



**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞAL OLARAK ÜRETİLEN
YOĞURTLARDAN İZOLE EDİLEN
Streptococcus thermophilus ve *Lactobacillus
delburieckii* subsp *bulgaricus*'un BAKTERİYOSİN
ÜRETME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ
VE ÜRETTİKLERİ BAKTERİYOSİNLERİN
KARAKTERİZASYONU**

Nilgün ZENGİN

YÜKSEK LİSANS

GIDA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalı

**Aralık-2012
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Nilgün ZENGİN tarafından hazırlanan “Doğal Olarak Yoğurtlardan Üretilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ‘un bakteriyosin üretme yeteneklerinin belirlenmesi ve ürettikleri bakteriyosinlerin karakterizasyonu” adlı tez çalışması 25.12.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Nihat AKIN

Danışman

Prof. Dr. Nihat AKIN

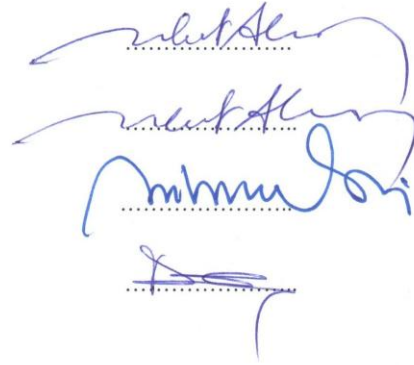
Üye

Doç. Dr. Mehmet AKBULUT

Üye

Yrd. Doç. Dr. Durmuş SERT

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aşı GENÇ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması S.Ü. BAP tarafından 12201015 No’lu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Nilgün ZENGİN

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞAL OLARAK ÜRETİLEN YOĞURTLARDAN İZOLE EDİLEN *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*'un BAKTERİYOSİN ÜRETME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ ve ÜRETTİKLERİ BAKTERİYOSİNLERİN KARAKTERİZASYONU

Nilgün ZENGİN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Nihat AKIN

2012, 87 Sayfa

Jüri

Prof.Dr. Nihat AKIN

Doç.Dr. Mehmet AKBULUT

Yrd.Doç.Dr. Durmuş SERT

Bu çalışmada doğal olarak üretilen yoğurttan izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının çeşitli patojenler üzerine antimikrobiyal etkinliği belirlenmiştir. Bu çalışmada öncelikle agar difüzyon, disk difüzyon ve agar sandviç olmak üzere 3 farklı metot test edildi. Agar sandviç metodu en uygun metot olarak seçildi. Laktik asit bakterileri' nin bakteriyosin benzeri madde üretimi için optimum koşullar; 30 °C–37 °C, pH 6.5–7.5 olarak tespit edilmiştir. *Streptococcus thermophilus* izolatlarının ürettiği bakteriyosin benzeri maddelere en duyarlı test bakterisi *Salmonella typhmurium* olarak değerlendirilirken, en dirençli test bakterisi ise *Bacillus cereus* olarak değerlendirilmiştir. *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının ürettiği bakteriyosin benzeri maddelere ise en duyarlı bakteri *Enterococcus faecalis* iken en dirençli test bakterisi *Bacillus cereus* olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Agar sandviç metodu, Bakteriyosin, Laktik asit bakterileri, Yoğurt

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF BACTERIOCIN PRODUCING ABILITY OF *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* AND *LACTOBACILLUS DELBURIECKII* SUBSP *BULGARICUS* THAT ISOLATED FROM NATURALLY PRODUCED YOGHURT AND CHARACTERIZATION OF THESE BACTERIOCIN

Nilgün ZENGİN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE OF PHILOSOPHY
IN FOOD ENGINEERING

Advisor: Prof.Dr. Nihat AKIN

2012, 87 Pages

Jury

Prof.Dr. Nihat AKIN

Assoc Prof. Dr. Mehmet AKBULUT

Asist Prof. Dr. Durmuş SERT

In this study were determined *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* isolates that isolated from naturally produced yoghurt antimicrobial activity on different pathogens. Agar diffusion, disc diffusion and agar sandwich in for 3 different method were tested. Agar sandwich method were chosen as convenient method. The optimum conditions for Lactic acid bacteria to produce bacteriocin like substance were determined as 30 °C–37 °C, pH 6.5- 7.5. The test bacteria which are most sensitive to bacteriocin like substances that produced by *Streptococcus thermophilus* is *Salmonella typhmurium* while *Bacillus cereus* is evaluated as most resistant test bacteria. The test bacteria which are most sensitive to bacteriocin like substances that produced by *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* is *Enterococcus faecalis* while *Bacillus cereus* is evaluated as most resistant test bacteria.

Keywords: Agar sandwich method, Bacteriocins, Lactic acid bacteria, Yoghurt

ÖNSÖZ

Laboratuar çalışmalarında, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarında, bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan danışmanım Prof. Dr. Nihat AKIN'a,

Çalışmalarım sırasında bana destek ve yardımları için arkadaşım Zeynep NALVURAN 'a

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi çalışmalarımda da her türlü destekleri ve sevgileriyle yanımda olan annem Zeliha ZENGİN, babam Münir ZENGİN ve kardeşlerim Gökhan ve Naime ZENGİN'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Nilgün ZENGİN

KONYA-2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Laktik Asit Bakterileri	3
2.2. Laktik asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Potansiyeli	6
2.2.1. Organik asit üretimi	7
2.2.2 Hidrojen peroksit	8
2.2.3. Dasetil ve asetaldehit üretimi.....	10
2.2.4. Reuterin.....	12
2.2.5. Karbondioksit.....	12
2.2.6. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretimi.....	13
2.2.7. Bakteriyosinler	16
2.2.7.1. Bakteriyosinlerin tanımlanması	16
2.2.7.2. Bakteriyosinlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri	19
2.2.7.3. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması	21
2.3. Laktik asit Bakterileri Tarafından Üretilen Lantibiyotiklerin Sınıflandırılması..	24
2.3.1. Laktik asit bakterilerinin lantibiyotiklerinin yapısal benzerlikleri ve özellikleri	25
2.4. Laktik asit bakterilerinin lantibiyotiklerinin kullanımı.....	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Laktik asit bakterileri	30
3.1.2. İndikatör patojen bakteriler	30
3.1.3. Kullanılan besiyerleri.....	30
3.1.4. Kullanılan diğer kimyasallar	31
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Kullanılacak bakterilerin analize hazırlanması	31
3.2.2. Antimikrobiyal aktivite tayini	32
3.2.3. Antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonu	34
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	36
4.1. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten LAB’ nin Belirlenmesi.....	36
4.1.1. Agar difüzyon yöntemi	36
4.1.2. Disk difüzyon yöntemi.....	36

4.1.3. Agar sandviç yöntemi	37
4.1.3.1. Agar sandviç yöntemiyle elde edilen sonuçlar	37
4.1.3.2. Bakteriyosin benzeri maddelerin proteolitik enzimler ile muamelesi	44
4.1.3.3. İnkübasyon sıcaklığının bakteriyosin benzeri madde üretimine etkisi	48
4.1.3.4. Besiyeri başlangıç pH değerinin bakteriyosin benzeri madde üretime etkisi	56
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	78

KISALTMALAR

LAB: Lactic acid bacteria

FDA: Food and Drug Administor

PEP:PTS: The phosphoenolpyruvate:carbohydrate phospho-transferase system

EMP: Embden-Mayerhof-Parnas

PTS: Phospho-transferase system

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide

GRAS: Generally recognized as safe

EPS: Extracellular polysaccharide

CPS: Capsuler polysaccharide

HePS: Heteropolysaccharide

NTG: N-metil22 N-nitro-N-nitroguanidin

SDS: Sodium dodecyl sulfat

Lan: Lanthionine

MeLan: Metillanthionine

Dha: Didehidroalanin

Dhb: 2,3-didehidrobütirin

MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

VRE: Vancomycin-resistant *Enterococcus*

MRS: De-Man Rogoso Sharp

BHI: Brain-Heart Infusion

BCP: Bromocresol Purple

1. GİRİŞ

İnsanların sağlıklı büyüme ve gelişmelerinde tükettikleri gıdaların güvenilir olması oldukça önemlidir. Her geçen gün, tüketici talebine bağlı olarak yeni gıdalar geliştirilmektedir. Bu gıdaların birçoğu bildiğimiz temel gıda kaynaklarından üretilmekte ve fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin uzatılması için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak bu katkıların bazılarının sağlıksız oluşu ve kullanım oranına bağlı olarak kanserojenik ve toksik etki yapabilmeleri, doğal ve güvenilir katkıların elde edilmesi ve kullanımını oldukça önemli hale getirmiştir. Gıdaların korunması ve muhafaza sürelerinin uzatılmasında, düşük sıcaklık veya ısıtma işlem uygulaması, paketlenme yöntemleri gibi prosesler ve tuz, şeker ve antimikrobiyal katkı maddeleri gibi katkıları kullanılmaktadır. Ancak yine de gıda kaynaklı sağlık sorunlarıyla karşılaşılabilir. Gıdaların güvenliğinin sağlanmasında mümkün olduğunca proses uygulamalarından kaçınılması ve doğal katkı maddelerinin kullanımı gerekmektedir. Bu amaçla biyokontrol yöntemi önerilmektedir.

Biyokontrol terimi, gerek mikroorganizmaların gerekse metabolitlerinin gıda güvenliğinin sağlanması veya raf ömrünün uzatılması amacıyla kullanılmasını ifade etmektedir (Hugas, 1998). Biyokontrol amacıyla en yaygın kullanılan mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir (LAB). LAB gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, kok/basil/kokobasil şeklinde, mezofilik ve termofilik özellikte olabilen bakterilerdir (Axelsson, 1998). LAB, fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra gıda güvenliği açısından da büyük önem taşımaktadır. LAB gıda ortamındaki yüksek besin rekabeti ve ürettikleri antimikrobiyal bileşiklerle bozulma ve hastalık etkeni mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Gilliland, 1990).

Gıdaların korunmasında laktik asit bakterileri gibi koruyucu kültürlerin kullanımı yanında, bu kültürlerden elde edilen bakteriyosin gibi metabolitler de kullanılmaktadır. Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, protein doğasında, antagonistik etkiye sahip bileşiklerdir. Bu bileşikler, özellikle üretici türe yakın akraba olan türlere karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki gösterirler (James ve ark.,1996). Farklı özelliklere sahip birçok çeşitlerinin olmasına rağmen, gıdalarda güvenli bir şekilde ve yaygın olarak daha çok laktik asit bakterilerinden elde edilen nisin kullanılmaktadır (Chen, Hoover ,2003). Dolayısıyla, nisinle birlikte diğer

bakteriyosinlerin özelliklerinin bilinmesi bu antimikrobiyal maddelerin birçok gıda maddesinde etkin bir şekilde kullanımını sağlayabilecektir.

Bakteriyosinlerin gıdalarda koruyucu olarak ilk kullanımları resmi olarak 1951 yılı olsa da, insanoğlu 8000 yıldır (peynir ve diğer fermente gıdaları üretmeye başladığından beri) farkında olmadan bakteriyosinlerden faydalanmaktadır. 1928 yılında çeşitli laktokok türlerinin diğer laktik asit bakterileri (LAB) üzerinde inhibitör etki gösterdikleri belirlenmiştir. 1933 yılında Yeni Zelanda’ da protein yapısında bir madde tanımlanmış ve 1947 yılında nisin olarak isimlendirilmiştir. Nisin analogu olan ve 12 amino asit kalıntısı bakımından farklılık gösteren subtilin ise 1948 yılında keşfedilmiştir. Nisin ilk olarak 1953 yılında ticari olarak İngiltere’de satışa sunulmuştur ve günümüzde yaklaşık 50 ülkede kullanılmaktadır. 1969 yılında Gıda ve Tarım Organizasyonu/Dünya Sağlık Organizasyonu gıda katkıları uzman kurulu tarafından gıdalarda kullanımının güvenli olduğu onaylanmıştır. Nisin, 1983 yılında Avrupa gıda katkı maddeleri listesinde E234 olarak numaralandırılmış (EEC 1983) ve 1988’ de FDA tarafından peynir üretiminde kullanımına izin verilmiştir (Cotter ve ark.,2005).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, tabiatta çok yaygın olarak bulunduğu bilinen laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar da başlamıştır. İlk kez 19. yüzyıl sonlarında sütte fermentasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda Lactobacillaceae familyası içinde sınıflandırılmıştır.

Morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren (kısa veya uzun çomak veya kok şekilli) familya üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzer özellik göstermektedirler. Tüm üyeler; gram pozitif, katalaz negatif (düşük oranda şeker ihtiva eden ortamda pseudokatalaza sahip suşlar görülebilir), *Sporolactobacillus inulus* hariç spor oluşturmayan, fakültatif anaerobik, *Pediococcus cinsi* hariç yalnız tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Shape ve ark.,1966; İ. Şain 1990). Mutlak fermentatiftirler ve asıl fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Hem grubu (katalaz, sitokrom) içermeksizin oksijen varlığında gelişebilen nadir mikroorganizmalardır. Doğal ortamları süt ve süt mamülleri, işlenmemiş taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların bağırsak mukozası içeriklidir (Schlegen 1986; Tunail ve Köşker 1989).

Laktik asit bakterileri tabiatta yaygın oluşları, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanılan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadırlar.

Çiğ materyalin laktik asit bakterileri ile fermente edilerek yeni gıdaların üretilmesi ve çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda muhafaza metodlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Süt bu bakteriler ile yoğurt, ekşi süt, peynir, tereyağı vb. ürünlere işlenmektedir. Tüm dünyada yaygın olarak tüketilen fermente et ürünleri ve farklı sebzelerden üretilen turşular laktik asit fermentasyonu ile hazırlanmakta ve muhafaza edilmektedir (Andersson 1989; Gökalp 1982; Marya-Makinen ve Biret 1993).

Çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunan veya başlangıç kültür olarak kullanılan birçok laktik asit bakterisinin gıdayı bozucu mikroorganizmalar veya gıda kaynaklı patojenleri ihtiva eden bir grup mikroorganizmaya karşı antagonistik aktivite gösterdiği de bilinmektedir (Andersson 1989; Schillinger ve Lücke 1989; Davidson ve Hoover

1993). Laktik asit bakterilerinin diğerk mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu antagonistik aktivitenin farklı bazı mekanizmaları ile olduğu bilinmektedir. Bunlar:

1. Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu laktik ve asetik gibi organik asitler üretilmektedir. Gıdalarda bulunan birçok mikroorganizma bu üretilen organik asitlere karşı hassastır ve sonuçta düşen pH'yı da tolere edememektedir.
2. Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme esnasında üretilen H₂O₂ birçok mikroorganizma üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir.
3. Bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve 'bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitler' olarak isimlendirilen antimikrobiyal karakterli proteinler özellikle yakın ilişkili bakteriler üzerine inhibitör etki göstermektedir.
4. Bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen diasetil, alkol ve karbondioksit gibi metabolitlerde bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir.

Tüm bu bileşenlerin ayrı ayrı inhibitör etkide bulunabilmesine rağmen laktik asit bakterilerinin diğerk mikroorganizmalara karşı antagonistik etkisi bunların yalnızca birisine bağlı olmayıp aksine bunların kombinasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Laktik asit bakterileri tat ve aromaya katkıda bulunduğu ve bozulmayı geciktirdiği için geleneksel olarak gıdaların ve içeceklerin fermantasyonunda starter kültür olarak kullanılır. Gıdada bulunan bu starterler laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosinler vb.gibi antimikrobiyal maddelerin in situ üretimiyle gıdaların muhafazasına da katkıda bulunur.

Ayrıca kokular, istenmeyen lezzetler, biyogenik aminler laktik asit bakterilerin gelişimiyle ilişkili olumsuz faktörlerdir. Ek olarak, starter kültürler tarafından bakteriyosin üretimi bazı problemlere sebep olabilir. Örneğin et fermantasyonu için hızlı bir şekilde gelişen starter kültürlerin karışımları bakteriyosin inhibisyonuyla birbirlerinin gelişmelerini geciktirebilirler.

Laktik asit bakterileri, özellikle lactobacilli kolonileştikleri sindirim sisteminde faydalı bir rol oynar (Gilliland, 1990). Böylece, canlı hücreler gıdalara ve besinlere ilave edilebilir ve insan ve hayvan tüketimi için probiyotik olarak kullanılabilir. Ayrıca lactobacilli ağız yoluyla bağışıklık sağlayıcı olarak potansiyel olarak faydalıdır, çünkü ağız yoluyla alınan lactobacilli bu organizmalara bağlı epitoplara karşı hem mukozal hem de sistemik immun reaksiyonu tetikler (Gerritse ve ark., 1990). Bu bakterilere atfedilen bazı önemli besinsel ve teröpatik etkiler (Gilliland, 1990) aşağıdaki gibidir:

- a) Gıdaların besinsel kalitesini iyileştirme,

- b) Bağırsak mikroflorasının stabilizasyonu, bağırsak duvarına yapışarak *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ve enteropatojenik *E.coli* gibi patojenik bakterilerin koloni oluşturmalarını engelleme,
- c) Antimikrobiyal bileşenler üreterek bağırsak ve idrar yolu enfeksiyonlarına karşı koruma,
- d) Makrofaj üretimi için immun sistemi uyarma yoluyla tümör baskılanması.

Laktik asit bakterileri büyük ekonomik önemi olan birkaç ilginç özelliğe sahiptir. Laktoz kullanımı, proteinaz aktivitesi, bakteriyofaj savunma mekanizması, bakteriyosin üretimi ve bağışıklık vb. gibi bu özelliklerin bazıları, genelde stabil olmayan ve doğal olarak transfer edilebilir plazmidler tarafından genetik olarak aktarılır. Böylece, araştırma şimdilerde endüstriyel olarak önemli özelliklerin geliştirilmesi ve stabilizasyonu üzerine odaklanmaktadır. Esas amaç bunların hepsinin pratik kullanım amacıyla bir veya daha fazla starter kültürde bir araya getirilmesidir (Gasson, 1993). Başlangıçta, bu fermantasyon özellikleri metabolik tekniklerle ve mutasyon, fenotipik adaptasyon ve seçimi gibi klasik genetikler kullanarak iyileştirildi. Daha sonra, konjugasyon, transpozisyon ve protoplast füzyonunun yanı sıra transdüksiyon gibi in vivo rekombinant teknikler denendi (Gasson, 1993). Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisi laktik asit bakterileri alanında uygulandı (De Vos, 1987). Ayrıca laktik asit bakterileri kimyasal maddeler, farmasötikler ve insana faydalı diğer ürünlerin sentezi için endüstriyel mikroorganizmalar olarak başarılı bir şekilde kullanılabilir, çünkü endüstriyel fermantasyonda birkaç avantaja sahiptir:

- a) Sindirilebilir ve patojen değildir;
- b) Toksinler ve toksik ürünler oluşturmaz;
- c) Mikroaerofilik ve aerotoleranttır, basit bir fermantasyon işlemi gerektirirler;
- d) Hızlı bir şekilde çoğalırlar, kısa bir fermantasyon işlemi gerektirirler;
- e) Bunların gelişimi bozulma ve diğer mikroorganizmalarla kontaminasyonu önler;
- f) Protein salgırlar;
- g) Süt, peynir altı suyu, atık su ve hidrolize nişasta gibi çeşitli ucuz maddeleri fermente edebilir;
- h) Yıllardır gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Sonuç olarak, büyük ölçekte üretimi henüz yeni oluşmuştur.

2.2. Laktik asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Potansiyeli

Üretim ve ardından fermente gıdaların depolanması süresince laktik asit bakterilerinin koruyucu etkisi temelde gelişimleri sırasında gıdada meydana gelen asidik koşullardan dolayıdır. Bu ekşime etkisi aslında son üründe daha uzun raf ömrü ve güvenliği sağlayan önemli bir özellik olan karbonhidratların organik asitlere fermentatif dönüşümünü takiben gıdanın pH'sının düşmesidir. Son yıllarda, laktik asit bakterilerinin tüm inhibe edici etkisinin starter kültürler tarafından üretilen daha kompleks antagonistik sistemlerden dolayı olduğu açık hale gelmiştir. Laktik asit bakterileri laktik ve asetik asitten başka inhibitör maddeler üretme ve salgılama yeteneğindedir. Bu maddeler mikroorganizmaların geniş bir spektrumu üzerinde antagonistiktir ve bu sebeple bu maddeler laktik asit bakterilerinin koruyucu aktivitesi üzerine önemli katkılar sağlar. Bunlar laktik ve asetik asitten çok daha az miktarlarda üretilirler ve formik asit, serbest yağ asitleri, amonyak, etanol, hidrojen peroksit, diasetil, asetoin, 2-3 bütandiol, asetaldehit, benzoat, bakteriyosinler ve antibiyotikler, toksinler, bakteriyolitik enzimler, bakteriyofajlar ve hatalı bakteriyofajlar, antibiyotik maddeler gibi birkaç az tanınmış veya tamamen tanımlanmamış inhibitör maddeleri kapsarlar (Klaenhammer, 1988; Daeschel, 1989; Piard ve Desmazeaud, 1991, 1992). Bu maddelerin bazıları psikotrofik lactobacilli ve leuconostoc, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* vb. içeren çoğu gıdada bozulmaya sebep olan ve gıda kaynaklı patojenik mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite sergiler (De Vuyst ve Vandamme, 1994). Fermente gıdalarda antimikrobiyal bileşenlerin in situ üretimi için belirli starter kültürlerin uygulanması ve hem fermente hem de fermente olmayan gıdalarda biyolojik gıda koruyucuları olarak kısmen saflaştırılmış veya saf antimikrobiyal bileşenlerin uygulanması gelecekte gıda muhafazasında çok daha önemli hale gelecektir. Gıda muhafazasında hücresiz antimikrobiyallerin kullanımı özellikle fermente olmayan gıdalarda tekstür ve aroma değişikliklerini minimize ettiği için bütün hücre kullanımından daha avantajlıdır. Basit fermentasyon çözeltisinin bütün hücreden daha fazla potansiyel kullanıma sahip olduğu için saflaştırılmış antimikrobiyal maddeler daha fazla talep edilmektedir.

2.2.1. Organik asit üretimi

LAB'ın karakteristik fermentasyon ürünü olan laktik asit ve asetik asit pH düşüşünü sağlayarak bozulma etkeni (*Clostridia*, *Pseudomonas*) ve patojen (*Salmonellae* ve *Listeria* spp.) bakterilerin gelişimini sınırlamakta veya inaktive etmektedir. Ayrıca her iki asit direkt antimikrobiyal aktivite de göstermektedir. Zayıf asitler olan laktik ve asetik asidin çözünmemiş formları hidrofobik özellikleri nedeniyle bakteri içerisine nüfus ederek hücre içinde çözünmektedir. Sonuçta sitoplazmada gerçekleşen pH düşüşü nedeniyle, hücre ölümü meydana gelmektedir (Ray, 2001). Asetik asit çözünürlük sabitinin daha yüksek olması nedeniyle (pKa 4,75) belirli bir pH ve konsantrasyonda laktik asitten (pKa 3,1) daha güçlü antimikrobiyal etki göstermektedir (Holzapfel ve ark., 1995).

