

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİMİKROBİYAL PEPTİT  
ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hafsa Nesibe AKSOY ÖZBEK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2022**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİMİKROBİYAL PEPTİT ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hafsa Nesibe AKSOY ÖZBEK

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Eş Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Harun ÖNLÜ

Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), çeşitli mikroorganizmalar, bitkiler, böcekler ve memeli hücreleri tarafından üretilen doğal moleküllerdir. Zararlı mikroorganizmalar ile bilhassa klasik antibiyotiklere dirençli olanlar ile mücadele etmek için antimikrobiyaller olan AMP' lere olan ilgi son zamanlarda oldukça hız kazanmıştır. AMP' ler, yeni antimikrobiyal ajanların araştırılması için ilaçların tasarımında kalıplar şeklinde kullanılabilir. Laktik asit bakterileri AMP üretici mikroorganizmalar arasında yer almaktadır ve ürettikleri AMP' ler gıdaları kontaminasyondan korumak, gıda kalitesini ve güvenliğini artırmak ve antibiyotiklere dirençli patojen mikroorganizmalarla savaşmak için umut verici bir stratejidir. Bu çalışma kapsamında farklı kaynaklardan izole edilmiş 14 adet Laktik asit bakterisinin AMP üretim potansiyelleri 10 farklı indikatör bakteri yardımıyla araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus faecalis*'in antimikrobiyal peptit üretim potansiyellerinin oldukça sınırlı olduğu belirlenmiştir.

**Temmuz 2022, 55 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Laktik asit bakterileri, antimikrobiyal peptit

## ABSTRACT

Master Thesis

### INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE PRODUCTION OF SOME LACTIC ACID BACTERIA

Hafsa Nesibe AKSOY ÖZBEK

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU  
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Harun ÖNLÜ

Antimicrobial peptides (AMPs) are natural molecules produced by a variety of microorganisms, plants, insects and mammalian cells. The interest in AMPs, which are antimicrobials, has recently gained momentum in order to combat harmful microorganisms, especially those resistant to classical antibiotics. AMPs can be used as templates in the design of drugs to search for new antimicrobial agents. Lactic acid bacteria are among the AMP-producing microorganisms, and the AMPs they produce are a promising strategy to protect food from contamination, improve food quality and safety, and fight antibiotic-resistant pathogenic microorganisms. In this study, AMP production potentials of 14 Lactic acid bacteria isolated from different sources were investigated with the help of 10 different indicator bacteria. As a result of the studies, it was determined that the antimicrobial peptide production potential of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* is quite limited.

**July 2022, 55 Pages**

**Key Words:** Lactic acid bacteria, antimicrobial peptide

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca bilgisini her zaman benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU'na

Tez çalışması kapsamında ilk olarak laboratuvarı sağlayan, akademik olarak nasıl ilerlenmesi gerektiğini gösteren - öğreten ve tüm bilgisi, ilgisi ve sonsuz desteğiyle her zaman yanımda olan çok değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Harun ÖNLÜ'ye

Tüm eğitim hayatımın en büyük destekçileri annem Hatice AKSOY'a, benimle Muş'a gelip beni orada bile yalnız bırakmayan babam Murat AKSOY'a ve bu süreçte olduğu gibi her zaman yanımda olan kardeşlerime,

Her koşulda tüm desteğiyle yanımda olan yol arkadaşım, sevgili eşime

Hafsa Nesibe AKSOY ÖZBEK  
Ankara, Temmuz 2022

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

|                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ETİK.....                                                                                                                       | i   |
| ÖZET.....                                                                                                                       | ii  |
| ABSTRACT .....                                                                                                                  | iii |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                                                  | iv  |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                                            | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                                           | ix  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                                         | x   |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                                  | 1   |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ .....                                                                                                        | 3   |
| 2.1 Probiyotikler .....                                                                                                         | 3   |
| 2.1.1 Probiyotiklerin tanımı ve tarihi .....                                                                                    | 3   |
| 2.1.2 Mikroorganizmaların probiyotik özellikleri.....                                                                           | 4   |
| 2.1.3 Probiyotiklerin yaraları.....                                                                                             | 5   |
| 2.1.4 Probiyotik mikroorganizmalar .....                                                                                        | 6   |
| 2.2 Laktik Asit Bakterileri.....                                                                                                | 6   |
| 2.2.1 Laktik asit bakterilerine genel bakış .....                                                                               | 6   |
| 2.2.2 Laktik asit bakterilerinin tanımı ve üyeliği .....                                                                        | 7   |
| 2.2.3 Laktik asit bakterilerinin ekolojileri .....                                                                              | 9   |
| 2.2.4 Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal özellikleri .....                                                               | 10  |
| 2.3 Organik Asitler.....                                                                                                        | 14  |
| 2.4 Düşük Moleküler Ağırlıklı Antimikrobiyal Maddeler .....                                                                     | 17  |
| 2.5 Bakteriyosinler .....                                                                                                       | 18  |
| 2.5.1 Bakteriyosinlerin sınıflandırılmaları ve etki şekilleri.....                                                              | 20  |
| 2.5.2 Laktik asit bakterilerinde bakteriyosin araştırmaları üzerine geçmiş,<br>güncel ve gelecekteki bilgileri ve yönleri ..... | 22  |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                                                                      | 25  |
| 3.1 Materyal .....                                                                                                              | 25  |
| 3.1.1 Bakteriyel suşlar ve geliştirme koşulları .....                                                                           | 25  |
| 3.2 Yöntem .....                                                                                                                | 29  |
| 3.2.1 Suşların geliştirilmesi.....                                                                                              | 29  |

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2 Antibakteriyel bileşenlerin amonyum sülfat ile presipitasyonu .....         | 29 |
| 3.2.3 Aktivite gösteren AMP'lerin SDS-PAGE yöntemi ile taranması .....            | 29 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....                                                      | 33 |
| 4.1 Kuyu Difüzyon Tekniği ile Antimikrobiyal Aktivitenin Taranması .....          | 33 |
| 4.2 Aktivite Gösteren AMP'lerin SDS-PAGE Yöntemi ile Taranması .....              | 40 |
| 4.3 Jellerin Besiyerinde Geliştirilmesi ve Antimikrobiyal Etkinin Taranması ..... | 41 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....                                                        | 43 |
| KAYNAKLAR .....                                                                   | 48 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                    | 55 |



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                               |                                        |
|-------------------------------|----------------------------------------|
| G                             | Gram                                   |
| L                             | Litre                                  |
| $\mu$ L                       | Mikrolitre                             |
| mL                            | Mililitre                              |
| m                             | Metre                                  |
| cm                            | Santimetre                             |
| M                             | Molar                                  |
| dk                            | Dakika                                 |
| h                             | Saat                                   |
| $^{\circ}$ C                  | Santigrat (Celcius) derece             |
| %                             | Yüzde                                  |
| V                             | Volt                                   |
| pH                            | Hidrojen konsantrasyonunun logaritması |
| kb                            | Kilobaz                                |
| mg                            | Miligram                               |
| mM                            | Milimolar                              |
| nm                            | Nanometre                              |
| UV                            | Ultra viyole                           |
| dH <sub>2</sub> O             | Distile su                             |
| HCl                           | Hidroklorik asit                       |
| HNO <sub>3</sub>              | Nitrik asit                            |
| KCl                           | Potasyum klorür                        |
| NaCl                          | Sodyum klorür                          |
| NaOH                          | Sodyum hidroksit                       |
| EtOH                          | Etanol                                 |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen peroksit                      |

## **Kısaltmalar**

|      |                                                                |
|------|----------------------------------------------------------------|
| bç   | Baz çifti                                                      |
| DNA  | Deoksiribonükleik Asit                                         |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetikasit                                   |
| rpm  | Dakikadaki dönüş sayısı                                        |
| SF   | Serum fizyolojik                                               |
| sp.  | Species                                                        |
| LAB  | Laktik asit bakterileri                                        |
| APM  | Antimikrobiyal Peptit                                          |
| TGE  | Tripton Glikoz Ektrakt                                         |
| TSA  | Triptik Soy Agar                                               |
| MRS  | de Man, Rogosa and Sharpe besiyeri                             |
| PBS  | Fosfat tamponlu tuz solüsyonu                                  |
| PZR  | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                    |
| rDNA | Ribozomal DNA                                                  |
| RNA  | Ribonükleik Asit                                               |
| WHO  | World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)                |
| FAO  | Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)       |
| GRAS | Generally Recognized as Safe (Genellikle Güvenli Kabul Edilen) |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.1 <i>Listeria monocytopenes</i> 'te zon oluşumu .....                                                               | 34 |
| Şekil 4.2 <i>Clavibacter michigonogensis</i> 'te zon oluşumu .....                                                          | 35 |
| Şekil 4.3 <i>Xanthomonas campestris</i> (CMM)'te zon oluşumu .....                                                          | 35 |
| Şekil 4.4 <i>Escherichia coli</i> 25922'de zon oluşumu .....                                                                | 36 |
| Şekil 4.5 <i>Pseudomonas syringae</i> ps. tomat., 'te zon oluşumu .....                                                     | 36 |
| Şekil 4.6 <i>Lactococcus lactis</i> 'te zon oluşumu .....                                                                   | 37 |
| Şekil 4.7 <i>Enterococcus faecalis</i> 'te zon oluşumu .....                                                                | 37 |
| Şekil 4.8 <i>Salmonella thypimirum</i> 'da zon oluşumu .....                                                                | 38 |
| Şekil 4.9 SDS-PAGE sonuçları.....                                                                                           | 41 |
| Şekil 4.10 İndikatör olarak a) <i>Lactococcus lactis</i> b) <i>Enterococcus faecalis</i> içeren<br>besiyerinde jeller ..... | 42 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1 Probiyotik bakterilerinin bazı etki mekanizmaları.....                                                  | 5  |
| Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler ve endüstriyel potansiyelleri ..... | 12 |
| Çizelge 2.3 Düşük moleküler ağırlıklı antimikrobiyal maddeler, üreticileri ve antimikrobiyal spektrumları .....     | 13 |
| Çizelge 2.4 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen Bakteriyosinlerin sınıflandırılmaları .....                 | 21 |
| Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteriler .....                                                                   | 26 |
| Çizelge 3.2 İndikatör bakteriler ve besi yerleri .....                                                              | 27 |
| Çizelge 3.3 TGE Besiyeri .....                                                                                      | 27 |
| Çizelge 3.4 MRS .....                                                                                               | 28 |
| Çizelge 3.5 TSB Besiyeri .....                                                                                      | 28 |
| Çizelge 3.6 SDS PAGE’de kullanılan tampon ve çözeltilerin bileşenleri .....                                         | 31 |
| Çizelge 4.1 Kuyularda oluşan zonlar ve çapları.....                                                                 | 33 |

## 1. GİRİŞ

Probiyotikler, insan ve hayvanlar tarafından tüketilen, bağışıklık sistemini olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalardır (Ghazzewi ve Tester, 2014). Probiyotik bakteriler farklı maya ve bakteriyel suşları içermektedir. Günümüzde birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır (Gadaga vd., 2001). Probiyotik olarak en çok tercih edilen mikroorganizmalar Laktik Asit Bakterileridir (LAB) (Goldin ve Gorbach, 1992).

Antimikrobiyal peptidler, mikrobiyal dünyada bakteriyosinler olarak tanımlanırlar. Antimikrobiyal peptitler bakterilerin savunma mekanizmalarının en önemli kısmını oluşturmaktadır.

Laktik asit bakterileri, antimikrobiyal peptit (AMP) üretici mikroorganizmalar arasında yer almaktadır ve ürettikleri AMP' ler gıdaları kontaminasyondan korumak, gıda kalitesini ve güvenliğini artırmak ve antibiyotiklere karşı dirençli patojen mikroorganizmalarla savaşmak için umut verici bir stratejidir (Suskovic, 2010). LAB'den izole edilen birçok bakteriyosin geçmişte iyi şekilde çalışılmış ve günümüzde ise güvenli ve aynı zamanda doğal gıda koruyucuları olarak kullanılmaktadır. Bakteriyosinler denildiğinde *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nişin akla gelmektedir (Delves-Broughton vd., 1996). Birkaç tür dışında LAB, “Genel Olarak Güvenli kabul edilen” (GRAS) olarak kabul edilmekte ve fermente yiyecek ve içeceklerin üretiminde kullanılmaktadır. Bazı Laktik asit bakterileri, bakteriyostatik veya bakterisidal ajanlar olarak hareket edebilen antimikrobiyal bileşikler üretir (Prescott ve Dunn, 1987).

Son yıllarda antimikrobiyal peptitler, özellikle terapötik etkileri nedeniyle bilim insanları, ilaç şirketleri ve sağlık uzmanları tarafından ilgi odağı haline gelmiştir. AMP, Gram-Pozitif ve Gram-Negatif gibi bulaşıcı bakteriler, mantarlara ve virüslere karşı oldukça yüksek bir spektrumda antimikrobiyal ve immünomodülatör aktivitelere sahip olan düşük moleküler ağırlıklı proteinler olarak tanımlanmıştır (Breukink vd., 2006).

Mikroorganizmaların antimikrobiyal peptitlerin çoğuna karşı direnç geliştirememesi, onları yeni antimikrobiyal çağını büyük ölçüde etkileyebilecek verimli yeni bir ürün haline getirmiştir. Buna ek olarak, bu peptitler ayrıca artan etkinlik, yüksek özgüllük, azaltılmış ilaç etkileşimi, düşük toksisite, biyolojik çeşitlilik ve doğrudan saldırı özellikleri de göstermektedirler (Gallo ve Zhang, 2016). Farmasötik endüstrisi bu sebeplerle bu peptitleri terapötik ilaçlar olarak geliştirmek amacıyla makul olan klinik deneyler gerçekleştirmektedir. Şimdiye kadar birçok peptit ilacı hali hazırda pazara ulaşmıştır ve yüzlerce yeni terapötik peptit, klinik öncesi ve klinik geliştirme aşamasındadır (Bechinger ve Gorr, 2017). Daha fazla peptit ilacına sahip olmak için daha fazla bakteriyosinin araştırılmasına ve aynı zamanda karakterize edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışmamızın amacı yeni bir antimikrobiyal ajanların araştırılması çabasıyla, bu çalışmada farklı kaynaklardan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal peptit üretim potansiyellerinin araştırılmasıdır.

## **2. KAYNAK ÖZETLERİ**

### **2.1 Probiyotikler**

#### **2.1.1 Probiyotiklerin tanımı ve tarihi**

Probiyotik terimi, Latince “pro” ve “bios” kelimelerinden gelmektedir ve Türkçe olarak canlı için anlamını taşımaktadır. Yapılan güncel araştırmalar ve kullanım alanları bakımından probiyotikler, kalitatif – kantitatif açıdan bağırsak mikroflorasını etkileyen veya bağışıklık sisteminin mevcut durumunu değiştirerek yararlı etkilere sebep olan, insan ve hayvanlar tarafından tüketilebilen canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Ghazzewi ve Tester, 2014).

Probiyotiklerin tarihi insanoğlunun tarihine dayanacak kadar eskidir. Mikroorganizmaların keşfinden çok daha önceki yıllarda şarap, ekmek, peynir, bira ve kefir gibi gıda maddesi olarak tüketilen fermente ürünler aynı zamanda sıklıkla tedavi amaçlı olarak da kullanılmıştır (Wassenaar ve Klein, 2008). Örneğin, Kadim Mısır’da ateşi düşürdüğü için şarap sıklıkla kullanılırdı. Fermente gıdaların yüksek bir olasılıkla kendiliğinden oluştuğu düşünülmektedir (Özen, 2011).

Probiyotik terimi her ne kadar ilk olarak 1953 yılında Kollath tarafından literatürde kullanmış olsa da (Kollath, 1953), bilimsel olarak ilk defa 1965 yılında Lilly ve Stillwell tanımlamıştır (Lilly ve Stillwell, 1965). Probiyotik, bir mikroorganizma tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmaların gelişmesini uyaran faktörler olarak tanımlanmıştır. 1974 yılında Parker probiyotikleri ‘barsakta mikrobiyal dengenin oluşmasına yardımcı olan mikroorganizmalar ve mikroorganizmaların ürettiği bileşenler’ olarak tanımlamıştır. 1989 yılında Fuller probiyotik için ‘İntensinal mikrobiyal dengeyi dengeleyerek kullandığı konakçının sağlığını olumlu olarak etkileyen canlı mikrobiyal yem kalıntısıdır’ tanımını yapmıştır (Fuller, 1989).

