characterisation of the action mechanism of a *Lactococcus*-specific bacteriocin, lactococcin Z”, *Journal of J. Biosci. Bioeng.*, (in press) (2018).
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P.D. and Hill, C. “Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *L. monocytogenes* in Cottage cheese”. *Int. J. Food Microbiol.*, 153, 58–65, (2012).
- De Vuyst and L. Leroy, F. “Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications”, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 194–199, (2007).
- Delves-Broughton, J. Blackburn, P., Evans, R.J. and Hugenholtz, J. “Applications of the bacteriocin, nisin”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69, (2), 193–202, (1996).

- Dimov, S. Ivanova, P. and Harizanova, N. “Genetics of Bacteriocins Biosynthesis by Lactic Acid Bacteria”, *Biotechnol. .Biotec. Eq.*, 19,2,4-10, (2005).
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. “Bacteriocin Production: a Probiotic Trait?”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78,(1),1-6, (2012).
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, LM. and Prevost, H., “The continuing story of class IIa bacteriocins”, *MMBR*, 70,564-582, (2006).
- Dündar, H., Çelikbıçak, O., Salih, B. and Bozoğlu, T.F. “Large-scale purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* using diatomite calcium silicate”, *Turk. J. Biol.*, 38,611-618, (2014).
- Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P. and Balasubramanian, T. “Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 4,305-311, (2014).
- Elicevik, S. Ucar, F. and Yalcın, H.T. “Gıda Kökenli *Bacillus cereus* Strainlerinin Bakteriyosin Üretme Kapasitelerinin Araştırılması”, *Elektro. Mikrobiyol. Der.*, 06,(3),25-38, (2008).
- Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. “Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation”, *J. Biosci. Bioeng.*, 87,705-716, (1999).
- Felicio, B.A., Pinto, M.S., Oliveira, F.S., Lempk, M.W., Pires, A.C.S. and Lelis, C.A. “Effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and physicochemical properties of Minas Frescal cheese”, *J. Dairy Sci.*, 98,4364–4369, (2015).
- Field, D. Ross, R.P. and Hill, C. “Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives”, *Curr. Opin. Food Sci*, 20,1–6, (2018).
- Field, D., Gaudin, N., Lyons, F., O'Connor, P. M., Cotter, P. D. and Hill, C. “A Bioengineered Nisin Derivative to Control Biofilms of *Staphylococcus pseudintermedius*”, *PLoS One*, 10,(3), (2015).
- Franz, C.M. A. P., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. “Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables”, *J. Basic. Microbiol.*, 37,197-196, (1997).
- Gabrielsen, C. Brede, D. A., Nes, I. F. and Diep, D. B. “Circular Bacteriocins: Biosynthesis and Mode of Action”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 6854-6862, (2014).

Gálvez, A. Abriouel, H. López, R. L. and Ben Omar, N. B., “Bacteriocin-based strategies for food biopreservation”, *Int. J. of Food Microbiol.*, 120,51 –70, (2007).

Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C. and Degraeve, P. “Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, DOI: 10.1080/10408398.2013.763765, (2015).

Griffiths, M.W. and Schraft, H., “*Bacillus cereus* Food Poisoning”, (eds: C. Dodd, T. Aldsworth and R. Stein), *Foodborne Diseases*, Third edition. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00020-6> 395, Elsevier Inc., 395-405, (2017).

Guilhelmelli, F. Vilela, N. Albuquerque, P. Derengowski, L.S. Silva-Pereira, I. and Kyaw, C.M. “Antibiotic development challenges the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance”, *Front. Microbiol., Antimicrob. Agents. Ch.*, 4,354, (2013).

Gülbandılar, A. “Kütahya yöresinde burun mukozasındaki *S. aureus* taşıyıcılığının ve antibiyotik duyarlılığının araştırılması”, *DPÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 18,1-6, (2009).

Güven, K. and Mutlu, M.B. “Properties of *Bacillus cereus* Collected from Different Food Sources”, *Turk. J. Biol.*, 33,101-108, (2008).

Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E. and Klaenhammer, T. R. “Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*”, *J. Food Prot.*, 52,6, 3784-387, (1989).

Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B. and Lotfipour, F. “Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance”, *J. Appl. Microbiol.*, 113,723-736, (2012).

Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E., “Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*”, *J. Bacteriol.*, 173,7491-7500, (1991).

Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y., “Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*”, *J. Gen. Microbiol.*, 138,2725-2731, (1992).

Henderson, J.T., Chopko, A.L. and Van Wasserman, P.D., “Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 295,5-12, (1992).

Heng, N.C.K. and Tagg, J.R. “What's in a name? Class distinction for Bacteriocins”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 4,160, (2006).

Heng, N.C.K., Wescobre, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W. and Tang, J.R., “The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria” (eds: M.A. Riley, M.A. Chavan), *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, Berlin, Springer, 39-63, (2007).

Hill, C., Nes, I.N. and Ross, R.P. Bacteriocins. The 10th LAB Symposium: Thirty years of Research on Lactic acid bacteria, Netherlands, 37-56, (2011).

Hockett, K.L., Clark, M., Scott, S. and Baltrus, D.A. “Conditionally Redundant Bacteriocin Targeting by *Pseudomonas syringae*”, *BioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/167593>, (2017).

Hols, P., Ledesma-García, L., Gabant, P., and Mignolet, J. “Mobilization of Microbiota Commensals and Their Bacteriocins for Therapeutics”, *Trends Microbiol.*, 27,(8),690-702, (2019).

Hu, Y. Liu, X. Shan, C. Xia, X. Wang, Y. Dong, M. and Zhou. J. “Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM4 from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics”, *Food Control*, 77,290-297, (2017).

Iwatani, S. Ishibashi, N. Flores, F.P. Zendo¹, T. Nakayama, J. and Sonomoto, K. “LncR, a TetR-family transcriptional regulator, positively regulates lacticin Q production in *Lactococcus lactis* QU 5”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 363, (2016).

Jack, R.W., Tagg, J.R and Ray, B. “Bacteriocins of gram positive bacteria”, *Microbiol. Rev.*, 59,171-200, (1995).

Jemmi, T., and Stephan, R., “*Listeria monocytogenes* : food-borne pathogen and hygiene indicator”, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 25,(2),571-580, (2006).

Jiang, H., Tang, X., Zhou, Q., Zou, J., Li, P., Breukink, E., and Gu, Q. “Plantaricin NC8 from *Lactobacillus plantarum* causes cell membrane disruption to *Micrococcus luteus* without targeting lipid II”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9182-3>, (2018).

Jimenez, M.A, Barrachi-Saccilotto, A.C., Valdivia, E., Maqueda, M. and Rico, M., “Design, NMR characterization and activity of a 21-residue peptide fragment of bacteriocin AS-48 containing its putative membrane interacting region”, *J. Pep.t Sci.*, 11,29-36, (2005).

Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R., “Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481” *J. Bacteriol.*,167,439-446, (1986).

Jordan, K. and McAuliffe, O., “*Listeria monocytogenes* in Foods”, *Adv Food Nutr. Res.*, <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.006>, (2018).

Juturu, W. and Wu, J.C. “Microbial production of bacteriocins: Latest research development and Applications”, *Biotechnol. Adv.*, 36,2187–2200, (2018).

Juven, B.J., Meinersmann, R.J. and Stern, N.J., “Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry” *J. Appl. Bacteriol.*, 70,(2),95-103, (1991).

Kadariya, J., Smith, T.C., and Thapaliya, D., “*Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health”, *BioMed. Res Int.*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/827965>, 1-9, (2014).

Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P. and Vederas, J.C. “Structure of subtilosin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine”, *J. Am. Chem. Soc.*, 125,4726-4727, (2003).

Kjos, M., Nes, I.F., and Diep, D.B. “Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells”, *Microbiology*, 155, 2949–2961, (2009).