Çeşitli ürünlerin doğal fermantasyonundan sorumlu olan laktik asit bakterilerinin ana fermantasyon ürünü heksozdan D (-), L (+) ya da rasemik karışım şeklinde üretilen laktik asittir. (Jehanno ve ark., 1992). Laktik asit bakterilerinde laktik asit üretimi iki farklı yolla gerçekleşebilmektedir. Laktik bakteriler oluşturdıkları ürünler temel alınarak homofermentatif (aldolaz enzimine sahip olanlar) ve heterofermentatif (aldolaz ve triozfosfat izomeraz enzimlerine sahip olmayanlar) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadırlar (Madigan ve Martinko, 2006). Ekşi tatlı bir organik asit olan laktik asit; membran yapısını bozmak suretiyle çeşitli mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etkiye sahip olan ve endüstriyel anlamda kullanılan kokusuz ve saydam bir maddedir (TSE, 1991). Süt endüstrisinde starter bakteriler olarak kullanılan laktokok suşlarının fermantasyon süreçlerindeki en önemli rollerinden biri, süt şekeri olan laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmalarıdır. Yapılan çalışmalar süt ürünlerinde laktik asit oluşumunun süte antimikrobiyal özellik kazandırdığını ve mikrobiyal bozulmalara karşı daha dirençli hale geldiğini göstermiştir (Kılıç, 2001). Starter bakterilerde laktoz metabolizması; diğer gram pozitif bakterilerin çoğunluğunda bulunmayan, fosfoenol piruvata bağımlı fosfotransferaz sistemi (PEPPTS) tarafından başlatılmaktadır. Bu sistemde laktoz hücre içine fosforile formda alınmakta ve fosfo- β -galaktozidaz enzimi aktivitesi ile glikoz ve galaktoz-6- fosfata parçalanmaktadır. Bu aşamadan sonra glikoz Embden-Mayerhof-Parnas (EMP), galaktoz-6-fosfat ise tagatoz-6-fosfat yolu ile katabolize edilmektedir. Fosfotransferaz (PTS) sisteminin laktoz spesifik bileşenleri (Enzim IIIac ve Faktör IIIlac), fosfo- β -D galaktozidaz ve tagatoz-6- fosfat yolunun üç enziminin (galaktoz-6-fosfat izomeraz, tagatoz-6-fosfat kinaz ve tagatoz-1,6-difosfat

aldolaz) gen kodunun, *Lactococcus lactis* suşlarında farklı plazmitler üzerinde bulunduğu saptanmıştır (Tükel ve Akçelik, 2000; Aslım ve ark., 2000; Tükel, 2004).

Şaraplarda malik asidin laktik aside dönüşümü malolik fermentasyon sırasında meydana gelen en önemli olaydır. L-malik asidin L-laktik asit ile yer değiştirmesi ile asitlik biyolojik olarak azalmış olur. Asitliğin düşmesi yalnızca asitlik değerliğinin azalmasından değil ayrıca malik asidin kuvvetli ekşi tadının daha yumuşak olan laktik asidin tadıyla yer değiştirmesinden kaynaklanmaktadır (Geredeli ve Anlı, 2005). D (-) laktik asit bebeklerde asidoz oluşumuna, yetişkinlerde de çeşitli bağırsak sendromlarına yol açmaktadır. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü ne D (-) ne de DL laktik asidin gıdalara ilave edilmesini önermektedir. Vücut ağırlığına göre, 100 mg/kg D (-) laktik asit alımı üst limit olarak önerilmektedir. Bu nedenlerden dolayı fermente gıdalarda L (+) izomerinin özelliklerini arttırıcı çalışmalar yapılmış fakat L (+) izomerini yüksek miktarda üreten suşların kolay izolasyonu için uygun bir metod bulunamamıştır (Jehanno ve ark., 1992).

2.2.2 Hidrojen peroksit

Güçlü oksitleyici etkiye sahip olması nedeniyle antimikrobiyal aktivite gösteren hidrojen peroksit, LAB tarafından oksijen, laktat, pürivat, NADH varlığında sentezlenmektedir (Holzapfel ve ark., 1995). Hidrojen peroksit yüksüz olup kolayca hücre içerisine nüfus etmektedir. Hücre içerisinde gerçekleşen indirgenme reaksiyonları sonucu oluşan hidroksi radikaller kalıtım materyalini etkileyerek hücre ölümüne neden olmaktadır (Lindgren ve Dobrogosz 1990). Geniş bir etki spektrumuna sahip hidrojen peroksit, bakteriler, mayalar, küfler, virüsler ve bakteri sporlarına karşı antagonistik aktivite göstermektedir (Russel ve ark., 1992).

Laktik asit bakterilerinden bazıları kültür ortamında eriyik halde bulunan oksijeni tüketmektedirler ve bu bağlamda oluşan oksidasyon-redüksiyon tepkimeleri sonucunda hidrojen peroksit oluşturmaktadırlar. Laktik asit üreten diğer bakterilere benzer şekilde *Lactobacillus* üyeleri hem' den yoksundurlar ve bu nedenle son oksidasyon için sitokrom sistemini kullanamamaktadırlar.

Laktobasiller, genel olarak oksijenin hidrojen perokside dönüşümünü sağlayan flavoproteinleri kullanmaktadırlar. Bu mekanizma genelde, hem katalaz proteininin yokluğu ile birlikte diğer organizmaları inhibe edecek kadar yüksek miktarda

H₂O₂ oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Laktik asit bakterileri tarafından hidrojen peroksit üretiminde 5 farklı enzim görev almaktadır. Bu enzimler sırası ile NADH: H₂O₂ oksidaz, pürivat oksidaz, α -gliserofosfat-oksidad, süperoksit dismutaz ve NADH peroksidazdır (Escehenbach ve ark., 1989; Kılıç, 2001).

Hidrojen peroksit oluşumu özellikle, katalaz, peroksidaz gibi hidrojen peroksit parçalayıcı enzimleri olmayan ya da düşük seviyelerde bu enzimleri taşıyan mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir. Hidrojen peroksidin mikrobiosidal aktivitesi özellikle halojenür iyonlar varlığında peroksidaz enzimi aracılığıyla dikkate değer oranda artmaktadır. Yapılan çalışmalarda hidrojen peroksit üretimini belirlemek amacı ile kromojen oksidasyonu temelli spektrofotometrik ölçümler ya da agar plaklarında renk değişimi kullanılmaktadır (Escehenbach ve ark., 1989; Rabe ve Hillier, 2003;).

Gıda endüstrisi açısından laktik asit bakterileri tarafından H₂O₂ üretimi kullanılabilir bir özelliktir. Ortamda mevcut diğer mikroorganizmaların inhibe edilebilmeleri açısından fermentasyonun en kritik dönemi olan başlangıç aşamasında ortamda çözünen oksijen konsantrasyonu ile sınırlı miktarda üretilen H₂O₂ seçici bir ortam yaratmaktadır. Bununla birlikte bu güne kadar H₂O₂ konusunda laktik asit bakterilerinin ürettiği diğer antimikrobiyal maddelerin aksine çok eski tarihli çalışmaların haricinde literatürde pek fazla bilgi bulunmamaktadır.

Değişik *Lactobacillus* türlerinin H₂O₂ üretimi ile ilgili literatürlerde 1945–1960 yılları arasında yapılan bazı araştırmalara rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda 5 °C de *Lactobacillus bulgaricus* ve *L. lactis* türlerinin *Staphylococcus aureus*'u inhibe edebilecek düzeyde (6–12 mg/ml), yine *L. plantarum*'un ise *Pseudomonas* türlerinin adaptasyon periyodunu (lag faz) uzatacak düzeyde (3–13 mg/ml) H₂O₂ ürettiği, ayrıca laktik *Streptococcus* türlerinin de buzdolabında depolanan sütlerde psikrotrofik bakterilerin gelişmesini önleyecek düzeyde H₂O₂ ürettiği saptanmıştır. 1970 yılında yapılan bir çalışmada kıyılmış sığır etine *S. lactis* ve *Leuconostoc citrovorum* inoküle edilmiş ve bu bakterilerin 7 °C de depolamada gram negatif bakterilerin gelişmesini önlediği saptanmıştır (Turantas, 2007). Yine 1972 yılında başka bir araştırmacı tarafından *S. diacetilactis*' in kıyılmış sığır eti, süt ve peynirde gram negatif bakterilerin gelişmesini önlediği saptanmıştır (Turantas, 2007).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen hidrojen peroksit ve kullanım olanakları gıda alanı dışında tıpta, insanlarda klinik açıdan incelenmiş ve özellikle kadınlarda vajina mikroflorası üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Bilindiği gibi insan

intestinal sistemi ve vajina bu ortamlarda yaşamaya adapte olmuş çeşitli mikroorganizmalardan oluşan bir mikrobiyal floraya sahiptir. Normal vajinada hidrojen peroksit üreten laktik asit bakterileri predominant organizmalardır. Vajinada bulunan *Lactobacillus* türleri'nin bel soğukluğuna ya da immün sistemde kusurlara yol açan diğer bazı virüsler gibi patojen mikroorganizmaların vajina ya da intestinal sisteme kolonizasyonunu önlediği ve bu sayede vajen mikroflorasının stabilizasyonunda önemli görevler üstlendiği düşünülmektedir. Yapılmış olan çeşitli çalışmalar bu mikroorganizmaların hamile bayanları çeşitli enfeksiyonlara karşı koruduğunu desteklemektedir. Her ne kadar hidrojen peroksit üreten *Lactobacillus* cinsi mikroorganizmaların spesifik olmayan antimikrobiyal savunma mekanizması ile vajinal ekosistemi koruduğu düşünülse de bu konuda yapılan çalışmalar ve tür seviyesinde yapılmış olan tayinler kısıtlıdır (Song ve ark., 1999; Felten ve ark., 1999; Wilks ve ark., 2004).

2.2.3. Diasetil ve asetaldehit üretimi

Tereyağına özgü aromasını kazandıran diasetil ("2,3-butanedione") LAB tarafından ara metabolit olan pirüvattan sentezlenmektedir. Başlıca dört laktik asit bakterisi cinsi Streptokoklar, Leukonostoklar, Laktobasiller ve Pediokoklar tarafından sentezlenebilmektedir (Jay, 1982). Diasetil, mayalar, gram negatif bakteriler ve laktik asit bakterileri dışındaki gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyal etki göstermektedir. GRAS statüsünde olmasına rağmen diasetilin gıda katkısı olarak kullanımı sınırlıdır. Antimikrobiyal etkinin sağlanabilmesi için diasetilin yüksek miktarlarda kullanımı gerekmektedir. Ancak yüksek düzeylerde diasetil kullanımı ürünün duyuşal özelliklerini olumsuz etkileyebilmektedir. Yüksek uçucu özelliği nedeniyle diasetilin çeşitli malzemelerin ve yüzeylerin temizliğinde kullanımı önerilmektedir (Daeschel, 1989).

Laktik asit bakterilerinin pek çoğu elektron akseptörü olarak ortamda oksijen bulunduğu zaman laktik asidi parçalayabilme yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda bu bakterilerin bir kısmı anaerobik koşullarda da alternatif bir elektron akseptörü bulunduğu zaman laktik asidi parçalayabilmektedirler. Örneğin *L. plantarum* ve *L. pentosus* elektron akseptörü olarak sitratı kullanıp; laktik asitten asetat, format ve CO₂ sentezleyebilmektedir (Elferink ve ark., 2001).

Laktik asit bakterileri tarafından da sentezlenen bir bileşik olan diasetilin üretim koşulları ve bu maddenin gıdalar üzerindeki etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar

yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda diasetilin tereyağındaki aromadan sorumlu olduğu yada aromatik materyallerin temel bileşeni olduğu belirtilmiştir.

Yine yapılan çalışmalarda diasetilin; süt ve süt ürünlerinde, bazen meyve sularında ve konsantre edilerek dondurulmuş meyve sularında da aroma oluşumu ile ilgili bulunduğu belirtilmiştir (Christensen ve Pederson, 1958; Rushing ve Senn, 1960).

Çeşitli laktik asit bakterilerinde sıkça görülen diasetil üretimi ortam bileşenleri, pH ve inkübasyon sıcaklığı gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Homofermentatif türler, heterofermentatif türlere nazaran daha hızlı ve daha fazla miktarda diasetil üretmektedir. Bazı örneklerde diasetil üretimi için sitrik asit gereksinimi olmaktadır. Laktik asit bakteri kültürlerinden sitrik asidi kullanabilenlerin geliştirilme ortamına sitrik asit eklendiği zaman karbondioksit ve diasetil üretiminde artış olduğu daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Christensen ve Pederson, 1958). Yine yapılan benzer çalışmalarda gelişim ortamında malat ya da sitrat bulunduğu zaman *Lactobacillus* türlerinin asetoin ya da diasetil ürettiklerini, fakat bu asitlerin gelişim periyoduna eş zamanlı olarak kullanılıp kullanılmadığının ölçülemediğini belirtmişlerdir (Drinan ve ark.,1976).

Drinan ve ark (1976) heterofermentatif laktik asit bakterilerinin sitratı enerji kaynağı olarak kullandığını ancak ortamda sitrat olduğu halde glikoz bulunmadığı zaman laktik asit bakteri kültürlerinde hiçbir gelişme gözlemlenemediğine dayanarak bu bilginin tam olarak doğru olmadığını belirtmişlerdir. Bu gözlemler sonucunda da sitrat yokluğunda laktobasillerin pürivat oluşumunu sınırlı biçimde sağlayabildiklerini, bu nedenle de sitratın ek pürivat kaynağı rolü üstlendiğini açıklamışlardır. Diğer araştırmacılar tarafından alternatif açıklama olarak sitrat yokluğunda çeşitli bileşenlerin sentezi daha yavaş olduğu için; sitratın temel hücre bileşenlerinin sentezinde karbon kaynağı olarak görev aldığı yorumu getirilmiştir. Çeşitli araştırmacılara göre de diasetil, gelişimin ileriki safhalarında enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar ise diasetilin bazı türler üzerindeki inhibe edici etkisi üzerinde durarak, organizmanın diğer organizmalarla rekabet için, savunma mekanizması olarak diasetil ürettiği görüşünü desteklemişlerdir (Rushing ve Senn, 1960; Drinan ve ark., 1976;). Ticari bitkisel fermantasyon çalışmalarında asetik asidin laktik aside dönüşüm oranı incelenmiş ve bu oranda dikkate değer farklılıklar gözlemlenmiştir. Çeşitli laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan fermantasyon son ürünleri kıyaslandığında bakteri türüne göre dönüşüm oranı çeşitlilikleri dikkati çekmektedir. Genel olarak, toplamda yüksek miktarda asit üreten kültürlerde asetik asidin laktik aside dönüşüm oranı daha

düşük bulunmaktadır. Belli fermente ürünlerde, ürünün niteliksel kalitesinden fermentasyon son ürünleri sorumlu olduğu için asitler arasındaki dönüşüm oranı üzerinde durulmuş ve en uygun dönüşümü belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Normalde yüksek düzeylerde asit üreten suşlar ve çeşitli şeker konsantrasyonlarına sahip farklı ortamlar kullanılarak, yüksek ve düşük asit üreten suşların arasındaki farklılıklar araştırılmıştır. Christinsen ve ark. (1958) tarafından bildirildiğine göre heterofermentatif laktik asit bakterileri ilgili konsantrasyonlarda glikoz, fruktoz ve sükroz içeren ortamlarda düşük miktarda karbondioksit ve asetik asit üretmektedir. Aynı çalışma sonucunda şeker konsantrasyonunda artış olduğu zaman, üretilen laktik asit miktarında da artış olduğu bildirilmiştir. Meyve suları ile yapılan araştırmalar kültürün başlangıç miktarının ve generasyon zamanının diasetil üretiminde etkili olduğunu göstermiştir. *Lactobacillus* türlerinin devam eden kültürlerinin mililitresinde bulunan bir milyon organizma saatte 2,5 ppm diasetil üretmektedir. Maksimum diasetil sentezi ve sentez mekanizması üretici suşa göre değişim göstermektedir. (Rushing ve Senn, 1960). Christensen ve Pederson (1958) yaptıkları çalışmalar sonucunda laktik asit bakterilerinin optimum büyüme koşulları altında daha az miktarda diasetil ürettiklerini bildirmişlerdir. Diasetil üretimi bu organizmaların gelişimi için temel gereksinim değildir.

2.2.4. Reuterin

Reuterin anaerobik koşullarda *Lactobacillus reuteri* tarafından gliserolden üretilen düşük molekül ağırlığında protein yapıda olmayan yüksek çözünürlüğe sahip bir bileşiktir (Dobrogosz ve ark., 1989). Reuterin, *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. gibi gram pozitif ve *Salmonella* spp., *Shigella* spp. gibi gram negatif bakterilere, *Candida* türü mayalara ve *Trypanosoma* protozoerine karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (Daeschel, 1989).

2.2.5. Karbondioksit

Heterofermantatif laktik asit bakterilerinin hekzozu fermente etmeleri sonucu karbondioksit oluşur. CO₂ diğer metabolik yollarla da oluşsa bile esas olarak heterofermantatif laktik asit bakterilerinin hekzozu fermente etmeleri süresince şekillenir. CO₂ amino asitlerin (histidin, tirozin) dekarboksilasyonu sonucu da şekillenmektedir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkilerine katkıda bulunan CO₂, çift antimikrobiyel etkiye sahiptir. Birincisi, gıda ortamında küfler gibi zorunlu

aerobik mikroorganizmaların üremelerini engellemesidir. İkincisi ise CO₂'in kendi antimikrobiyal etkisidir (Adams ve ark., 1997).

2.2.6. Ekstraselüler polisakkarit (EPS) üretimi

Polisakkarit üretim yeteneği bakteriler arasında oldukça yaygın olarak görülmektedir. Mikroorganizmalar sitoplazmada yer alan glikojen, gram pozitif bakterilerde hücre duvarı yapısında bulunan peptidoglikan ile lipoteikoik asit ve gram negatif bakterilerde dış membranda bulunan lipopolisakkaritler gibi depo polisakaritleri sentezlemektedirler. Bununla birlikte bazı bakteriler genel olarak glikokaliks terimi altında toplanan, az miktarda glikoprotein içeren ve yüzeyde bulunan polisakkaritler salgılamaktadır. Bu ekzopolisakkaritler kapsülün hücre yüzeyine kovalent bağlanmasını ya da tabakalara yapışmayı sağlayan kapsül polisakkaritleri ve hücre yüzeyine gevşekçe bağlı ince tabaka formundaki ekzopolisakkaritleri (EPS) kapsamaktadır. EPS üretim yeteneği, maya ve küflerde daha az görülmekte, bakteriler arasında ise yaygın olarak görülmektedir (Madedo ve Reyes-Gavilan, 2005).

Mikrobiyal EPS lerden bazıları, bitkilerdeki polisakkaritlere (selüloz, pektin, alginat vb) benzer fizikokimyasal özelliklerinden dolayı endüstride kullanılmaktadır. EPS'ler yeni işlevsellikleri ile pek çok ilginç fiziki, kimyasal ve reolojik (maddenin sıvı halindeki özellikleri) özelliklerinden dolayı yeni biyomateryaller gibi hareket ederler. Bu nedenle tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri (NEOR), atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler. Laktik asit bakterileri ve diğer bakteriler tarafından üretilen EPS ler gıda endüstrisinde ürünün yapısından ve reolojik özelliklerinden dolayı viskozite için, stabilizasyon için kullanılmaktadır ancak LAB starter kültürleri aynı zamanda süt fermantasyonunda da kullanıldığı için, laktik asit bakteri suşları tarafından doğal olarak üretilen EPS lerin gıdalarda kullanımı son yıllarda oldukça dikkat çekmiştir (Madedo ve Reyes-Gavilan, 2005; Yılmaz ve Çelik, 2007).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen polisakkaritler lokasyonları temel alınarak iki sınıf altında toplanmaktadır; (i) hücre yüzeyi ile ilişkili olan ve patojenite ile bağlantısı olduğu düşünülen kapsüler polisakkaritler (CPS) ve (ii) hücrelerin çevrelerine salgıladıkları ekstraselüler polisakkaritler. Kapsüler polisakkaritlerin mikrobiyal hücreleri kurumaya, fagositoza, faj saldırılarına, osmotik strese antibiyotiklere ve toksik

bileşiklere karşı korumada rol oynadıkları ve hücrelere katı yüzeylere tutunabilme ve biyofilm oluşturabilme yetisi kazandırdıkları düşünülmektedir. Geçmiş yıllarda pek çok EPS üreten *Lactobacillus* türü tanımlanmıştır. Bu *Lactobacillus* türlerinin çoğu, fermente süt, yoğurt, kefir gibi süt ürünlerinden izole edilmiştir.

EPS üreten bakteriler ürettikleri EPS'leri yıkabilme yeteneğine sahip olmadığı için EPS'ler besin deposu olarak görülmemektedir. EPS'ler kompozisyonları temel alındığında homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler (HePS) olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Homopolisakkaritler monosakkaritlerden (daha çok fruktoz ya da glikoz) oluşmaktadır ve genelde sükrozdan bol miktarda üretilmektedir. Heteropolisakkaritler ise daha çok, galaktoz, glikoz, rhamnoz ve fruktoz gibi iki ya da daha fazla monosakkaritten oluşan identik tekrarlı ünitelerden oluşmaktadır. Heteropolisakkaritler alt üniteler gibi intraselüler olarak ve genelde 1,5 g/L. gibi düşük miktarlarda sentezlenmektedirler. Lokasyon ve kimyasal kompozisyona ilaveten konformasyon, moleküler kütle gibi diğer kriterlerde polisakkaritin özelliklerine etki etmektedir (Korakli, 2002; Tallon ve ark., 2003).

EPS üreten laktik asit bakterilerinin büyük bir çoğunluğu *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinslerine aittir. Bunun yanı sıra *Bifidobacterium* cinsine ait bazı suşların da biyopolimer ürettikleri bilinmektedir. *Leuconostoc mesenteroides* tarafından sentezlenen dekstran 1948 yılında endüstriyel anlamda üretilmiş ilk biyopolimerdir EPS üretimi için çok sayıdaki laktik asit bakterisi incelenmiştir. Bu çalışmalarda daha çok teknolojik özelliklerinden dolayı *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *Streptococcus thermophilus* gibi termofilik türler incelenmiştir. Bununla birlikte günümüzde *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. rhamnosus* gibi mezofilik bakteriler tarafından üretilen EPS'lere karşı oluşan ilgede artmaktadır (Korakli, 2002; Tallon ve ark., 2003; Madiedo ve Reyes-Gavilan, 2005).