Nobel ödüllü olan Rus araştırmacı Elie Metchnikoff, probiyotik özellikte olan mikroorganizmaların, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini ilk olarak 1908 yılında ortaya koymuştur. Metchnikoff, Bulgar çiftçilerin fermente süt ürünlerinin tüketimine bağlı olarak daha sağlıklı, kaliteli ve uzun bir ömre sahip olduklarını belirtmiştir. Bu şekilde söylemesinin nedeni bu ürünlerdeki çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus*) bağırsaktaki mikrofloraya olumlu etki etmesi ve toksik mikrobiyel aktivite azaltmada etkili olduğunu belirlemiştir (Metchnikoff, 1910). Sağlıklı yaşam ve fermente besinler arasındaki bu birliktelik günümüzde de devam etmektedir.

Probiyotikler için yaygın olarak atıfta bulunulan tanım, ‘yeterli miktarlarda uygulandıklarında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar’dır (FAO / WHO, 2001).

### **2.1.2 Mikroorganizmaların probiyotik özellikleri**

Probiyotik olarak kullanılacak olan mikroorganizmaların verildiği canlılarda bulunan diğer mikroorganizmalara karşı etkili olmaları ve kullanacağı konakçıya yararları etki göstermeleri en büyük etkidir.

Bir bakterinin probiyotik olarak seçilmesi için sahip olması gereken özellikler şu şekilde maddelenebilir (Ewaschuk ve Dieleman, 2006);

- Varolan mikrobiyal yapıya zarar vermeden patojen bakterileri etkileyebilmeli,
- Uygun koşullarda canlı kalabilmeli, farklı bir ortamda ürememeli, kullanıldığı konakçı kaynaklı olmalı
- Kullandığı konakçı için patojen olmamalı,
- Safra tuzlarına, pH’a ve aside dirençli olmalı,
- Mukoza yüzeyine tutunabilmeli,
- Sindirim sisteminde geçici veya bazen de olarak kolonize olabilmeli,
- Antimikrobiyel maddeler üretebilmeli,
- Tüketilen besinlere eklenebilmeli ve klinik kullanım için uygun olmalı,

- Araştırmalar sonucunda klinik olarak etkinliğini ortaya koymuş olmalı,
  - Teknik açıdan iyi özellikleri olmalı: oksijene karşı dirençli olmalı, konakçı içinde canlı kalabilmeli, stabil bir suş olmalı, fajlara karşı dirençli olmalı, liyofilize preparat haline gelebilmeli,
  - Mikrobiyota içinde kolay tanımlanabilir olması,
  - Kullanacağı konakçıda immünolojik duyarlılık, sistemik toksisite ve dirençli mikroorganizmaların gelişmesine neden olmamalı,
  - Kullanacağı konakçı dokularında uzun süre etki etmesi için konakçıya yerleşebilmesi
- Probiyotik bakterilerinin sahip oldukları DNA yapıları, enzimler, hücre duvarı bileşenleri ve enzimleri açısından kullanacağı konakçı hücrelerinde değişik etki mekanizmaları gözlemlenmektedir.

Çizelge 2.1 Probiyotik bakterilerinin bazı etki mekanizmaları (Ewaschuk ve Dieleman, 2006)

|                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Patojen ve zararlı bakterilerin azaltmak</b>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Antimikrobiyal bileşik üretmeleri</li> <li>- Besin elementleri için rekabet etmeleri</li> <li>- Kolonizasyon bölgeleri için rekabet etmeleri</li> </ul>                                             |
| <b>Mikrobiyal metabolizmayı (enzimatik aktiviteyi) değiştirmek</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sindirimi sağlayan enzimlerin aktivasyonunu sağlaması</li> <li>- Amonyak, amin veya toksik enzimlerin üretiminin azalması</li> <li>- Bağırsak duvarının fonksiyonlarının iyileştirilmesi</li> </ul> |
| <b>Bağışıklık sistemini iyileştirmek</b>                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Antikor düzeyinin artması</li> <li>- Makrofaj aktivitesinin artması</li> </ul>                                                                                                                      |

### 2.1.3 Probiyotiklerin yararları

Probiyotikler uygulamalarının sonucunda hayvanlarda canlı ağırlık artışının artığı, yemden yararlanmanın iyileştiği, üretim yükseldiği, gastrointestinal hastalıkların azaldığı, yara onarımında olumlu etkisi gözlenmesine rağmen etki şekilleri konusunda halen belirsizlikler bulunmaktadır.

Probiyotikler, patojen bakterilerin sayısını azaltmalarındaki etkisi, besin elementleri için rekabet etmesi, adezyon mekanizması, bağışıklık sistemi üzerine etkisi, antibiyotik ilişkili diyareler üzerine etkileri, antikarsinojenik etki, antikolestrol etki, besin sentezi ve biyo yararlanım gibi farklı etki mekanizmalarına da sahiptir (Ewaschuk ve Dieleman, 2006).

#### **2.1.4 Probiyotik mikroorganizmalar**

Probiyotik bakteriler çok farklı maya ve bakteriyel suşları içermektedir. Güncel olarak birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır (Gadaga vd, 2001). Probiyotik olarak kullanılan organizmalar içerisindeki en önemli grup Laktik asit bakterileridir (Schaafsma 1996). Laktik asit bakterilerinin çok uzun yıllardan beri fermente gıdaların üretiminde kullanılmaktadır (Leroy ve de Vuyst, 2004). Laktik asit bakterilerinin bu gıdalarla birlikte tüketilmesi ayrıca LAB'nin GRAS (generally recognized as safe) kabul edilmesini sağlamıştır (Wood ve Holzapfel, 1995) .

Probiyotik olarak en çok tercih edilen mikroorganizmalar Laktik asit bakterileridir (Goldin ve Gorbach, 1992). Laktik asit bakterileri 6 farklı grup olarak (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. *Leuconostoc* spp. *Pediococcus* spp. *Enterococcus* spp. ve *Bifidobacterium* spp.) sınıflandırılmaktadır. Bu mikroorganizmalara ek olarak *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *E. coli* nissle 1917 ve *Bacillus* türleri de yaygın olarak probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar arasında sayılmaktadır.

### **2.2 Laktik Asit Bakterileri**

#### **2.2.1 Laktik asit bakterilerine genel bakış**

Laktik asit bakterileri, laktik asit üretebilmek için dış ortamdaki karbonhidratların metabolizmasını kullanan bir bakteri sınıfıdır. Doğada yaygın olarak çok çeşitli habitatlarda bulunmaktadır (Abriouel vd, 2012). LAB, biyo çeşitlilik bakımından oldukça zengindir ve insan vücudu ve yaşamı ile de ilgilidir. Ayrıca, önemli sosyal ve



ekonomik değ rlere de sahiptir. İnsanlar için oldukça değ rli bir biyolojik kaynaktır (Chen, 2019).

Laktik asit bakterilerinin insanlar tarafından kullanımı çok uzun bir geçmişe dayanmaktadır. Arkeolojik kayıtlara göre, laktik asitler 10.000 yıl kadar eski tarihlidirler. Bu uzun tarihsel süreçte, bu bakterilerinin kullanımı, insan toplumunun gelişimine ve uygulamasına çok yüksek oranda katkıda bulunmuştur. On dokuzuncu yüzyılın sonlarında ve yirminci yüzyılın ba larında insan doğa bilimi ve mühendislik biliminin büyük gelişimi, biyoloji, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji ve diğer ilgili disiplinlerin hızlı gelişimi ile sayesinde, laktik asit bakterisinin bilim ve teknolojisi de olağan üstü bir gelişme göstermiştir ( zen, 2011). LAB, kayda değ r teorik araştırmada önemi olan mikrobiyoloji, moleküler biyoloji, biyokimya, ve genetik gibi temel biyolojik bilimlerin esas araştırma organizmaları olarak kabul edilmektedir (Osmana ao lu ve Kıran, 2011). Diğer bir yönüyle pratik uygulamada, laktik asit bakterileri endüstriyel biyo-üretim, yüksek verimli hayvancılık, yüksek verimli tarım, gıda üretimi ve işleme, sağlık ve tıbbi ve insanlarla ilgili başka birçok önemli bir uygulama alanı mevcuttur (Chen, 2019).

Son yıllarda mikrobiyom, biyoinformatik, proteomik ve büyük veri analiz teknolojisi gibi modern teknolojilerin ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanması, laktik asit bakterilerinin bu alanlardaki önemini daha fazla oranda belirlemiş ve birbirinden ayrı araştırma alanlarından araştırmacılar bu konu hakkında araştırmalar ger ekle tirmi lerdir. Modern bilim ve uygulama teknolojisinin önemli bir araştırma ve uygulama geliştirme etkin noktası haline gelmiştir (Chen, 2019).

### **2.2.2 Laktik asit bakterilerinin tanımı ve  yeli i**

Laktik asit bakterileri, prokaryotik mikroorganizmaların önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Bununla birlikte, laktik asit bakterilerinin net bir tanımı olmadığı gibi, mikrobiyoloji ve bakteriyolojinin taksonomik bir terimi de değildir. Gelişim dönemleri farklı olan laktik asit bakterilerinin, birçok araştırmacı tarafından birbirinden ayrı anlayışları ve tanımları mevcuttur. Yirminci yüzyılın ba larında, laktik asit bakterileri

bilim ve teknoloji sistemi oluşmaya başladığında, laktik asit bakterileri esas olarak sütü asitleştirebilen bakterileri (süt ekşiyen bakteriler) olarak tanımlanmıştır (Beijerinck, 1901).

Yirminci yüzyıldan sonra farklı araştırmacılar, laktobasilin hücre morfolojik özellikleri ve fizyolojik - metabolik reaksiyonları açısından farklı tanımlar ve açıklamalar önermişlerdir. Mesela, 1986 yılında Kandler, *Lactobacillus*'u "ana karbonhidrat fermantasyon ürünleri laktik asit olan bir tür gram-pozitif, spor üretmeyen, mikro-aerobik bakteri" olarak tanımlamıştır (Kandler ve Weiss, 1986). 1995 yılında, Wood ve Holzapfel ise *Lactobacillus*'u "karbonhidratları metabolize eden ve laktik asidi tek veya ana metabolit olarak alan bir tür bakteri grubu" olarak tanımlamıştır (Wood ve Holzapfel, 1995). 2002 yılında Carr, laktik asit bakterilerini Gram-Pozitif, spor oluşturmeyen, enzimlerle negatif temasta bulunan ve laktik asit metabolitleri olan heterojen bir bakteri sınıfı olarak değerlendirmiştir (Carr vd, 2002). 2004 yılında Axelsson, laktik asit bakterilerinin Gram-Pozitif, spor oluşturmeyen ve ana ürün olarak laktik asit ile karbonhidratları fermente eden bir basil ve kok türü olduğunu düşünmüşlerdir (Axelsson, 2004). Bu tanımlardan, laktik asit bakterilerinin net bir tanımı ve sınırı olmadığı, ancak benzer fizyolojik özelliklere sahip bir bakteri sınıfı için genel bir terim olduğu görülebilmektedir (Axelsson, 2004).

Günümüze kadar yapılmış olan birçok tanımda laktik asit bakterilerinin spor oluşturmadağı belirtilmiştir. Buna ek olarak, spor oluşturan bazı bakterilerin de (*Bacillus* ve *Sporolaktobacillus* vb) bakterileri homolaktik fermentasyon yoluyla laktik asit oluşturduğu belirlenmiştir (Drinan vd, 1976). Bu nedenle, metabolizma yoluyla laktik asit üretiminin, laktik asit bakterilerinin en önemli temel metabolik özelliğı olduğuna inanılmaktadır (Pessione, 2016).

Laktik asit bakterileri, Gram boyamada pozitif olan, genellikle spor oluşturmeyen, genellikle solunum yoluyla enerji üretmeyen ve esas olarak karbonhidratları metabolize ederek laktik asit üreten, farklı taksonomik statü ve morfolojik fizyolojiye sahip çeşitli heterojen bakteriler için genel bir terimdir (Gaiser vd, 2016).

Laktik asit bakterilerinin araştırılırken özellikle *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* bakterileri kullanılmıştır. Geçen zaman ve ilerleyen teknoloji ile birlikte daha fazla laktik asit bakterisinin keşfi ve bakteri sınıflandırmasının evrimi ve düzeltilmesi ile mevcut laktik asit bakterileri yaklaşık 41 cins içermiştir (Axelsson, 2004). Bu bakterilerin içerisinde bilimsel çalışmada ve uygulamada genellikle 12 cins (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*) bakteriye odaklanılmıştır. *Bifidobacterium*'un genel laktik asit bakterilerinden ayrı bir bifidus metabolik yola sahip olduğu belirlenmiştir (Bergey's Manual Trust, 2015).

Mikrobiyal taksonomide Actinomycete sınıfına ait olmasına rağmen *Bifidobacterium* heterolaktik fermantasyon yoluyla laktik asit ve asetik asit üretir. Bu nedenle, ilgili araştırmacılar geleneksel olarak *Bifidobacterium*'un laktik asit bakterilerine ait olduğuna inanmaktadır. Bununla birlikte, *Listeria* bakterileri gibi bazı insan ve hayvan patojenik bakterileri de laktik asit bakterilerinin özelliklerinin tanımına uygundur (Chen, 2019).

### 2.2.3 Laktik asit bakterilerinin ekolojileri

Laktik asit bakterileri zengin bir beslenme kaynağına sahip habitatlarda gelişir. LAB, ayrışan bitki materyalleri ve meyvelerde, süt ürünlerinde, fermente et ve balıkta, sirkede, turşuda, ekşi hamurda, salamura sebzelerde, bitkilerde, suda ve meyve sularında oluşurlar. Laktik asit bakterileri ayrıca üzümelerde, şıra ve şarapta ve ayrıca birada bulunabilir. İnsan bağırsağının sağlıklı mikrobiyotasının bir parçasıdırlar. Bazı türler gıda fermantasyonu için starter kültür olarak uygulanır (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

Laktik asit bakterileri asidifikasyon nedeniyle gıdaların bozulmasını ve patojen mikroorganizmaların büyümesini engellerler (Hammes vd, 1991). Bazı LAB, insanların ve diğer hayvanların bağırsak ekosistemine potansiyel olarak faydalı bakteri hücreleri olan probiyotikler olarak kullanılır (Tannock vd, 2005).

#### **2.2.4 Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal özellikleri**

Penisilin 1928'de Alexander Fleming tarafından keşfedildiğinden beri insanlar bulaşıcı hastalıklarını tedavi etmek için geniş çapta çeşitli antibiyotikler kullanmıştır (Jenssen vd, 2006; Bahar ve Ren, 2013). Antibiyotikler genellikle patojen bakterilerin tedavisinde etkilidir (Kosciuczuk vd, 2012; Moravej vd, 2018). Bununla birlikte, antibiyotikler antibakteriyel yeteneklerini yavaş yavaş yitirmiş ve büyük miktarlarda antibiyotik kullanımı ve hatta çeşitli antibiyotiklerin kötüye kullanılmasıyla ilaca dirençli bakteriler ortaya çıkmıştır (Rathinakumar ve Wimley, 2010; Lau vd, 2018). Böylece, yeni antibiyotiklerin veya diğer yeni antibakteriyel kaynakların keşfine olan ihtiyaç acil bir hale gelmiştir ve dünyanın her yerindeki bilim insanlarının giderek daha fazla dikkatini çekmektedir.

Antimikrobiyal peptitler veya konakçı savunma peptitleri ilk olarak 1980'lerde keşfedilmiştir. AMP'ler, bakteri, mantar ve virüslere karşı geniş spektrumlu ve güçlü antimikrobiyal etkinliklere sahiptir (Zanetti, 2004; Bahar ve Ren, 2013). AMP'ler, insan, hayvan ve bitkiler dahil çeşitli türlerde doğuştan gelen bağışıklık sisteminin vazgeçilmez bileşenleridir ve yabancı saldırılara karşı birinci sıra savunma elemanı olarak kullanılırlar (Kosciuczuk vd, 2012; Starr vd, 2018) ve antimikrobiyal mekanizmaları geleneksel antibiyotiklerden farklıdır. Bu sebeple, farklı mikropları ve hatta sahip oldukları antibiyotiklere dirençli olanları tedavi etmek için uygulanabilirler. AMP'ler çeşitli organizmalarda (bakteriler, mantarlar, hayvanlar ve bitkiler) bulunur ve binlerce AMP keşfedilmiş ve gösterilmiştir (Jenssen vd, 2006; Kosciuczuk vd, 2012).

AMP'ler üzerine araştırmalar sürekli olarak geliştirilmekte ve AMP'lerle ilgili önemli miktarda veri AMP veritabanlarında depolanmaktadır. Bununla birlikte, AMP'lerin mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır ve dikkate değer antimikrobiyal etkilere sahip düşük maliyetli ve oldukça güvenli AMP'ler elde etmek için farklı fizyokimyasal özellikler arasındaki ilişkiyi belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Lazzaro vd, 2020).