Klaenhammer, T.R., “Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 12,39-85, (1993).

Küçükçetin, A. and Milci, S., “*Staphylococcus aureus* ile Kontamine Olan Peynirlerden Kaynaklanan Gıda Zehirlenmeleri”, *Gıda*, 33, (3), 129-135, (2008).

Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M., “*Staphylococcus aureus* and food poisoning”, *Genet. Mol. Res.*, 2,(1), 63-76, (2003).

Lü, X. Hu, P. Dang, Y. and Liu, B. “Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China”, *Food Control*, 43,276-283, (2014^a).

Lü, X. Yi, L. Dang, J. Dang, Y. and Liu, B. “Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms”, *Food Control*, 46,264-271, (2014^b).

Madera, C. García, P. Rodríguez, A. Suárez, J.E. and Martínez, B. “Prophage induction in *Lactococcus lactis* by the bacteriocin Lactococcin 972”, *Int. J. Food Microbiol.*, 129,99–102, (2009).

Maldonado-Barragán, A. Cárdenas, N. Martínez, B. Ruiz-Barba, J.L. Fernández-Garayzábal, J.F. Rodríguez, J.M. and Gibelloe, A. “Garvicin A, a Novel Class IId Bacteriocin from *Lactococcus garvieae* That Inhibits Septum

Formation in *L. garvieae* Strains”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79,14,4336-4346, (2013).

Martinez, B. Bottiger, T. Schneider, T. Rodri’guez, A. Sahl, H-G. and Wiedemann, I. “Specific Interaction of the Unmodified Bacteriocin Lactococcin 972 with the Cell Wall Precursor Lipid II”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 4666–4670, (2008).

Martinez, B., Rodriguez, A., and Suarez, J.E. “Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibit sseptum formation in lactococci”, *Microbiology*, 146, 949–955, (2000).

Martin-Visscher, L.A. Gong, X. Duszyk, M. and Vederas, J.C. “The Three-dimensional Structure of Lactococcin A Reveals That Many Circular Bacteriocins Share a Common Structural Motif”, *J. Biol. Chem.*, 284,42, 28674–28681, (2009).

Marx, R., Stein, T., Entian, K-D and Glaser, S.J. “Structure of the *Bacillus subtilis* Peptide Antibiotic Subtilisin A Determined by 1 H-NMR and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry”, *J. Protein Chem.*, 20,6, (2001).

Mesa-Pereira, B. Rea, M.C. Cotter, P.D. Hill, C. and Ross, R.P. “Heterologous Expression of Biopreservative Bacteriocins With a View to Low Cost Production”, *Front. Microbiol.*, 9,1654, (2018).

Miller, K.W., Schamber, R., Osmaağaoğlu, O. and Ray, B. “Isolation and Characterization of Pediocin AcH Chimeric Protein Mutants with Altered Bactericidal Activity”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997-2005, (1998).

Mills, S., Serrano, L.M., Griffin, C., O’Connor, M.P., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, R.P. and Meijer, W.C. “Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG p-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese”, *Microb. Cell Fact.*, 10,(1),S7, (2011).

Mitra,D., Pometto, A.L., Khanal, S.K., Karki, B., Brehm-Stecher, B.F. and van Leeuwen,J. “Value-Added Production of Nisin from Soy Whey”, *Appl Biochem Biotechnol.*, 162,1819–1833, (2010).

Mogi, T. and Kita, K., “Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics”, *Cell. Mol. Life Sci.*, 66,3821-3826, (2009).

Molloy, E.M., Casjens, S.R., Cox, C.L., Maxson, T., Ethridge, N.A., Margos, G., Fingerle, V. and Mitchell, D.A. “Identification of the minimal cytolytic unit for streptolysin S and an expansion of the toxin family”, *BMC Microbiology*, 15,141, (2015).

Moreno, F.M.R., Callewaert, R., Devreese, B., van Beeumen, J. and de Vuyst, L. "Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources", *J. Appl. Microbiol.*, 94,214-229, (2003).