Kimyasal kompozisyonları, yapıları, moleküler ağırlıkları, ürünleri ve fonksiyonları dikkate alındığı zaman heteropolisakkaritler oldukça geniş bir çeşitlilik göstermektedirler. Son dönemlerde farklı laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen heteropolisakkaritler ile ilgili moleküler genetik çalışmaları artmış ve heteropolisakkaritlerin tekrarlayan ünitelerinde çeşitli glikotransferaz enzimleri bulunmuştur. Örneğin *Streptococcus thermophilus* genomunda EPS üretiminde polimerizasyonu sağlayan enzimler ile glikotransferaz enzimlerini kodlayan çeşitli genler bulunmaktadır. EPS üretimi nükleotid şekerler tarafından aktive edilmekte ve düşük prekürsör varlığında üretim azalmaktadır. Laktik asit bakterilerinde EPS

oluşumuna çok daha az önem verilmiştir. LAB strainlerinin geniş çeşitliliğinin açıklanmasında EPS fenotiplerinin incelenmesi daha uygun bir yaklaşım olarak görülmektedir (Levander ve ark., 2002; Mozzi ve ark., 2006).

Gıda endüstrisinde laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS' lerin ilgi çekmesi fermente ürünlerin yapısını geliştiren reolojik özelliklerinden (örneğin yoğurtlarda yapı gelişimini sağlama, peynirlerde pıhtılaşma riskini azaltma) ve genel olarak güvenli bulunmalarından (GRAS) kaynaklanmaktadır. Teknolojik faydalarının yanı sıra laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS ler antiülser, antitümoral olma, kolesterolü düşürme, immün sistemi güçlendirme gibi sağlığa faydalı çeşitli özellikleri de taşımaktadırlar (Van Calsteren ve ark., 2002; Champagne ve ark., 2007).

Ticari değeri yüksek olduğundan dolayı laktik asit bakteri suşları tarafından üretilen EPS miktarının artırılması ve ürün geliştirilmesi açısından çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Welman ve ark. (2003) nın bildirildiğine göre NTG (N-metil-2,2 N-nitro-N-nitroguanidin) kullanımı ile kimyasal mutasyona uğratılan *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* da EPS üretimi artmaktadır. Benzer şekilde çeşitli *Streptococcus* türleri ile yapılan çalışmalarda kimyasal mutasyon yolu ile EPS üretiminin artırılabilirliğini desteklemektedir.

Gıdalarda katkı maddesi olarak EPS kullanımının başarı ile sonuçlanabilmesi için üreticilerin uygun ortamda, dondurularak ya da kurutulularak konsantre hale getirilmiş kültürün stabilizasyonunu, tekrar eldesini ve istenilen ürün eldesini sağlaması zorunludur. EPS üretimi temel olarak suşlara bağlı olarak gelişmekle birlikte; yüksek seviyelerde EPS üretimi için karbon ve nitrojen kaynakları arasında denge olması gerekmektedir. Ayrıca sıcaklık, ortam bileşenleri, inkübasyon süresi gibi büyüme koşulları da ürün eldesini etkilemektedir (Bouzar ve ark., 1996; Champagne ve ark., 2007).

Uygun koşulların sağlanmasına rağmen EPS üretimi tam kontrollü bir şekilde gerçekleştirilememektedir. Suşların genetik seviyede EPS üretimindeki kararsızlıkları, süt ürünlerinde lif oluşumunda kararsızlığa neden olmakta ve üretimde sıklıkla karşılaşılan bir problemi doğurmaktadır. Optimum gelişim sıcaklığında bile, uzun süren inkübasyon periyodundan sonra lif oluşumu kaybı olabilmektedir. EPS üretimi genellikle plazmitlerle ilişkilidir ve genetik kararsızlık plazmit kaybı ile açıklanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda mukoz oluşumunu sağlayan çeşitli plazmitler tanımlanmıştır. Diğer yandan termofilik laktik asit bakterilerinde EPS üretimi plazmit varlığı ile ilişkili değildir. EPS üretimi için gerekli olan genler kromozomlarda yer

almaktadır ve genetik kararsızlık hareketli genetik elementlerden ya da delesyonları da kapsayan genel genomik kararsızlıktan kaynaklanmaktadır. Her iki olay da *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *S. thermophilus* da gözlemlenmiştir (Stingele ve ark., 1996).

2.2.7. Bakteriyosinler

2.2.7.1. Bakteriyosinlerin tanımlanması

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen antibakteriyel etkiye sahip, protein ya da proteinlerle birlikte bazı yan gruplar da içerebilen metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Tagg et al. 1976, Klaenhammer 1993, Jack et al. 1995). Bu tanımdan hareketle birçok kaynakta bakteriyosinler ile antibiyotikler karıştırılmaktadır. Ancak bakteriyosinler ile antibiyotikler arasında temel farklılıklar bulunmaktadır. Söz konusu farklılıklar aşağıdaki maddeler halinde özetlenebilir;

1. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen ürünlerdir, antibiyotikler ise enzimatik işleme sonucu aktif formlarını kazanırlar.
2. Bakteriyosinler, antibiyotiklere göre çok daha dar etki spektrumlarına sahiptir.
3. Her bakteriyosinin kendi bağışıklık proteini vardır. Bu bağışıklık proteinlerini kodlayan genler, bakteriyosinlerin yapısal genleri ile bağlantılıdır. Antibiyotik bağışıklığını yöneten genetik determinantlar ise, yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir.
4. Bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilir ve iki bileşenli bir sistem tarafından regüle edilir. Antibiyotikler ise, gelişimin durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Nes et al. 2002).

Bakteriyosin sentezleme yeteneğine sahip bakteriler incelendiğinde, oldukça geniş bir yelpaze ile karşılaşılacaktır. Başta *Lactobacillus* ve *Lactococcus* olmak üzere *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsi bakterilere ait pek çok tür, bakteriyosin üretme yeteneğine sahiptir (Gorris 1996).

Bakteriyosinlerin çoğunlukla Gram-pozitif bakteriler tarafından üretildiği bilinmektedir. Fakat son araştırmalar bazı Arke üyeleri tarafından da bakteriyosinlerin üretildiğini göstermiştir. Halobakterler tarafından üretilen halosinin karakterizasyonu yapılan diğer bakteriyosinler ile hiçbir dizi benzerliği belirlenmezken, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen *S pyosinin*, *Escherichia coli* tarafından üretilen kolisinlerin bir kısmının, *Enterobacter cloacae* tarafından üretilen kloasinin, *Klebsiella*

pneumonia tarafından üretilen klebsin ve *Serratia marcescens* tarafından üretilen marcesinin protein dizi analizlerinin karşılaştırılması sonucunda ortak atadan evrimleştikleri saptanmıştır (Riley ve ark.,1998).

Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler genel olarak mikrosinler olarak adlandırılmaktadır. Mikrosinler; protein büyüklükleri, mikrobiyel hedefleri, etki mekanizmaları ve direnç sistemleri açısından farklılıklar içermektedir. Örneğin CoIV gibi mikrosinler sadece doğal amino asitler içerirken (modifiye olmayan), mikrosin B17 ve mikrosin C7 pek çok modifikasyona uğrarlar. MccB17 heterosiklik oksalaz, tiazol halkaları ve yüksek oranda glisin kalıntıları içerirken, mikrosin C7 amino ve karboksi uçlara sahip bir heptatpeptit yapısıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda 21 amino asit büyüklüğünde bir peptit olan ve translasyon sonrası modifikasyon yolu ile olgunlaştırılan yeni bir mikrosin (mikrosin J25) tanımlanmıştır. Mikrosin J25, 58 amino asitlik büyük bir öncü peptit halinde sentezlenir. Ardından 37 amino asitlik öncü peptit proteolitik olarak yapıdan uzaklaştırılarak 21 amino asitlik aktif peptitin halka yapısı oluşturulur. Hangi mekanizmalar ile bu basamakların gerçekleştiği ve halka yapısının oluşmasını yöneten sinyaller henüz tanımlanamamıştır (Gouaux, 1997).

En kapsamlı çalışılmış gram negatif bakteriyosini *Escherichia coli* tarafından üretilen kolisindir (James ve ark.,1996). Kolisin gen kümeleri plazmidler üzerinde kodludur ve toksinin üretiminden sorumludur. Kolisin gen kümesindeki direnç geni, toksin proteinine bağlanmak suretiyle toksini inaktive eden ve üretici hücreye spesifik bir direnç sağlayan proteini kodlarken, lizis geni hücrenin parçalanması sonucu üretilen kolisinin serbest bırakılmasını sağlayan proteini kodlar. Kolisin üretimine SOS regülону aracılık eder ve çoğunlukla stres koşulları altında çalışır. Kolisin proteininin üzerinde yer alan bir reseptör bölge, hedef organizmalarda spesifik yüzey reseptörlerini saptayarak hedefe bağlanır. Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları, hücre zarında por oluşturma, DNA, rRNA ve tRNA' ya karşı nükleaz aktivitesi gösterme gibi esaslara dayanır. Kolisinler, gram-negatif bakteriler tarafından üretilen tüm bakteriyosinlerden farklı olarak büyük proteinlerdir. Hücre zarında por oluşturan kolisinlerin büyüklükleri 449–629 amino asit arasında değişim gösterir. Nükleaz bakteriyosinlerinin amino asit sayısı ise daha geniş bir değişim aralığına (178 ile 777 amino asit içerirler) sahiptir (Silverstein ve ark.,2005).

Gram-negatif bakterilerden izole edilen pek çok bakteriyosinin, mevcut olan bakteriyosinler arasında meydana gelen rekombinasyonlar sonucu oluştuğu

belirlenmiştir. Bu rekombinasyonların sıklıkla meydana gelmesi bakteriyosin proteinlerinin domain (bölge farklılaşması) yapısından dolayı kolaylaşmaktadır. Kolisinlerde merkezi domain, protein yapısının % 50' sini kapsamaktadır ve spesifik hücre yüzey proteinlerinin tanınmasında rol alır. N-terminal domaini (proteinin yaklaşık %25'ini oluşturur) proteinin hedef hücreye translokasyonundan sorumludur. Bu toksinlerin domain konfigürasyonları doğada bulunan çoğu bakteriyosinin farklılaşmasından sorumludur (Thevissen ve ark., 2007).

Gram-pozitif bakteriler de, Gram-negatif bakteriler gibi birçok farklı bakteriyosin üretmektedir. Ancak bu gruba dahil olan bakteriyosinler Gram-negatif bakterilerin bakteriyosinlerinden temelde farklılık gösterirler. Gram-pozitif bakterilerde bakteriyosinin salınmasından sorumlu transport mekanizması, Gram-negatif bakterilerin mekanizması ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Bazı bakteri grupları bakteriyosin transportu için spesifik sistemler geliştirmiş iken, bazıları sadece salgı-bağımlı salınım yolunu kullanmaktadır. Sonuç olarak Gram-pozitif bakteriler bakteriyosinlere özgü regülasyonlara sahipken, Gram-negatif bakterilerin bakteriyosinleri yalnız konakçı regülasyon sistemlerini kullanmaktadır. Gram-pozitif bakterilerde bakteriyosin üretimi, genellikle logaritmik fazdan durağan faza geçiş sırasında gerçekleşmektedir. Nisin üretimi logaritmik fazın ortalarında başlar ve hücrenin durağan faza girmesi ile en yüksek düzeye ulaşır. Ekspresyonun yoğunluğu hücre döngüsüne değil, kültür yoğunluğuna bağlıdır (Hammami ve ark.,2007).

Evrensel bakteriyosin veri tabanında (<http://www.cck.rnu.tn/pfba/bactibase/main.php>) 39 adet lantionin içeren bakteriyosin (sınıf I), 40 adet lantionin içermeyen bakteriyosin (sınıf II) ve sınıflandırılmayan türler olmak üzere 145 bakteriyosin yer almaktadır (Linde ve ark.,2008).

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyel bileşiklerin sınıflandırılmasında pek çok farklı özellik kullanılmaktadır. Peptitler, disülfid ve monosülfid (lantionin) bağları ve etki spektrumları esas alındığında 4 gruba ayrılır. En iyi çalışılmış bakteriyosin grubu, gıda korunmasında kullanım potansiyellerinden dolayı laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinlerdir.

Bakteriyosinlerin tanımlanmasına yönelik ilk çalışma 1925'te *E. coli* tarafından sentezlenen colicin'in tespit edilmesiyle başlamıştır. Bakteriyosinlerin aynı ya da farklı bakteri grupları tarafından sentezlenen yüzden fazla çeşidi bulunmaktadır. *E. coli* suşlarının yanı sıra *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* ve *Enterococcus* gibi birçok mikroorganizma bakteriyosin üretmektedir

(Chen, Hoover 2003). Ancak daha çok gıdalar da güvenli olduğu düşünölen laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen bakteriyosinler üzerinde araştırma yapılmakta ve gıdalarda bu bakteriyosinler kullanılabilmektedir. Bu nedenle laktik asit bakterileri, özellikle de *Lactobacillus* ve *Lactococcus* tarafından sentezlenen bakteriyosinler üzerinde önemle durulmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin sentezlediğı bakteriyosinler birbirinden farklı özellikte olup, etki spektrumları, biyokimyasal özellikleri ve genetik determinantları farklılık göstermektedir. Genellikle düşük molekül ağırlığına (3-10kDa) sahip olup, hidrofilik ve hidrofobik kısımları bulunmaktadır. pH aralıkları geniş, izoelektrik noktaları yüksektir (De Martinis ve ark.,2002). Nisin ve pediocin asidik koşullarda yüksek sıcaklığa daha dayanıklı olup, nisin otoklavlandıktan sonra pH 5'te aktivitesinin %40'ını, pH 6.8'de ise %90'ını kaybetmektedir (Yıldırım, 2000). Laktik asit bakterilerinin ürettiğı bakteriyosinlerin çoğı katyonik, hidrofobik veya amfilik moleküller olup, 20-60 amino asit rezidüsü içermektedirler (Chen, Hoover 2003).

2.2.7.2. Bakteriyosinlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri

Bakteriyosinler farklı öbakteriyal taksonomik dallara ait mikroorganizmalar tarafından üretilen ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptidlerdir (Oscariz ve ark., 2001). Küçük antibiyotik peptidlerin üretimi bakterilere karşı yaygın bir savunmadır, bunlar yalnız mikroorganizmalar için değil aynı zamanda hayvanlar ve bitkiler içinde sergilenir (Oscariz ve ark., 2001). Maganin, cecropin ve defensin hayvan (Lehrer ve ark., 1993; Zasloff, 1987) ve thionin bitki (Broekaert ve ark., 1995) antimikrobiyal peptidleridir. Proteaza duyarlılık bir inhibitörün bakteriyosin olarak tanımlanmasında anahtar kriterdir. Çünkü bakteriyosinler proteinli maddeler olarak tanımlanır, genellikle bir dizi proteolitik enzimlerle (trypsin, α -chymotrypsin, pepsin, proteinaz K, vb.) inaktif hale gelir (De Vusyt ve Vandamme, 1994). Aksine aynı aktivite spektrumu ile ilgili proteaz duyarlılığının aynı modeli aynı bakteriyosin üreticilerinin çoklu izolasyonlarını gösterebilir. İlave olarak, gastrik ve pankreatik kökenli proteolitik enzimlere duyarlılık gıda ve yemlerde biyolojik koruyucu olarak bakteriyosinlerin kullanımına gelince oldukça ilginçtir, çünkü bu bunların alınımının sindirim sistemi mikroflorasını etkilemeyeceğı anlamına gelmektedir (De Vusyt ve Vandamme, 1994). Ayrıca bazı bakteriyosinler belirli proteazlar için duyarsız gibi görünmektedir. Bakteriyosinlerin yalnızca çok az bir proteinli bileşik içermesi

mümkündür. Birtakım bakteriyosinler bir karbonhidrat, lipit veya fosforlu kısım içerir. Böyle proteinli olmayan kısımların bulunuşu bu bakteriyosinlerin glikolitik (α -amilaz), lipolitik (lipaz) ve fosfolipolitik (fosfolipaz) enzimlere duyarlılığıyla doğrulanabilir (De Vuyst ve Vandamme, 1994). Bakteriyosin 466 (De Klerk, 1967) ve lactocin 27 (Upreti ve Hinsdill, 1973) böyle lipokarbonhidrat protein komplekslerinin tipik örnekleriyken, caseicin LHS (Dicks ve ark., 1992) ve leuconocin S (Lewus ve ark., 1992) glikoproteinler gibi davranır. Ek olarak, bazı bakteriyosinler basit yapılarının izahını daha zor hale getiren farklı amino asitler (lantibiyotikler) veya birtakım çapraz bağlar içerir. örnek olarak lantibiyotik biyosentezi esnasında thioether amino asitlerin post-translasyonel oluşumu, monosülfür köprüleriyle intramoleküler halka oluşumuyla sonuçlanır (Jung, 1991). Böyle halka yapıları Edman bozunumuyla otomatik olarak sıralama esnasında boş döngülere sebep olacaktır (Schnell ve ark., 1988).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin moleküler kütlesi, küçük peptidlerden (örneğin lactocin 481, 1700 Da) protein-protein ve protein-lipit agregatlarına ve 200.000 Da 'u aşan moleküler kütleli makromoleküllere (örneğin lactocin 27, lactacin B, lactacin F, helveticin J) kadar önemli ölçüde değişebilir. Bu agregatlar deterjanlar veya üreyle muameleyle bozulabilir: bu bozulma çoğu zaman doğal bakteriyosin kompleksinden daha aktif monomerlerin oluşumuna yol açar. Örneğin SDS varlığında lactocin 27 'nin poliakrilamid jel elektroforezi aktif kısmın boyut dışlama kromatografisiyle belirlendiği gibi 200.000'den ziyade 12.400 moleküler kütleli bir protein olduğunu gösterdi (Upreti ve Hinsdill, 1973).

Bakteriyosin preparasyonlarının stabilitesi artan saflaşmayla birlikte ciddi bir azalma sergilemektedir. Ayrıca, bakteriyosinler pH ve sıcaklıktaki değişimlerle inaktivasyona karşı duyarlılıklarına gelince önemli ölçüde farklılaşır. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğu sadece asit ve nötral pH 'da stabildir ve pH 8.0'in üzerinde inaktive olur (nisin, pediocin AcH, leucocin A-UAL 187). Isı direnci laktik asit bakterileri tarafından üretilen çoğu bakteriyosinin en önemli özelliğidir ve 60 veya 100 °C'de 30 dk 'dan (örneğin lactocin 27, lactocin S, carnobacteriocin A ve B) 121 °C'de 15-20 dk (örneğin lactacin B, lactacin F, nisin) otoklavlamaya kadar önemli ölçüde değişebilir. Böyle ısı stabilitesi, küçük globüler yapıların oluşumu ve son derece hidrofobik bölgelerin varlığı (örneğin lactacin F, lactococcin A, nisin), stabil çapraz bağlar (örneğin nisin, lactacin 481, lactocin S), yüksek bir glisin içeriği (örneğin diplococcin, lactacin F, lactocin 27, lactococcin A) , vb.'den dolayıdır (De Vuyst ve Vandamme, 1994).

2.2.7.3. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında çeşitli sınıflandırma kriterleri kullanılır. Jack ve ark., (1995) 'e göre bakteriyosinler disülfid ve monosülfid (lanthionine) bağlarının bulunuşuna dayanarak dört gruba ayrılır: (1) dehidroalanin, dehidrobütirin, lanthionine veya β -metil-lanthionine gibi farklı posttranslasyonel şekilde modifiye amino asitler içeren antibiyotikler (lantibiyotikler); (2) aktiviteleri için elzem en azından bir disülfid köprüsü içeren antibiyotikler (cystibiyotikler); (3) antibiyotiğin aktif hale gelebilmesi için indirgenmiş yapıda olmaları gereken yalnızca bir -SH kalıntısına sahip antibiyotikler (thiolbiyotikler); ve (4) sistein kalıntısı içermeyen antibiyotikler.

Klaenhammer (1993)'e göre, bakteriyosinler moleküler kütle, ısı stabilitesi, enzimatik duyarlılık, post translasyonel modifiye amino asitlerin varlığı ve etki şekli baz alınarak dört grupta sınıflandırılabilir.

2.2.7.3.1. GRUP I bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler daha çok "lanthionine" içermeleri nedeniyle lantibiyotikler olarak adlandırılmakta ve yapılarında bilinen amino asitlerden farklı olarak lanthionine (Lan) ve metillanthionine (MeLan) amino asit türevlerini içermektedirler. Bununla birlikte yapılarında biyokimyasal özelliklerini etkileyen dehidroalanine ve dehidrobutyrine de bulunmaktadır (Twomey ve ark.,2002). Molekül ağırlıkları 5kDa'dan daha düşüktür. Bu grupta yer alan nisin, lacticin 3147A ve 3147B ile plantaricin C'nin ısı stabiliteeleri yüksek olup, asidik pH'da 100 °C 'ye kadar stabiliteelerini koruyabilmektedirler (Chen, Hoover 2003).

Lantibiyotikler grubuna dahil bakteriyosinler, olgunlaşmış peptitlerin amino asit kompozisyonu esas alınarak 6 kategoriye ayrılmıştır. Söz konusu kategoriler; nisin alt grubu (nisin A ve nisin Z), laktisin 481 alt grubu (laktisin 481 ve laktisin J49), laktisin 3147 alt grubu (PlwF ve Ltn A2), mersacidin alt grubu (plantarasin C, Ltn A1 ve PlwG), sitolisin alt grubu (CylL1 ve CylL2) ve laktosin S alt grubu adını almaktadır (Twomey et al. 2002).

Bu gruptaki bakteriyosinler kimyasal yapılarına ve antimikrobiyal aktivitelerine göre I A ve I B lantibiyotikleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar:

Grup IA: Bu gruptaki bakteriyosinler net pozitif yüke sahip ve hidrofobik polipeptid yapısındadırlar. Membran aktif peptidler olup, bakteri zarında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Grup I B'deki bakteriyosinlere kıyasla daha esnek bir yapıya sahiptirler (Chen, Hoover 2003, Twomey ve ark.,2002). Biyokimyasal ve genetik düzeyde en iyi tanımlanmış olan “nisin” bir tip A bakteriyosindir. Nisin, 34 amino asit grubundan oluşan pentasiklik yapıda bir peptidir. Ortamda 3,75 ve 12,5 mg.kg⁻¹ düzeylerinde nisin mevcudiyeti antibotülinal, antilisterial ve antistafilokokal aktivite sağlamaktadır (Hugas, 1998).

Grup IB: Bu gruptaki bakteriyosinler yüksüz veya negatif yüklü olup, globüler peptid yapısındadırlar. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Twomey ve ark.,2002).