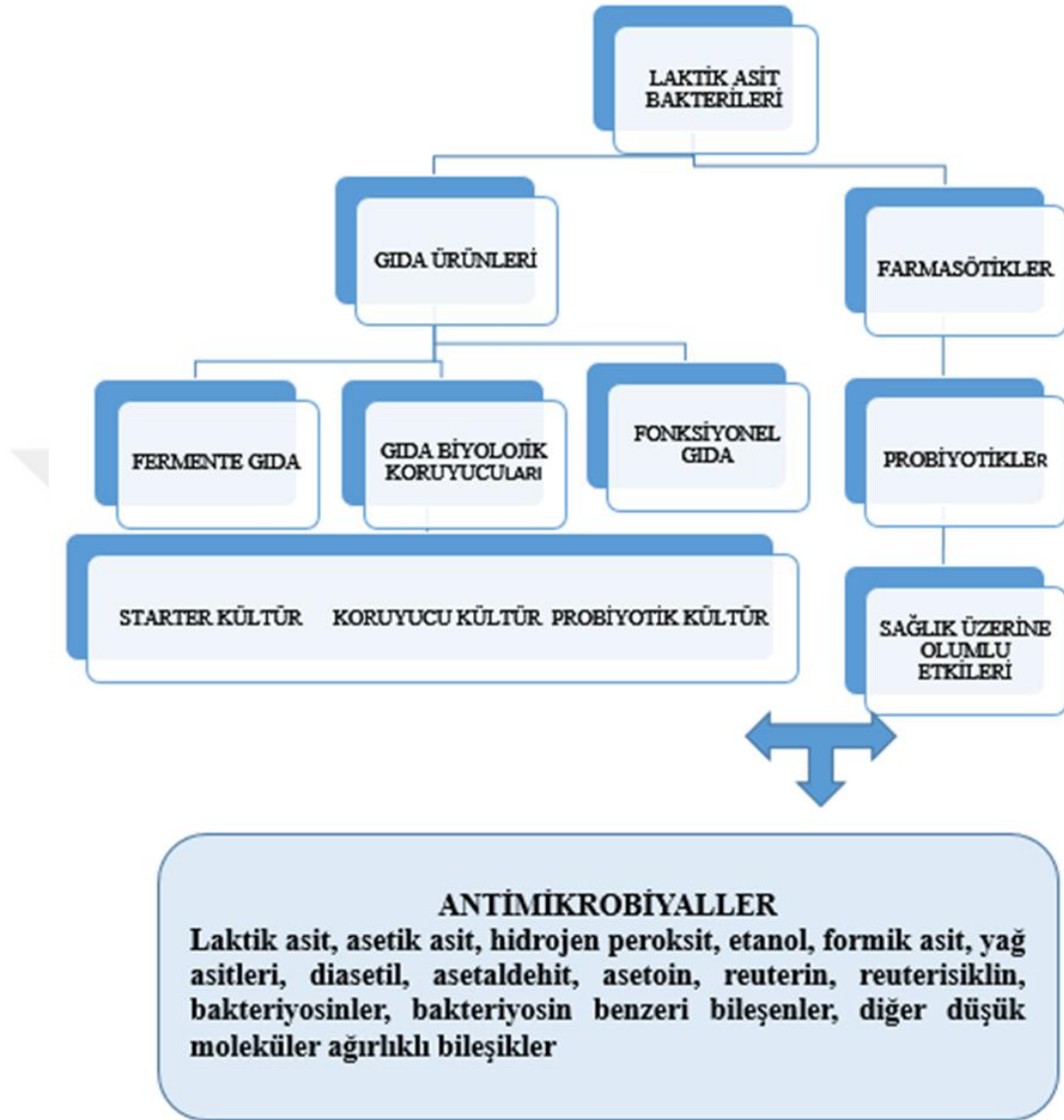
Laktik asit bakterileri, antimikrobiyal peptit üretici mikroorganizmalar arasında yer almaktadır ve ürettikleri AMP' ler gıdaları kontaminasyondan korumak, gıda kalitesini ve güvenliğini artırmak ve antibiyotiklere karşı dirençli patojen mikroorganizmalarla savaşmak için umut verici bir stratejidir. LAB'den izole edilen bazı bakteriyosinler, araştırmacılar tarafından geçmişte iyi çalışılmıştır. Günümüzde ise güvenli ve doğal gıda koruyucuları olarak kullanımı mevcuttur. Bakteriyosinler denildiğinde *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nişin akla gelmektedir (Delves-Broughton vd, 1996). Yalnız birkaç tür haricinde LAB, GRAS olarak kabul edilmektedir ve fermente yiyecek ve içeceklerin üretiminde oldukça sık şekilde kullanılmaktadır. Bazı Laktik asit bakterileri, bakteriyostatik veya bakterisidal ajanlar olarak hareket edebilen antimikrobiyal bileşikler üretir (Prescott ve Dunn, 1987).

Antimikrobiyal aktiviteler esasen bakteriyosinler, organik asitler (laktik asit ve asetik asit), Diasetil, reuterin ve hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal metabolitlerin üretimine bağlıdır (Stiles ve Holzapfel, 1997).

Laktik asit bakterileri fermente gıdaların temel florasını oluşturan mikroorganizmalar olarak bilinirler. Bu bakteriler fermente gıdaların yapısal ve aromatik özelliklerinin oluşumunda rol alsa da bu familyaya ait bazı üyeler çeşitli antimikrobiyal metabolitler üreterek gıda ürünlerinin korunmasına da katkıda bulunur (De Vuyst ve Leroy, 2007).

LAB'in bazı üyelerinde antimikrobiyal özelliğin kullanılmasına yardımcı olan en etkili metabolitin bakteriyosinler olduğu belirlenmiştir (Klaenhammer, 1993). Üretici LAB'in ve bakteriyosinlerin fermente gıdaların üretiminde kullanılması sonucunda gıda güvenliğinin arttığı ve aynı zamanda raf ömrünün uzatıldığı belirlenmiştir (O'Shea vd, 2013).

Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler ve endüstriyel potansiyelleri (Suskovic, 2010)



Çizelge 2.3 Düşük moleküler ağırlıklı antimikrobiyal maddeler, üreticileri ve antimikrobiyal spektrumları

| METABOLİT                                                 | ÜRETİCİ<br>MİKROORGANİZMA                                                                                                                      | ANTİMİKROBİYAL<br>SPEKTRUM                    |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Laktik Asit</b>                                        | Tüm LAB suşları                                                                                                                                | - Mayalar<br>- Gram (+) ve Gram (-)           |
| <b>Asetik Asit</b>                                        | Heterofermantatif LAB suşları                                                                                                                  | - Mayalar<br>- Gram (+) ve Gram (-)           |
| <b>Diasetil<br/>Asetaldehit<br/>Asetoin</b>               | <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> ,<br><i>Lactobacillus</i> , <i>Leconostoc</i> ,                                                        | - Mayalar<br>- Gram (+) ve Gram (-)           |
| <b>Hidrojen Peroksit</b>                                  | Tüm LAB suşları                                                                                                                                | - Mayalar<br>- Gram (+) ve Gram (-)           |
| <b>CO<sub>2</sub></b>                                     | Heterofermantatif LAB suşları                                                                                                                  | Birçok taksonomik gruba ait mikroorganizmalar |
| <b>Reuterin</b>                                           | <i>Lactobacillus reuteri</i>                                                                                                                   | - Mantar, protozoa<br>- Gram (+) ve Gram (-)  |
| <b>Siklik dipeptitler</b>                                 | <i>Lactobacillus reuteri</i>                                                                                                                   | Gram pozitif bakteriler                       |
| <b>3-fenillaktik asit</b>                                 | <i>Lactobacillus plantarum</i><br><i>Lactobacillus pentosus</i>                                                                                | Mantarlar                                     |
| <b>3-hidroksifenillaktik asit</b>                         | <i>Lactobacillus plantarum</i><br><i>Lactobacillus alimentarius</i><br><i>Lactobacillus rhamnosus</i><br><i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> | Mantarlar                                     |
| <b>3-hidroksi yağ asitleri</b>                            | <i>Lactobacillus plantarum</i>                                                                                                                 | Mantarlar                                     |
| <b>Benzoik Asit<br/>Metilhidantoin<br/>Mevalonolakton</b> | <i>Lactobacillus plantarum</i>                                                                                                                 | - Mantarlar<br>- Gram negatif bakteriler      |

### 2.3 Organik Asitler

Laktik asit bakterileri, laktik asidi homofermantasyon yoluyla sentezlerken, heterofermantasyon yoluyla ise çok az miktarda laktik asit, CO<sub>2</sub> ve etanolu heterofermantasyon yoluyla sentezlemektedirler. Zayıf asit olan laktik asit ve asetik asit bulundukları ortamın pH'ını düşürmektedir. Bu pH düşüşü nedeniyle de bozulma etkeni ve patojenler ile mikroorganizmaların gelişimi sınırlanmaktadır (Marounek vd, 2011).

Daha düşük pH değerinde, zayıf asitlerin daha yüksek bir oranda antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirlenmiştir (Theron ve Lues, 2011). Asedik asidin çözünürlük değeri daha yüksektir (pKa 4.75) ve çok az miktarda sentezlenen ve çözünürlük değeri asedik aside göre daha düşük olan propionik asidin (pKa 4.87) ortam belli bir pH değerine sahipken, laktik aside (pKa 3.08) göre daha yüksek bir oranda antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Hem Propionik asidin hem de Asetik asidin bu sebeplerle ve maya, küf ve bakterilere daha fazla etki ettiği belirlenmiştir (Schnürer ve Magnusson, 2005).

Laktik asitler bulundukları ortamda pH değerini düşürürler ve aynı zamanda ilgili hücrenin zarının geçirgenliğini artırmaktadırlar. Bu sayede farklı antimikrobiyal maddelerin aktivitesinin oranı yükselmektedir (Waters ve Bassler, 2005). Buna ek olarak, asedik asit ve laktik asidin çözünmemiş formları, hidrofobik özelliği sebebiyle, hücre zarından geçer ve hücrenin içine girer. Asitlerin hücrenin içinde çözünmesi ve sitoplazmadaki pH'ı düşürmesi sonucunda ise hücre ölümü meydana gelmektedir (Dalié, 2010).

**Laktik asit:** Laktik asitler zayıf asitler olup suda kolaylıkla çözünebilirler. Laktik asitler sahip oldukları özellikler nedeniyle gıda endüstrisinde koruyucu, aroma verici, asitlendirici ve pH düzenleyici olarak kullanılmaktadır (Limsowtin vd, 2002).

Laktik asitler, FDA (Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından GRAS sınıfında yer almaktadır. Laktik asitler hem gıdalarda doğal olarak bulunabilirler hemde gıdaların fermentasyonu



esnasında mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmektedirler (Daly ve Davis, 1998). Örnek olarak, peynir, zeytin, turşu ve et verilebilir (Narayanan vd, 2004; Theron ve Lues, 2011).

**Asetik asit:** Heterofermentatif laktik asit bakterilerinin glikoz metabolizması sonucunda açığa çıkan ürünlerden biri olan asetik asit, bakterilere küfe ve mantarlara karşı yüksek bir oranda inaktivasyon özellik sergilemektedir (Ouwehand, 2004).

Asetik asit, antimikrobiyal aktivite açısından karşılaştırılırsa Laktik aside göre daha güçlüdür. Aynı zamanda, Asetik asidin çözünürlük sabiti ( $pK_a$  4.75) laktik aside göre daha yüksektir. Bu nedenle bilinen bir pH değeri söz konusu olduğunda, çözünmemiş yapıda olan asetik asit miktarının laktik asitten daha fazladığı bilinmektedir (Vesterlund vd, 2004). Fakat laktik asidin bulunduğu ortamın pH'ını düşürmesi nedeniyle ortamdaki asetik asidin etkinliğini artırmaktadır. Asetik asit, hücre zarından kolaylıkla geçer ve hücre içinin pH'ını düşürür. Asetik asit de laktik asit gibi GRAS statüsündedir ve aynı zamanda gıda koruyucusu ve gıda katkıları olarak da kullanılmaktadır. Oldukça yüksek bir lezzet potansiyeline sahiptir (Lues vd, 2011). Buna ek olarak, asetik asit et ürünlerinde meydana gelebilecek kontaminasyonları engellemek amacıyla da kullanılabilir. Örnek olarak, karkas üzerine sprey şeklindeki uygulama verilebilir (Üner, 2012).

**Propionik asit:** Propionik asit, heterofermentatif LAB suşları tarafından eser miktarlarda sentezlenebilmektedir. Laktik asit ve asetik asite göre daha yüksek bir çözünürlük sabitine ( $pK_a$  4,87) sahip olan propionik asit, aynı zamanda daha yüksek bir oranda antimikrobiyal özelliğe sahiptir. Propionik asit, sahip olduğu yüksek orandaki antimikrobiyal özelliği sayesinde gıdalarda film olarak ve yine gıdalarda yenilebilir kaplama olarak kullanılmaktadır (Rayner ve Wright, 2011).

Yapılan araştırmalarda, propionik asidin, hayvan yemlerine eklenmesi sonucunda karkasta kontaminasyonu düşürdüğü de gözlemlenmiştir (Üner, 2012).

**Hidroksi yağ asitleri:** Hidroksi yağ asitlerinin etki oranı oldukça yüksektir, aynı zamanda etki alanı da oldukça geniştir. İnaktive edici özellikleri özellikle maya ve küflere karşı oldukça güçlüdür. Hidroksi yağ asitleri, Propionik, valerik ve butirik asit gibi bazı asitlerle sinerjistik etkileşimde bulunmaktadır. Bakterilerin ürettiği oldukları hidroksillenmiş yağ asiti konsantrasyonu ile bakterilerin gelişimlerinin de aynı zamanda orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir (Magnússon vd, 2005).

**Fenillaktik asit:** Fenillaktik asit organik bir asittir ve Laktik asit bakterilerinin fenilalanin metabolizmalarının yan bir ürünü olarak bilinir. Çok güçlü antibakteriyel, antifungal ve antimaya özelliklerine sahiptirler. Bu nedenle fenillaktik asitler, gıda teknolojisinde yüksek bir oranda antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilmektedirler (Rodriguez, 2012).

Fenillaktik asitler, maya ve küf gelişimini engellemek amacıyla propionik asitten daha fazla tercih edilmektedirler. Çok farklı Laktik asit bakterileri türlerinin Fenillaktik asit sentezlendiği belirlenmiş, ancak *Lactobacillus plantarum*'un en iyi tür olduğu belirlenmiştir (Ström vd, 2002).

**Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ):** Laktik asit bakterileri, ortamda oksijen bulunduğunda flavoprotein oksidaz enzimiyle hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşumunu sağlamaktadırlar. LAB'da katalaz enzimi bulunmamaktadır. Katalaz enzimi bulunmadığı için hidrojen peroksit ortamda birikir ve bu sebeple hedefteki hücrenin lipid membranı ve aynı zamanda hücresel proteinlerini de oksitlemektedir. Bu etki sayesinde hidrojen peroksit, küf, virüs, maya ve bakterilere karşı antagonistik bir etki meydana getirmektedir (Naidu, 2000).

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) molekülü düşük dozlarda antimikrobiyal etkide göstermektedir. Buna örnek olarak sütteki laktoperoksidaz enzimi varlığında tiyosiyanat molekülü ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşması verilebilir. Laktik asit bakterisinin sütte gelişmesi sonucunda  $H_2O_2$  ortama salınması sonucunda hipotiyosiyanat ve ara moleküller oluşur. Oluşan ara moleküllerin ise farklı mikroorganizmaları inaktive etmesindeki rolü belirlenmiştir (Harris vd, 1989). Bahsedilen bu sistemin bir maya türü

olan *Candida albicans* üzerinde inaktivasyon etkisi belirlenmiştir (Choi vd, 2017). Ek olarak, küflerin hidrojen peroksit molekülünü parçalayabilen enzimlere sahip oldukları belirlenmiştir (Naidu, 2000).

## 2.4 Düşük Moleküler Ağırlıklı Antimikrobiyal Maddeler

**Reuterin (3-hidroksipropanal):** Heterofermentatif türler olan *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus collinoides* ve *Lactobacillus coryniformis* bakterileri anaerobik ortamlarda gliserolü fermente ederek Reuterin (3-hidroksipropanal) molekülünü oluşturmaktadır. Oluşan düşük moleküler ağırlıklı molekülün hem aerobik hemde anaerobik ortamlarda etki gösterdiği bilinmektedir (El-Ziney, 1999).

Reuterin, düşük molekül ağırlıklı, nötral pH'a sahip, yüksek çözünürlüklü ve protein yapıdadır. Bu özellikleri sebebiyle de maya, protozoa, küf ve bakterilere karşı aktive gösterdiği belirlenmiştir. *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata* ve *Candida albicans* gibi türlerden mayaları içerdikleri belirlenmiştir (Chang vd, 2010). Ayrıca, hücrelerin RNase aktivitesinde etkisi olduğu belirlenmiştir. (El-Ziney, 1999).