Moreno, I., Lerayer, A.L.S., Baldini, V.L.S. and Leitão, M.F.de. "Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactococcus lactis* Strains", *J. Microbiol.*, 31,184-192, (2000).

Munoz, A., Maqueda, M Gálvez, A., Martinez-Bueno, M., Rodriguez, A. and Valdivia, E. "Biocontrol of Psychrotrophic Enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a Nonfat Hard Cheese by an Enterococcal Strain–Producing Enterocin As-48", *J. Food Prot.*, 67,(7),1517–1521, (2004).

Münch, D. Müller, A. Schneider, T. Kohl, B. Wenzel, M. Bandow, J.E. Maffioli, S. Sosio, M. Donadio, S. Wimmer, R. and Sahl, H-G. "The Lantibiotic NAI-107 Binds to Bactoprenol-bound Cell Wall Precursors and Impairs Membrane Functions", *J. Biol. Chem.*, 289,(17),12063–12076, (2014).

Nakamura, K., Arakawa, K., Kawai, Y., Yasuta, N., Chujo, T., Watanabe, M., Ioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitawaza, H., Tsurumi, K. and Saito, T. "Food preservative potential of gassericin A-containing concentrate prepared from cheese whey culturesupernatant of *Lactobacillus gasseri* LA39", *Anim. Sci. J.*, 84,144-149, (2013).

Nawrocki, K.L., Crispell, E.K. and McBride, S.M. "Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria", *Antibiotics*, 3,461-492; doi:10.3390/antibiotics304, (2014).

Nes, I.F., Yoon, S. and Diep, D.B., "Ribozomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria" *Food Sci. Biotechnol.*, 16,(5),675-690, (2007).

Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.C., Sacristan-Perez-Minayo, G., Gutierrez-Fernandez, A.J. and De La Torre, A.H. "The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *L. monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters", *Food Control*, 21,679-685, (2010).

Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H.S. and Kristiansen, P.E. "Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria" *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 10,19-37, (2009).

O'Connor, M.A., Ross, P.R., Hill, C. and Cotter, P.D. "Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective" *Curr. Opin. Food Sci.*, 2,51–57, (2015).

O'Shea, E.F. Cotter, P.D. Ross, R.P. and Hill, C. "Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria" *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24,130–134, (2013).

Oscariz, J.C. and Pisabarro, A.G. "Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram positive bacteria", *Int. Microbiology*, 4,13-19, (2001).

Pag, U. and Sahl, H.G., "Multiple activities in lantibiotics—models for the design of novel antibiotics?", *Curr. Pharm. Des.*, 8,815-833, (2002).

Papagianni, M. and Anastasiadou, S., "Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications", *Microb. Cell Fact.*, 8,(3),1-16, (2009).

Papagianni, M., "Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications", *Biotechnol. Adv.*, 21, 465-499, (2003).

Pei, J., Yuan, Y. and Yue, T. "Primary characterization of bacteriocin paracin C-A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei*", *Food Control*, 34,168-176, (2013).

Perez, R.H., Zendo, T. and Sonomoto, K. "Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications and Prospects", *Front. Microbiol.*, 9:2085.doi: 10.3389/fmicb.2018.02085, (2018).

Prudêncio, C.V. dos Santos, M.T. and Vanetti, M.C.D. "Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria relevance in food microbiology" *Food Sci. Technol.*, 52,(9),5408–5417, (2015).

Quadri, L.E.N., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., De vos, W.M., Roy, K., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. "Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicolalv17b* involved in bacteriocin production and immunity: Evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation", *J. Bacteriol.*, 6163–6171, (1997).

Rea, M.C., Ross, R.P., Cotter, P.D. and Hill, C., "Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria", (eds: D. Drider and S. Rebuffat), *Prokaryotic antimicrobial peptides from genes to applications*, USA, Springer, 29-53, (2011).