2.2.7.3.2. GRUP II bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler Grup I'den farklı olarak lanthionine içermezler. Ayrıca, molekül ağırlıkları 10kDa'dan daha düşük olup, ısı stabilitesine sahiptirler. Amfilik helikse, değişik oranlarda hidrofobiteye ve β -tabakalı yapıya sahiptirler. Ayrıca, bu gruptaki bazı bakteriyosinler 100 °C'den 121 °C'ye kadar olan sıcaklıklara karşı stabildirler. Antimikrobiyal aktiviteleri, membran aktif olmalarından kaynaklanmaktadır. Çok sayıda bakteriyosin içeren bu grup 3 alt gruba ayrılmaktadır (Riley, 1998).

Grup IIA :Bu gruptakiler özellikle listeria'ya karşı aktif olup, yapılarında bulunan peptid'in N-terminalinin sonunda Try-Gly-Asn-Gly-Val Xaa-Cys amino asit dizisine sahiptirler (Chen, Hoover 2003)

Grup IIB: Bu gruptaki bakteriyosinler primer yapıları birbirinden farklı iki polipeptid içerirler. Aynı aktivite gösterebildikleri gibi, etkin bir şekilde aktif hale gelebilmeleri için her ikisinin de aktif olması gerekmektedir. İki polipeptidin aktif hale gelmesiyle, hücre membranında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Hechard, Sahl 2002).

Grup IIC: Bu gruptaki bakteriyosinler, Grup II deki bakteriyosinlerin özelliklerini gösteren, Grup IIA ve IIB dışındaki diğer bakteriyosinlerdir. Bu gruptakilerin birçoğu sistein amino asit rezidüsü içermekte ve bu bakteriyosinlere thiolbiotic'ler veya cystibiotic'ler denilmektedir. Tiyo-aktif bakteriyosinler olup, aktiviteleri için indirgenmiş cystine rezidüsüne gereksinim duyarlar (Riley, 1998).

2.2.7.3.4. GRUP III bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler daha büyük molekül ağırlığına (>30kDa) sahip olup, ısıya karşı duyarlı peptid zincirlerinden oluşmaktadırlar (Riley, 1998). Ancak bu gruptaki bakteriyosinler henüz yeterince karakterize edilememişlerdir. Bu grupta yer alan bakteriyosinlerin büyük bir kısmı *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından sentezlenmektedir. Helvetisin J, laktisin A, laktisin B, helvetisin V-1829 ve enterolisin A bu grubun en bilinen üyeleridir. Grup III üyesi bakteriyosinlerin çoğu ısı duyarlı proteinler olmasına rağmen, helvetisin J gibi ısı stabil üyeleri de bulunmaktadır (Klaenhammer 1993, Ennahar et al. 2000, O'Sullivan et al. 2002a, Trotter et al. 2004).

2.2.7.3.5. GRUP IV bakteriyosinler

Dördüncü grup altında sınıflandırılan bakteriyosinler, polipeptit yapısı dışında, lipoprotein veya glikoprotein gibi ilave bazı yapılar içermeleri ile karakterize edilmektedir. Plantarasin S, laktosin 27 ve leukonosin S bu gruba dahil bazı bakteriyosinlerdir (Klaenhammer 1993, Nes et al. 1996, Ennahar et al. 2000, Nes and Holo 2000). Bu sınıflandırma, bakteriyosin aktivitesinin protein dışı yan gruplardan da kaynaklanabileceğine işaret eden sınırlı sayıda literatür verisi esas alınarak yapılmıştır. Ancak, yan grupların bakteriyosin aktivitesi hiçbir araştırmada kesin bir şekilde tanımlanamamıştır (Oscariz and Pisabarro 2001, Madera et al. 2003).

Bu gruptaki bakteriyosinler ise büyük ve kompleks moleküller olup, aktiviteleri için karbonhidrat veya lipid bileşenlerine gereksinim duymaktadırlar. Bu bakteriyosinler hakkındaki bilgiler yetersiz olup, biyokimyasal olarak henüz yeterince karakterize edilememişlerdir. Dolayısıyla bu konuda daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır (Chen, Hoover 2003).

Gıdalarda biyokoruma amacıyla LAB kullanımı üç farklı yolla gerçekleştirilmektedir. Birinci uygulama bakteriyosin üreten bir laktik asit bakterisinin gıdaya ilave edilmesidir. Bu uygulamadaki önemli nokta, laktik asit bakterisinin

çevresel ve teknolojik koşullar altında (sıcaklık, pH, tuz, vb.) gıdada gelişebilmesi ve bakteriyosin üretebilmesidir (Chen ve Hoover, 2003; Hugas, 1998). Örneğin *Lc. lactis* bakterisinin 10 °C’de yeterli düzeyde nisin üretememesi nedeniyle proteolitik olmayan *C. botulinum*’un toksin üretiminin engellenemediği belirtilmektedir (Rodger, 2001).

İkinci uygulama şekli, saflaştırılmış veya yarı saflaştırılmış bakteriyosinin doğal gıda katkısı olarak kullanımıdır. Bu kapsamda nisin 1950’li yıllardan itibaren birçok ülkede gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. (Chen ve Hoover, 2003).

Üçüncü uygulama ise ürünün organoleptik özelliklerinde olumsuz değişimlere neden olmadan gıdada hızlı çoğalabilen kültürlerin kullanımıdır. Bu yöntemde kültür soğuk depolama koşullarında canlılığını sürdürmekte, ancak sıcaklık artışı durumunda kültür hızla çoğalarak olası patojen ve bozulma etkeni bakterinin gelişimini ve toksin oluşumu önlemektedir (Stiles, 1996).

Bakteriyosinlerin doğal gıda katkısı olarak kullanımları maliyet ve verim problemleri nedeniyle sınırlıdır. Bununla birlikte günümüzde yeni ve daha etkin bakteriyosinler üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar yeni bakteriyosinlerin belirlenmesinin yanı sıra bakteriyosin üretiminin optimizasyonunu da kapsamaktadır (Naidu ve ark., 2006).

2.3. Laktik asit Bakterileri Tarafından Üretilen Lantibiyotiklerin Sınıflandırılması

Lantibiyotikler ya Lan veya MeLan köprüleri oluşumuyla sonuçlanan iç halka yapılarının bulunuşuyla diğer bakteriyosinlerden önemli ölçüde farklıdır. Bu farklı amino asitler sırasıyla α,β -doymamış aminoasitlerin didehidroalanin (Dha) veya 2,3-didehidrobütirin (Dhb) oluşturmak için ya serin ya da treoninin dehidrasyonu ile oluşur. Bu kalıntılar sonuç olarak ya Lan veya MeLan oluşumu için aynı peptid içinde serbest sistine peptid bağıyla bağlanır. Dehidrate amino asidin bu ilişkili durumları ve onun özel hedef sisteini sonuç halka yapısı ve büyüklüğünü gerektirir. Bugüne kadar Lan ve MeLan kalıntılarının varlığı LAB tarafından üretilen sekiz farklı lantibiyotikte onaylandı (Çizelge 1) ve üretici ırklar laktokok, laktobasil ve enterokokları kapsamaktadır. Ek olarak bilinen lantibiyotiklerle yakından ilişkili çok sayıda antimikrobiyal peptid LAB ‘de tanımlandı ama Lan ve MeLan varlığı onaylanmadan kaldı. Bunlar lacticin 481 türeyle yakından ilişkili gibi görünen lacticin J46 şeklinde gösterilen bir laktococcal peptidi içerir ve ortaya çıkan olgun peptidde henüz dört amino asit değişimine sahiptir (Huot ve ark.,1996) Muhtemelen J46 inhibitörlerin lantibiyotik

ailesine dahil edilecektir. Ya Lan veya MeLan varlığı lantibiyotiklerin temel tanınal özelliğiiken diğer Dha veya Dhb serbest kalıntılarını içeren posttranslasyonel olarak modifiye kalıntılar da karşılar (Skaugen ve ark., 1994) (Çizelge1).

Çizelge 2.1. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen lantibiyotikler

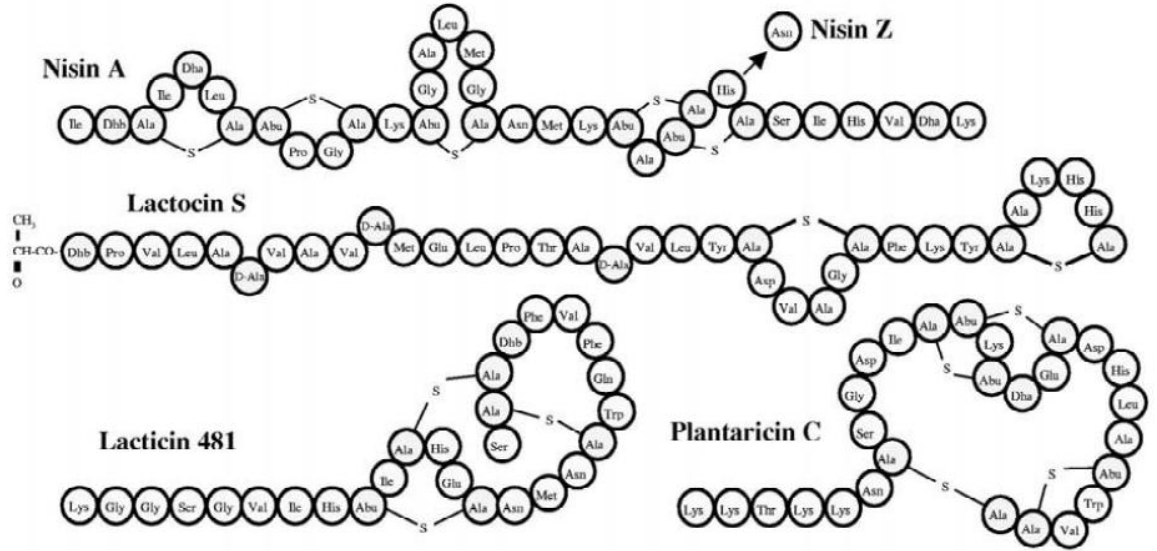
Lantibiyotik	Üretici ırk	Referans
Nisin A	<i>Lactococcus lactis</i> <i>NIZOR5,6F3,NCFB894,ATCC11454</i>	Gross&Morell (1974)
Nisin Z	<i>Lactococcus lactis</i> N8, <i>NIZO22186</i>	Mulders ve ark.(1991);de Vos (1993)
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ481, <i>ADRIA85LO30</i>	Piard ve ark. (1993), van den Hooven ve ark.(1996)
Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i> DPC3147, <i>IFLP105</i>	Ryan ve ark.(1996),Martinez-Cuesta
Lacticin S	<i>Lactobacillus sake</i> L45	Mortvedt ve ark.(1991)
Plantaricin C	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Turner ve ark.(1999)
Plantaricin W	<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2379	Holo ve ark.(2001)
Cytolsin	<i>Enterococcus faecalis</i> FA22	Booth ve ark.(1996)

2.3.1. Laktik asit bakterilerinin lantibiyotiklerinin yapısal benzerlikleri ve özellikleri

LAB lantibiyotiklerinin çoğu komple yapılarının belirlendiği noktada karakterize edildi ve antimikrobiyal aktivitenin mekanik temeli hakkında geniş kapsamlı bilgi elde edildi. Antimikrobiyal özellikleri ilk kez 1920 yılında Rogers ve Whittier (1928) tarafından keşfedilen bir molekül olan nisinle ilgili çok kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Bu *Lactococcus lactis*'in belirli suşları tarafından üretilir ve dünya çapında 50 'den fazla ülkede gıda koruyucu olarak onaylanmıştır. Çoğu LAB lantibiyotikleri tekli peptidken, cytolysin, lacticin 3147 ve plantaricini içeren bazıları iki peptidin bütünleyici aktivitesini gerektirir (Plw α ve Plw β) (Holo ve ark., 2001).

Lan ve MeLan bulunuşu lantibiyotikleri bütünleyen bir özellikken posttranslasyonel modifiye antimikrobiyal peptidler homojen bir grup değildir ve olgun peptid yapısı, ön peptidlerin yapısı, biyosentetik mekanizma ve son olarak etki mekanizmasını kapsayan birçok diğer kritere dayalı olarak alt gruplara ayrılabilir (Jung 1991;Vos ve ark,1995; Guder ve ark., 1998). Jung (1991) lantibiyotiklerin tip A ve tip B

şeklinde iki gruba ayrılmasını tavsiye etmiştir. Tip A lantibiyotikler pozitif yüklü uzun esnek moleküllerdir ve sitoplazmik membranların depolarizasyonu ile hareket ettiği, por oluşumuna ve esas hücre bileşenlerinin sızınmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Tip A lantibiyotik prototipi, esnek merkezi bağlantı bölgesi ve beş halka yapısı serisiyle düz helezon benzeri yapıya sahip olan nisindir (Şekil 1). Aksine tip B lantibiyotikler globüler yapıdadır ve negatif yüke sahiptir ya da yüksüzdür, hedef bakterilerin yaşaması ve gelişmesi için gerekli olan enzimatik reaksiyonları önler. Bu peptidlerde Lan ve MeLan oluşumu sıkı globüler yapıya sahip biyomolekül ile sonuçlanan bir sistein sülfidril grup ve bir doymamış amino asit arasındaki etkileşimi kapsar. Üyeleri mersacidin ve actagardini kapsar. Lantibiyotiklerin büyük çoğunluğunun bu iki türden birinden türemesine rağmen aracı özellikli lantibiyotikler şimdilerde ayrıca tanımlanmakta ve tanımlanmış çoğu lantibiyotikğin yeni sınıflandırma yöntemine göre düzenleneceği açıktır. Ek olarak iki bileşenli lantibiyotiklerin tanımlanması her bir türden bir peptide sahip A ve B gibi açık tipteki lantibiyotikleri tanımlamaktan çok daha zordur. Por oluşumuna ek dahası bir sorun bazı tip A lantibiyotikler ayrıca hücre zarı için temel enzimatik reaksiyonları, tip B lantibiyotiklerle alakalı normal bir özelliği etkileyebilir. Son zamanlarda lantibiyotiklerin çok sayıda fonksiyonel özelliğe dayanarak bağlı peptidleri daha fazla alt gruplarına ayrıldı (Sahl ve Bierbaum 1998;Guder ve ark.,2000). Tüm LAB lantibiyotiklerinin esas kenetlenme modeli bilinmediğinden gruplandırma olgun peptidlerin birincil dizin karşılaştırmasına dayanıyordu. Tüm onaylanmış LAB lantibiyotiklerinin dizinleri BLASTP kullanılarak karşılaştırıldı ve benzer dizinler CLUSTALW algoritması kullanılarak sıraya konuldu. Bu çoğu zaman birincil dizin karşılaştırmalarına dayalı alt gruplandırmayı mümkün kılar ve bilenen kenetlenme modelini veya biyosentetik işlem veya aktarım genlerinin bulunuşunu dikkate almaz.



Şekil 1. Farklı lantibiyotik gruplarının seçilen lantibiyotik peptidlerinin yapısının sembolik gösterimi

Olgun peptidlerin sıralamasına dayanarak LAB ‘nin lantibiyotik peptidleri altı alt gruba ayrıldı. Nisin grubuna ait nisin A ve nisin Z; lacticin grubuna ait 481 (Piard ve ark.,1992;Rince ve ark.,1994), lacticin J46 (Huot ve ark.,1996); mersacidin grubuna ait plantaricin C (Turner ve ark., 1999), LtnA1 (Ryan ve ark., 1999)ve Plw α (Holo ve ark.,2001); LtnA2 gurubuna ait LtnA2 (Ryan ve ark.,1999)ve Plw β (Holo ve ark.2001); iki bileşenli cytolysinden (Cyl^{L_I} ve Cyl^{L_S};Gilmore ve ark.1994) iki peptid kendileri bir grup oluştururken lactocin S (Skaugen ve ark.,1994) ayrı bir grup oluşturur. Bu sıralamayı kapsayan lantibiyotik olarak tanımlanan diğer türlerden çok sayıda varsayılan lantibiyotik peptidler vardır. Bunların dahil edilmeleri bilinen lantibiyotiklere benzerliklerine ve bağışıklık, modifikasyon ve/veya diğer lantibiyotiklerin aktarımını içeren genler arasında bunların yapısal belirleyicilerine dayanır. Bunlar belirgin şekilde trunkat-lantibiyotik modifikasyon genin yukarı yönünde yerleşen ve lacticin 481 ve mersacidin gruplarına benzerlik sergileyen *Ruminococcus gnavus*’u içerir. Direkt olarak aşağı yöndeki bu genler henüz yeni tanımlanan lantibiyotik ruminococcin A için neredeyse aynı üç kopyanın yapısal genidir (Dabard ve ark.,2001;Gomez ve ark.,2002) . Alkalifilik *Bacillus halodurans*’ın tamamen ardışık genomundan varsayılan iki bileşenli lantibiyotiklerin her iki bileşenini de kapsar (Takami ve ark.,2000). Bu ortaya çıkan peptidler BhaA1 ve BhaA2 şeklinde gösterilir ve sırasıyla mersacidin ve LtnA2

gruplarını içerir. prekürsör moleküllerin belirlenen farzedilen ayrılma bölgesi benzer peptidlerin benzerliklerine dayanır.

2.4. Laktik asit bakterilerinin lantibiyotiklerinin kullanımı

LAB 'den türeyen lantibiyotikler çok sayıda özelliğe sahiptir bu onları önemli derecede hem gıda hem de biyomedikal uygulamalarda cazip hale getirir. Bu post-translasyonel şekilde modifiye olmuş peptidlerin çoğu geniş bir etki spektrumuna sahiptir ve nispeten termostabildir ve proteolitik yıkıma karşı dirençlidir. Örneğin nisin ve lacticin 3147 çoğu gıdalarda bozulmaya sebep olan ve patojen bakterileri içeren Gram pozitif bakterilerin geniş bir aralığını inhibe eder. Lantibiyotik çok sayıda farklı yollardan gıdaya ulaştırılabilir örneğin bir lantibiyotik üreten ırk fermente gıdalarda bir starter veya ilave olarak kullanılabilir. Eşit ölçüde, bir üretici ırk uygun gıda maddesi üzerinde istenmeyen bakteri gelişimini azaltmada sıcaklığın kötüye kullanımına karşı koruyucu kültür olarak kullanılabilir. Bakteriyosin üreticileri normal starterlerin yerini basit bir şekilde tutabilir ve lantibiyotik doğal olarak hücre içinde üretilebildiğinden dolayı bu dağıtım sistemleri oldukça uygun maliyetli olma avantajına sahiptir. Alternatif olarak lantibiyotik spesifik gıdaya ve ekleme miktarına bağlı olarak saflaştırılmış veya konsantre bileşik olarak eklenebilir. Özellikle nisin gıda endüstrisinde yıllardır kullanılmaktadır ve ticari olarak üretilen tek lantibiyotiktir. Nisin 70 yıldan fazla zaman önce keşfedildi (Rogers ve Whittier, 1928, Whitehead, 1933) ve ilk kez İngiltere de 1953 yılında satıldı. Bugünlerde 40'dan fazla ülkede satılıyor ve Bileşmiş Milletler tarafından katkı numarası E234 (EEC 1983) olarak gıda katkıları pozitif listesine eklendi. Nisin kullanımı çok sayıda kapsamlı araştırmanın odağıdır (Delves-Broughton ve ark.,1990; De Vuyst ve Vandamme, 1994; Delves-Broughton ve ark., 1996). Gıdalardaki etkinliği basit bir örneğidir, işlenmiş peynir ve krem peynir, doğrudan asitlendirilmiş peynir, pastörize süt tatlıları, taze ve rekombine süt gibi çeşitli süt ürünlerinde kullanıldığı gibi sıvı yumurta, salata sosu ve soslar, yüksek nemli/yağı azaltılmış gıdalar, konserve gıdalar ve hamburger ekmeği gibi ürünlerde de kullanılır (http://www.aplin-barrett.co.uk/key_benefits.htm). Kriter olarak nisinin kullanarak ticari potansiyele sahip LAB tarafından üretilen diğer lantibiyotikler hakkında da yorum yapabiliriz. Belirli gıda bozulması ve çeşitli gıda ortamlarında patojenik bakteri inhibisyonunda etkinlik gösteren lacticin 3147 bir örnektir (Ryan ve ark.,1996;Ross ve ark., 1999;Morgan ve ark.,2001). Bu bakteriyosinin belirgin faydalı bir özelliği, bu

bakteriyosinin genetik belirleyicileri ticari starter ırklarının türevleri olan 30 ‘dan fazla laktokokkal konakçıya transfer edilen kendiliğinden nakledilebilir plazmid üzerinde kodlanır (Ryan ve ark., 1996;Coakley ve ark.,1997). Bu ırklar peynir üretiminde istenmeyen flora’ya karşı korumak için alternatif starter olarak kullanılır. Aslında böyle bir starter ırkın kullanımı *Listeria monocytogenes*’in en az %99,9’unun ölümüyle sonuçlanır (McAuliffe ve ark.,1999).