**Diasetil (2,3-butanedione):** Bazı Laktik asit bakterileri tarafından üretilen Diasetil (2,3-butanedione) metabolik bir son üründür. Kendine ait özel aroma ve lezzet özelliğine sahip olan düşük moleküler ağırlıklı moleküldür. GRAS sınıfından olduğu bilinmektedir. Keskin bir koku vermesi sebebiyle yiyecek sanayinde antifungal olarak kullanımı düşük bir orandadır. Sanitasyon amacıyla belirli gıdalarda kullanılabilirler (Ray ve Liewen, 2004).

Diasetil'in bulunduğu ortamdaki asitliğinin antimikrobiyal aktivitesiyle direkt olarak bir etkisi görülmüştür. Araştırmacılar, pH değerinin 7'den düşük olduğu zamanlarda diasetil aktivitesinde artış olduğu belirlemişlerdir. Mayalara karşı 200 ppm Diasetilin ve küflere karşı 300 ppm Diasetilin öldürücü bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Gram-Pozitif,

Gram-Negatif ve Laktik asit bakterisi olmayan bakterilerin laktik asit bakterilerine göre daha az dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Ouwehand, 2004; Vesterlund, 2004).

Diasetil molekülü ayrıca, Gram-negatif bakterilerde bulunan arginin aminoasidine bağlanır ve bunun sonucunda ilgili proteinin kullanımını kısmen engellediği tespit edilmiştir (Tang vd, 1998). Gram-Pozitif bakterilerde, Gram-Negatif bakterilerdeki gibi bağlanma proteinleri içermediğinden dolayı ve ayrıca daha çok aminoasit çeşidi bulunduğundan daha kuvvetli olabileceğini belirtilmiştir (Ray ve Liewen, 2004).

## **2.5 Bakteriyosinler**

Bakteriyosinler kısaca, dar bir antimikrobiyal etki alanına sahip, üretici türün birtakım bağışıklık mekanizmaları ile ilgili olan ve hücre dışına sentezlenen, esas ve gelişmiş protein yapısında olan bakteriyel ribozomal sentez ürünleri olarak tanımlanabilir. Hem Gram-Pozitif bakterileri hem de Gram-Negatif bakterileri bakteriyosinler üretebilmektedir (Bals ve Koczulla, 2003).

Antimikrobiyal peptidler, mikrobiyal dünyada bakteriyosinler olarak tanımlanırlar. Antimikrobiyal peptitler bakterilerin savunma mekanizmalarının en önemli kısmını oluşturmaktadır (Hill vd, 2002). Bakteriler tarafından üretilen antibiyotikler, antimikrobiyal bileşenler olan bakteriyosinlerden ayrı bir grup olarak görölmektedirler. Ayrı bir grup olarak sayılmalarına sentezlenme mekanizmaları örnek olarak verilebilir (Gallo ve Izadpanah, 2005). Antibiyotikler, multi enzim kompleksleri tarafından sentezlenirler ve bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenmektedirler (Zou vd, 2018). Esasen, bakteriyosinlerin büyük bir kısmı geleneksel antibiyotiklerle kıyasla çok daha dar bir inhibisyon spektrumuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, antibiyotiklerin yan etkilere neden olduğu bilinmektedir, ancak bakteriyosinler toksik olmamakla birlikte kokusuz ve renksiz özelliktedirler (Nes vd, 2007).

Bakteriyosinler, farklı laktik asit bakterilerince ribozomal olarak sentezlenen ve peptit yapılı olan moleküllerdir. Bu peptit yapılı moleküller, sentezlenen bakterilerin yakın

türlerinde hücre duvarlarında por oluştururlar buna bağlı olarak da hücre duvar sentezini durdururlar (Skaugen vd, 2003). Ayrıca, daha çok daha farklı mekanizmayla etki gösterdikleri tespit edilmiş ve hedefteki hücrede ölüm etkisine sebep oldukları da tespit edilmiştir (Ahmad vd, 2017).

Bakteriyosinler geleneksel antibiyotiklere kıyasla gıda kalitesini ve ayrıca gıda güvenliğini geliştirmek amacıyla doğrudan doğruya kullanılabilirler için çok daha avantajlı bir konumdadır (Osmanağaoğlu, 2002). Buna ek olarak, bakteriyosinler doğal kaynaklı yapılardır (Nes vd, 2007). Korunacak gıdaların fizikokimyasal yapısında herhangi bir farklılaşmaya sebep olmadan gıdalarda bozulma etkeni ve aynı zamanda hastalık yapan bakterileri de inhibe edebilme özelliğine sahiptir (Riley, 1998).

Bakteriyosinler protein yapıdadırlar ve bu protein yapı düşünülenin aksine herhangi bir sorun oluşturmadan gıda sanayiinde sorunsuz bir biçimde kullanılabilirler. Fakat biyokoruyucu olarak kullanıma olanağı bakteriosinlerin dar ve yetersiz mekanizmaları nedeniyle daha sınırlıdır. Ek olarak, bakteriyosinlerin üretimleri bakteri suşlarına göre farklılık göstermektedir (Klaenhammer, 1988). Laktik asit bakterilerinin birçok türü farklı bakteriyosinler üretmektedirler (Juturu ve Wu, 2018). Mesela, bazı laktokok türlerinin nisin ve laktisin, ayrıca bazı pediokok türlerinin pediosin, laktobasil türlerinin de plantarisin bakteriyosinleri ürettikleri tespit edilmiştir (Salim Ammor vd, 2007).

Yapılan araştırmalarda, son yıllarda oldukça fazla bakteriyosin tanımı gerçekleştirilmiştir. Tanımlanan bakteriyosinler özellikle gıda alanında kullanılmaya başlanmıştır. Fakat tanımlanan bakteriyosinlerden yalnızca *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanılabileceği söylenmiştir (Luchansky, 1998). Sayılan özellikler ve daha birçok mekanizması nedeniyle son yıllarda bakteriyosinler ile ilgili yapılan çalışmalar yüksek bir oranda artmıştır. Bakteriyosinlerin en önemli karakteristik özelliklerinden birisi üretici türüne göre yapısal farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple de bu duruma bağlı olarak da farklı antimikrobiyal etki spektrumuna sahiptirler (Bechinger ve Gorr, 2017).

### **2.5.1 Bakteriyosinlerin sınıflandırılmaları ve etki mekanizmaları**

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler yapısal özelliklerine ve amino asit miktarlarına bağlı olarak gerçekleştirilen çalışmaların sonuçlarına göre molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılmışlardır. Yapılan sınıflandırmada bakteriyosinler dört ana gruba ayrılmışlardır (Collins vd, 1999). LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin sınıflandırılmaları Çizelge 2.4'te verilmiştir (Ennahar vd, 2000).

Biyolojik membranlar çok çeşitli lipidler içerir. Bu membranların antimikrobiyal özgüllük ile ilişkilendirilmesinin nedeni negatif yükleridir. Bazı antimikrobiyal peptitler katyoniktir ve tercihen anyonik lipidlere bağlanır. Bu, mikrobiyal özgüllük için potansiyel bir mekanizma sağlamaktadır (Erand ve Vogel, 1999).

Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları iki kademedeyi kapsamaktadır. İlk olarak bakteriyosinler ilgili bakterinin hücre duvarında var olan reseptörlere tutunurlar. İkinci kademedeyi ise mevcut haldeki her bir bakteriyosin ilgili hücrede farklı patolojik değişikliklere neden olmaktadır. Bu kademe tek yönlü olarak gerçekleşmektedir. Bu olaydan çok az bir zaman sonra hücre içinde ortamdaki canlı sayısında yüksek bir oranda azalma meydana gelmektedir (Daw ve Falkner, 1996; Moll vd, 1999).

Çizelge 2.4 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Sınıflandırılmaları (Ennahar vd, 2000)

| SINIFLAR   | ALT SINIF   | ÖRNEKLER                                                      | ÖZELLİK                                                                                                                                                |
|------------|-------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I</b>   |             | Laktosin S, kornosin U149, lactisin 481, nisin, lactosin 3147 | Lantibiyotikler, küçük, ısıya dayanıklı az rastlanan amino asitler içerir                                                                              |
| <b>II</b>  | <b>II a</b> | Pediosin PA-1/AcH, sakasin A ve P kurvasin A Laktasin F,      | Küçük (25 kDa, 30-100 amino asit), ısıya dayanıklı, lantibiyotik olmayan bakteriyosinler<br><br>Antilisterial etkili, pediosin benzeri bakteriyosinler |
|            | <b>II b</b> | Laktokokkin G, Laktokokkin M                                  | Thiol aktif bakteriyosinler.                                                                                                                           |
|            | <b>II c</b> | Laktokokkin B, Enterosin P                                    | Kompleks aktivite için iki peptit gerektiren bakteriyosinler.<br><br>Bakteriyosinlerin salgılanmasına bağlı olarak salgılanan bakteriyosinler.         |
| <b>III</b> |             | Helvetisin J, Helvetisin V-1829, laktasin A ve B, Asidosin A  | Büyük (> 30 kDa), ısıya dayanıksız bakteriyosinler.                                                                                                    |
| <b>IV</b>  |             | Leukokkin S, Laktosin 27 ve Pediosin SJ-1, Plantarisin        | Aktivitesi için karbonhidrat veya lipidkompleksi bulunan bakteriyosinler.                                                                              |

### **2.5.2 Laktik asit bakterilerinde bakteriyosin araştırmaları üzerine geçmiş, güncel ve gelecekteki bilgileri ve yönleri**

Hem karyotik organizmalar hem de bakteriler ribozomal olarak antimikrobiyal peptitler üretebilirler. Bakterilerde bu tür bileşiklere bakteriyosinler denir. Bakteriyosinlerin tarihi 1920'lerin başlarına kadar gitmektedir (Hugenholtz vd, 1998). Bakteriyosinler, 1990'larda ve 21. yüzyılda özellikle Avrupa'da çok yaygın bir araştırması konusu haline gelmiştir (Breukink vd, 2006). Bakteriyel patojenlerle savaşmak için en umut verici antimikrobiyal ajan gruplarından biri olmasına rağmen, bu bileşiklerin pratik kullanımda nasıl kullanılacağına dair geçmişte birçok hayal kırıklığı yaşanmıştır. Günümüzde ise insan ve hayvanların yararına bu tür peptitlerden nasıl yararlanılacağı konusunda yeni olanaklar mevcuttur (Gallo ve Izadpanah, 2005).

Günümüzde 800 kadar peptit bilinmektedir. Keşfedilen bu peptitler ilk olarak bzeklerin, amfibilerin ve bitkilerin savunması için oldukanemli olarak belirlenmiştir. Gelişen teknoloji ve uygulanan yeni araştırmalar sayesinde bu peptitlerin, memeli bağışıklık tepkisi için de önemli olduğu kabul edilmiştir (Reis vd, 2012). AMP'ler, memelilerin bağışıklık sistemini korumasındaki temel rolünü göstermiştir ve bu moleküllerin insan sağlığı ve hastalıklarında değerlendirilmesi açısından yeni bir ağ açmıştır (Bechinger ve Gorr, 2017).

Bakteriyosin retimi, probiyotik bakterilerin en önemli bir özelliklerinden birisi haline gelmiştir. Belirli patojenlerle savaşmak için bakteriyosinlerin kullanımının umut verici bir geleceği söz konusudur (Cotter vd, 2005). Bakteriyosinler geleneksel peptit antibiyotiklerden çok farklıdır. Birinci olarak, peptit antibiyotikler ribozomal olarak sentezlenen peptitlerden farklıdır çünkü peptit antibiyotikler enzimler tarafından sentezlenmektedir. İkincisi, klasik antibiyotikler geniş bakteri spektrumlarına karşı aktifken bakteriyosinler, genellikle üreticinin veya yakından ilişkili türlerin içindeki dar bir bakteri spektrumunu hedef almaktadır (Mathur ve Singh, 2005). Bakteriyosinleri antibiyotiklerden ayıran bir diğer özellik ise bakteriyosinlerin duyarlı bakterilere karşı etkili olmalarıdır. Bakteriyosinler nanomolar konsantrasyonlarda dahi bakterilerde ölüm etkisi oluştururken, geleneksel antibiyotiklerin etki edebilmesi için çok daha yüksek



konsantrasyonlar gerekmektedir. Bu nedenle bakteriyosinler benzersizdir (Reis vd, 2012).

Gram-Pozitif ve Gram-Negatif bakterilerinin bakteriyosinlerini birden fazla nedenden dolayı ayırmak gerekmektedir (Breukink vd, 2006). Gram-Pozitif bakterilerinin bakteriyosinlerini iki ana gruba ayırmak oldukça anlamlıdır: ısıya dayanıklı lantibiyotikler (Sınıf I) ve değiştirilmemiş (bazı küçük modifikasyonlar olabilir) ve ısıya dayanıklı bakteriyosinler (Sınıf II). Bu iki ana sınıf ayrıca alt sınıflara ayrılır (Oppegård vd, 2007).

1920'lerin başında lantibiyotik bakteriyosinlerin keşfinden sonra, ilk tanımlanan lantibiyotik olan nisin yapısının belirlenmesinin 50 yıldan fazla sürdüğü belirtilmiştir (Gross ve Morell, 1971). 1960'larda laktobasillerin organik asitlerden farklı antimikrobiyal maddeler ürettiği bildirilmiştir (de Klerk ve Smith, 1967). Lantibiyotik araştırma alanı 1970'larda hız kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda Lantibiyotikin, yapı, etkisi, genetik, düzenleme, sentez ve modifikasyon açısından çok sayıda lantibiyotik tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Willey ve van der Donk, 2007). Son yıllarda lantibiyotiklerle ilgili bu konularda birçok kapsamlı inceleme makalesi mevcuttur.

Bakteriyosinlerin gram pozitif bakterilerdeki odak noktasının esas nedeni gıda ve yem fermentasyonundaki önemlerinden kaynaklanmaktadır (Tagg vd, 1976). Ayrıca FDA tarafından GRAS organizmaları olarak kabul edilmeleri de etkilidir. Bakteriyosin üzerine araştırmaların önemli bir nedeni, *Listeria monocytogenes* gibi patojenler de dahil olmak üzere bir dizi bakteriye karşı nanomolar konsantrasyonlarda antimikrobiyaller olarak oldukça etkileri olmuştur ve yapılan çalışmalar günümüzde öyle olduğunu göstermektedir. Metisiline dirençli olan *Staphylococcus aureus* ve vankomisine dirençli *Enterococ* (VRE) gibi çoklu ilaca dirençli patojenlere karşı bakteriyosinler etki etmektedir. Bu aktiviteleri sayesinde tıbbi ve veterinerlik uygulamalarında çok yüksek bir potansiyele sahip olabilecekleri belirlenmiştir (Gallo ve Izadpanah, 2016).

Antimikrobiyal peptitler insan kaynaklı olabileceği için ilaç reaksiyonlarının gelişme olasılığı düşüktür. Gerçekleştirilen AMP araştırmaları sonucunda, bu peptitlerin doku onarımı, anjiyogenez ve iltihaplanma gibi konakçının verdiği yanıtlarda rol oynadığını göstermektedir. Buna sahip olan peptitler, akne, rozasea ve sedef hastalığı gibi oldukça yaygın ve karmaşık cilt bozukluklarına yeni ve güvenilir bir yaklaşım sağlayabilmektedir (Bechinger ve Gorr, 2017).

Fermente gıda, yem ve bitki materyali, bakteriyosin üreten LAB'nin izolasyonu için bir kaynak olmuştur. Probiyotik bakteri olarak öneminin artan farkındalığı nedeniyle, insanlardan ve hayvanlardan LAB'nin bağırsak fekal numunesinin alınması, bu tür bakteriler için giderek daha da önemli bir kaynak haline gelmiştir (Pessione, 2016).

Antimikrobiyal peptitler, insan bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olarak ve etkin bir şekilde korunan evrimsel bir savunma stratejisidir. Antimikrobiyal peptitlerin canlılar üzerindeki antimikrobiyal ve immünomodülatör etkileri araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Bu etkilerin çoğu yakın zamanda tanımlanmıştır ve hem savunma tepkisini hem de daha yavaş adaptif ve onarım süreçlerini etkiledikleri tespit edilmiştir (Bals ve Koczulla, 2003). AMP'ler, üretilen birçok antibiyotiği etkisiz hale getirirken antimikrobiyal direnci önleme konusundaki başarısını göstermektedir. AMP'ler araştırılmaya devam edildiği sürece, hastalıklardaki alakalarının ve ayrıca kesin rollerinin çok daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir. AMP'lerin cilt hastalığındaki önemi, kutanöz biyolojinin bu bileşeninin potansiyel terapötik uygulamalarının çekici örnekleri olarak hizmet etmektedir (Gallo ve Izadpanah, 2016).