Ribeiro, S.C., Ross, R.P., Stanton, C. and Silva, C.E.C.G. "Characterization and Application of Antilisterial Enterocins on Model Fresh Cheese", *J. Food Protect.*, 80, 8, 1303–1316, (2017).

Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J.J., Vázquez-Sánchez, D. and Cabo, M.L. "Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-

Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol”, *Foods*, 7,85; doi:10.3390/foods7060085, (2018).

Ruiz Martinez, R.C., Alvarenga, V.O., Thomazini, M., Favaro-Trindade, C.S. and Sant'Ana, A.S. “Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk”, *Food Sci. Technol.*, 68,67-75, (2016).

Saavedra, L. and Sesma, F. “Purification techniques of bacteriocins from lactic acid bacteria and other gram-positive bacteria”, (eds: D. Drider and S. Rebuffat), *Procarvotic antimicrobial peptides: from genes to applications*, Springer, 7,99-115, (2011).

Sarika, A. R., Lipton, A. P., Aishwarya, M. S. and Dhivya, R. S. “Isolation of a Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* and Application of Its Bacteriocin to Manage Spoilage Bacteria in High-Value Marine Fish Under Different Storage Temperatures”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 167,1280–1289, (2012).

Siegers, K., Heinzmann, S. and Entian, K.D., “Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modifications of its prepeptide occurs at a multimeric membrane associated lanthionine synthetase complex”, *J. Biol. Chem.*, 271,12294-12301, (1996).

Silva, C.C.G., Silva, S.P.M. and Ribeiro, S.C. “Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation”, *Front. Microbiol.*, 9,594, (2018).

Simha, B.V., Sood, S.K., Kumariya, R. and Garsa, A.K. “Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application”, *Microbiol. Res.*, 167,544-549, (2012).

Simmonds, R.S., Simpson, W.J. and Tagg, J.R. “Cloning and sequence analysis of zooA, a *Streptococcus zooepidemicus* gene encoding a bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin” *Gene*, 189,255-261, (1997).

Sullivan, A. and Nord, C.E. “Probiotics and gastrointestinal diseases”, *J. of Int. Medicine*, 257,78-92, (2005).

Tabit, F.T., “Contamination, Prevention and Control of *Listeria monocytogenes* in Food Processing and Food Service Environments”, (ed: M. A. Nyila), *Listeria monocytogenes*, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.76132, 71-85 (2018).

Tagg, J.R. and McGiven, A.R. “Assay system for bacteriocins”, *Appl. Microbiol.*, 21,943, (1971).

Tarım ve Orman Bakanlığı, “Türk Gıda Kodeksi, Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği” (15.03.2019), <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.html>, (2013).

Tewari, A. and Abdullah, S., “*Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective”, *J Food Sci Technol*, 52(5), 2500–2511, (2015).

Thomsen, T.T. Mojsoska, B. Cruz, J.C.S. Donadio, S. Jenssen, H. Løbner-Olesen, A. and Rewitz, K. “The lantibiotic NAI-107 efficiently rescues *Drosophila melanogaster* from infection with methicillin-resistant *S. aureus* USA300”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60,5427–5436, (2016).

Tichaczek, P.S., Nissenmeyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F. and Hammes, W.P., “Characterization of the bacteriocins curvacin a from *Lactobacillus curvatus* Lth1174 and sakacin-P from *Lb. sake* Lth673”, *Syst. Appl. Microbiol.*, 15,460-468, (1992).

Todorov, S.D. “Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - Production, Genetic Organization and Mode of Action”, *Braz. J. Microbiol.*, 40,209-221, (2009).

Todorov, S.D., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, L.M.T., van Reenen, C.A., Pre´vost, H. and Dousset, X. “Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon”, *Anaerobe* 17, 23–31, (2011).

Towle, K. M., and Vederas, J. C. “Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides”, *Med. Chem. Commun.*, 8,276–285, (2017).

Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B. and Hill, C. “Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications”, (eds: Sizezen, R.J., Kok, J. Abee, T. and Schaafsma, G.), *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 165-185, (2002).