LAB tarafından üretilen lantibiyotikler insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisi için antibiyotiklere faydalı alternatifler sunan biyomedikal uygulamalarda da potansiyele sahiptir. Aslında son yapılan bir çalışma MRSA (methicillin dirençli *Staphylococcus aureus*) veya VRE (vancomycin dirençli *Enterococcus*) gibi çoğu antibiyotiğe dirençli insan patojenlerinin lacticin 3147’ye hassas olduğunu görüldü (Galvin ve ark.,1999). Hayvan sağlığında LAB lantibiyotiklerinin potansiyeli için bir örnek olarak hem nisin hem de lacticin 3147 sığırdaki mastitisin tedavisi ve/veya önlenmesinde incelenmektedir (Ryan ve ark., 1998; Twomey ve ark., 2000). Bu hastalık memede yangı olarak tanımlanır ve dünya çapında süt üretimde çok büyük ekonomik kayıplarla sonuçlanır. Sonuç olarak hayvanlara yaygın bir şekilde koruyucu olarak özellikle laktasyon periyodu sonlarına yaklaşıldığında hastalığa yakalanma eğilimleri arttığında antibiyotikler uygulanır. Çalışmalar örneğin Teat sealTM formülasyonu içeren lacticin 3147 koruyucularının uygulanması hayvanları *Streptococcus dysgalactiae* veya *Staph.aureus* gibi mastitik patojenlerle enfeksiyondan hayvanları koruyabildiğini gösterdi (Twomey ve ark., 2000). Bu tip denemeler özellikle antibiyotik muamelesinin istenmediği ya da etkisiz olduğu durumlarda bazı hayvan enfeksiyonlarını önleme veya tedavi etmede lantibiyotiklerin potansiyele sahip olduğunu aydınlatır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Laktik asit bakterileri

Bu çalışmada, İNTERMAK A.Ş ve Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı'nın doğal olarak üretilen yoğurttan izole edilmiş, identifikasyonu gerçekleştirilmiş laktik asit bakteri stokundan 60 adet *Streptococcus thermophilus* ve 10 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* kullanılmıştır. Kültürler % 20 gliserol içeren De-Man Rogosa Sharp (MRS) broth besiyerinde -20°C'de muhafaza edilmiştir (Sharpe, 1979; Harrigan, 1998). Kültürler gliserolle muhafazanın yanı sıra aktivasyon işleminin ardından MRS agar kültür ortamına dikey ekim yapılarak +4°C'de de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. İndikatör patojen bakteriler

Çalışmalarda Konya İl Kontrol Müdürlüğü'nden temin edilen *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49642, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojen kültürleri kullanılmıştır. Kültürler %20 gliserol içeren Brain-Heart Infusion (BHI) broth besiyerinde -20°C'de muhafaza edilmiştir. Kültürler gliserolle muhafazanın yanı sıra aktivasyon işleminin ardından BHI agar kültür ortamına dikey ekim yapılarak +4°C'de de muhafaza edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan besiyerleri

Laktik asit bakterilerinin stoklanması, aktivasyonu ve antimikrobiyal aktivitelerin taranması aşamalarında MRS broth ve agar (Merck, Almanya) kullanılmıştır. İndikatör patojen bakterilerin stoklanmasında ve aktivasyonunda BHI agar ve broth (Merck, Almanya) besiyerinden faydalanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde indikatör inokülasyonu için % 1 (w/v) Agar-Agar (Merck, Almanya) içeren BHI (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan diğer kimyasallar

Antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonunda trypsin (Sigma-Aldrich, A.B.D.) α -chymotrypsin (Sigma-Aldrich, A.B.D.), proteinaz-K (Sigma-Aldrich, A.B.D.) enzimleri kullanılmıştır. Enzimlerin çözeltilerini hazırlamak için fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonunda besiyerinin pH'sını ayarlamak için 1 M NaOH ve 1 M HCl kullanılmıştır.

Laktik asit bakterilerini geliştirdiğimiz besiyerinin (MRS) pH 'sını takip etmek ve doğrulamak için pH indikatörü olan Bromocresol Purple (BCP) kullanılmıştır. Bu indikatör pH 5.2'nin altında sarı renk verirken 6.8'in üzerinde mor renk verir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılacak bakterilerin analize hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakterileri -20°C'de % 20 gliserol içeren MRS broth besiyerinde 1 ml'lik eppendorflar içinde muhafaza edilmiştir. Analiz öncesinde donmuş halde olan eppendorf içindeki bakteriler termal şoktan sakınılması sebebiyle oda sıcaklığında bekletilerek eritilmiş ve analize hazır hale getirilmiştir. Analize hazır hale getirilen *Lactobacillus* suşları MRS broth da 42 °C'de mikroaerofilik ortamda 48 saat ve *Streptococcus* suşları ise 42 °C'de aerobik ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada kullanılan patojen bakterilerde oda sıcaklığında eritilip analize hazır hale geldikten sonra BHI broth da her bir patojenin gelişimine uygun sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2. Antimikrobiyal aktivite tayini

3.2.2.1. Agar difüzyon yöntemi

Laktik asit bakterilerinin indikatör patojenler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için agar difüzyon yöntemi uygulanmıştır (Mary-Harting ve ark., 1972). Yöntemde öncelikle uygun sıcaklık ve sürelerde geliştirilmiş test kültürlerinin fermentasyon sonrası sıvısı (süpernatant) elde edilmiş, ardından BHI besiyerine inoküle edilmiş patojenler üzerindeki etki zon oluşumlarıyla tespit edilmiştir.

3.2.2.1.1. Süpernatantların hazırlanması

Stok LAB'dan inokulum düzeyi % 1 (v/v) olacak şekilde MRS broth (5 ml) besiyerine ekimler yapılarak 37°C'de 24 saat aktivasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. LAB ikinci kez aktive edildikten sonra son aktivasyonun yapıldığı tüpten MRS broth (20 ml) içeren santrifüj tüplerine % 1 (v/v) düzeyinde ekimler yapılmıştır. Ardından kültürler aynı koşulda fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon işleminin ardından kültürleri içeren santrifüj tüpleri 4 °C'de 14.000 rpm'de santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve süpernatant kısmı ayrılmıştır. Elde ettiğimiz süpernatantlar 0.22 µm gözenek çaplı membran filtre kullanılarak sterilize edildi.

3.2.2.1.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Patojen inoküle edilmiş BHI agar besiyeri üzerine kuyucuklara açıldı. Bu kuyucuklara elde ettiğimiz süpernatantlardan 100 µl ilave edildi. Süpernatantların ön difüzyonu için petriler +4 °C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra petriler her bir indikatör patojen için uygun olan sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda oluşan zonlar ölçülmüştür (Simonetta ve ark., 2002).

3.2.2.2. Disk difüzyon yöntemi

Stok LAB'dan inokulum düzeyi % 1 (v/v) olacak şekilde MRS broth (5 ml) besiyerine ekimler yapılarak 37°C'de 24 saat aktivasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. LAB ikinci kez aktive edildikten sonra son aktivasyonun yapıldığı tüpten MRS broth (20 ml) içeren santrifüj tüplerine % 1 (v/v) düzeyinde ekimler yapılmıştır. Ardından kültürler aynı koşulda fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon işleminin ardından kültürleri içeren santrifüj tüpleri 4 °C'de 14.000 rpm'de santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve süpernatant kısmı ayrılmıştır. Elde ettiğimiz süpernatantlar 0.22 µm gözenek çaplı membran filtre kullanılarak sterilize edildi.

Daha sonra elde edilen steril süpernatantlar 6 mm çapında (Whatmann No 42) hazırlanan disklere emdirildi ve patojen inoküle edilmiş BHI agar besiyeri üzerine yerleştirildi. Süpernatantın besiyerine iyice difüze olabilmesi için düz bir şekilde 1 saat bekletildikten sonra petriler her bir indikatör patojen için uygun olan sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan zonlar ölçülmüştür (Yamato ve ark., 2003; Campos ve ark., 2006).

3.2.2.3. Agar-sandviç yöntemi

MRS broth besiyerinde optimum gelişme koşullarında aktifleştirilmiş olan LAB izolatlarından, 1µl MRS agara nokta ekim yapılmıştır. LAB nin gelişimi için uygun sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Bir gecelik taze kültürleri hazırlanan patojen bakteriler 10ml yumuşak agarlı (% 0,8 agar) BHI broth içeren tüplere 0.1 ml konmuş ve iyice karıştırıldıktan sonra, 24 saat inkübasyon sonrası gelişen LAB nin bulunduğu petrilerin yüzeyine yavaşça dökülmüştür. Bu petriler her bir patojenin gelişimine uygun sıcaklıklarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür.

3.2.3. Antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonu

Tespit edilen zon olşumunun ardından, buna neden olan antimikrobiyal aktivitenin kaynağı araştırılmıştır. Antimikrobiyal etkinin protein yapıda molekül(ler)den ileri gelip gelmediği proteolitik enzimler kullanılarak araştırılmıştır. Bu veriler ışığında tespit edilen protein yapıdaki bakteriyosin benzeri aktivitenin proteolitik enzim, pH ve ısıl stabilitesine bakılarak ileri karakterizasyonları yapılmıştır.

3.2.3.1. Proteolitik enzimlerin bakteriyosin benzeri madde aktivitesi üzerine etkisi

Bakteriyosinler protein yapısında maddelerdir. LAB izolatlarımızın test bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite protein yapısında bir maddeden kaynaklanıyorsa, bu durumda proteolitik enzimlerle inaktive olmalıdır. Bu hipotezden yola çıkılarak bu aşamada, LAB izolatları proteolitik enzimlerle muamele edilerek, test bakterilerine karşı tekrar denenmiştir.

Enzimlerin bakteriyosin-benzeri madde aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek için trypsin (Sigma-Aldrich, A.B.D.), α -chymotrypsin (Sigma-Aldrich, A.B.D.), proteinaz-K (Sigma-Aldrich, A.B.D.) enzimleri kullanılmıştır.

Enzimler 4 mM (pH 7) fosfat tamponu ile konsantrasyonu 400 µg/ml olacak şekilde çözündürülmüş ve filtreden (0,45 µm por çaplı) geçirilerek steril edilmiştir (Bhunja et al., 1988). Enzimler, MRS agara nokta ekim yapılarak geliştirilen LAB kolonilerinin üzerine pipet yardımıyla damlatılmıştır. Kontrol grubu olarak, enzimlerle muamele edilmemiş olan koloniler kullanılmıştır. Koloniler enzimlerle 37 °C'de 1 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında patojen bakterileri içeren yumuşak agarlı (%1 agar) BHI agar enzimle muamele edilen kolonilerin yüzeyini kaplayacak şekilde dikkatlice dökülmüştür. Petriler 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Omar, et al., 2006). Bu sürenin sonunda inhibisyon zonları ölçülmüştür.

3.2.3.2. Farklı pH değerlerinin bakteriyosin benzeri madde aktivitesine üzerine etkisi

MRS agarın pH'ı 1 M NaOH veya 1M HCl kullanılarak 4.5, 5.5 ,6.5 ve 7.5 ayarlanmıştır. LAB nokta ekim yöntemiyle, farklı pH'larda MRS agar içeren plakların yüzeyine ekilmiştir (Hugas, 1998). İnkübasyon sonrasında test mikroorganizmaları içeren % 1 agarlı BHI kültürleri, MRS plaklarının üzerine dökülmüştür. Her bir indikatör patojen için uygun olan sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan zonlar ölçülmüştür.

3.2.3.3. Farklı sıcaklık değerlerinin bakteriyosin benzeri madde aktivitesine etkisi

Bakteriyosin-benzeri madde üretiminde sıcaklık etkisini belirlemek için, LAB izolatları MRS agar plakları üzerine nokta şeklinde ekilmiş ve 25, 30, 37 ve 42 °C'de de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, test mikroorganizmalarını içeren % 1 agar içeren BHI agar MRS plakları üzerine dökülmüştür. Her bir indikatör patojen için uygun olan sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan zonlar ölçülmüştür(Marshall, 1992).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten LAB' nin Belirlenmesi

LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerini test etmede, en uygun test yöntemini belirlemek için üç farklı yöntem kullanılmış (disk difüzyon, agar difüzyon, agar-sandviç yöntemi), bu yöntemlerden elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği karşılaştırılmıştır.

4.1.1. Agar difüzyon yöntemi

LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitesini test etmede kullandığımız yöntemlerden biri olan agar difüzyon yönteminde yöntemin tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla 24 *Streptococcus thermophilus* suşu ve 5 *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* suşu kullanılmıştır.

2 tekrarlı yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlara göre; 24 *Streptococcus thermophilus* suşundan 6 tanesinin yapılan çalışmanın ilkinde *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı geniş bir inhibisyon zonu (≥ 10 mm) oluşturduğu belirlendi. Aynı çalışmanın tekrarında ise aynı *Streptococcus thermophilus* suşlarının *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı oldukça dar bir inhibisyon zonu (1-5 mm) oluşturduğu belirlendi.

Sonuçların birbiriyle uyumsuz olması nedeniyle bu yöntem çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmamıştır.

4.1.2. Disk difüzyon yöntemi

LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitesini test etmede kullandığımız yöntemlerden bir diğeri olan disk difüzyon yönteminde yöntemin tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla agar difüzyon yönteminde olduğu gibi 24 *Streptococcus thermophilus* suşu ve 5 *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* suşu kullanılmıştır.

2 tekrarlı yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlara göre; 24 *Streptococcus thermophilus* suşundan 7 tanesinin yapılan çalışmanın ilkinde *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı dar bir inhibisyon zonu (1-5 mm)

oluşturduğu belirlendi. Aynı çalışmanın tekrarında ise aynı *Streptococcus thermophilus* suşlarının *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlemlendi. Ayrıca bu yöntemde 6 *Streptococcus thermophilus* suşunun *Enterococcus faecalis*'e karşı inhibisyon zonu oluşturmaktan ziyade diskler etrafında daha fazla geliştiği gözlemlendi.

Sonuçların birbiriyle uyumsuz olması nedeniyle bu yöntem çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmamıştır.

4.1.3. Agar sandviç yöntemi

LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitesini test etmede kullandığımız bir diğer yöntem ise agar sandviç metodudur. Bu yöntemde ilk olarak elimizde mevcut olan 60 adet *Streptococcus thermophilus* suşu ve 10 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşunun tamamı test edilmiştir. Daha sonra elde edilen sonuçlara göre kuvvetli inhibisyon zonu oluşturan 15 *Streptococcus thermophilus* suşu ve 5 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşu seçilmiş diğer aşamalarda bu suşlar kullanılmıştır.

4.1.3.1. Agar sandviç yöntemiyle elde edilen sonuçlar

En az iki tekrarlı yapılan antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan üç yöntem karşılaştırıldığında, agar-sandviç yönteminin tekrarlarından elde edilen inhibisyon zon çaplarının birbiriyle daha uyumlu olduğu gözlenmiştir. Disk difüzyonu ve agar difüzyonu ile yapılan çalışmanın ilkinde, bir bakteriye geniş bir inhibisyon zonu olduğu belirlenirken, aynı çalışmanın tekrarında oldukça dar inhibisyon zonu elde edildiği durumlarla karşılaşmıştır. Yani LAB izolatları, test bakterileriyle direkt kontak halindeyken daha geniş zon çaplarıyla inhibisyon sağlamaktadır. Benzer gözlemler bazı araştırmacılar tarafından da gözlenmiştir (Karagül, 2010).

Schillinger ve Lücke (1989) etlerden izole ettikleri *Lactobacillus sake* izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerini inceledikleri çalışmalarında agar sandviç yöntemi ile 19 izolatı etkili bulurken agar difüzyon yönteminde yalnızca 6 izolatı etkili bulmuşlar ve bakteriyosin üretiminin katı ve sıvı ortamda farklı olabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Yine bir başka çalışmada Bromberg ve ark., (2004) etlerden izole ettikleri laktik asit bakterlerinin 174 tanesini agar sandviç yöntemi ile etkili bulurken, agar difüzyon yönteminde bunlardan yalnızca 128 tanesinin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Lewus ve ark., (1991) etlerden izole ettikleri, agar sandviç yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteye sahip bulunan laktik asit bakteri izolatlarından çok azının agar difüzyon yönteminde etkili bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar agar difüzyon yönteminde çökelti oluşma ihtimalinin, agar içerisine difüze olamayan bakteriyosinlerin varlığının ve kullanılan konsantrasyonun yöntemi daha hassas hale getirebildiğini ve negatif sonuç çıkma ihtimalinin arttığını bildirmişlerdir. Bu nedenle çalışmanın diğer aşamalarında, agar-sandviç yönteminin kullanılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir.

Tüm izolatlar agar-sandviç yöntemiyle tüm indikatör patojen bakterilere karşı denenmiştir. Daha sonra kuvvetli inhibisyon zonu oluşturan 15 *Streptococcus thermophilus* suşu ve 5 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşu seçilmiş diğer aşamalarda bu suşlar kullanılmıştır. Test bakterilerine karşı antimikrobiyal etkili olan *Streptococcus thermophilus* izolatların sonuçları Çizelge 4.1 'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Streptococcus thermophilus* izolatlarının çeşitli indikatör patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin agar- sandviç yöntemiyle belirlenmesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

İndikatör patojen bakteri								
İzolat no	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
1	9.3	11.4	9.0	8.6	8.6	8.6	10.2	7.0
2	9.9	11.2	11.7	8.4	8.8	10.9	9.8	6.5
3	10.7	12.5	9.9	9.7	9.9	11.8	11.3	6.3
4	10.3	10.8	10.1	9.0	9.9	9.7	8.9	8.6
5	9.0	11.2	7.2	10.9	9.5	8.3	9.3	8.8
6	8.1	8.8	7.9	8.2	8.5	7.7	8.8	6.9
7	11.0	9.7	9.4	11.0	8.6	10.6	9.8	8.2
8	9.1	10.4	7.3	10.4	7.8	8.0	9.6	8.1
9	8.6	9.6	6.8	7.9	8.2	8.2	9.9	8.1
10	10.4	9.4	8.2	8.2	8.1	8.0	9.1	8.5
11	8.5	9.9	7.1	8.4	6.5	-	8.4	7.2

12	8.5	9.5	7.3	7.9	6.6	-	7.8	7.1
13	9.7	10.7	8.4	7.8	6.8	10.6	8.2	6.6
14	8.6	11.1	7.6	8.4	7.5	9.5	8.0	5.8
15	7.5	9.7	7.0	7.8	6.7	7.7	8.0	6.2

* Zon çapı; 1-5 mm: düşük düzeyde duyarlı, 6-9 mm: orta düzeyde duyarlı, ≥10: yüksek düzeyde duyarlı

Streptococcus thermophilus izolatlarından 9 tanesi *Enterococcus faecalis* indikatör patojen bakterisinin gelişimini 9 mm ve 11 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe ederken diğer 6 tanesi ise 7.5 ve 8.6 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon göstermiştir. *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 8 tanesi *Salmonella typhmurium* indikatör patojen bakterisinin gelişimini 10.4 ve 12.5 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe ederken diğer 7 izolat ise 8.8 ve 9.9 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon göstermiştir. *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 5 tanesi *Escherichia coli* indikatör patojen bakterisinin gelişimini 9 ve 11.7 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe ederken diğer 10 izolat ise 6.8 ve 8.4 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon göstermiştir. *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 5 tanesi *Klebsiella pneumoniae* indikatör patojen bakterisinin gelişimini 9 ve 11 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe ederken diğer 10 izolat ise 7.8 ve 8.6 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon göstermiştir. *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 9 tanesi *Listeria monocytogenes* indikatör patojen bakterisinin gelişimini 9.9 ve 8.1 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe ederken diğer 6 izolat ise 6.5 ve 7.8 mm arasında zon çaplarıyla inhibisyon göstermiştir. *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 6 tanesi *Pseudomonas fluorescens* indikatör patojen bakterisinin gelişimini 9.5 ve 11.8 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe ederken 7 tanesi 7.7. ve 8.6 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe etmiş ve 11 ve 12 numaralı izolatın ise *Pseudomonas fluorescens* indikatör patojen bakterisine karşı herhangi bir inhibe edici etkisi görülmemiştir. *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamı *Staphylococcus aureus* indikatör patojen bakterisinin gelişimini 7.8 ve 11.3 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe etmiştir. *Streptococcus thermophilus* izolatlarından tamamının *Bacillus cereus* indikatör patojen bakterisine karşı zon çapları diğer patojen bakterilerine kıyasla daha küçük olup 5.8 ve 8.8 arasında değişmektedir.

Streptococcus thermophilus izolatlarından 1 numaralı izolat 11.4 mm zon çapıyla test bakterilerinden *Salmonella typhmurium* 'a karşı, 2 numaralı izolat 11.7 mm zon çapıyla *Escherichia coli*'ye karşı, 3 numaralı izolat 12.5 mm zon çapıyla

Salmonella typhmurium 'a karşı, 4 numaralı izolat 10.8 mm zon çapıyla *Salmonella typhmurium* 'a karşı, 5 numaralı izolat 11.2 mm zon çapıyla *Salmonella typhmurium* 'a karşı, 6 numaralı izolat 8.8 mm zon çapıyla *Salmonella typhmurium* ve *Staphylococcus aureus* 'a karşı, 7 numaralı izolat 11.0 mm zon çapıyla *Enterococcus faecalis* ve *Klebsiella pneumoniae* 'ya karşı, 8 numaralı izolat 10.4 mm zon çapıyla *Salmonella typhmurium* ve *Klebsiella pneumoniae* 'ya karşı, 9 numaralı izolat 9.9 mm zon çapıyla *Staphylococcus aureus* 'a karşı, 10 numaralı izolat 10.4 mm zon çapıyla *Enterococcus faecalis* 'e karşı, 11 numaralı izolat 9.9 mm zon çapıyla *Salmonella typhmurium* 'a karşı, 12 numaralı izolat 9.5 mm zon çapıyla *Salmonella typhmurium* 'a karşı, 13 numaralı izolat 10.7 mm zon çapıyla *Salmonella typhmurium* 'a karşı, 14 numaralı izolat 11.1 mm zon çapıyla *Salmonella typhmurium* 'a karşı, 15 numaralı izolat ise 9.7 mm zon çapıyla *Salmonella typhmurium* 'a karşı daha geniş inhibisyon zonu sergilemişlerdir.

Sonuçlardan da görüldüğü gibi 15 *Streptococcus thermophilus* izolatından 11 tanesi en geniş inhibisyon zonlarını *Salmonella typhmurium* 'a karşı sergilemiştir. Bu nedenle bu bakteri en duyarlı indikatör patojen bakteri olarak değerlendirilmiştir. İzolatların tamamının *Bacillus cereus* 'a karşı sergiledikleri zon çapları 8.8 mm ve 5.8 mm arasında değiştiğinden *Bacillus cereus* ise en dirençli indikatör patojen bakteri olarak değerlendirilmiştir.

Reinheimer ve ark., (1990), laktik asit bakterilerinin *E. coli* 'de 0.7-5.8 mm'lik, *Enterobacter aerogenes* 'de 0.4-7.3 mm, *Klebsiella* spp. 'de 0.5-8.9 mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğunu belirlemişlerdir.

İndikatör patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkili olan *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatların sonuçları Çizelge 4.2 'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının çeşitli indikatör patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin agar sandviç yöntemiyle belirlenmesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

İndikatör patojen bakteri								
İzolat no	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella typhmurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
1	7.3	8.3	10.1	8.6	8.5	8.0	8.1	7.2
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	9.1	7.4	8.8	8.2	7.6	8.0	8.9	7.2
5	10.2	9.1	8.5	8.0	8.0	8.4	7.7	5.9

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Enterococcus faecalis* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 7.3, 9.1, 10.2 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki göstermemiştir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Salmonella typhmurium* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 8.3, 7.4, 9.1 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki göstermemiştir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Escherichia coli* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 10.1, 8.8, 8.5 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki sergilememiştir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Klebsiella pneumoniae* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 8.6, 8.2, 8 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki sergilememiştir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Listeria monocytogenes* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 8.5, 7.6, 8 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki sergilememiştir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Pseudomonas flourescens* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 8, 8, 8.4 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki sergilememiştir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Staphylococcus aureus* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 8.1, 8.9, 7.7 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki sergilememiştir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından 1, 4, 5 numaralı izolatlar *Bacillus cereus* indikatör patojen bakterisinin gelişimini sırasıyla 7.2, 7.2, 5.9 mm zon çaplarıyla inhibe ederken 2 ve 3 numaralı izolatlar bu indikatör patojen bakterinin gelişimini inhibe edici bir etki sergilememiştir.