AMP'lere geliştirilen teknolojinin potansiyel klinik uygulamaları oldukça geniş bir yelpazeye sahiptir. AMP'lerin gelişimi çok kısa bir süre içerisinde yepyeni topikal bir antibiyotik sınıfı şeklinde yorumlanmaktadır. Yüzeysel bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonların AMP'lerin türevleri ile tedavisi, mikrobiyal direnci önleme yeteneği ile birlikte yüksek potansiyelleri ve geniş spektrumlu aktiviteleri gibi bu molekül sınıfının temel avantajlarından yararlanılarak araştırmalara devam edilmektedir (Zou vd, 2018).

### 3. MATERİYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Bakteriyel suşlar ve geliştirme koşulları

Tez çalışmamızda kullanan suşlar Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonunda daha önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan izole edilen Laktik Asit Bakteri suşları arasından seçilmiştir.

Çalışmada pozitif kontrol olarak pediosin üreticisi olan *Pediococcus pentasaceus* OZF suşu kullanılmıştır. İndikatör olarak ATCC kültür koleksiyonundan temin edilen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michigonogensis*, *Xanthomonas campestris* (CMM), *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytopenes*, *Salmonella thypimirum*, *Escherichia coli* 25922 ve *Escherichia coli* 0157 H:7 suşları kullanılmıştır.

Daha önce % 50 gliserol içerisinde -80°C'de muhafaza edilen Laktik Asit Bakterilerine ait suşlar ve kontrol suş MRS (de Man-Rogosa-Sharp) besiyerinde 37°C'de 24 saat geliştirilmiştir. İndikatör mikroorganizmalar ise TSB (Tryptic Soy Broth) besiyerinde 37°C'de 24 saat geliştirilmiştir (Yang vd,1992).

Tez çalışmasında Laktik Asit Bakteri grubuna ait 15 adet suş kullanılmıştır. Kullanılan bakteriler ve numaraları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteriler

|             |                                                 |
|-------------|-------------------------------------------------|
| <b>TOS9</b> | <i>Lactobacillus pentosus</i>                   |
| <b>1</b>    | <i>Lactobacillus sakei</i>                      |
| <b>3</b>    | <i>Lactococcus garviae</i>                      |
| <b>10</b>   | <i>Lactococcus lactis</i>                       |
| <b>13</b>   | <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> |
| <b>16</b>   | <i>Enterococcus faecium</i>                     |
| <b>24</b>   | <i>Weissella confusa</i>                        |
| <b>26</b>   | <i>Weissella confusa</i>                        |
| <b>29</b>   | <i>Lactococcus lactis</i>                       |
| <b>31</b>   | <i>Lactococcus lactis</i>                       |
| <b>36</b>   | <i>Pediococcus acidilactici</i>                 |
| <b>39</b>   | <i>Pediococcus acidilactici</i>                 |
| <b>40</b>   | <i>Pediococcus acidilactici</i>                 |
| <b>44</b>   | <i>Pediococcus acidilactici</i>                 |
| <b>OZF</b>  | <i>Pediococcus pentasaceus</i>                  |

Tez çalışmasında; 3 tane bitki patojeni (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michigonogensis*, *Xanthomonas campestris*), 3 tane Laktik Asit Bakterisi (*Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus sakei*) ve 4 tane Laktik Asit Bakterisi olmayan ancak gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan bakteriler (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella thypimirum*, *Escherichia coli* 25922, *Escherichia coli* 0157 H:7) olmak üzere toplamda 10 indikatör bakteri kullanılmıştır. Kullanılan bu bakteriler ve besi yerleri adı geçen sıra dahilinde Çizelge 3.2’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 İndikatör bakteriler ve besi yerleri

| BAKTERİLER                             | BESİYERLERİ   |
|----------------------------------------|---------------|
| <i>Listeria monocytopenes</i>          | TSB           |
| <i>Salmonella thypimirum</i>           | TSB           |
| <i>Escherichia coli</i> 25922          | TSB           |
| <i>Escherichia coli</i> 0157 H:7       | TSB           |
| <i>Lactococcus lactis</i>              | TGE BROTH     |
| <i>Enterococcus faecalis</i>           | TGE BROTH     |
| <i>Lactobacillus sakei</i>             | TGE BROTH     |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato | KING'S B AGAR |
| <i>Clavibacter michigonogensis</i>     | TSB           |
| <i>Xanthomonas campestris</i> (CMM)    | TSB           |

Çizelge 3.3 TGE Besiyeri (Trypton-Glucose-Yeast Extract)

| İÇERİK            | %g    |
|-------------------|-------|
| Trypton           | 1     |
| Glukoz            | 1     |
| Tween 80          | 0.1   |
| Maya ekstratı     | 1     |
| MnSO <sub>4</sub> | 0.005 |
| MgSO <sub>4</sub> | 0.005 |

TGE Besiyeri için tüm bişenler 100 ml distile su içerisinde çözüldürülür. pH 6.8'e ayarlanır. Katı besiyeri için % 1.5 agar ilave edilir, 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Çizelge 3.4 MRS Besiyeri (de Man-Rogosa-Sharp)

| İÇERİK                               | %g   |
|--------------------------------------|------|
| Kazein pepton                        | 10   |
| Et ekstraktı                         | 8    |
| Maya ekstraktı                       | 4    |
| Glukoz                               | 20   |
| Tween 80                             | 1 ml |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.5  |
| MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O | 0.2  |
| Dipotasyum hidrojenfosfat            | 2    |
| Triamonyum sitrat                    | 2    |
| Sodyum asetat                        | 5    |

MRS Besiyeri, 100 ml distile suda 5.2 g hazırlanan besiyerinin çözdürülmesiyle hazırlanır. Katı besiyeri için % 1.5 agar ilave edilir, 121°C’de 15 dakika sterilize edilir.

Çizelge 3.5 TSB Besiyeri (Tryptic Soy Broth)

| İÇERİK                          | %g   |
|---------------------------------|------|
| Kazein pepton                   | 1.7  |
| Soya pepton                     | 0.3  |
| NaCl                            | 0.5  |
| Glukoz                          | 0.25 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.25 |

TSB Besiyeri için tüm bişenler 100 ml distile su içerisinde çözdürülür. Besiyerinin pH’ı 7.3’e ayarlanır. Besiyeri 121°C’de 15 dakika sterilize edilir.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Suşların geliştirilmesi**

-80°C'de muhafaza edilen ve çalışmada kullanılacak olan suşlar kullanımdan önce uygun steril besi yerleri içerisinde en az iki kez aktifleştirilmiştir (LAB lerine ait suşlar MRS sıvı besiyerinde 30°C 24 saat, LAB lerine ait olmayan suşlar ise TSB/TGE sıvı besi yerlerinde, 37°C de 24 saat).

### **3.2.2 Antibakteriyel bileşenlerin amonyum sülfat ile presipitasyonu**

Kısaca, bir gecelik bakteri kültürü, 20 dakika (4°C) 13.000 x g'de santrifüjlenerek hücresiz süpernatanı (CFS-cell free supernatant) elde etmek amacıyla kullanıldı. CFS, 0.22 µm gözenekli membran kullanılarak filtrelendi. Hücre içermeyen süpernatant pH'sı 5M NaOH kullanılarak pH:6 olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra, LAB'nin antimikrobiyal bileşenlerinin bir protein ailesine ait olup olmadığını belirlemek ve peptitleri çöktirmek için % 80 konsantrasyona (4°C, 24 saat) ulaşan kültürize edilmiş suşun süpernatantının 100 mL'sine % 60-80 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edildi ve süpernatant, 4°C'de 20 dakika boyunca 4000 x g'de santrifüjleme yoluyla presipite edildi (Tang vd, 2015). Süpernatantların antimikrobiyal aktiviteleri indikatör bakterilere karşı agar kuyu-difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi (Garzón vd, 2017). Her bir indikatör bakteri için 3 petri plaka kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sona erdiğinde zon oluşumu kontrol edilmiş, oluşan zonların çapı cetvel yardımıyla ölçülerek antimikrobiyal aktivite varlığı ya da yokluğu belirlenmiştir (Dayong vd, 2018).

### **3.2.3 Aktivite gösteren AMP'lerin SDS-PAGE yöntemi ile taranması**

Kuyu difüzyon tekniği ile antimikrobiyal aktivitesi olduğu tespit edilen süpernatantlar SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforez) yöntemi kullanılarak taranmıştır. AMP içeren süpernatantların protein içeriğinin belirlenmesi için Laemmli (1970) tarafından kullanılan yöntem kullanılmıştır.

Bakteri kültürlerinden ammonyum sülfat ile ekstrakte edilen toplam hücre ve hücre dışı proteinler 1 mm kalınlığında (% 4'lük stacking ve % 10'luk resolving) jelde yürütülmüştür (Laemmli, 1970). Yürütme işlemi dikey elektroforez tankında stacking jel boyunca 20 mA (1 saat) ve resolving jel boyunca 30 mA'lık (2 saat) sabit akım uygulanarak gerçekleştirildi. SDS PAGE için gerekli olan bileşenler Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Bu çalışmada aynı koşullar altında iki paralel SDS-PAGE yürütülmüştür. Jellerden biri SIGMA sb19088 low molecular weight protein markörü içermekte olup yürütme işleminden sonra Coomassie Brilliant Blue (R250) ile boyanarak elde edilen bantların moleküler büyüklükleri belirlenmiştir. Diğer jel ise indikatör bakteriye karşı zon oluşumu temel alınarak antimikrobiyal aktivitenin tanımlanması amacıyla kullanılmıştır (Yang vd, 1992). Bu amaç için, jel üzerinde mikroorganizmaların gelişimine negatif etki gösterebilecek organik bileşiklerin uzaklaştırılması için jel 24 saat boyunca, 6 saatte bir değiştirmek suretiyle, steril distile suda bekletilmiştir. İnhibisyonun gözlenebilmesi için jel MRS agar içeren petri plaka yüzeyine yerleştirilir ve üzerine indikatör suşu içeren yarı katı besiyeri yayılmıştır. Yarı katı besiyeri için uygun sıvı besiyerine % 0.75 agar ilave edilir. 30°C de 18 saatlik inkübasyon sonrasında petrilerde indikatör bakteri üremesinin olmadığı bölgeler boyanan jel üzerindeki bantlarla kıyaslanır ve bu doğrultuda hangi protein bandının antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğu belirlenir.



Çizelge 3.6 SDS PAGE’de kullanılan tampon ve çözeltilerin bileşenleri

|                                               |              |
|-----------------------------------------------|--------------|
| <b>Akrilamid –Bisakrilamid Çözeltisi</b>      | <b>(%) g</b> |
| Akrilamid                                     | 29.2         |
| Bis-akrilamid                                 | 0.8          |
| <b>SDS Çözeltisi</b>                          | <b>(%) g</b> |
| SDS                                           | 10           |
| <b>Toplayıcı Jel Tamponu (0.5 M , pH 6.8)</b> | <b>(%) g</b> |
| 0.5 M Trizma Base                             | 6.05         |
| SDS                                           | 0.4          |
| <b>Ayırıcı Jel Tamponu (1.5 M , pH 8.8)</b>   | <b>(%) g</b> |
| 15 M Trizma Base                              | 18.17        |
| SDS                                           | 0.1          |
| <b>Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi</b>      | <b>g/mL</b>  |
| Amonyum persülfat                             | 0.1          |
| <b>Elektrot Tamponu</b>                       |              |
| Tris                                          | 1.65 g       |
| Glisin                                        | 8 g          |
| SDS                                           | 1.4 g        |
| dH <sub>2</sub> O                             | 1100 mL      |
| <b>Ayırıcı Jel (Resolving jel)</b>            |              |
| dH <sub>2</sub> O                             | 3.30 mL      |
| Akril-Bisakrilamid                            | 4.0 mL       |
| 1.5 M Tris (pH 8.8)                           | 2.5 mL       |
| % 10 SDS                                      | 100 µL       |
| %10 Amonyum persülfat                         | 100 µL       |
| TEMED                                         | 5.5 µL       |

Çizelge 3.6 SDS PAGE’de kullanılan tampon ve çözeltilerin bileşenleri (devam)

|                                                |        |
|------------------------------------------------|--------|
| <b>Toplayıcı Jel (Stacking jel):</b>           |        |
| dH <sub>2</sub> O                              | 3.4 mL |
| Akril-Bisakrilamit                             | 830 µL |
| 0.5 M Tris (pH 6.8)                            | 630 µL |
| % 10 SDS                                       | 50 µL  |
| % 10 Amonyum persülfat                         | 50 µL  |
| TEMED                                          | 5.5 µL |
| <b>Coomasie Brilliant Blue Boya Çözeltisi:</b> |        |
| Commasie brillant blue R 250                   | 1 g    |
| Metanol                                        | 400 mL |
| Glasial asetik asit                            | 100 mL |
| dH <sub>2</sub> O                              | 500 mL |
| <b>Boya Geri Alma Çözeltisi:</b>               |        |
| Metanol                                        | 400 mL |
| Glasial asetik asit                            | 100 mL |
| dH <sub>2</sub> O                              | 500 mL |
| <b>Jel Fiksasyon Çözeltisi:</b>                |        |
| Glasial asetik asit                            | 70 mL  |
| dH <sub>2</sub> O                              | 930 mL |

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1 Kuyu Difüzyon Tekniği ile Antimikrobiyal Aktivitenin Taranması

Kuyu difüzyon tekniği ile antimikrobiyal aktivite taranması yapılmıştır. Kuyularda oluşan zonlar ve çapları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Sütundaki numaralar kullanılan suşları, satırda yer alan A,B,C ise deneyin 3 paralelde yapıldığını ifade etmektedir.

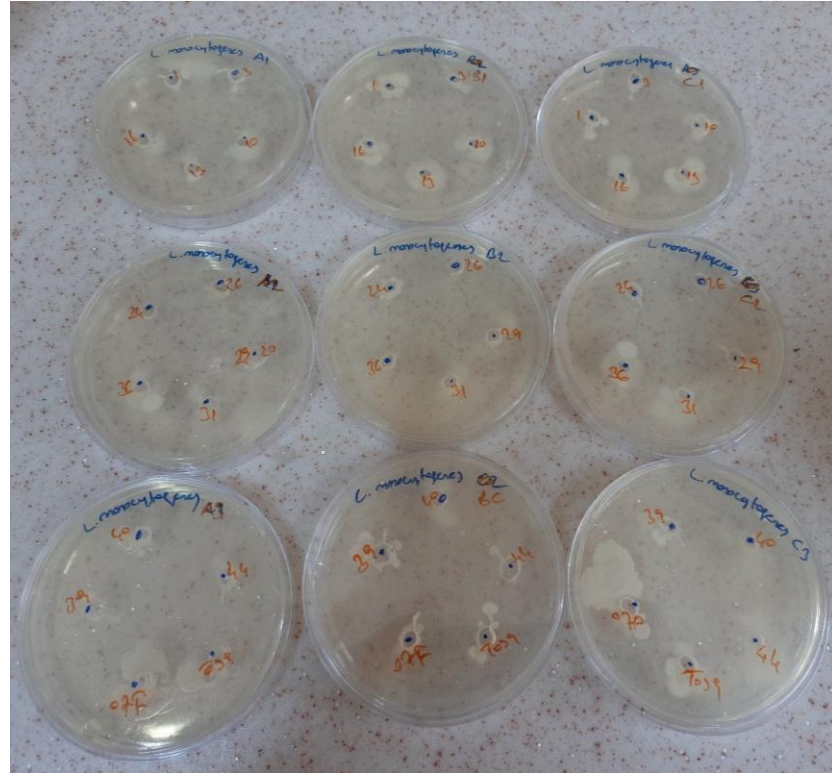
Tez çalışmamızda kuyu difüzyon tekniği ile indikatör bakterilere karşı zon oluşum çalışmalarına ait şekiller ise Şekil 4.1-Şekil 4.8 arasında yer almaktadır. Adı geçen sıra dahilinde şekillerde kullanılan indikatör bakteriler: *Listeria monocytopenes*, *Clavibacter michigonogensis*, *Xanthomonas campestris* (CMM), *Escherichia coli* 25922; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella thypimirum*.