Uteng, M., Hauge, H.H., Markwick, P.R.L., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J. and Muhle-Goll, C. “Three-Dimensional Structure in Lipid Micelles of the Pediocin-like Antimicrobial Peptide Sakacin P and a Sakacin P Variant That Is Structurally Stabilized by an Inserted C-Terminal Disulfide Bridge”, *Biochemistry*, 42,11417-11426, (2003).

Valdes-Stauber, N. and Scherer, S., “Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60,3809-3814, (1994).

Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G. “Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55,1187-1191, (1989).

Van Belkum, M.J., Martin-Visscher, L.A. and Vederas, J.C. “Structure and genetics of circular bacteriocins”, *Trends Microbiol.*, 19,(8),411-418, (2011).

Varella Coelho, M.L., Duarte, A.F. and Bastos, M.C.F. “Bacterial Labionin-Containing Peptides and Sactibiotics: Unusual Types of Antimicrobial Peptides with Potential Use in Clinical Settings”, *Curr. Top. Med. Chem.*, 17,1-22, (2017).

Vasilchenko, A.S and Valyshev, A.V. “Pore-forming bacteriocins: structural–functional relationships” *Arch. Microbiol.*, <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1610-3>, (2018).

Verma, S.K., Sood, S.K., Saini, R.K., Saini, N., “Pediocin PA-1 containing fermented cheese whey reduces total viable count of raw buffalo (*Bubalis bubalus*) milk”, *LWT – Food Sci. Technol.*, doi: 10.1016/j.lwt.2017.02.031, (2017).

Vijayakumar, P.P. and Muriana, P.M. “Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat Meats Using Bacteriocin Mixtures Based on Mode-of-Action”, *Foods*, 6, 22, (2017).

Wang, G., Feng, G., Snyder, A.B., Manns, D.C., Churey, J.J. and Worobo, R.W. “Bactericidal thurincin H Causes Unique Morphological Changes in *Bacillus cereus* F4552 Without Affecting Membrane Permeability”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 357,69–76, (2014).

Wen, S.L. Philip, K. and Ajam, N. “Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*”, *Food Control*, 60,430-439, (2016).

Whitehead, H. R. “A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci”, *Biochem. J.*, 27,1793-800, (1933).

Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. and Sah, H-G. “Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity”, *J. Biol. Chem.*, 276,1, 1772–1779, (2001).

Wiley, J.M. and Van der , W.A., “Lantibiotics: peptides of diverse structure and function”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 61,477-501, (2007).

Wirawan, R.E. Klesse, N.A. Jack, R.W. and Tagg, J.R. “Molecular and Genetic Characterization of a Novel Nisin Variant Produced by *Streptococcus uberis*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1148–1156, (2006).

- Woraprayote, W., Yuwares, M., Sorapukdee, S., Swetwiwathana, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W. “Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products”, *Meat Sci*, 120,118–132, (2016).
- Woraprayotea, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Roytrakul, S., Pres, R.H., Zendo, T., Kenji, S., Benjakul, S. and Visessanguan, W. “Two putatively novel bacteriocins active against Gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293”, *Food Control*, 55,176-184, (2015).
- Xu, Z., Peters, B.M., Li, B., Li, L. and Shirliff, M.E., “Staphylococcal Food Poisoning and Novel Perspectives in Food Safety”, (ed: H. Makun) Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases, *IntechOpen*, DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/62177>, 159-213, (2016).
- Yavuz, M. and Korukluoğlu, M. “*Listeria monocytogenes*’in Gıdalardaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri”, *J. Agric. Fac. Uludag Uni.*, 24,(1),1-10, (2010).
- Yıldırım, Z., Öncül, N., Yıldırım, M. and Karabıyıklı, Ş. “Application of Lactococcin BZ and Enterocin KP against *L. monocytogenes* In Milk as biopreservation Agents”, *Acta Aliment.*, 45,(4),486–492, (2016).
- Zacharof, M.P. and Lovitt, R.W. “Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria A Review Article”, *APCBEE Procedia*, 2,50 – 56, (2012).
- Zendo, T. “Screening and Characterization of Novel Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria”, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 77,5, 893-899, (2013).
- Zhu, X. Zhao, Y. Sun, Y. and Gu, Q. “Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008”, *Food Chem.*, 165,216-223, (2014).
- Zommiti, M., Almohammed, H. and Ferchichi, M. “Purification and Characterization of a Novel Anti-campylobacter Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* DN317”, *Probiotics and Antimicro. Prot.*, 8,191–201, (2016).
- Zou, J. Jiang, H. Cheng, H. Fang, J. and Huang, G. “Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 117,781–789, (2018).