Elde edilen sonuçlara göre en geniş inhibisyon zonunu 10.2 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat *Enterococcus faecalis*'e karşı sergilemiştir. En dar inhibisyon zonunu ise 5.9 mm zon çapıyla 5 numaralı izolat *Bacillus cereus*'a karşı sergilemiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde 1 numaralı izolata 10.1 mm zon çapıyla en duyarlı indikatör patojen bakterisi *Escherichia coli* iken, en dirençli indikatör patojen bakterisi ise 7.2 mm zon çapıyla *Bacillus cereus* 'tur. 4 numaralı izolata 9.1 mm zon çapıyla en duyarlı indikatör patojen bakterisi *Enterococcus faecalis* iken, en dirençli indikatör patojen bakterisi ise 7.2 mm zon çapıyla *Bacillus cereus*'tur. 5 numaralı izolata 10.2 mm zon çapıyla en duyarlı indikatör patojen bakterisi *Enterococcus faecalis* iken, en dirençli indikatör patojen bakterisi ise 5.9 mm zon çapıyla *Bacillus cereus*'tur. Sonuçlara göre, *Escherichia coli* 8.5 ve 10.1mm arasında değişen zon çapıyla *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarına karşı en duyarlı bakteri, *Bacillus cereus* indikatör patojen bakterisinin 5.9 ve 7.2 mm arasında değişen zon çapıyla *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarına karşı en dirençli indikatör patojen bakterisi olduğu ortaya çıkmıştır. 2 ve 3 numaralı izolatlara karşı ise bütün bakterilerin dirençli olduğu görüldü.

Reddy ve ark., (1984), *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* suşunun *Staphylococcus aureus* indikatör patojen bakterisi üzerinde 9-12 mm'lik, *Escherichia coli* 'de ise 5-8 mm'lik inhibisyon zonu meydana getirdiğini bildirilmişlerdir. Abdel Bar ve ark., (1985) ise, *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* suşunun *Staphylococcus aureus* indikatör patojen bakterisinde 29.5 mm'lik, *Pseudomonas fragi* indikatör patojen bakterisinde de 34.67 mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğunu bulmuşlardır.

Karagül (2010)'nın yaptığı çalışmada 19 adet LAB izolatından 8 tanesi, *Escherichia coli* O157 indikatör patojen bakterisinin gelişimini 5 mm ve 21 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibe ettiğini bulmuş bu nedenle en duyarlı indikatör patojen bakterisi olarak değerlendirilmiştir. En dirençli indikatör patojen bakterilerin ise, *Acinetobacter baumannii* ve Vancomycin-dirençli *Enterococcus* (VRE) olduğunu belirtmiştir.

Coconnier (1997) yaptığı çalışmada, *Lactobacillus acidophilus* LB izolatının insan bağırsağında bulunan hücre içi *Salmonella typhimurium*'u etkisiz hale getirdiğini ve antibakteriyal özelliği nedeniyle maymuna uygulandığında bakteri kolonizasyonunu azalttığını göstermiştir.

Garriga ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada, tavuk bağırsağından izole ettikleri 296 adet laktik asit bakterisinin inhibitör aktivitesini incelemişlerdir. Bu izolatlardan 77'sinin *Salmonella enteritidis* ve *Escherichia coli*'ye karşı inhibisyon etkisi gösterdiğini belirlemişlerdir.

1989 yılında Almanya' da yapılan bir çalışmada araştırmacılar et ve et ürünlerinden *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* ve *Lactobacillus sake* türlerini içeren toplam 221 Laktobasil izole etmişler ve bu izolatların organik asit ve H₂O₂ üretimini elemine ederek antagonistik aktivitesini çalışmışlardır. Çalışmada 19 *L. sake*'nin 6'sının inhibitör aktivite gösterdiğini belirlemişler ve bakteriyosin ürettiği düşünülen bu 6 izolattan *L. sake* (Lb 706) izolatını, *Listeria monocytogenes*'e, *Staphylococcus aureus*'a, *Salmonella typhimurium*'a ve diğer laktik asit bakterilerine karşı denemişlerdir. *Lactobacillus sake* (Lb 706)'nin, *Listeria monocytogenes* ve diğer laktik asit bakterilerine karşı inhibisyon etkisi gösterirken, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı inhibisyon etkisi göstermediğini belirlemişlerdir (Schillinger ve Lücke, 1989).

Brezilya' da yapılan bir çalışmada araştırmacılar, tavuklardan izole ettikleri *Lactobacillus fermentum* izolatlarının probiyotik özelliklerini araştırmışlardır. Bu amaçla başta tavuk bağırsağı olmak üzere çeşitli organlardan izole ettikleri *Lactobacillus fermentum* izolatlarının, asit, pH ve antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Bu kriterlere dirençli olan izolatları tavuk yemlerine ilave ederek, tavuklardaki etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak bu yemlerin, antibiyotik etkisine benzer etki gösterdiğini belirlemişlerdir (Reque ve ark., 2003).

4.1.3.2. Bakteriyosin benzeri maddelerin proteolitik enzimler ile muamelesi

Farklı proteolitik enzimlerle muamele edilen *Streptococcus thermophilus* izolatlarının meydana getirdikleri inhibisyon zonları Çizelge 4.3. 'de verilmiştir. Bakteriyosinler protein yapısında maddelerdir. LAB izolatlarımızın indikatör patojen bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite protein yapısında bir maddeden kaynaklanıyorsa, bu durumda proteolitik enzimlerle inaktive olmalıdır. Bu hipotezden yola çıkılarak bu aşamada, LAB izolatları proteolitik enzimlerle muamele edilerek, indikatör patojen bakterilerine karşı tekrar denenmiştir.

Streptococcus thermophilus izolatlarının proteolitik enzimlerle (tripsin, α -kimotripsin, proteinaz-K) muamelesinden sonra inhibisyon zonlarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Antimikrobiyal aktivite inaktive olmamıştır. Dolayısıyla izolatların gösterdiği antimikrobiyal aktivite muhtemelen protein yapısında olan bakteriyosinlerden kaynaklanmamaktadır.

Çizelge 4. 3. Farklı proteolitik enzim uygulaması sonrası *Streptococcus thermophilus* izolatlarının indikatör patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

İndikatör patojen bakteri	Proteolitik enzim	İzolat No														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Enterococcus faecalis</i>	Tr.	9.1	9.8	10.5	10.2	9	8.1	11	9.2	8.7	10.3	8.5	8.7	9.5	8.6	7.4
	α -ktr.	8.8	9.9	10.6	10.5	8.9	8.2	10.9	9.1	8.6	10.2	8.6	8.4	9.7	8.7	7.3
	Pro.-K	9.3	9.7	10.7	10.3	8.9	8.1	10.8	9.3	8.6	10.4	8.7	8.5	9.6	8.6	7.5
<i>Salmonella typhimurium</i>	Tr.	11.4	11.1	12.4	10.7	11.3	8.8	9.6	10.6	9.6	9.4	9.9	9.6	10.7	11.2	9.8
	α -ktr.	11.4	11.2	12.5	10.8	11.2	8.7	9.7	10.3	9.4	9.2	9.8	9.5	10.6	11.1	9.7
	Pro.-K	11.3	11.4	12.6	10.8	11.3	8.6	9.5	10.4	9.5	9.3	9.9	9.4	10.5	11.3	9.7
<i>Escherichia coli</i>	Tr.	9	11.6	9.9	10.2	7.2	7.8	9.3	7.2	6.8	8.2	7.1	7.4	8.6	7.7	7.0
	α -ktr.	8.9	11.4	9.8	10.1	7.4	7.9	9.2	7.3	6.7	8.1	7.3	7.5	8.5	7.4	7.1
	Pro.-K	9.1	11.7	9.8	10.3	7.3	7.9	9.4	7.1	6.8	8.3	7.1	7.4	8.4	7.5	7.2

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tr.	8.5	8.4	9.5	8.9	10.8	8.1	11	10.3	7.9	8.1	8.4	7.8	7.9	8.3	7.9
	α -ktr.	8.6	8.6	9.6	9	10.9	8.2	10.8	10.1	7.8	8.2	8.3	7.9	7.8	8.5	8.1
	Pro.-K	8.6	8.3	9.7	9.1	10.7	8.3	10.9	10.4	7.9	8.3	8.2	7.9	7.7	8.4	7.8
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tr.	8.5	8.8	9.8	9.9	9.3	8.5	8.5	7.7	8.3	8.1	6.5	6.6	6.8	7.5	6.7
	α -ktr.	8.6	8.6	9.9	9.8	9.4	8.4	8.7	7.6	8.2	8.2	6.4	6.5	6.8	7.4	6.8
	Pro.-K	8.7	8.7	9.8	9.7	9.5	8.3	8.6	7.9	8.1	8.1	6.5	6.7	6.7	7.5	6.7
<i>Pseudomonas flourescens</i>	Tr.	8.5	10.8	11	11.7	9.6	8.5	7.7	10.5	8.1	8.2	-	-	10.5	9.5	7.7
	α -ktr.	8.7	10.9	8.1	11.8	9.7	8.4	7.6	10.6	8	8.1	-	-	10.6	9.3	7.6
	Pro.-K	8.6	11	8.7	11.6	9.8	8.3	7.7	10.6	8.1	8.2	-	-	10.6	9.4	7.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tr.	10.2	9.6	11.3	8.9	9.2	8.8	9.8	9.5	9.9	9.1	8.4	7.7	8.1	8	7.9
	α -ktr.	10.1	9.7	11.2	8.8	9.3	8.9	9.5	9.6	9.8	9.2	8.3	7.8	8.1	8	8
	Pro.-K	10.2	9.8	11.1	8.9	9.3	8.7	9.8	9.6	9.7	9.1	8.3	7.7	8.2	8.1	8.1
<i>Bacillus cereus</i>	Tr.	6.9	6.4	6.5	8.6	8.8	6.7	8.2	8.3	8.1	8.3	7.1	7.1	6.5	5.7	6.2
	α -ktr.	6.8	6.5	6.3	8.5	8.7	6.9	8.1	8.1	8.2	8.4	7.2	7.2	6.6	5.8	6.1
	Pro.-K	7	6.4	6.3	8.7	8.8	6.9	8.2	7.9	8.1	8.5	7.1	7.1	6.5	5.8	6.3

Tr.=tripsin , α -ktr.= α -kimotripsin, Pro.-K=proteinaz K

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatları proteolitik enzimlerle muamale edildiğinde zon çaplarında belirgin bir değişme olmamıştır. Antimikrobiyal aktivite inaktif olmamıştır. Dolayısıyla izolatların antimikrobiyal aktivitesi muhtemelen protein doğasında olan bakteriyosinlerden kaynaklanmamaktadır.

Karagül (2010) 19 adet LAB izolatının %98.1 'inin tripsin ve pepsinle muamele edildikten sonra, antimikrobiyal etkisini yitirdiği belirlemiştir. Enzim muamelesine maruz kalmayan kontrol gruplarında ise antimikrobiyal etkinin devam ettiği belirlenmiştir

Brezilya’ da yapılan bir çalışmada araştırmacılar, et ve et ürünlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin indikatör patojenlere karşı etkisini araştırmışlardır. Çalışmada laktik asit bakterileri (LAB)’ nin *Staphylococcus aureus* ve *Listeria innocua*’ yı inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ayrıca LAB tarafından üretilen inhibitör bileşiklerin, α -kimotripsin, pronoz E ve fisin enzimlerine duyarlıyken, tripsine dirençlilik gösterdiğini bulmuşlardır. Bu çalışma sonunda araştırmacılar izole ettikleri laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin gıda kökenli patojenler ve bozulma etmeni olan bakterilerin gelişimini inhibe etmede koruyucu olarak kullanılabileceği bildirmişlerdir (Bromberg ve ark., 2004).

2003 yılında ülkemizde yapılan bir çalışmada vajen kökenli 100 izolatın, 6’ sınıfın bakteriyosin ürettiğini belirleyen araştırmacılar, bu çalışmada 6 izolatın çeşitli proteolitik enzimlere duyarlılığını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda 6 izolattan proteinaz K’ ya 2’ sinin duyarlı, 4’ ünün orta duyarlı olduğunu, tripsine 5’ inin duyarlı, 1’ inin orta duyarlı olduğunu, katalaza ise 6 izolatın hepsinin dirençli olduğunu bulmuşlardır (Karaoğlu A. ve ark., 2003).

1999’ da Pakistan’ da yapılan bir çalışmada araştırmacılar, klinik bir örnekten izole ettikleri *Lactobacillus* spp.’ nin ürettiği bakteriyosine (Lactocin LC-09) çeşitli enzimler uygulamışlardır. Sonuçta bakteriyosinin tripsin, subtilisin ve pronoz E’ ye duyarlı olduğunu, katalaza ise dirençli olduğunu bulmuşlardır (Khalid ve ark.,1999).

Farklı proteolitik enzimlerle muamele edilen *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının meydana getirdikleri inhibisyon zonları Çizelge 4.4. ’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı proteolitik enzim uygulaması sonrası *Lactobacillus delbrueckii subps. bulgaricus* izolatlarının indikatör patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

İndikatör patojen bakteri	Proteolitik enzim	İzolat no				
		1	2	3	4	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	Tr.	7.2	-	-	9.2	8.4
	α -ktr.	7.2	-	-	9.3	8.5
	Pro.-K	7.3	-	-	9.1	8.5
<i>Salmonella typhmuri</i>	Tr.	8	-	-	7.4	9.1
	α -ktr.	8.1	-	-	7.2	9.1
	Pro.-K	8.3	-	-	7.4	9.2
<i>Escherichia coli</i>	Tr.	10.1	-	-	8.6	8.5
	α -ktr.	10.2	-	-	8.8	8.6
	Pro.-K	10.1	-	-	8.8	8.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tr.	8.5	-	-	8.5	8.1
	α -ktr.	8.7	-	-	8.3	8
	Pro.-K	8.6	-	-	8.2	8
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tr.	8.4	-	-	7.5	8
	α -ktr.	8.3	-	-	7.4	8.1
	Pro.-K	8.5	-	-	7.6	8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tr.	8	-	-	8.1	8.4
	α -ktr.	8.1	-	-	8	8.4
	Pro.-K	8.1	-	-	8.1	8.3

<i>Staphylococcus aureus</i>	Tr.	7.9	-	-	8.7	7.7
	α -ktr.	8.1	-	-	8.9	7.6
	Pro.-K	8.1	-	-	8.8	7.7
<i>Bacillus cereus</i>	Tr.	7.2	-	-	7.2	5.9
	α -ktr.	7.1	-	-	7.3	5.8
	Pro.-K	7.2	-	-	7.2	5.9

Tr.=tripsin , α -ktr.= α -kimotripsin, Pro.-K=proteinaz K

4.1.3.3. İnkübasyon sıcaklığının bakteriyosin benzeri madde üretimine etkisi

LAB izolatlarının farklı gelişme sıcaklıklarında geliştirilmesi sonrasında elde edilen zon çapları Çizelge 4.5 ve 4.6' da verilmiştir.

Enterococcus faecalis indikatör patojen bakterisine karşı *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 1, 5, 8, 13, 14, numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 8–10.1 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 42 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C'de 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar sırasıyla 13.7–8.7 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 °C'de 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar sırasıyla 7.5–12.8 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 30 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 25 °C'de 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 numaralı izolatlar sırasıyla 8.5–12.9 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 25 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Salmonella typhmurium indikatör patojen bakterisine karşı *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 1, 4, 5, numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 9.1, 8.5, 9.3 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 42 °C' de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C' de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14 numaralı izolatlar sırasıyla 7.3–12.1 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 °C'de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14 numaralı izolatlar sırasıyla 8.4–13.3 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 30 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 25 °C'de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 numaralı izolatlar sırasıyla 8.5–

9.7 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon zonu sergilerken diğer izolatlar 25 °C’de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir

Escherichia coli indikatör patojen bakterisine karşı *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 1, 4, 5, 6, 7, numaralı izolatlar 42 °C’ de sırasıyla 9.1-11.1 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 42 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C’ de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14 numaralı izolatlar sırasıyla 8.7-14.3 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 37 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 °C’ de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, numaralı izolatlar sırasıyla 7.8-11.5 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilemişlerdir. 25 °C’ de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15 numaralı izolatlar sırasıyla 8-10.3 mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 25 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Klebsiella pneumoniae indikatör patojen bakterisine karşı *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 1, 4, 5, numaralı izolatlar 42 °C’ de sırasıyla 8.9-9.7 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 42 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C’ de 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 13, 14 numaralı izolatlar sırasıyla 8.3–11.9, mm arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken diğer izolatlar 37 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememiştir. 30 °C’ de 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar sırasıyla 8.7–12.3 mm 25 °C’de arasında değişen zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 4 numaralı izolat 30 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememiştir. 25 °C’ de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar sırasıyla 6.8-9.5 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 6 numaralı izolat 25 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememiştir.

Listeria monocytogenes indikatör patojen bakterisine karşı *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 1, 5 numaralı izolatlar 42 °C’ de sırasıyla 8.9, 9.1 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar 42 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C’ de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 numaralı izolatlar sırasıyla 7.4-11.7 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 10, 15 numaralı izolatlar 37 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 °C’ de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar sırasıyla 7.5-12.3 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 8 numaralı izolat 30 °C’ de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememiştir. 25 °C’ de 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 11,

12, 13 numaralı izolatlar sırasıyla 7.1-8.9 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 4, 8, 9, 14, 15 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir

Pseudomonas fluorescens indikatör patojen bakterisine karşı *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 1, 5 numaralı izolatlar 42 °C' de sırasıyla 9.7, 8.9 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar 42 °C' de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C' de 2, 7, 8, 11, 12, 15 numaralı izolatlar sırasıyla 8.7-10.7 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 14 numaralı izolatlar 37 °C' de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 °C' de 1, 2, 3, 5, 7, 8, numaralı izolatlar sırasıyla 8.9-10.7 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar 30 °C' de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 25 °C' de 3, 4, 6, 7, 9, 10 numaralı izolatlar sırasıyla 8.9-10.1 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 1, 2, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar 25 °C' de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Staphylococcus aureus indikatör patojen bakterisine karşı *Streptococcus thermophilus* izolatlarından 1, 5, 6 numaralı izolatlar 42 °C' de sırasıyla 8.5-9.3 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 numaralı izolatlar 42 °C' de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C' de 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14 numaralı izolatlar sırasıyla 7-12.1 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 3, 10, 11, 12, 15 numaralı izolatlar 37 °C' de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 °C' de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14 numaralı izolatlar sırasıyla 12.9-8.9 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 11, 12, 15 numaralı izolatlar 30 °C' de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 25 °C' de 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14 numaralı izolatlar sırasıyla 6.6- 10.5 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 5, 11, 12, 15 numaralı izolatlar 25 °C' de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Bacillus cereus indikatör patojen bakterisine karşı izolatların tamamında 4 farklı sıcaklıkta belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Dolayısıyla kullandığımız patojenler bakteriler içerisinde *Streptococcus thermophilus* izolatlarına karşı en dirençli patojenin *Bacillus cereus* olduğu farklı inkübasyon sıcaklığı uygulamalarında da ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4. 5. Farklı sıcaklık uygulaması sonrası *Streptococcus thermophilus* izolatlarının patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

İndikatör patojen bakterisi	İnkübasyon sıcaklığı(°C)	İzolat no														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Enterococcus faecalis</i>	42	8.9	-	-	-	9.5	-	-	10.1	-	-	-	-	8	7.7	-
	37	11.9	13.1	11.1	9.9	11.1	-	-	-	-	-	9	9.7	13.7	12.7	8.7
	30	12.7	12.3	12.3	12.7	12.1	-	-	-	-	-	7.5	8.1	8.7	12.8	9.3
	25	8.9	8.5	9.7	10.1	12.5	-	-	11.7	12.9	12.9	8	9	10.1	10.6	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	42	9.1	-	-	8.5	9.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	11.7	12.1	9.5	10.3	10.3	10.9	9.7	9.9	8.7	8.9	-	-	7.3	7.3	-
	30	10.5	9.7	10.5	10.7	10.7	9.1	9.3	13.3	-	8.7	-	-	8.4	8.4	-
	25	8.9	8.5	8.5	8.7	8.7	9.7	9.5	9.1	9.5	9.3	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	42	11.1	-	-	9.1	10.9	9.3	8.7	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	12.3	13.1	9.5	11.3	14.3	11.9	9.7	8.7	8.7	14.3	-	-	10.6	10.2	-
	30	11.5	11.1	11.3	10.3	11.1	10.3	12.3	10.9	10.1	11.5	8.5	8.4	11.1	11.3	7.8
	25	10.3	8.9	9.3	9.1	8.7	8.7	8.7	9.3	8.9	10.3	-	-	8	10	9.1

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından *Enterococcus faecalis* indikatör patojen bakterisine karşı 1, 4, 5 numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 8.2, 7.1, 6.6 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 42 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C'de 1, 4, 5 numaralı izolatlar sırasıyla 7.2, 7.3, 7.5 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 ve 25 °C'de izolatların tamamı belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından *Salmonella typhmurium* indikatör patojen bakterisine karşı 1, 4, 5 numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 7.3, 8.2, 7.5 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 42 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C'de 1, 4, 5 numaralı izolatlar sırasıyla 7.7, 7, 6.8 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 ve 25 °C'de izolatların tamamı belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından *Escherichia coli* indikatör patojen bakterisine karşı 1, 4, 5 numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 8.7, 6.8, 6.8 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 42 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C'de 1, 4, 5 numaralı izolatlar sırasıyla 8.4, 6.8, 6.4 mm zon çaplarıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememiştir. 30 ve 25 °C'de izolatların tamamı belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından *Klebsiella pneumoniae* indikatör patojen bakterisine karşı 1, 4, 5 numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 7.7, 9.2, 6.8 mm zon çapıyla inhibisyon oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar 42 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C'de 5 numaralı izolat 8.6 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 1, 2, 3, 4 numaralı izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 °C'de 5 numaralı izolat 5.1 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 1, 2, 3, 4 numaralı izolatlar 30 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 25 °C'de 5 numaralı izolat 5.6 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 1, 2, 3, 4 numaralı izolatlar 25 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından *Listeria monocytogenes* indikatör patojen bakterisine karşı 1, 4, 5 numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 7.1, 6.9, 7.1 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 42

°C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C'de 1, 4, 5 numaralı izolatlar sırasıyla 7.4, 6, 6.5 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerlerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 ve 25 °C'de izolatların tamamı belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından *Pseudomonas fluorescens* indikatör patojen bakterisine karşı 1, 4, 5 numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 8.3, 8.8, 10 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 42 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C'de 1, 4, 5 numaralı izolatlar sırasıyla 7.8, 8.5, 9.7 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 °C'de 1 ve 5 numaralı izolatlar sırasıyla 6.9 ve 5.9 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 2, 3, 4 numaralı izolatlar 30 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 25 °C'de izolatların tamamı belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından *Staphylococcus aureus* indikatör patojen bakterisine karşı 1, 4, 5 numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 7.7, 8.6, 7 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 42 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C'de 4 numaralı izolat 6.8 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 1, 2, 3, 5 numaralı izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 ve 25 °C'de izolatların tamamı belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından *Bacillus cereus* indikatör patojen bakterisine karşı 1, 4, 5 numaralı izolatlar 42 °C'de sırasıyla 6.8, 7.3, 5.6 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 42 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 37 °C'de 1, 4, 5 numaralı izolatlar sırasıyla 6.6, 6.3, 7 mm zon çapıyla inhibisyon sergilerken 2 ve 3 numaralı izolatlar 37 °C'de belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir. 30 ve 25 °C'de izolatların tamamı belirgin bir inhibisyon zonu sergilememişlerdir.