Çizelge 4.1 Kuyularda oluşan zonların çapları

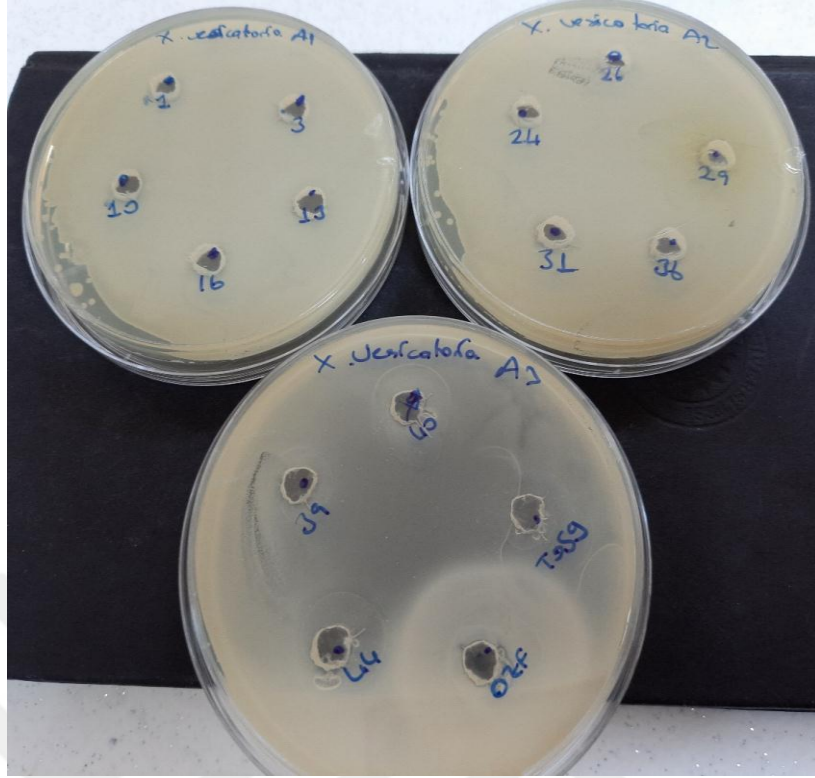
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> |     |     | <i>Escherichia coli</i> 25922 |   |   | <i>Clavibacter michigonogensis</i> |   |   | <i>Lactobacillus sakei</i> |   |   | <i>Salmonella typhimurium</i> |     |     |     |
|-----------------------------------------------|-----|-----|-------------------------------|---|---|------------------------------------|---|---|----------------------------|---|---|-------------------------------|-----|-----|-----|
|                                               | A   | B   | C                             | A | B | C                                  | A | B | C                          | A | B | C                             | A   | B   | C   |
| 1                                             | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 1,2 | 1   |
| 3                                             | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 10                                            | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0,9 | 1   |
| 13                                            | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 16                                            | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 24                                            | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 26                                            | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 29                                            | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 31                                            | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 36                                            | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 39                                            | 0,9 | 0   | 0,8                           | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 40                                            | 1   | 1   | 0,9                           | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| 44                                            | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| OZF                                           | 0   | 0   | 0                             | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0   |
| TOS9                                          | 1,5 | 2,5 | 1,8                           | 0 | 0 | 0                                  | 0 | 0 | 0                          | 0 | 0 | 0                             | 1,1 | 1   | 1,1 |

Çizelge 4.1 Kuyularda oluşan zonların çapları (devam)

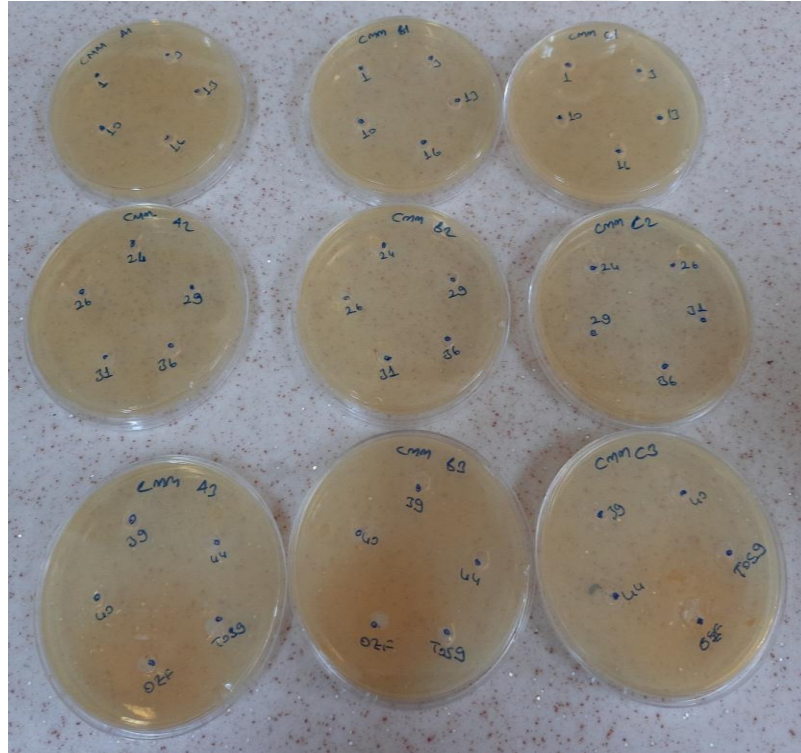
| <i>Xanthomonas campestris</i> (CMM) | <i>Escherichia coli</i> 0157 H:7 |   |   | <i>Lactococcus lactis</i> |   |   | <i>Listeria monocytopenes</i> |     |     | <i>Enterococcus faecalis</i> |   |   |     |     |     |
|-------------------------------------|----------------------------------|---|---|---------------------------|---|---|-------------------------------|-----|-----|------------------------------|---|---|-----|-----|-----|
|                                     | A                                | B | C | A                         | B | C | A                             | B   | C   | A                            | B | C | A   | B   | C   |
| 1                                   | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 0   | 0   |
| 3                                   | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 1,2 | 0,8 |
| 10                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 0   | 0   |
| 13                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 0   | 0   |
| 16                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 0   | 0   |
| 24                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 1                             | 0   | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 0   | 0   |
| 26                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 0   | 0   |
| 29                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 1                             | 1,2 | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 0   | 0   |
| 31                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 1,2                           | 1,1 | 0   | 0                            | 0 | 0 | 1   | 0   | 1   |
| 36                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 0                             | 0,8 | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 1,5 | 1,9 |
| 39                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 0                             | 0   | 0,8 | 1,7                          | 0 | 0 | 1,7 | 0,7 | 0   |
| 40                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 1,2                           | 1,5 | 1   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 0   | 0   |
| 44                                  | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 1,2                           | 0   | 0   | 0                            | 0 | 0 | 0   | 0   | 0   |
| OZF                                 | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 1,3                           | 1   | 1,2 | 0                            | 0 | 0 | 1   | 1,1 | 1,1 |
| TOS9                                | 0                                | 0 | 0 | 0                         | 0 | 0 | 1,9                           | 2,2 | 1,9 | 0                            | 0 | 0 | 1,6 | 1,7 | 1,5 |



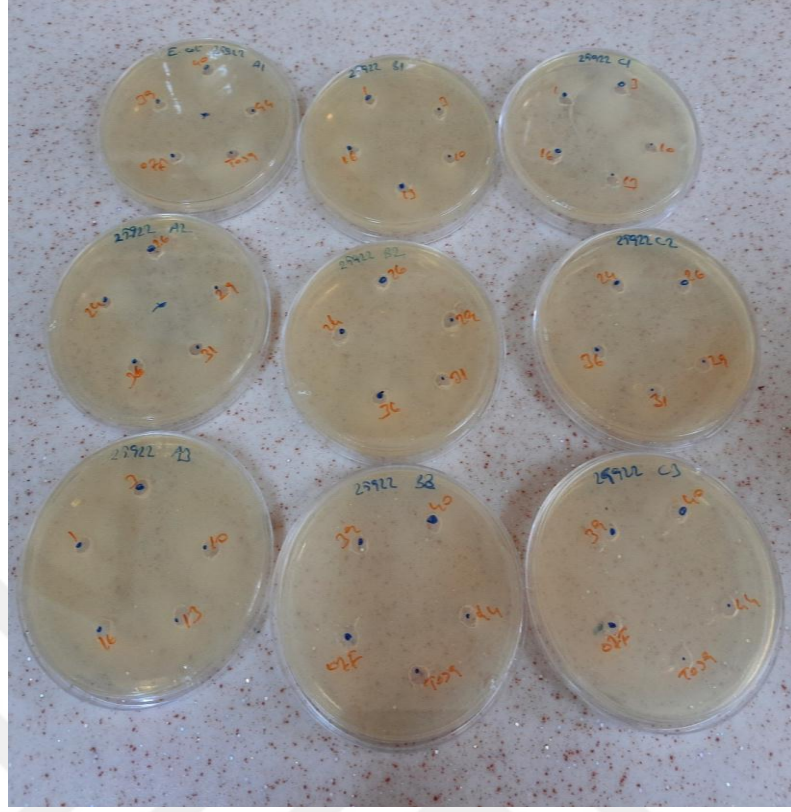
Şekil 4.1 *Listeria monocytopenes*'te zon oluşumu



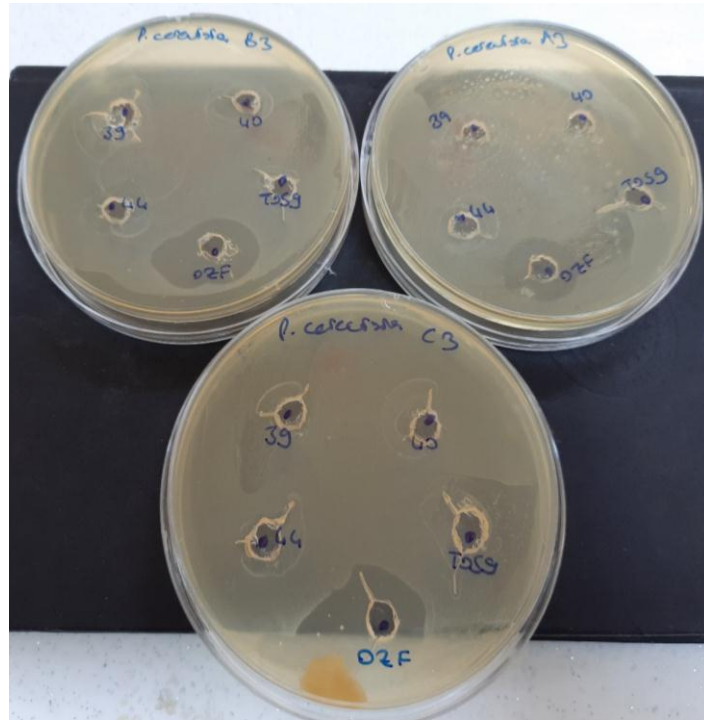
Şekil 4.2 *Clavibacter michiganensis*'te zon oluşumu



Şekil 4.3 *Xanthomonas campestris* (CMM) 'te zon oluşumu

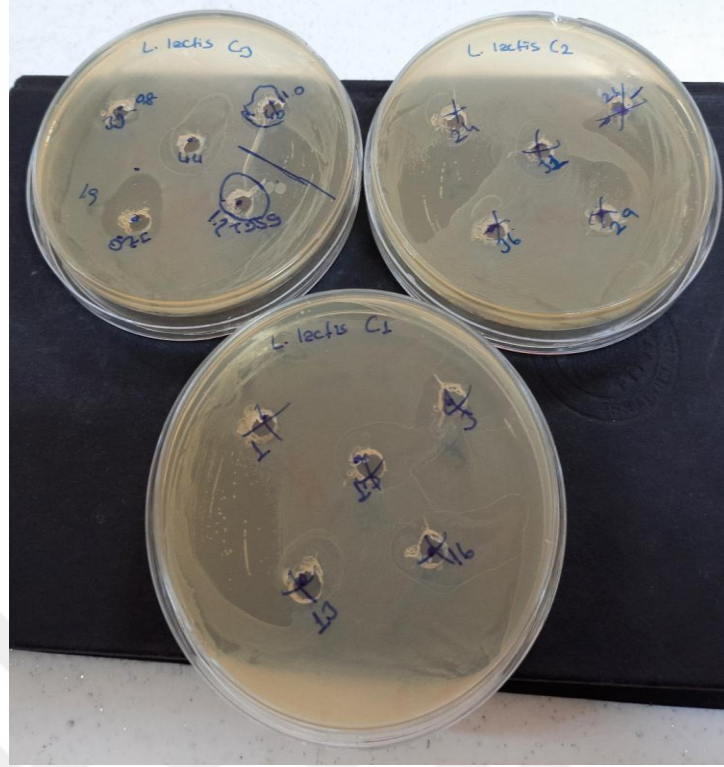


Şekil 4.4 *Escherichia coli* 25922’de zon oluşumu

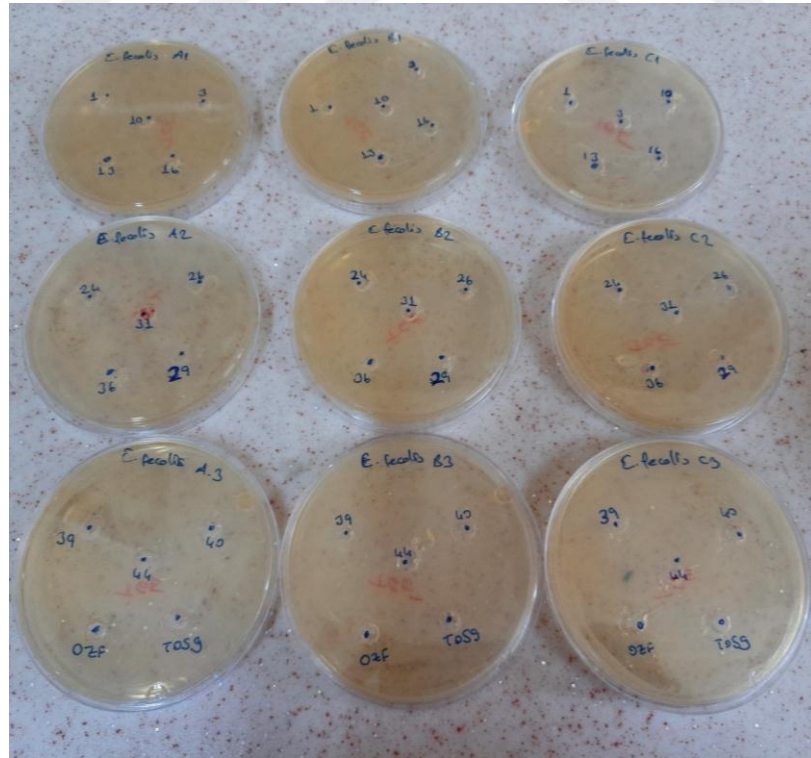


Şekil 4.5 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*’da zon oluşumu

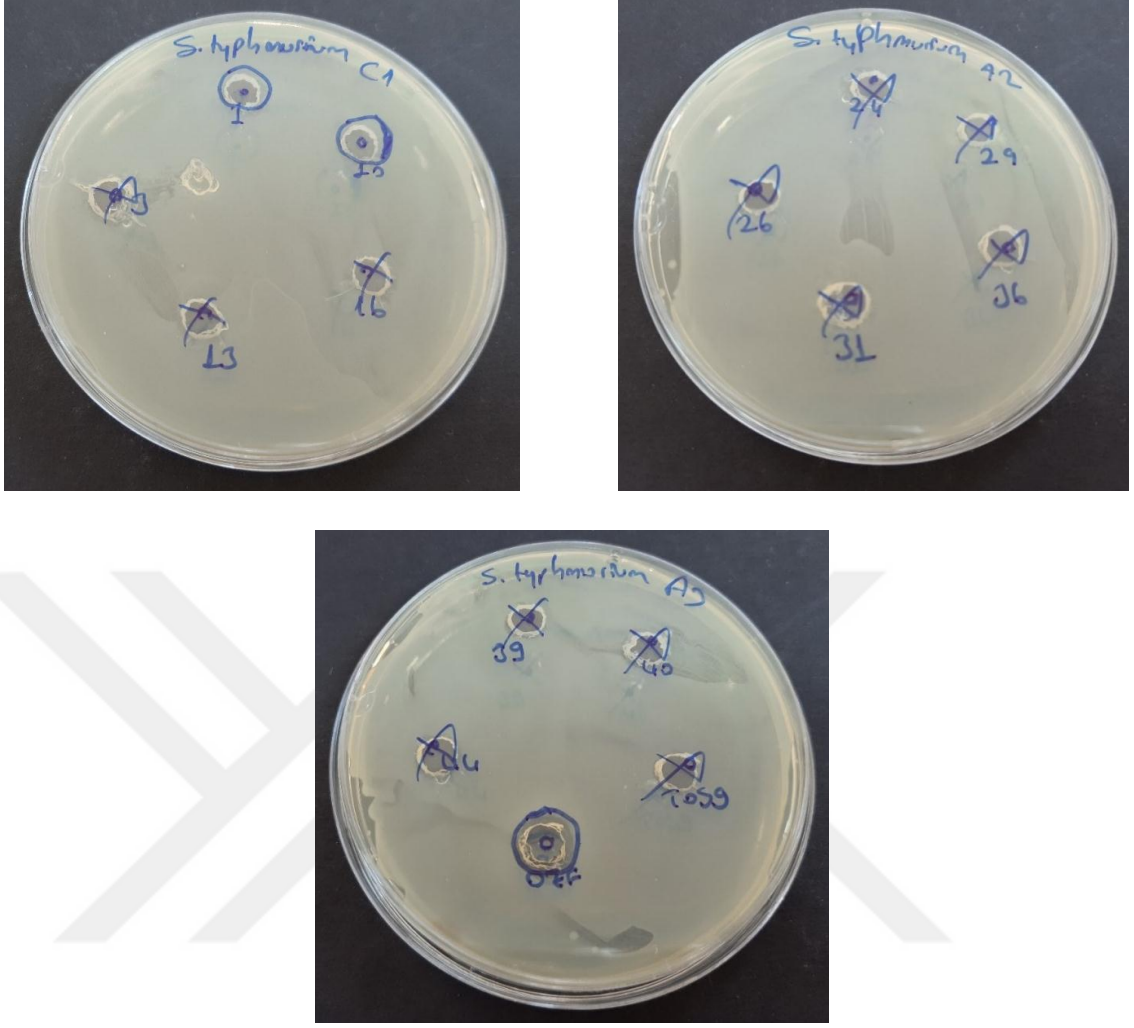




Şekil 4.6 *Lactococcus lactis*'te zon oluşumu



Şekil 4.7 *Enterococcus faecalis*'te zon oluşumu



Şekil 4.8 *Salmonella thypimirum*'da zon oluşumu

Yapılan çalışmalar sonucunda *Listeria monocytopenes*, *Clavibacter michigonogensis*, *Xanthomonas campestris* (CMM), *Escherichia coli* 25922, *Escherichia coli* 0157 H:7'de *Lactobacillus sakei* suşlarına karşı zon oluşumu gözlemlenmemiştir.