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : HALİL İBRAHİM KAYA

Doğum Yeri ve Tarihi : Demirci/1988

Lisans Üniversite : Selçuk Üniversitesi/2010

Yüksek Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi/2013

Elektronik posta : hik7588@gmail.com

İletişim Adresi : Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü Pamukkale/Denizli

Yayın Listesi :

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

Kaya, H.I., Simsek, O. “Characterization of pathogen-specific bacteriocins from lactic acid bacteria and their application within cocktail against pathogens in milk”, LWT-Food Science and Technology, 115, 108464, (2019).

Ergezer, H., Kaya, H.I, Simsek, O. “Antioxidant and antimicrobial potential of artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract in beef patties”, Czech Journal of Food Sciences, 36,(No. 2),154-162, Doi: 10.17221/179/2017-CJFS, (2018).

Kaya, H.I., Sabanoglu, S., Yapar, A., Simsek, O. “Utilisation of antimicrobial agents at pre and post smoking on the microbial quality of hot smoked rainbow trout”, Acta Alimentaria, 44,(2), 289-296, Doi: 10.1556/AAlim.2014.2222, (2015).

Tulumoğlu, S., Kaya, H.I., Simsek, O. “Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese”, Anaerobe, 30, 120-125, Doi:10.1016/j.anaerobe.2014.09.015, (2014).

Karakus, M., Ikiz, Y., Kaya, H.I., Simsek, O. “Synthesis characterization electrospinning and antibacterial studies on triphenylphosphinedithiophosphonates

Copper I and Silver I complexes”, Chemistry Central Journal, 8,(1), 18, Doi: 10.1186/1752-153X-8-18, (2014).

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

Ozel, B., Kaya, H.I., Simsek, O. “Bazı Fermente Gıdalardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suslarının Metal Dirençlilik Özellikleri”, Akademik Food Journal, 14,(4), 393-397.(2016).

Kaya, H.I., Kördikanlıoğlu, B., Taşoğulları, N., Simsek, O. “Vitamin ve Aminoasit Katkısının Liyofilize Laktik Asit Bakterilerinin Gelisim Egrisine Etkisi”, Academic Food Journal, 13,(2), 115-118, (2015).

Simsek, O., Kördikanlıoğlu, B., Yazıcı, G., Kaya, H.I. “Beyaz Peynirde Nisini Tolere Eden Laktik Asit Bakteri Miktarı ve Çesitliliği”, Academic Food Journal, 12,(4), 36-40, (2014).

Konferans listesi:

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

Özel Burcu, Kaya Halil İbrahim, “Psikobiyotik Bakteriler”, Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum), (2018).

Kaya Halil İbrahim, Şimsek Ömer, “A novel bacteriocin, isolated from karın butter with a specifically antimicrobial activity against *L. monocytogenes*”, 4th International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, (Özet Bildiri/Sözlü Sunum), (2018).

Kaya Halil İbrahim, Şimsek Ömer, “A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* with a specifically antimicrobial activity against *Bacillus cereus*”, 12th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, (Özet Bildiri/Poster), (2017).