Elde edilen sonuçlara göre izolatların farklı sıcaklıklarda oluşturdukları zon çapları değişkenlik göstermektedir. *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatların oluşturdukları inhibisyon zonları genellikle 42 ve 37 °C'de genişlerken 30 ve 25 °C'de genellikle daralmış hatta yok olmuştur. *Streptococcus thermophilus* izolatlarına kıyasla *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının patojenlere karşı oluşturdukları inhibisyon zonlarının çapları daha dardır. *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının oluşturdukları en geniş inhibisyon zonu *Pseudomonas*

fluorescens bakterisine karşı 5 numaralı izolatın oluşturduğu 10 mm çaplı zondur. 2 ve 3 numaralı izolatlar patojenlerin hiçbirine karşı 4 farklı sıcaklık uygulamasında da herhangi inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Karagül (2010) 25 ve 42 °C’ de geliştirilen LAB izolatlarının meydana getirdiği zon çapları daralırken, aynı izolatlar 30 veya 35 °C’ de geliştirildiğinde meydana getirdikleri zon çapları genişlediğini gözlemlemiştir. 30 °C’ de yaptığı çalışmalarda 35 °C’ ye göre % 8- 29 arasında inhibisyon zonlarının daha büyük olduğu gözlemlemiştir.

Çizelge 4. 6. Farklı sıcaklık uygulaması sonrası *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* izolatlarının indikatör patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir)

İndikatör patojen bakterisi	İnkübasyon sıcaklığı (°C)	İzolat no				
		1	2	3	4	5
<i>Enterococcus</i>	42	8.2	-	-	7.1	6.6
<i>.faecalis</i>	37	7.2	-	-	7.3	7.5
	30	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	42	7.3	-	-	8.2	7.5
<i>typhmurium</i>	37	7.7	-	-	7	6.8
	30	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-
<i>Escherichia</i>	42	8.7	-	-	6.8	6.8
<i>coli</i>	37	8.4	-	-	6.8	6.4
	30	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	42	7.7	-	-	9.2	6.8
<i>pneumoniae</i>	37	-	-	-	-	8.6
	30	-	-	-	-	5.1
	25	-	-	-	-	5.6
<i>Listeria</i>	42	7.1	-	-	6.9	7.1
<i>monocytogenes</i>	37	7.4	-	-	6	6.5
	30	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-

<i>Pseudomonas</i>	42	8.3	-	-	8.8	10
<i>fluorescens</i>	37	7.8	-	-	8.5	9.7
	30	6.9	-	-	-	5.9
	25	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	42	7.7	-	-	8.6	7
<i>aureus</i>	37	-	-	-	6.8	-
	30	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	42	6.8	-	-	7.3	5.6
	37	6.6	-	-	6.3	7
	30	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-

4.1.3.4. Besiyeri başlangıç pH değerinin bakteriyosin benzeri madde üretime etkisi

Farklı pH değerlerine sahip katı besiyerlerinde geliştirilen *Streptococcus thermophilus* izolatlarının meydana getirdikleri inhibisyon zonları Çizelge 4.7. 'de verilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda, başlangıç pH değeri 4.5 ve 5.5 olan besiyerlerinde bakteriyosin-benzeri madde üretiminde gözlenmezken, pH 6,5 ve 7,5 da en yüksek düzeye ulaşmıştır.

Enterococcus faecalis indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ve pH 5.5 'de 15 farklı *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamında belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. pH 6.5 'te 10.5 mm zon çapıyla en geniş inhibisyon zonunu 11 numaralı izolat oluştururken, 7 mm zon çapıyla 10 numaralı izolat en dar inhibisyon zonunu oluşturmuştur. pH 7.5 'te 8.8 mm zon çapıyla en geniş inhibisyon zonunu 7 numaralı izolat oluştururken 6.4 mm zon çapıyla en dar inhibisyon zonunu 4 numaralı izolat oluşturmuştur.

Salmonella typhimurium indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ve pH 5.5 'de 15 farklı *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamında belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. pH 6.5 'te 11.8 mm zon çapıyla 3 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 7.8 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat en dar inhibisyon zonunu oluşturmuştur. pH 7.5 'te 11.3 mm zon çapıyla 7 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 7.3 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat en dar inhibisyon zonunu oluşturmuştur.

Escherichia coli indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ve pH 5.5 ‘de 15 farklı *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamında belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. pH 6.5’te 10.2 mm zon çapıyla 3 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken, 6.5 mm zon çapıyla 5 numaralı izolat en dar inhibisyon zonunu oluşturmuştur. pH 7.5 ‘te 10.3 mm zon çapıyla 11 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 6, 7, 10, 14 ve 15 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Klebsiella pneumoniae indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ve pH 5.5 ‘de 15 farklı *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamında belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. pH 6.5 ‘te 10 mm zon çapıyla 9 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2, 3 ve 4 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. pH 7.5 ‘te 9.1 mm zon çapıyla 6 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 14 ve 15 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Listeria monocytogenes indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ve pH 5.5 ‘de 15 farklı *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamında belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. pH 6.5 ‘te 9.9 mm zon çapıyla 3 ve 13 numaralı izolatlar en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 7.6 mm zon çapıyla 10 numaralı izolat en dar inhibisyon zonunu oluşturmuştur. pH 7.5’te 12.9 mm zon çapıyla 7 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 14 ve 15 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Pseudomonas fluorescens indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ve pH 5.5 ‘de 15 farklı *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamında belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. pH 6.5’te 12 mm zon çapıyla 2 ve 13 numaralı izolatlar en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 5.3 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat en dar inhibisyon zonunu oluşturmuştur. pH 7.5 ‘te 10.9 mm zon çapıyla 11 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 7.2 mm zon çapıyla 9 numaralı izolat en dar inhibisyon zonunu oluşturmuştur.

Staphylococcus aureus indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ve pH 5.5 ‘de 15 farklı *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamında belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. pH 6.5 ‘te 8.2 mm zon çapıyla 7 ve 11 numaralı izolatlar en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 6 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat en dar inhibisyon zonunu oluşturmuştur. pH 7.5’te 10.8 mm zon çapıyla 7 numaralı izolat en geniş

inhibisyon zonunu oluştururken 14 ve 15 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Bacillus cereus indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ve pH 5.5 ‘de 15 farklı *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamında belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. pH 6.5 ‘te 10.5 mm zon çapıyla 13 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 6.8 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat en dar inhibisyon zonunu oluşturmuştur. pH 7.5 ‘te 8.7 mm zon çapıyla 8 ve 10 numaralı izolatlar en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 14 ve 15 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Sonuçlara göre pH 4.5 ve 5.5 ‘te farklı *Streptococcus thermophilus* izolatlarının tamamında belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. İzolatların bir kısmı pH 6.5 ‘ta en geniş inhibisyon zonunu oluştururken bir kısmı da pH 7.5 ‘ta en geniş inhibisyon zonunu oluşturmuştur. Farklı pH uygulaması sonucuna göre en geniş inhibisyon zonunu pH 7.5’ta 12.9 mm zon çapıyla 7 numaralı izolat *Listeria monocytogenes* indikatör patojen bakterisine karşı oluşturmuştur.

Chaveerach ve ark., (2004) yaptıkları çalışmada, tavuk bağırsağından izole edilen *Lactobacillus* (P93)’ un, *Campylobacter* gelişimini inhibe ederken, *E. coli* ve *Enterococcus*’ un *Campylobacter* gelişimini inhibe etmediğini belirlemişlerdir. Bu inhibitör etki gösteren *Lactobacillus* izolatını *Lactobacillus fermentum* olarak tanımlamışlar ve bu izolatın ürettiği antimikrobiyal maddenin yapısını belirlemek için süpernatantı farklı pH’ larda incelemişlerdir. pH 4,5 ve 6’ da inhibisyon etkisinin devam ettiğini, pH 7’ den itibaren inhibisyon etkisinin kaybolduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca süpernatanta katalaz enzimi uygulandıktan sonra inhibisyon zon büyüklüğünün de azaldığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada da inhibisyon etkisi belirlenen *Lactobacillus* izolatlarına katalaz enzimi uygulandıktan sonra inhibisyon zon çapında küçölme olduğu, ayrıca pH 8’ den itibaren inhibisyonun kaybolduğu bulunmuştur.

2003 yılında ölkemizde yapılan bir çalışmada araştırmacılar, bakteriyosin üreten 6 izolatın farklı pH derecelerine duyarlılıklarını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda pH 3’ de 2’ sini dirençli, 4’ ünü duyarlı; pH 4,5’ da 6’ sını dirençli; pH 7’ de 5’ ini dirençli, 1’ ini duyarlı; pH 9’ da ise 5’ ini duyarlı olarak bulmuşlardır(Karaoğlu A. ve ark.,2003).

Ölkemizde yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar, *L. salivarius* M7 tarafından üretilen Salivarisin B proteininin yapısını araştırmışlardır. Çalışmada bu proteinin pepsin, tripsin, kimotripsinin gibi protein parçalayan enzimlerden

etkilenmediğini, proteinaz K' ya karşı ise kısmen duyarlı olduğunu ve pH 3-9 aralığında aktif olduğunu belirlemişlerdir (Çataloluk ve Gürakan, 2003).

1999' da Pakistan' da yapılan bir çalışmada araştırmacılar, inceledikleri Laktobasilin ürettiği bir bakteriyosinin, farklı pH derecelerine dirençliliklerini araştırmışlardır. pH 3-7 aralığında dirençlilik gösterdiği ve bu dirençliliğin pH 4 ve 5' de maksimum seviyede olduğunu belirlemişlerdir (Khalid ve ark., 1999).

Çizelge 4. 7. Farklı pH uygulaması sonrası *Streptococcus thermophilus* izolatlarının indikatör patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

İndikatör patojen bakteri	pH	İzolat no														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	8.6	9.5	9.8	8.1	8.5	7.5	8.1	9.8	8.0	7.0	10.5	9.6	8.3	9.0	8.0
	7.5	7.7	7.4	7.2	6.4	8.0	8.7	8.8	8.7	8.0	8.2	8.3	7.9	7.5	8.3	8.2
<i>Salmonella typhimurium</i>	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	9.9	10.3	11.8	7.8	9.2	8.0	10.3	10.3	10.3	10.3	11.3	11.6	11.3	10.6	10.4
	7.5	10.0	8.9	8.9	7.3	10.4	8.2	11.3	8.9	7.5	8.5	9.4	9.4	8.7	8.8	8.7
<i>Escherichia coli</i>	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	8.1	9.3	10.2	6.6	6.5	7.5	8.3	7.2	7.3	8.0	9.8	9.7	9.6	9.6	8.1
	7.5	7.1	6.6	6.3	6.7	9.0	-	-	6.4	6.5	-	10.3	9.4	9.3	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	9.0	-	-	-	7.3	8.1	8.3	9.2	10.0	9.7	7.8	7.3	6.7	5.2	6.4
	7.5	-	-	-	-	-	9.1	-	-	-	-	5.6	6.2	5.0	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	9.0	9.7	9.9	8.0	9.7	8.8	8.9	8.3	8.1	7.6	8.8	9.0	9.9	9.5	8.5
	7.5	8.4	8.9	8.8	6.0	9.1	8.8	12.9	8.7	7.3	7.7	8.1	8.3	8.5	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	11.0	12.0	10.5	5.3	9.1	10.7	11.7	10.4	10.1	10.8	11.3	11	12.0	10.4	8.8
	7.5	10.6	10.7	8.4	7.7	7.4	8.7	10.1	7.6	7.2	8.1	10.9	10.1	8.7	8.4	8.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	7.1	7.7	8.0	6.0	6.6	7.5	8.2	7.8	7.1	7.2	8.2	8.0	7.9	7.4	7.5
	7.5	8.7	9.1	8.7	7.3	7.9	8.3	10.8	9.6	9.5	8.7	8.4	8.1	8.5	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	10.1	9.8	8.2	6.8	8.4	7.7	8.2	8.8	9.1	7.4	9.9	9.7	10.5	9.9	8.2
	7.5	7.5	7.6	7.7	7.6	8.6	8.4	8.6	8.7	8.2	8.7	8.5	8.2	8.3	-	-

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarına gelince, *Enterococcus faecalis* indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 'te hiçbir izolat belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmazken, pH 5.5 'te yalnızca 5 numaralı izolat 8.8 mm zon çapıyla inhibisyon zonu oluşturmuştur. pH 6.5'te 11.9 mm zon çapıyla en geniş inhibisyon zonunu 4 numaralı izolat oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. pH 7.5 'te 11.5 mm zon çapıyla 1 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Salmonella typhmuri indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 'te hiçbir izolat belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmazken pH 5.5 'te sadece 4 ve 5 numaralı izolatlar 7.2 ve 7.5 mm zon çapıyla inhibisyon oluşturmuşlardır. pH 6.5 'te 15.2 mm zon çapıyla 1 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. pH 7.5'te 8.6 mm zon çapıyla en geniş inhibisyon zonunu 4 numaralı izolat oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Escherichia coli indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 'te hiçbir izolat belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmazken pH 5.5'te sadece 5 numaralı izolat 8.1 mm zon çapıyla inhibisyon oluşturmuştur. pH 6.5'te 10.7 mm zon çapıyla 1 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. pH 7.5'te 8.9 mm zon çapıyla 5 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Klebsiella pneumoniae indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 'te hiçbir izolat belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmazken pH 5.5 'te sadece 5 numaralı izolat 8 mm zon çapıyla inhibisyon oluşturmuştur. pH 6.5 'te 11.4 mm zon çapıyla 5 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. pH 7.5'te 9.3 mm zon çapıyla 5 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Listeria monocytogenes indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 'te hiçbir izolat belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmazken pH 5.5 'te sadece 5 numaralı izolat 6.5 mm zon çapıyla inhibisyon oluşturmuştur. pH 6.5 'te 8.6 mm zon çapıyla 4 ve 5 numaralı izolatlar en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. pH 7.5 'te 7.2 mm zon çapıyla 1 numaralı

izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Pseudomonas fluorescens indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ‘te hiçbir izolat belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmazken pH 5.5’te yalnızca 5 numaralı izolat 6.1 mm zon çapı oluşturmuştur. pH 6.5 ‘te 11 mm zon çapıyla 1 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. pH 7.5 11.4 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır..

Staphylococcus aureus indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5’te hiçbir izolat belirgin bir inhibisyon oluşturmazken pH 5.5 ‘te sadece 4 ve 5 numaralı izolatlar 6.2 ve 6.5 mm zon çapı oluşturmuşlardır. .pH 6.5 ‘te 11.9 mm zon çapıyla 5 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. pH 7.5’te 8.2 mm zon çapıyla 5 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Bacillus cereus indikatör patojen bakterisine karşı pH 4.5 ve 5.5’te hiçbir belirgin inhibisyon zonu oluşmazken pH 6.5’te 13 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluşturmuştur 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. pH 7.5 ‘te 8.6 mm zon çapıyla 1 numaralı izolat en geniş inhibisyon zonunu oluştururken 2 ve 3 numaralı izolatlar belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarının farklı pH değerlerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları Çizelge 4.8 ‘da verilmiştir.

Çizelge 4. 8. Farklı pH uygulaması sonrası *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

	pH	1	2	3	4	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.5	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	8.8
	6.5	8.7	-	-	11.9	9.7
	7.5	11.5	-	-	7.7	7.2
<i>Salmonella typhimurium</i>	4.5	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	7.2	7.5
	6.5	15.2	-	-	12.2	10.5
	7.5	7.2	-	-	8.6	6.9

<i>Escherichia coli</i>	4.5	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	8.1
	6.5	10.7	-	-	9.0	10.4
	7.5	8.2	-	-	8.2	8.9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4.5	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	8.0
	6.5	10.1	-	-	10.0	11.4
	7.5	8.2	-	-	8.1	9.3
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.5	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	6.5
	6.5	7.6	-	-	8.6	8.6
	7.5	7.2	-	-	7.0	7.0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.5	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	6.1
	6.5	11.0	-	-	10.1	9.9
	7.5	9.9	-	-	11.4	9.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.5	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	6.2	6.5
	6.5	9.9	-	-	11.2	11.9
	7.5	7.1	-	-	8.2	7.8
<i>Bacillus cereus</i>	4.5	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	-	-	-
	6.5	10.2	-	-	13	7.5
	7.5	8.6	-	-	7.0	7.3

Sonuçlara bakıldığında hem *Streptococcus thermophilus* hem de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* izolatlarının neredeyse tamamının pH 4.5 ve 5.5 ‘te antimikrobiyal etkinliği azalırken pH 6.5 ve 7.5 ‘te antimikrobiyal etkinlik artmıştır. LAB izolatlarının asidik pH’dan ziyade nötr ve nötre yakın pH değerlerinde antimikrobiyal etkinliklerinin arttığı gözlenmiştir.

Mattiason ve ark., (2005) *Lactobacillus aciophilus* ile yaptıkları çalışmada bakteriyosin aktivitesinin pH 4-9 arasında değişmediği ancak pH 10’da aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada *S. thermophilus*’da görülen bakteriyosin aktivitesinin pH 10’da kaybolduğu saptanmıştır (Aktypis ve Kalantzopoulou, 2003).

Aykanat (2008) *Lactobacillus* izolatlarının, patojen bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyonunda, asitliğin etkisini belirlemek amacıyla, bu izolatların asitliği denatüre edilmiştir. Asitlik denatüre edildikten sonra Laktobasillerin bazı patojenlere karşı hiç zon oluşturmadıkları, bazılarının ise zon çaplarının küçüldüğü belirlenmiştir. F7 kodlu *L. salivarius*, asitliği denatüre edilmeden önce *C. Jejuni* (ATCC 33291)’ ye karşı 14 mm çapında bir zon oluştururken, *L. salivarius*’ un asitliği denatüre edildikten sonra zon oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu durum da, bu izolatın *C. jejuni* ATCC 33291’ e karşı oluşturduğu inhibisyonun tamamının asitlikten kaynaklandığını

göstermektedir. A11 kodlu *L. acidophilus* asitlik denatüre edilmeden önce *S. typhimurium*' a karşı 16 mm çapında bir zon oluştururken, asitlik denatüre edildikten sonra bu zon çapının 10 mm' ye düştüğü belirlenmiştir. Bu durum da, bu izolatın patojene karşı antimikrobiyal etkisine asitliğin yanında başka antimikrobiyal maddelerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Ammor ve ark., (2006) laktik asit bakterilerinin antibakteriyal aktiviteleri ile ilgili yaptıkları çalışmada, izolatların asitliğini nötralize ettikten sonra inhibisyon zon çaplarında küçülmenin olduğunu belirlemişlerdir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doğal olarak üretilen yoğurttan izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının çeşitli patojenler üzerine antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesini amaçlayan çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

Streptococcus thermophilus ve *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının çeşitli patojenler üzerine antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesini amaçlayan çalışmada öncelikle 3 farklı metot test edildi. Test edilen bu metotların iki tanesinde MRS broth içerisinde geliştirilen LAB'ların süpernatantları kullanılırken bir tanesinde direk bakteri kültürü kullanılmıştır. İki tekrarlı denemeler neticesinde süpernatant kullandığımız agar difüzyon ve disk difüzyon metodunda ilk denemede patojenlere karşı kuvvetli zon oluşturan izolatların ikinci denemede oluşturdıkları zonların çaplarının daraldığı hatta tamamen kaybolduğu görüldü. Bu nedenle direk bakteri kültürünün kullanıldığı ve daha tutarlı sonuçlar veren agar sandviç metodu en uygun metod olarak seçilmiştir.

Agar sandviç metodu kullanılarak bakterilerin seçtiğimiz patojenler üzerine antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. Bunun sonucunda 15 *Streptococcus thermophilus* izolatından 11 tanesi en geniş inhibisyon zonlarını *Salmonella typhmurium*'a karşı sergilemiştir bu nedenle bu bakteri en duyarlı test bakterisi olarak değerlendirilmiştir. İzolatların tamamının *Bacillus cereus*'a karşı sergiledikleri zon çapları 8.8 mm ve 5.8 mm arasında değiştiğinden *Bacillus cereus* ise en dirençli test bakteri olarak değerlendirilmiştir.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarından elde edilen sonuçlara göre 2 ve 3 numaralı izolatlar patojenlerin tamamına karşı herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. En geniş inhibisyon zonunu 10.2 mm zon çapıyla 4 numaralı izolat *Enterococcus faecalis*'e karşı sergilemiştir. En dar inhibisyon zonunu ise 5.9 mm zon çapıyla 5 numaralı izolat *Bacillus cereus*'a karşı sergilemiştir.

Bakteriyosinler protein yapısında maddelerdir. LAB izolatlarımızın test bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite protein yapısında bir maddeden kaynaklanıyorsa, bu durumda proteolitik enzimlerle inaktive olmalıdır. Bu hipotezden yola çıkılarak bu aşamada, LAB izolatları proteolitik enzimlerle muamele edilerek, test bakterilerine karşı tekrar denenmiştir.

Streptococcus thermophilus izolatlarının proteolitik enzimlerle (tripsin, α -kimotripsin, proteinaz-K) muamelesinden sonra inhibisyon zonlarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Antimikrobiyal aktivite inaktif olmamıştır. Dolayısıyla izolatların gösterdiği antimikrobiyal aktivite muhtemelen protein yapısında olan bakteriyosinlerden kaynaklanmamaktadır.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatları proteolitik enzimlerle muamale edildiğinde zon çaplarında belirgin bir değişme olmamıştır. Antimikrobiyal aktivite inaktif olmamıştır. Dolayısıyla izolatların antimikrobiyal aktivitesi muhtemelen protein doğasında olan bakteriyosinlerden kaynaklanmamaktadır.