Bununla beraber indikatör olarak *Pseudomonas syringae ps. tomat.* kullanıldığı çalışmada 39 numaralı bakteride (*Pediococcus acidilactici*) A serisinde 0,9 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 0,8 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. B serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 40 numaralı bakteride (*Pediococcus acidilactici*) A serisinde 1cm zon oluşumu, B serisinde 1cm zon oluşumu ve C serisinde ise 0,9 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. OZF'de (*Pediococcus pentasaceus*) ise A serisinde 1,5 cm



zon oluşumu, B serisinde 2,5 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1,8 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir.

İndikatör olarak *Lactococcus lactis* suşunun kullanıldığı çalışmada 24 numaralı bakteride (*Weissella confusa*) yalnızca A serisinde 1 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. B serisinde ve C serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 29 numaralı bakteride (*Lactococcus lactis*) A serisinde 1 cm zon oluşumu ve B serisinde ise 1,2 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. C serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 31 numaralı bakteride (*Lactococcus lactis*) A serisinde 1,2 cm zon oluşumu ve B serisinde ise 1,1 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. C serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 36 numaralı bakteride (*Pediococcus acidilactici*) yalnızca B serisinde 0,8 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. A serisinde ve C serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 39 numaralı bakteride (*Pediococcus acidilactici*) yalnızca C serisinde 0,8 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. A serisinde ve B serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 40 numaralı bakteride (*Pediococcus acidilactici*) A serisinde 1,2 cm zon oluşumu, B serisinde 1,5 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. 44 numaralı bakteride (*Pediococcus acidilactici*) yalnızca A serisinde 1,2 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. C serisinde ve B serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. TOS9 numaralı bakteride (*Lactobacillus pentosus*) A serisinde 1,3 cm zon oluşumu, B serisinde 1 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1,2 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. OZF’de (*Pediococcus pentasaceus*) A serisinde 1,9 cm zon oluşumu, B serisinde 2,2 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1,9 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir.

İndikatör olarak *Enterococcus faecalis* suşunun kullanıldığı çalışmada, 3 numaralı bakteride (*Lactococcus garviae*) B serisinde 1,2 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 0,8 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. A serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 16 numaralı bakteride (*Enterococcus faecium*) B serisinde 1,1 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1,2 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. A serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 31 numaralı bakteride (*Lactococcus lactis*) A serisinde 1 cm zon oluşumu, C serisinde ise 1 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. B serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 36 numaralı bakteride (*Pediococcus acidilactici*) B serisinde 1,5 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1,9 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir.

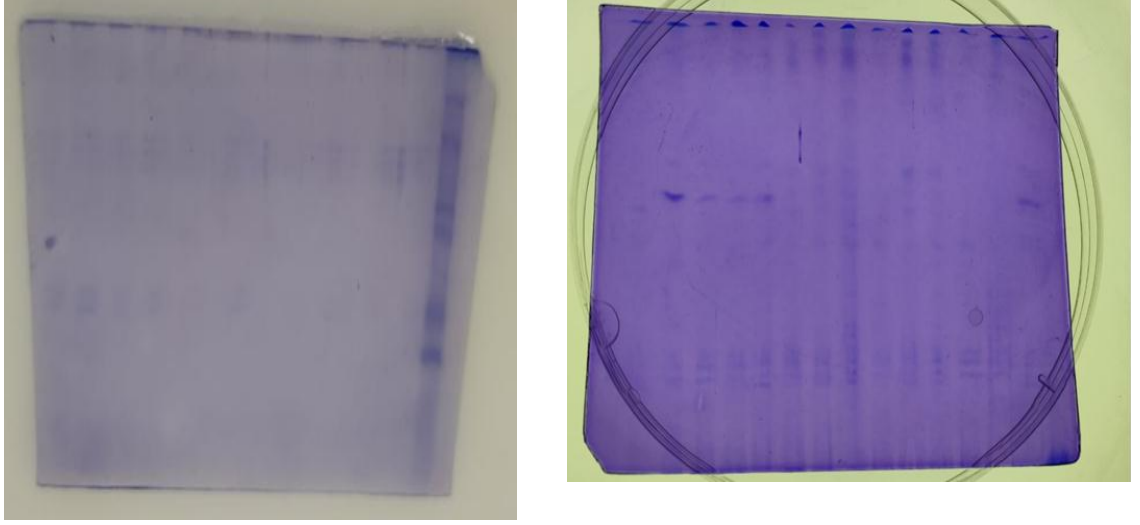
A serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 39 numaralı bakteride (*Pediococcus acidilactici*) A serisinde 1,7 cm zon oluşumu ve B serisinde ise 0,7 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. C serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. TOS9 numaralı bakteride (*Lactobacillus pentosus*) A serisinde 1 cm zon oluşumu, B serisinde 1,1 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1,1 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. OZF numaralı bakteride (*Pediococcus pentasaceus*) A serisinde 1,6 cm zon oluşumu, B serisinde 1,7 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1,5 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir.

İndikatör olarak *Salmonella thypimirum* suşunun kullanıldığı çalışmada, 1 numaralı bakteride (*Lactobacillus sakei*) B serisinde 1,2 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. A serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 10 numaralı bakteride (*Lactococcus lactis*) B serisinde 0,9 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir. A serisinde ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. OZF numaralı bakteride (*Pediococcus pentasaceus*) A serisinde 1,1 cm zon oluşumu, B serisinde 1 cm zon oluşumu ve C serisinde ise 1,1 cm zon oluşumu gözlemlenmiştir.

#### **4.2 Aktivite Gösteren AMP'lerin SDS-PAGE Yöntemi ile Taranması**

Kuyu difüzyon tekniği ile antimikrobiyal aktivitesi olduğu tespit edilen süpernatantlar SDS-PAGE yöntemi kullanılarak taranmıştır. AMP içeren süpernatantların protein içeriğinin belirlenmesi için Laemmli (1970) tarafından kullanılan yöntem kullanılmıştır.

Yapılan tez çalışmamızda kuyu difüzyon tekniği ile *Pseudomonas syringae ps. tomat*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella thypimirum*'da zon oluşumu gözlemlenmiştir. Zon oluşturan preoteinde antimikrobiyal etkinin belirli bir protein bandının varlığı ile ilişkilendirilmesi için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır (Şekil 4.9).

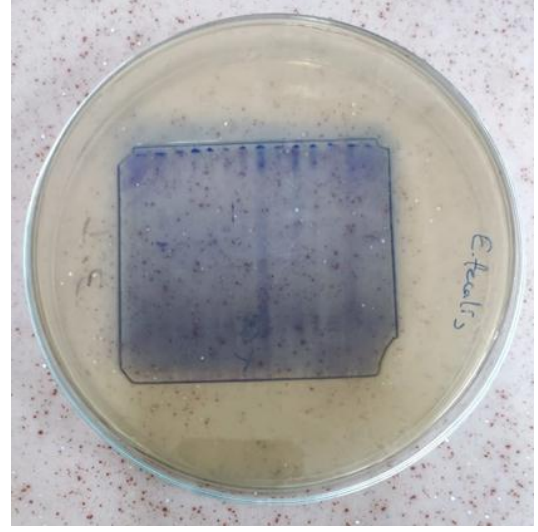
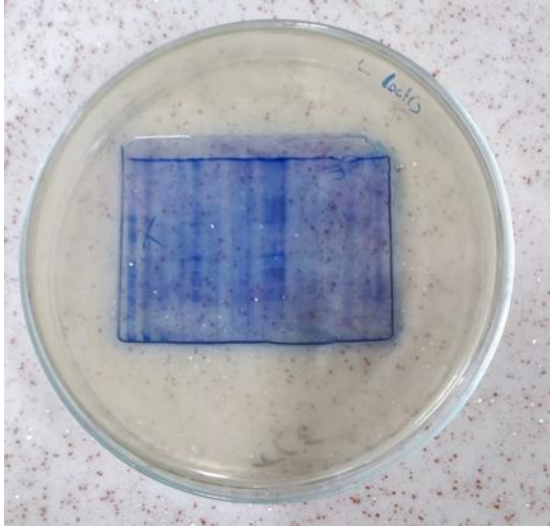


Şekil 4.9 SDS-PAGE sonuçları

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında kuyu difüzyon tekniği ile antimikrobiyal aktivite taranması sonucunda en fazla zon oluşturan türler olan *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus faecalis* seçilmiş ve jeller besi yerinde geliştirilerek ve antimikrobiyal etki taranması yapılmıştır.

#### 4.3 Jellerin Besiyerinde Geliştirilmesi ve Antimikrobiyal Etkinin Taranması

SDS-PAGE sonucunda görülen protein bantlarının antimikrobiyal aktivite ile olan ilişkisinin belirlenmesi için hazırlanan katı besi ortamlarına seçilen indikatör bakteriler  $10^5$  olacak şekilde seyreltilerek aşılandı ve ardından SDS-PAGE jelleri indikatör içeren agar üzerine yayılarak 24 saat  $37^\circ \text{C}$ 'de inkübe edildi. *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus faecalis* için geliştirilen besi yerleri Şekil 4.10'da verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda kullanılan indikatör bakterilerine (*Lactococcus lactis* ve *Enterococcus faecalis*) karşı zon oluşumu görülmemiştir.



Şekil 4.10 İndikatör olarak a) *Lactococcus lactis* b) *Enterococcus faecalis* içeren besiyerinde jeller

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Artan antibiyotik kullanımına bağılı olarak modern dünyada antibiyotiklere alternatif yeni bir yöntem araştırılması son yıllarda hız kazanmıştır. Geleneksel antibiyotiklere nazaran çok daha kolay ve kesin sonuç veren ve ayrıca ilaç reaksiyonlarının gelişme olasılığı düşük olan antimikrobiyal peptitler araştırmacılar için çok büyük bir umut kaynağıdır (Cotter vd, 2005).

Antimikrobiyal peptidler, mikrobiyal dünyada bakteriyosinler olarak tanımlanırlar. Antimikrobiyal peptitler bakterilerin savunma mekanizmalarının en önemli kısmını oluşturmaktadır.

Antimikrobiyal Peptitler (AMP) protein yapıdadır ve bu protein yapıda olmaları düşünülenin aksine hiçbir bir sorun oluşturmada gıda sanayiinde sorunsuz bir biçimde kullanılmasını sağlamaktadır. AMP üretimleri bakteri suşlarına göre farklılık göstermektedir (Klaenhammer, 1988). Laktik asit bakterilerinin birçok suşu farklı antimikrobiyal peptitler üretmektedirler ve ürettikleri AMP' ler gıdaları kontaminasyondan korumak, gıda kalitesini ve güvenliğini artırmak ve antibiyotiklere dirençli patojen mikroorganizmalarla savaşmak için umut verici bir stratejidir. Bu nedenle antimikrobiyal araştırmalarında en yaygın olarak kullanılan bakteriler laktik asit bakterileridir (Juturu ve Wu, 2018).

Antimikrobiyal peptitler ve klasik antibiyotikler birçok açıdan birbirinden ayrılır. Bu iki mekanizmayı birbirinden ayıran ilk özellik sentezlenme mekanizmalarıdır. AMP'ler ribozomal olarak sentezlenirken, klasik antibiyotikler enzimler tarafından sentezlenir. Geleneksel antibiyotikler antimikrobiyal peptitlere nazaran çok daha geniş bir etki alanına sahiptir ancak AMP'ler yalnızca hedefe odaklanan dar bir etki alanına sahiptir (Mathur ve Singh, 2005). Antimikrobiyal peptitleri ve klasik antibiyotikleri ayıran diğer bir özellik ise kullanım miktarına bağılı olarak etki etme mekanizmalarıdır. AMP'ler nano düzeyinde miktarlarda eklendiğinde bile bakterilere karşı savunma mekanizması gösterir ve bakteri ölümünü gerçekleştirirler ancak klasik antibiyotiklerin etki edebilmesi için çok daha fazla miktarlara ihtiyaç duyulmaktadır (Reis vd, 2012).

Özellikle biyomühendislik alanındaki araştırmacılar, hem in vivo hem de in vitro kullanım için spesifik hedef organizmalara karşı artırılmış stabiliteye, daha geniş özgülüğe ve hatta daha yüksek aktivitelere sahip türevler oluşturmak için antimikrobiallerin geliştirilmesine odaklanmış durumdadır (Bechinger ve Gorr, 2017).

Yürütülen tez çalışmasıyla yeni bir antimikrobiyal ajanların araştırılması çabasıyla, bu çalışmada farklı kaynaklardan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin AMP üretim potansiyelleri araştırılmıştır.

Tez çalışması kapsamında kültür koleksiyonunda mevcut bulunan 14 laktik asit bakterisi (*Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Weissella confusa*, *Weissella confusa*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus acidilactici*) ve kontrol suş olan OZF (*Pediococcus pentasaceus*) kullanılmıştır.

Tez çalışmasında; 3 tane bitki patojeni (*Clavibacter michigonogensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*., *Xanthomonas campestris* (CMM) 3 tane laktik asit bakterisi (*Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus sakei*) ve 4 diğer bakteri (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella thypimirum*, *Escherichia coli* 25922, *Escherichia coli* 0157 H:7) olmak üzere toplamda 10 indikatör bakteri kullanılmıştır.

Çalışmamızda kuyu difüzyon tekniği ile antimikrobiyal aktivite taranması yapılmıştır. Kuyu difüzyon tekniği ile antimikrobiyal aktivite taranması sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella thypimirum*'da zon oluşumu gözlemlenmiştir. Zon oluşturan preoteinlerde antimikrobiyal etki varlığı saptanmıştır. Bu nedenle bu proteinler SDS-PAGE yöntemi kullanılarak moleküler ağırlıkları belirlenmiştir

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında kuyu difüzyon tekniği ile antimikrobiyal aktivite taranması sonucunda en fazla zon oluşturan türler olan *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus faecalis* seçilmiş ve jeller besi yerinde geliştirilerek ve antimikrobiyal etki taranması yapılmıştır.

Yapılan tarama sonucunda ne *Lactococcus lactis*’te ne de *Enterococcus fecalis*’te zon oluşumu gözlemlenmemiştir. Yani ilgili proteinler etki göstermemiştir. Hem *Lactococcus lactis*’te hem de *Enterococcus fecalis*’te antimikrobiyal peptit üretim potansiyelleri oldukça sınırlıdır.

Araştırmacılar birçok laktik asit bakterisinin antimikrobiyal peptit olarak kullanılabileceklerini ortaya koymuşlardır. Yapılan bir çalışmada *Laktococcus spp*’nin seçilmiş türleri için membran geçirgenliği yoluyla antimikrobiyal aktivite taranmıştır. Sonuçlara göre *L. lactis* için antimikrobiyal peptitlerin potansiyel uygulanabilirliğini tespit etmiştir (Somonto vd, 2010).

Diğer bir çalışma ise Hassan vd (2011) tarafından yapılmıştır. Çalışmaya göre çoklu antibiyotiğe dirençli *Enterococcus spp*’nin seçilmiş izolatları için enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerin karşılaştırmalı minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Yapılan araştırmalar, antibiyotik direnci problemlerini hafifletmede *Enterococcus fecalis* için antimikrobiyal peptitlerin potansiyel uygulanabilirliğini tespit etmiştir. Buna bağlı olarak da AMP’lerin in vivo üretiminin, en dirençli patojenlere karşı bile yeni bir araç sunabileceği belirtilmiştir.

Baindara vd (2013) yapmış oldukları bir çalışmada, *Bacillus subtilis*’in iki yeni antimikrobiyal ürettiğini ve için çeşitli Gram-Pozitif bakterilere karşı aktif olduklarını belirlemişlerdir. Bu antimikrobiyal peptitlerin üretimi, sıklıkla gıda bozulmasına bağlı olan *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes*’e karşı yüksek antimikrobiyal aktivitesinden dolayı bir biyokontrol ajanı olarak veya gıda muhafazasındaki uygulamaları arttırdığını tespit etmiştir.

Tulini vd (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Brezilya fûme balıklarından (Surubim, *Pseudoplatystoma sp.*) izole edilen *Carnobacterium maltaromaticum* C2'nin, gıda kaynaklı önemli bir patojen olan *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda hem *Listeria monocytogenes* 'nin antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiş hem de iki bileşenli lantibiyotik ürettiği tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışma Borrero vd (2015) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada AMP'lerin üretimi için klorür ile indüklenebilir bir promotör belirlemişler ve bunu uygulamışlardır. Araştırma sonucunda AMP'lerin ekspresyonunun *Enterococcus faecalis* ve *Listeria monocytogenes* bakterilerinin sayısını büyük ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir.

Bir diğer çalışmada Geetha vd (2015) tarafından yapılmıştır. Çalışmada kısmen çürümüş gıda örneklerinden izole edilen saflaştırılmış laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal peptitlerinin, seçilmiş mastitis bakteriyel patojenleri, yani *Escherichia coli* klinik izolatlarına karşı etkinliğini değerlendirmesi yapılmıştır. Çalışma sonucunda *Lactobacillus fermentum* (Tp-5) ve *Enterococcus* (CRp-2 ve CRp-3) tarafından üretilen yeni tanımlanmış antimikrobiyal peptitlerin varlığı belirlenmiştir. Tanımlanan peptitlerin başlıca sığır mastitis bakteriyel patojenlerine karşı güçlü antimikrobiyal spektrumu belirlenmiştir. Bu yeni peptitlerin veterinerlik alanında geleneksel antibiyotiklerin çiftlikte kullanımını azaltmak adına kullanılma olasılığının yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Her ne kadar yapılan tez çalışmamız kapsamındaki sonuçlarımızda zon oluşumu gözlemlenmemiş ve proteinler etki göstermemiş olsa da, gerçekleştirilen çalışmaların birçoğu geleneksel antibiyotikler yerine antimikrobiyal peptitlerin kullanılabileceğini kanıtlar niteliktedir.

LAB'nin antimikrobiyal maddelerin, özellikle bakteriyosinlerin üreticileri olarak kullanılması, gıda endüstrisi için gıda ürünlerinin güvenliğini artırmak, raf ömrünü uzatmak ve tüketicilerin sağlığını korumak için umut verici bir gelişmedir. Buna ek



olarak antimikrobiyal maddelerin geleneksel antibiyotikler yerine kullanılabilmesi de ayrıca umut vericidir. (Ahmad vd, 2017). Bu nedenle, doğal olarak oluşan antimikrobiyal moleküllerin kullanımının etkinliği, çevresel faktörlerin bakteriyosinogenik suşların implantasyonu ve hayatta kalması üzerindeki etkileri ve bunların etkinliğini nicel olarak tahmin etmek için bakteriyosinlerinin aktivitesi hakkındaki anlayışımızı genişletmeye devam edilmesi gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fuentes, M.A.F., Pérez Pulido, R. ve Gálvez, A. 2012. Characterization of lactic acid bacteria from naturally fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*, (32), 308-316.
- Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Karaawi, M.A.A. ve Siddiqui, M.U. 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49, 1–11.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology in Salminen, S., von Wright, A. ve Ouwehand, A., eds, *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*, Marcel Dekker, pp 1-66, New York ABD.
- Bahar A. and Ren D. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6, 1543-75.
- Baindara, P., Mandal, S., Chawla, N., Singh, P., Pinnaka, A. ve Korpole, S. 2013. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *Springer; AMB Express*, 3, 2.
- Bals, R. ve Koczulla, A. 2003. Antimicrobial Peptides. *Springer Link*, (63), 389–406
- Bechinger, B. ve Gorr, S. 2017. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96, 3.
- Beijerinck M. W. 1901. Surles ferments lactiques de l'industrie. *Arch. (Netherlands)*; (6), 212–243.
- Bergey's Manual Trust. 2015. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, Springer.
- Borrero, J., Geldart, K. ve Kaznessis, Y. 2015. Chloride-Inducible Expression Vector for Delivery of Antimicrobial Peptides Targeting Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecium*. *ASM Journals Applied and Environmental Microbiology*, 81, 11.
- Breukink, E., Hasper, H., Kramer, N., Hillman, J. ve Smith, J. 2006. An Alternative Bactericidal Mechanism of Action for Lantibiotic Peptides That Target Lipid II. *Science*, 313(5793), 1636-1637.
- Carr, F.C., Chill, D. Ve Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28 (4), 281-370.
- Chang, R., Kivela, J. and Mak, A. 2010. Food preferences of Chinese tourists. *Annals of Tourism Research*, 37(4), 989-1011.
- Chen, W. 2019. *Lactic Acid Bacteria; Omics and Functional Evaluation*; Springer Nature Singapore Pte, 134(7832), 978-981.
- Choi, H.A., Cheong, D.E., Lim, H.D., Kim, W.H., Ham, M.H., Oh, M.H., Wu, Y., Shin, H.J. ve Kim, G.J. 2017. Antimicrobial and anti-biofilm activities of the

- methanol extracts of medicinal plants against dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1242–1248.
- Collins, J., Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., ve Shanahan, F. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, 279–292.
- Cotter, P., Hill, C. ve Ross, P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777–788.
- Dalié, D., Deschamps, A. ve F.Richard-Forgeta, F. 2010. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4), 370-380.
- Daly, C. ve Davis, R., 1998. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agric. Food Science, Finland* 7, 219-250.
- Dayong, R., Jianwei, Z., Shengjie, G., Hongyan, L., ve Hansong, Y. 2018. Antimicrobial Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Homemade Fermented Foods. *Hindawi BioMed Research International*. Article ID 5416725, 9.
- Daw, M. and Falkiner, F. 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, 27(6), 467-479.
- De Klerk, H. ve Smith, J. 1967. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. *Microbiology Society*, 48, 2.
- De Vusty, L. ve Leroy, F. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. 13, 4.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., ve Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 193-202.
- Drinan, D.F., Tobin, S., ve Cogan, T.M. 1976. Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 31(4), 481-486.
- Ennehar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. ve Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 85-106.
- El-Ziney, M. 1999. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria metabolites: The role of lactic acid, enterocin 5701 and reuterin. *Doktora Tezi. Universiteit Gent, Belgium*.
- Epanand, R. and Vogel, H. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1462(1-2), 15, 11-28.

- Ewaschuk, J. and Dieleman, L. 2006. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 5941-5950.
- FAO/WHO Expert Consultation. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- Gadaga, T. H., Mutukumira, A. N. and Narvhus, J. A. 2001. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk, *International Journal of Food Microbiology*, 68, 21-32.
- Gaiser, T. Kather, J., Weis, C., Bianconi, F., Melchers, S., Schad, L., Marx, A. and Zöllner, G. 2016. Multi-class texture analysis in colorectal cancer histology. *Scientific Reports*, 6, 27988.
- Gallo, R. ve Izadpanah MD, A. 2005. Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(3), 381-390.
- Gallo, R. ve Zhang, L. 2016. Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), 14-19.
- Gasbarrini, G., Fiorenza, B. ve Annagiulia, G. 2016. Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50(1), 116-119.
- Geetha, R., Sathian, C., Prasad, V. ve Gleeja1, V. 2015. Efficacy of purified antimicrobial peptides from lactic acid bacteria against bovine mastitis pathogens. *Asian Journal of Dairy and Food Research Abbreviation*, 34(4), 2015, 253-258.
- Ghazzewi, F. ve Tester, R. 2014. Impact of prebiotics and probiotics on skin health. *Beneficial Microbes*, 5(2), 99-107.
- Goldin, B. R. ve Gorbach, S. L. 1992. Probiotics for humans. In R. Fuller, *Probiotics the scientific basis* London, Chapman and Hall, 355-376.
- Gross, E. ve Morell, J. 1971. Structure of nisin. American Chemical Society. ACS Publications, 93(18), 4634-4635.
- Hammes, W.P., Weiss, N. ve Holzapfel, W.H. (1991) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes. Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* (eds Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H.). Springer, New York, USA, pp. 1535-1594.
- Harris, L. Daeschel, M., Stiles, M. ve Klaenhammer, T. 1989. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *International Association for Food Protection*, 52, 6.
- Hassan, M., Javadzadeh, Y., Lotfipour, F. ve Badomchi, R. 2011. Determination of comparative minimum inhibitory concentration (MIC) of bacteriocins produced by enterococci for selected isolates of multi-antibiotic resistant *Enterococcus spp.* *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(2), PMC3845979.
- Hill, C., O'Keeffe, T. ve Ross, P. 2002. Bacteriocins, Elsevier Science Ltd., 128-135.

- Jenssen, H., Hamill, P. ve Hancock, RE. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiol Reviews*, 19, 491-511.
- Juturu, W. ve Wu, J.C. 2018. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnol. Advanced*, 36, 2187–2200.
- Kandler, O. ve Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus beijerinck* 1901. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol 2 pp 1209–1234 Edited by Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. Baltimore: Williams & Wilkins
- Kıran, F. 2010. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Klaenhammer, T. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Science Direct. Biochimie*, 70(3), 337-349.
- Klaenhammer, T. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39-85.
- Kollath, W. 1953. Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. 8(11), Suppl 7-16.
- Kosciuczuk, EM., Lisowski, P., Jarczak, J., Strzał-kowska, N., Jozwik, A., Horbanczuk, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., ve Bagnicka, E. 2012. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep*, 39, 10957-70.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lau, QY., Li, J., Sani, MA., Sinha, S., Kang, C., Bhattacharjya, S., Separovic, F. ve Verma, C. 2018. Elucidating the bactericidal mechanism of action of the linear antimicrobial tetrapeptide BRBR-NH<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860, 1517-27.
- Lazzaro, B. P., Zasloff, M., ve Rolff, J. 2020. Antimicrobial peptides: application informed by evolution. *Science*, 368:5480. doi: 10.1126/science.aau5480.
- Leroy, F., ve de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol*, 15; 67-78.
- Lilly, D.M. ve Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, 147, 747-748.
- Limsowtin, G. K. Y., Broome, M. C. ve Powell, I.B., 2002. Lactic acid bacteria, taxonomy, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp. 1470-1478.
- Luchansky J. Muriana, P. and Klaenhammer, T. 1998. Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Molecular Biology*, 2, 5.
- Lues, J., Ikalafeng, B., Maharaso1, M., Shale1, K., Malebol, N. ve Pool, E. 2011. *Staphylococci* and other selected microbiota associated with indigenous traditional beer. *Academic Journals*, 5 (13), 1691-1696.
- Magnússon, M., Tryggvason, Gíslason, H. ve Jónasson, J. 2005. Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: The Icelandic GIST study, a population-

- based incidence and pathologic risk stratification study. *International Journal of Cancer*, 117,2.
- Marounek, M., Skřivanová, E., Molatová, Z., Matěnová, M. ve Houf, K. 2011. Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (3-5), 367-371.
- Mathur, S. ve Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 281-295.
- Metchnikoff, E. In: Mitchell PC. editor. *The Prolongation of Life. Optimistic Studies*. New York: G P Putnam's Sons; (1910). 96 p.
- Moll, G., Konings, W. ve Driessen, A. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Springer*, 76, 185-198.
- Moravej H, Moravej Z, Yazdanparast M, Heiat M, Mirhosseini A, Moosazadeh Moghaddam M. ve Mirnejad R. 2018. Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 24, 747-67.
- Naidu, A. 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*. United States of America: CRC Press.
- Narayan, N., Roychoudhury, P. ve Srivastava, A. 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7, 2.
- Nes, I., Diep, D. ve Holo, H. 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus Enterococcus*. *ASM Journals, Journal of Bacteriology*, 189, 4.
- Oppegård, C. Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G., ve Nissen-Meyer, J. 2007. The Two-Peptide Class II Bacteriocins: Structure, Production, and Mode of Action. *Journal Microbiology Biotechnology*, 13,4.
- O'Shea, J., Holland, S. ve Staudt, L. 2013. JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 368, 161-170
- Osmanağaoğlu, Ö. ve Kıran, F. 2011. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/ Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(1), 62 – 74.
- Osmanağaoğlu, Ö. 2002. The Use of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria in Food Biopreservation. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 32(3-4), 295-306.
- Ouwehand, A. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition*. United States of America: Marcel Dekker.
- Özen, M. 2011. Sağlıklı Kalmak İçin Probiyotikler ve Prebiyotikler Anlatılmayan Tarihçe, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Pessione, E. 2016. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *LAB Bioactive Compounds in Food* 876 (7).

- Prescott, C.S. and Dunn, G.C. 1987. *Industrial Microbiology*, Published on Distributors, Delhi, India, 882.
- Rathinakumar R, Wimley WC. 2010. High-throughput discovery of broad-spectrum peptide antibiotics. *FASEB J*, 24, 3232-8.
- Ray, P. and Liewen, M. B. 2004. Antifungal food additives in Arora, D. K., Bridge, P. D. ve Bhatnagar, D., eds, *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications*, Marcel Dekker Inc., 291-297, New York.
- Rayner, J. and Gavin J. Wright, G. 2011. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 480, 534–537.
- Reis, J., Paula, A., Casarotti, S. and Penna, A. 2012. *Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications*. Springer Science- Business Media, 4,124–140.
- Riley, M. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics*, 32:255-278.
- Rodriguez, M. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation*, 28, 1.
- Salim, Ammor, M., Belen, F. ve Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Schaafsma, G., 1996. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutrition News*, 5, 23-24.
- Shelef, L. A. ve Seiter, J. 2005. Indirect and miscellaneous antimicrobials in Davidson, P. M., Sofos, J. N. ve Larry, B. A., eds, *Antimicrobials in Food*, 573-598. Boca Raton, FL.
- Skaugen, M., Cintas, L. ve Nes, I. F., 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: *Genetic of Lactic Acid Bacteria*. Eds. Wood, B., Warner, P. J., Book Series: *The Lactic Acid Bacteria*, Vol. 3. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 225-249.
- Sonomoto, K., Zendo, T. and Yoneyama, F. 2010. Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 1–9.
- Starr CG, Maderdrut JL, He J, Coy DH, ve Wimley WC. 2018. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent broad-spectrum antimicrobial peptide: structure-activity relationships. *Peptides*, 104, 35-40.
- Stiles, M., and Holzapfel, W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1–29.
- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A. and Schnürer, J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. *ASM Journals Applied and Environmental Microbiology*, 68, 9.
- Suskovic, J. 2010. Antimicrobial Activity - The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 3.

- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Vannamaker, L.V. 1976. Bacteriocin of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40; 721-756.
- Tang, Y. W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith D. H., Dodge, D. and Persing, D. H. 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (12), 3674-3679.
- Tannock, L., O'Brien, K., Knopp, R., Retzlaff, B., Fish, B., Wener, M., Kahn, S. ve Chait, A. 2005. Cholesterol Feeding Increases C-Reactive Protein and Serum Amyloid A Levels in Lean Insulin-Sensitive Subjects. *American Heart Association Journals*, 111, 23.
- Theron, M. M. and Lues, J. F. R., 2011. Organic acids and food preservation. CRC Press, ABD. 21-95.
- Tulini, F., Lohans, C., Bordon, K., Zheng, J., Arantes, E., Vederas, C. and De Martinisa, E. 2014. Purification and characterization of antimicrobial peptides from fish isolate *Carnobacterium maltaromaticum* C2: Carnobacteriocin X and carnolysins A1 and A2. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 81–88.
- Üner, A. 2012. Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddelerin Gıda Patojeni Olarak Mayalar Üzerinde Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Vesterlund, S., Palta, J., Lauková, A., Karp, M. ve COuwehand, A. 2004. Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. *Journal of Microbiological Methods*, 57(1), 23-31.
- Vinderola, C.G. ve Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36; 895-904.
- Yang, R., Johnson, M.C. ve Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (10), 3355-3359.
- Willey, J. ve Van der Donk, W. 2007. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annual Review of Microbiology*, 61, 477-501.
- Wassenaar, T.M. ve Klein, G. 2008. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements. *Journal of Food Protection*, 71(8), 1734-1741.
- Waters, C.M. ve Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319-346.
- Wood, B.J.B. ve Holzapfel, W.H. 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic & Professional, London.
- Zanetti M. 2004. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 75, 39-48.
- Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J. ve Huang, G. 2018. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 781-789.