Kaya Halil İbrahim, Demiray Engin, Yılmaz Tülin, Taşdelen Elif, “The Modeling of the Effect of Different Drying Methods and Pretreatment on the

Antimicrobial Activity of Cauliflower”, International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 173, (ÖzetBildiri/Sözlü Sunum), (2017).

Kaya Halil İbrahim, Zehir Duygu, “Microbiological Properties of Strained (Süzme) and Burnt (Yanık) Yoghurts Consumed in Denizli”, International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 1131, (Özet Bildiri/Poster), (2017).

Demiray Engin, Kaya Halil İbrahim, Taşdelen Elif, Yılmaz Tülin, “Modelling of Antimicrobial Change in Some Herbal tea Bag During The Brewing”, Uluslararası Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Kongresi, 1489, (Özet Bildiri/Poster), (2017).

Zehir Duygu, Kaya Halil İbrahim, Şimsek Ömer, “Determination of Antimicrobial Activities of Sage and Linden Herbal Teas Which are Sold by Tea Bag and Unpacked” Uluslararası Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Kongresi, 1521, (Özet Bildiri/Poster), (2017).

Ergezer Haluk, Kaya Halil İbrahim, Şimsek Ömer, “The efficiency of artichoke Cynarascolumus L extracts in raw beef patties for antioxidant and antimicrobial activity”, The Food Factor I Barcelona Conference, (Özet Bildiri/Poster), (2016).

Kaya Halil İbrahim, Şimsek Ömer, “The Diversity of Bacteriocin Producing Lactic AcidBacteria in Tarhana Fermentation” Symposium on Euroasian Biodiversity, 580, (ÖzetBildiri/Poster), (2016).

Çon Ahmet Hilmi, Şimsek Ömer, Kaya Halil İbrahim, Özdemir Nilgün, “The Organic Acid Amount and Profile of Usak Tarhana Dough During the Fermentation”, The 3rd InternationalSymposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 91, (Özet Bildiri/Poster), (2015).

Özel Burcu, Kaya Halil İbrahim, Şimsek Ömer, “Innovative Nisin Production Systems”, 2nd International Congress on Food Technology, 183, (Özet Bildiri/Poster), (2014).

Kaya Halil İbrahim, Özel Burcu, Şimsek Ömer, Çon Ahmet Hilmi, “Use of Bacteriocin Producer Lactic Acid Bacteria at the Production of Tarhana” The 2 nd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 211, (Özet Bildiri/Poster), (2013).

Şimsek Ömer, Kaya Halil İbrahim, Sabanoğlu Seba, Çon Ahmet Hilmi, “NovelBacteriocin-Producer Lactic Acid Bacterial Strains Sourced From Tarhana Dough”, 4th InternationalCongress on Food and Nutrition, 3rd SAFE Consortium International Congress on Food Safety, 212, (Özet Bildiri/Poster), (2011).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Özel Burcu, Kaya Halil İbrahim, Şimsek Ömer, “Fermente Gıdalardan İzole Edien *Lactobacillus plantarum* Suslarının Metal Dirençlilik Özellikleri ve Genetik Dogası”, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster), (2015).

Taşoğulları Nermin, Kaya Halil İbrahim, Yazıcı Gizem, Şimsek Ömer, “Starter Kültürün Kurutulmasında Hücre Stabilitesinin Korunmasına Yönelik Uygulamalar”, Pamukkale Gıda Sempozyumu III Kurutulmuş ve Yarı Kurutulmuş Gıdalar, 71, (Özet Bildiri/Poster), (2015).

Kaya Halil İbrahim, Özel Burcu, Şimsek Ömer, “Usak Tarhanasının Fermentasyon Özellikleri”, 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 179, (Özet Bildiri/Poster), (2014).

Kaya Halil İbrahim, Özel Burcu, Çandır Beyhan, Şimsek Ömer, “Nisine Dirençli Laktik Asit Bakterilerinin Beyaz Peynirden İzolasyonu ve Tanısı”, 8. Gıda Mühendisliği Kongresi, 148, (Özet Bildiri/Poster), (2013).