Streptococcus thermophilus izolatlarının farklı inkübasyon sıcaklığı uygulaması sonrası oluşturdıkları zon çaplarına bakıldığında zon çapları genellikle 30 ve 37 °C’de genişlerken 42 ve 25 °C’de daralmıştır.

Lactobacillus delbrueckii subps. *bulgaricus* izolatlarının da farklı sıcaklık uygulaması sonrası oluşturdıkları zon çapları 37 ve 42 °C’de genişlerken 30 ve 25 °C’de daralmıştır. Ancak *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının oluşturdıkları zon çapları *Streptococcus thermophilus* izolatlarına kıyasla daha dardır.

Besiyeri başlangıç pH değerinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisine gelince sonuçlara bakıldığında hem *Streptococcus thermophilus* hem de *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* izolatlarının neredeyse tamamının pH 4.5 ve 5.5 ‘te antimikrobiyal etkinliği azalırken pH 6.5 ve 7.5 ‘te antimikrobiyal etkinlik artmıştır. LAB izolatlarının asidik pH’dan ziyade nötr ve nötre yakın pH değerlerinde antimikrobiyal etkinliklerinin arttığı gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde LAB izolatlarının uygun pH ve sıcaklık değerlerinde patojen bakterilerinin gelişimi üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu ortaya çıkmıştır. Ancak proteolitik enzimle muamele sonucunda zon çaplarında herhangi bir daralma ve yok olma durumuna rastlanmadığından çalışmada kullandığımız LAB izolatlarının antimikrobiyal etkisinin bakteriyosinden kaynaklanmadığı sonucuna varıldı.

Biyokorumanın her geçen gün önem kazandığı günümüzde sağlıklı ve güvenilir ürünler üretmek için mümkün olduğunca proses uygulamalarından kaçınılmakta ve doğal ve güvenilir katkı maddelerine olan ilgi artmaktadır. Bu noktada doğal olarak üretilen yoğurttan izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* suşlarının gıdalarda bozulmaya sebep olan birçok patojen bakteri üzerinde antimikrobiyal etkili olduğu tespit edildiğinden bu izolatların uygun ortam

şartları sağlanmak suretiyle gıdalarda biyokoruma amacıyla güvenli bir şekilde kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Bar, M.M. and Abdel, N.M., Purification and characterization at an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. Dissertation Abs. -Int. -B. Sci. And Eng., 46, 1, 12, 202, 1985.
- Adams, M.R., Nicolaides, L.: Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8 (5-6): 227–239, 1997.
- Aktypis, A. ve Kalantzopoulos, G., 2003. Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001. *Lait*, 83, 365-378.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I., “Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-screening and characterization of the antibacterial compounds”, *Food Control*, 17: 454-461 (2006).
- Andersson R: Food Processing, Lactic Acid Bacteria in the Production of Food, SIK Publication, Food Laboratory Newsletter 14: 17 (1989).
- Aslım, B., Beyatlı, Y., Halkman, K. (2000), ‘Yoğurt Starter Kültür Metabolitlerinin İnhibisyon Etkisi,’ *Turk J. Biol* 24: 65-78.
- Axelsson, L., 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*, Eds. Salminen, S., Wright, A., Marcel Decker, Inc. New York, Bassel, Hong Kong, pp. 1-72.
- Aykanat, Ö. 2008. Tavuktan izole edilen *Lactobacillus* cinsi bakterilerin, çeşitli patojen bakteriler üzerine antagonistik etkisinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bhunja, A., Johnson, M.C. and Ray, B. 1988, Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 2, 319-322.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P. A., Osborn, R. W. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant. Physiol.* 108: 1353-1358.
- Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C. L., Delboni, R. R., de Oliveire, J., “Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity”, *Brazillian Journal of Microbiology* 35; 137-144 (2004).
- Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M. (1996), ‘Exopolysaccharide Production in Milk by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by Two Kolonial Variants,’ *Journal of Dairy Science*, 79 (2), 205–211.

- Campos, C.A., Rodriguez, O., Mata, P.C., Prado, M. and Velazquez, J.B. 2008, Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (Psetta Maxima), *Food Research International*, 7, 432-441.
- Champagne, C.P., Gardner, N.J., Lacroix, C. (2007), 'Fermentation Technologies for the production of exopolysaccharide synthesizing *Lactobacillus rhamnosus* concentrated cultures,' *Journal of Biotechnology*, 10 (2), 211– 220.
- Chaveerach, P., Lipman, L. J. A., van Knapen, F., "Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*", *International Journal of food Microbiology*, 90; 43-50 (2004).
- Chen H, Hoover D G (2003): Bacteriosins and their food applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 2: 82-100
- Christensen, M.D. ve Pederson, C.S. (1958), 'Factors Affecting Diacetyl Production by Lactic Acid Bacteria,' *Applied and Environmental Microbiology*, 6 (5); 319–322.
- Coakley M, Fitzgerald G, Ross RP, (1997) Application and evaluation of the phage resistance and bacteriocin encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1434–1440.
- Coconnier, M. H., Lievin, V., Bernert-Camard, M. F., Hudault, S., Servin, A. L., "Antimicrobial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB", *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1046-1052 (1997).
- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P., *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777, 2005
- Çataloluk, O., Gürakan, G. C., "Characterization of salivaricin B, a protein expressed by *Lactobacillus salivarius* M7", *Turk J. Biol.* 27: 131-136 (2003).
- Dabard J, Bridonneau C, Phillipe C, Anglade P, Molle D, Nardi M, Ladiré M, Girardin H, Marcille F, Gomez A & Fons M (2001)
- Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43: 91-94.
- Daeschel, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 164-167.
- Davidson PM, Hoover DG: Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. "Salminen, S. and von Wright, a. (ed): *Lactic Acid Bacteria*" p. 127, Marcel Dekker Inc. New York (1993).
- Delves-Broughton J (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food Tech.* 44: 100–117.

- Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J (1996) Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2: 193–202.
- De Klerk, H. C. 1967. Bacteriocinogeny in *Lactobacillus fermenti*. *Nature*. 214: 609
- De Martinis E C P, Alves V F, Franco B D G M (2002): Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, 18(2-3): 191-208.
- De Vos, W. M. 1987. Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 281-295.
- De Vuyst, L., Vandamme, E. J. 1994. Nisin, lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: De Vuyst L., Vandamme E.J.(eds), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Blackie, London, pp. 151-221.
- Dicks, L. M. T., van Jaarsveld, D. E. and van Vuuren, H. J. J. (1992) Caseicin LHS, a broad spectrum bacteriocin produced by *Lactobacillus casei*. *Abstr. Book 7th Biennial Congr. of the South African Soc. Microbiol.*, p.214.
- Dobrogosz, W.J., ve Talarico, T.L., 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 674-679.
- Drinan, D.F., Tobin, S., Cogan, T.M. (1976), 'Citric Acid Metabolism in Heteroand Homofermentative Lactic Acid Bacteria,' *Applied and Environmental Microbiology*, 31 (4), 481–486.
- Elferink, S.J.E.H., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F. (2001), 'Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*,' *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1), 125–132.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85-106
- Eschenbach, D.A., Davick, P.R., Williams, B.L., Klebanoff, S.J., Young-Smith, K., Critchlow, C.M., Holmes, K.K. (1989), 'Prevalence of hydrogen Peroxide-Producing *Lactobacillus Tür* in Normal Women and Women with Bacterial Vaginosis,' *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (2), 251–256.
- Felten, A., Barreau, C., Bizet, C., Lagrange, P.H., Philippon, A. (1999), 'Lactobacillus Tür Identification, H₂O₂ Production, and Antibiotic Resistance and Correlation with Human Clinical Status,' *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (3), 729–733.
- Galvin M, Hill C, Ross RP (1999) Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 355–358.

- Garriga, M., Pascual, M., Monford, J. M. and Hugas, M., "Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts", *Journal of Applied Microbiology*, 84, 125-132 (1998).
- Gasson, M. J. 1993. Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 43-60.
- Geredeli, S. ve Anlı, E. (2005), 'Saraplardaki Laktik Asit Bakterilerinin Malolaktik Fermantasyondaki Önemleri,' *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3 (1), 1–14.
- Gerritse, K., Posno, M., Schnellekens, M. M., Boersma, W. J. A. and Claassen, E. 1990. Oral administration of TNP-Lactobacillus conjugates in mice: a model for evaluation of mucosal and systemic immune responses and memory formation elicited by transformed lactobacilli. *Res. Microbiol.* 141: 955-962.
- Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie, CP, Hall, LR & Clewell DB (1994) Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335– 7344.
- Gomez A, Ladiré M, Marcille F & Fons M (2002) Trypsin mediates growth phase-dependent transcriptional regulation of genes involved in biosynthesis of Ruminococcin A, a lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain from a human intestinal microbiota. *J Bacteriol.* 184: 18–28.
- Gorris, G. M. L. 1996. Bacteriocins potential applications in food preservation. *Kitap. Food preservation by combined processes. Final Report Flair. Concerted Action No: 7 Subgroup B.*
- Gouaux E (1997) The long and short of colicin action: The molecular basis for the biological activity of channel-forming colicins. *Structure*, 5: 313-317.
- Gökalg H.Y: Değişik Olgunlaşma Sıcaklıklarında Farklı Starter Kültürleri Uygulayarak Türk tipi Sucuk üretimi. (Doçentlik Tezi) s. 178, Atatürk Üni. Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Tek. Bölümü, Erzurum (1982).
- Guder A, Wiedemann I & Sahl H-G (2000) Post-translationally modified bacteriocins – the lantibiotics. *Biopolymers* 55: 62–73.
- Hammami R., Zouhir A., Ben Hamida J., Fliss I., *BMC Microbiology*, 7, 89, 2007.
- Harrigan, W. F., McCance, M. E., 1966, *Laboratory Methods in Microbiology.* Academic Pres London, New York, 362.
- Hechard Y, Sahl H-G (2002): Mode of action of modified and unmodified bacteriosins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84: 545-557.

- Holo H, Jeknic Z, Daeschel M, Stevanovic S & Nes I (2001) Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-component lantibiotics. *Microbiology* 147: 643– 651.
- Holzapfel, W., Geisen, R. ve Schillinger, R.G.U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343-362.
- Hugas, M., 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49, Suppl.1
- Hugas M, Pagés F, Garriga M, Monfort JM. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol* 15:639-50
- Huot E, Meghrouh J, Barrena-Gonzalez C & Petitdemange H (1996) Bacteriocin J46, a new bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46: isolation and characterization of the protein and its gene. *Anaerobe* 2: 137–145.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171-200.
- James R., Kleanthous C., Moore G.R., *Microbiology*, 142, 1569, 1996.
- Jay, J.M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 3, 525-532
- Jehanno, D., Thuault, D., Bourgeois, C.M. (1992), ‘Development of a Method for Detection of Lactic Acid Bacteria Producing Exclusively the L-(+)- Isomer
- Jung, G. 1991. Lantibiotics-ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α - β -didehydroamino acids. *Angew. Chemie.* 30: 1051-1068.
- Karaoğlu, A. Ş., Aydın, F., Kılıç, S. S., Kılıç, A. O., “Antimicrobial Activity and Characteristics of Bacteriocins Produced by Vaginal *Lactobacilli*”, *Turk J Med Sci*, 33;7-13 (2003).
- Karagül, B. 2010. Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Yetenekleri, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Khalid, F., Siddiqi, R., Mojgani, N., “Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (Lactocin LC-09) produced by a clinical isolate of *Lactobacilli*”, *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences*, 12:3, 67-71 (1999).
- Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337- 349.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-85.

- Korakli, M. (2002), 'Sucrose metabolism and exopolysaccharide production by *Lactobacillus sanfranciscensis*,' Doctoral thesis, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Freising.
- Kılıç, S., (2001), Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 542, İzmir., 109-111.
- Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K., Ganz, T. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 105-128.
- Levander, F., Svensson, M., Radström, P. (2002), 'Enhanced Exopolysaccharide Production by Metabolic Engineering of *Streptococcus thermophilus*,' *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2), 784–790.
- Lewus, C.B. and Montville, T.J., 1991, Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 13, 145- 150.
- Lewus, C. B., Sun, S. and Montville , T. J. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 5: 143-149.
- Linde A., Ross C.R., Avis E.G., Di L., Blecha F., Melgarejo T., *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 247, 2008.
- Lindgren, S.E. ve Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 149–163.
- Madera, C., Garcia, P., Janzen, T., Rodriguez, A. and Suárez, E. J. 2003. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistance to phage infection. *Int. J. Food Microbiol.*, 86; 213-222.
- Madiedo, P.R. and Reyes-Gavilan, C.G., (2005), 'Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria,' *Journal of Dairy Science*, 88, 843-856.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. (2006), 'Brock Biology Of Microorganisms,' Pearson Education, Inc. Eleventh Edition, 375–378.
- Marshall R.T., 1992, *Standart Methods for The Examination of Dairy Products*, 16th ed., APHA, Washington, 532-539.
- Mary-Harting, A., Hedges, A.J., Berkley, R.W. 1972, Methods for Studying Bacteriocins, in 'Methods In Microbiology', J.R. Norris And N.W. Ribbons (Eds.), 315- 442.
- Mattiasson, B., Deraz, S.F., Karlsson, E.N., Hedström, M. ve Andersson, M.M., 2005. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology*, 117, 343-354.

- McAuliffe O, Hill C, Ross RP (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147- producing starter culture. *J. Appl. Microbiol.* 86: 251–256.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E.M., Van der Meulen, R., Moreno, M.R.F., Font de Valdez, G., Vuyst, L. (2006), ‘Diversity of Heteropolysaccharide- Producing Lactic Acid Bacterium Strains and Their Biopolymers,’ *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (6), 4431–4435.
- Naidu, A.S., Unal, R. ve Tulpinski J., 2006. Bacteriocins: Antimicrobial Activity and Applications. In: *Food Biotechnology*, Eds. Shetty K., Paliyath, G., Levin, R.A.P.E. Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- . Nes, I. F. and Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*. 55: 50-61.
- Nes, I. F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H. H. and Nissen-Meyer, J. 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (ClassII) produced by lactic acid bacteria. In: *Peptide antibiotics; discovery, modes of action, and applications.* (Dutton, C. J., Haxell, M. A., McArthur, H. A. I. and Wax, R. G. Eds.) pp. 81-115. Marcel Dekker, Inc., New York
- Omar, N. B., Abriouel H., Lucas R., Martinez-Canamero, M., Guyot, J., P. and Galvez, A., 2006, Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel frual Burkina Faso, *International Journal of Food Microbiology*, 112, 44-50.
- Oscáriz, J. C., Pisabarro, A. G. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 4: 13-19.
- O’ Sullivan, L., Morgan, S. M., Ross, R. P. and Hill, C. 2002. Elevated enzyme release from Lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic Lactacin 481, produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. *J. Dairy Sci.* 85: 2130-2140.
- Piard, J.-C. and Desmazeaud, M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 71: 525-541.
- Piard, J-C, Muriana PM, Desmazeaud MJ & Klaenhammer TR (1992) Purification and partial characterisation of lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 279–284.
- Rabe, L.K., and Hillier, S.L. (2003), ‘Optimization of Media for Detection of Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus Tür*,’ *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (7), 3260 3264.
- Ray, B., 2001. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press Boca Raton. pp.201-210
- Reddy, G.V., Shahani, K.M., Friend, B.A. and Chandan, R.C., Natural antibiyotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus* III. Production and partial

- purification of bulgarican from *Lactobacillus bulgaricus*. J. Cultured Dairy Prot., 7-11, May 1984.
- Reinheimer, J. A., Demkow, M. R. and Condioti, M. C., Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures, The Aust. J. Dairy Technol., 5-9, May 1990.
- Reque, F. E., Pandey, A., Franco, G. S., Soccol, R. C., “Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LBP for use as probiotic in chickens”, Brazilian Journal of Microbiology 31: 303-307 (2003).
- Riley M A (1998): Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annu. Rev. Genet., 32: 255-278.
- Rince A, Dufour A, Le Pogam S, Thuault D, Bourgeois C M & Le Pennec JP (1994) Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 652–1657.
- Rodgers, S., 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures- a review. Trends in Food Science and Technology, 12, 276-284.
- Rogers LA &Whittier ED (1928) Limiting factors in lactic fermentation. J. Bacteriol. 16: 211–229.
- Ross RP, Galvin M, McAuliffe O, Morgan SM, Ryan MP, Twomey DP, Meaney WJ & Hill C (1999) Developing applications for lactococcal bacteriocins. Antonie van Leeuwenhoek 76: 337–346.
- Rushing, N.B. ve Senn, V.J. (1960), ‘Effect of Citric Acid Concentration on the Formation of Diacetyl by Certain Lactic Acid Bacteria,’ Applied and Environmental Microbiology, 8 (5): 286–290.
- Russel, A.D., Hogo, W.B. ve Ayliffe, G.A.J., 1992. Principles and Practise of Disinfection, Preservation and Sterilization. Balckwell Science, Oxford.
- Ryan MP, Rea MC, Hill C & Ross RP (1996) An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad spectrum bacteriocin, lacticin 3147. Appl. Environ. Microbiol. 62: 612–619.
- Ryan MP, Jack R, Josten W, Sahl H-G, Jung G, Ross, RP & Hill C (1999) Extensive translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticin 3147. J. Biol. Chem. 274: 37544–37550.
- Sahl H-G & Bierbaum G (1998) Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from grampositive bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 52: 41–79.
- Schlegel HG: General Microbiology. p. 587, Cambri University Press, Cambridge (1986).

- Schillinger U, Luke F-K: Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. microbiol.* 55: 1901 (1989).
- Schlegel HG: *General Microbiology*. p. 587, Cambridge University Press, Cambridge (1986).
- Schnell, N., Entian, K.-D., Schneider, U., Gotz, F., Zährner, H., Kellner, R. and Jung, G. 1988. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature*. 333: 276-278.
- Shope ME, Fryer TF, Smith DG: Identification of the Lactic Acid Bacteria. "Gibbs, M.M. and Skinner, F.A (ed): Identification Methods for Microbiologists" Part A. p. 245, Academic Press, New York (1966).
- Sharpe, M. E., 1979, Identification of Lactic Acid Bacteria. F. A. Skinner ve D. W. Lovelock (Ed) Identification Methods for Microbiologists. London Academic Press. 233-259.
- Silverstein K.A., Graham M.A., Paape T.D., VandenBosch K.A., *Plant Physiology*, 138, 600, 2005.
- Simonetta, A.C., Carrasco, M.S. ve Scarinci, H.E., 2002. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 1, 15-19.
- Skaugen M, Nissen-Meyer J, Jung G, Stevanovic S, Sletten K, Abildgaard CIM & Nes I F (1994) In vivo conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide. *J. Biol. Chem.* 269: 27183–27185.
- Stiles, M., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 331–345.
- Stingle, F., Neeser, J.R., Mollet, B. (1996), 'Identification and Characterization of the eps (Exopolysaccharide) Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6,' *Journal of Bacteriology*, 178 (6), 1680–1690.
- Şain İ: *Mikrobiyolojiye Giriş*. s. 237, Eser Matbaas, Samsun (1990).
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Grampositive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.
- Takami H, Nakasone K, Takaki Y, Maeno G, Sasaki R, Masui N, Fuji F, Hirama C, Nakamura Y, Ogasawara N, Kuhara S & Horikoshi K (2000) Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 28: 4317– 4331.
- Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M.C. (2003), 'Isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56,' *Research in Microbiology*, 154 (10), 705–712.

- Thevissen K., Kristensen H.H., Thomma B.P., Cammue B.P., IE. François, Drug Discovery Today, 12, 966, 2007.
- Trotter, M., McAuliffe, O. E., Fitzgerald, G. F., Hill, C., Ross, R. P. and Coffey, A. 2004. Variable bacteriocin production in the commercial starter *Lactococcus lactis* DPC4275 is linked to the formation of the cointegrate plasmid pMRC02. Appl. Environ. Microbiol., 70; 34-42.
- Tunail N, Köşker Ö: Süt Mikrobiyolojisi s. 138 Ankara Üni. Zir. Fak. Yay. 1116, ders kitabı, 320, Ankara Üni. Basımevi (1989).
- Turantas, F. (2007), 'Laktik Asit Bakterileri Tarafından Hidrojen Pereoksit Üretimi,' <http://www.fulyaturantas.com/Bilimsel/H2O2.doc>
- Turner DL, Brennan L, Meyer HE, Lohaus C, Siethoff C, Costa HS, Gonzalez B, Santos H & Suárez JE (1999) Solution structure of plantaricin C, a novel lantibiotic. Eur. J. Biochem. 264: 833–839.
- Tükel, Ç. ve Akçelik M. (2000), 'Lactococcus lactis subsp. lactis Suşlarında Laktoz Plazmitlerinin Tanımlanması,' Turk J. Biol 24, 405–424.
- Tükel, Ç. (2004), Starter Kültür Olarak Kullanılan Laktokok Suslarında Doğal Gen Aktarım Sistemlerinin Analizi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Türk Standartları Enstitüsü, (1991), TS8979, Laktik Asit-Sanayide Kullanılan, Ankara.
- Twomey DP, Wheelock AI, Flynn J, Meaney WJ, Hill C & Ross RP (2000) Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. J. Dairy Sci. 83: 1981–1988.
- Twomey D, Ross R P, Ryan M, Meaney B, Hill C (2002): Lantibiotics produced by actic acid bacteria: structure, function and application. Antonie van Leeuwenhoek, 82: 165-185
- Upreti, G. C. and Hinsdill, R. D. 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrob. Agents Chemother. 4: 487-494.
- Van Calsteren, M.R., Pau-Roblot, C., Begin, A., Roy, D. (2002), 'Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R,' Journal of Biochemical Society, 363, 7-17.
- Yamato, M. , Ozaki K. ve Ota, F., 2003. Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. Microbiological Research, 158, 169-172.
- Yıldırım Z, Yıldırım M (2000): Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Tebliğler Kitabı, 247-253.

- Yılmaz, M., Çelik Yuvalı, G. (2007), 'Bakteriyel Ekstraselüler Polisakkaritler (EPS),' Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 05 (2), 7-13.
- Welman, A.D., Maddox, I.S., Archer, R.H. (2003), 'Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,' Journal of Applied Microbiology, 95, 1200–1206.
- Wilks, M., Wiggins, R., Whiley, A., Hennessy, E., Warwick, S., Porter, H., Corfield, A., Millar, M. (2004), 'Identification and H₂O₂ production of Vaginal Lactobacilli from Pregnant Women at High Risk of Preterm Birth and Relation with Outcome,' Journal of Clinical Microbiology, 42 (2), 713– 717.
- Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5449-5453.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nilgün ZENGİN
Uyruğu : TC
Doğum Yeri ve Tarihi : Konya-1988
Telefon : 03323505327
Faks :
e-mail :

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Muhittin GüzelKılınç Lisesi/Meram	2006
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi	2010
Yüksek Lisans	:	
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
-----	-------	--------

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR