

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYOSİN ÜRETİCİSİ LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİ İÇİN DOĞAL GELİŞME ORTAMI
FORMÜLASYONU VE FERMENTASYON
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Aslı POLAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı

Danışman
Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Eş Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Furkan DEMİRGÜL

Temmuz, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAKTERİYOSİN ÜRETİCİSİ LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİ İÇİN DOĞAL GELİŞME ORTAMI
FORMÜLASYONU VE FERMENTASYON
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

Aslı POLAT tarafından hazırlanan tez çalışması 31.07.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **YÜKSEK LİSANS** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Furkan DEMİRGÜL
Doğuş Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Görkem ÖZÜLKÜ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Özge TAŞTAN, Üye
Yeditepe Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Bakteriyosin Üreticisi Laktik Asit Bakterileri İçin Doğal Gelişme Ortamı Formülasyonu ve Fermantasyon Koşullarının Optimizasyonu” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Aslı POLAT

İmza

TEŞEKKÜR

Bilimsel çalışma disiplinini öğrenmemde ve akademik gelişimimde büyük emeği olan, çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren, karşılaştığım her zorlukta hoşgörüsüyle bana destek veren ve öğrencisi olmaktan her zaman mutluluk duyacağım değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e,

Çalışmam süresince yardımını esirgemeyen değerli eş danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Furkan DEMİRGÜL'e

Laboratuvar günlerini birlikte geçirdiğim sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmam boyunca bütün sıkıntıları dinleyip çalışmaya teşvik eden, eğitimimin her aşamasında beni maddi ve manevi destekleyen sevgili aileme,

Çalışmalarım boyunca her türlü sıkıntımı paylaştığım, uzun yıllardır aynı yolları birlikte yürüdüğümüz sevgili arkadaşlarım Kardelen ERYILDIZ, Ceren ÖZBAĞCI ve Ceyda ARIKAN'a,

Tez çalışmamın zorlu günlerinde minicik kalbiyle beni cesaretlendiren biricik yeğenim Betül POLAT'a,

Deneysel çalışmaların yapılabilmesine imkân veren Yıldız Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Aslı POLAT

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Laktik Asit Bakterileri	1
1.1.2 Bazı Önemli Laktik Asit Bakterileri	3
1.1.3 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bazı Antimikrobiyal Bileşikler.....	4
1.1.4 Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması	8
1.1.5 Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması	10
1.1.6 Biyokoruma Kapsamında Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler	11
1.1.7 Laktik Asit Bakterilerinin Doğal Ortamda Geliştirilmesi	12
1.2 Tezin Amacı	13
2 MATERYAL-METOT	14
2.1 Materyal	14
2.1.1 Bakteri Suşları ve Kültür Ortamları	14
2.1.2 Fermantasyon Ortamı Olarak Kullanılan Gıda Bileşenleri	14
2.2 Metot	14
2.2.1 Araştırma Planı ve Örneklem	15
2.2.2 Biyoreaktör Çalışma Koşulları	17
2.2.3 Besiyeri Hazırlanması	19
2.2.4 Antimikrobiyal Aktivite Tayini	20
2.2.5 Mikrobiyal Ekim	21
2.2.6 Glikoz Tayini	21
2.2.7 Optimum Koşullarda Üretim	22
2.2.8 Metabolitlerin Taşıyıcıya Yüklenmesi ve Kurutulması	23
2.2.9 Fermantasyon Tozlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti	24
3 BULGULAR VE TARTIŞMA	25
3.1 Araştırma Planı ve Örneklem	25

3.2 Yumuşak Agar Yöntemi ile Sıvı Fermentlerde Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	28
3.3 Mikrobiyal Ekim Sonuçları ve Glikoz Tayini	31
3.4 Optimum Üretim Sonuçları	33
3.5 Yumuşak Agar Yöntemi ile Fermantasyon Tozlarının Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	34
3.6 Bağımsız Değişkenlerin Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi	36
3.6.1 DPST Konsantrasyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi ..	36
3.6.2 Soya Küspesi Konsantrasyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi.....	38
3.6.3 Glikoz Şurubu Konsantrasyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi.....	39
3.6.4 Soya küspesi-DPST, Glikoz Şurubu-DPST, Soya Küspesi-Glikoz Şurubu İnteraksiyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi	41
4 SONUÇ	45
4.1 Sonuç	45
KAYNAKÇA	47
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	57

KISALTMA LİSTESİ

ATP	Adenozin trifosfat
CCD	Central Composite Design
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPST	Demineralize Peynir Altı Suyu Tozu
FAO	Gıda ve Tarım Organizasyonu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
GRAS	Generally Recognized as Safe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LAB	Laktik Asit Bakterileri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
dk	Dakika
g	Gram
IU	International Unit
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
N	Normalite
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
ppm	Milyonda bir birim
µL	Mikrolitre

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Çalışmada gerçekleştirilen biyoreaktör uygulamaları	18
Şekil 2. 2. Fermantasyon sonucu elde edilen fermentler	19
Şekil 2. 3. Besiyerinin hazırlanması süresince gerçekleştirilen basamaklar	20
Şekil 2. 4. Antimikrobiyal aktivite analizi süresince gerçekleştirilen basamaklar	21
Şekil 2. 5. Standart glikoz eğrisi	22
Şekil 2. 6. Standart nisin eğrisi	25
Şekil 3. 1. Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.....	27
Şekil 3. 2. Denemelere ait zon görüntüleri.....	31
Şekil 3. 3. Optimum üretime ait sonuçlar.....	33
Şekil 3. 4. Farklı yüklemelere ait zon görüntüsü.....	35
Şekil 3. 5. DPST konsantrasyonunun antimikrobiyal aktiviteye etkisi (g/L).....	36
Şekil 3. 6. Soya küspesi konsantrasyonu (g/L).....	38
Şekil 3. 7. Glikoz şurubu konsantrasyonu (g/L).....	40
Şekil 3. 8. Antimikrobiyal aktivite üzerine soya küspesi-DPST interaksiyonunun etkisi.....	41
Şekil 3. 9. Antimikrobiyal aktivite üzerine glikoz şurubu-DPST interaksiyonunun etkisi.....	42
Şekil 3. 10. Antimikrobiyal aktivite üzerine glukoz şurubu-soya küspesi interaksiyonunun etkisi.....	42

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. Fermantasyon tozu üretimi için faktörlerin kodlanmış seviyeleri	15
Tablo 2. 2. Deneme Deseni Tablosu	16
Tablo 2. 3. Üretim plan çizelgesi	23
Tablo 3. 1. Model için hesaplanan istatistiksel değerler	26
Tablo 3. 2. Modele ait istatistiksel veriler	27
Tablo 3. 3. Antimikrobiyal aktivitenin deneysel verileri	29
Tablo 3. 4. 24 saatlik fermentasyonun ardından biyoreaktörden alınan örneklerin bakteri sayıları ve rezidü glikoz miktarları	32
Tablo 3. 5. Optimum üretime ait sonuçlar	33
Tablo 3. 6. Fermentasyon süresine göre kinetik değerler	34
Tablo 3. 7. Fermentasyon tozlarına ait antimikrobiyal aktivite sonuçları	35
Tablo 3. 8. Peynir altı suyu ortamlarının bileşimi [82]	37
Tablo 3. 9. Nisin üretiminde yenilikçi yaklaşımlar	43

BAKTERİYOSİN ÜRETİCİSİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ İÇİN DOĞAL GELİŞME ORTAMI FORMÜLASYONU VE FERMENTASYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Aslı POLAT

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Eş-Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Furkan DEMİRGÜL

Bu tez çalışmasında, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 suşu kullanılarak antimikrobiyal fermentasyon tozlarının üretilmesi için etkili olan fermentasyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Optimizasyon işlemleri biyoreaktör ortamında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sıvı fermentler, uygun taşıyıcılara belirli oranlarda yüklenmiş ve püskürtmeli kurutucu ile toz formuna getirilmiştir.

Biyoreaktörde gerçekleştirilen çalışmanın ilk aşamasında, antimikrobiyal aktivite üzerine etkili olan demineralize peynir altı suyu tozu (DPST), soya küspesi ve glikoz şurubu konsantrasyonları yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Fermentasyon koşullarının optimizasyonu için bağımsız değişkenlerin sınır değerleri DPST konsantrasyonu için 50 ile 100 g/L, soya küspesi konsantrasyonu için 20 ile 50 g/L, glikoz şurubu konsantrasyonu içinse 5 ile 50 g/L olarak belirlenmiştir. Merkezi Bileşik Tasarımı (Central Composite Design, CCD) yöntemi kullanılarak belirlenen parametreler ile orta noktanın 6 kez tekrar

edildiği toplam 20 denemeden oluşan bir deneme deseni oluşturulmuştur. Fermantasyon ortamından alınan örnekler aracılığıyla fermentasyon sũresince ortamda kalan glukoz miktarı, mikrobiyal gelişim ve antimikrobiyal aktivite takip edilmiştir.

DPST konsantrasyonunun 50 g/L değerinden 100 g/L değerine artırılması ile antimikrobiyal aktivitenin bir miktar yũkseldiđi ancak daha sonra dũřtũđũ, soya kũspesi konsantrasyonunun 20 g/L değerinden 50 g/L değerine artırılması ile antimikrobiyal aktivitenin yũkseldiđi, glikoz şurubu konsantrasyonunun 5 g/L değerinden 50 g/L değerine artırılması ile antimikrobiyal aktivitenin yũkseldiđi gũzlemlenmiřtir. Optimum fermentasyon ortamı konsantrasyonlarının DPST için 100 g/L, soya kũspesi için 50 g/L ve glikoz şurubu içinse 50 g/L olduğu belirlenmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen validasyon fermentasyonuyla ũretilen sıvı fermentin antimikrobiyal aktivitesinin *M. luteus*'a karşı 9120 IU/mL olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, en yũksek antimikrobiyal aktivite gũsteren sıvı ferment %5-10-15-20-30 oranlarında DPST'ye ve %1-3-5-10-15-20-30 maltodekstrine yũklenerek pũskũrtmeli kurutucu ile kurutulmuştur. En yũksek antimikrobiyal aktiviteye sahip yũkleminin %5 oranında maltodekstrin olduğu tespit edilmiştir.

Bu alışma ile DPST, soya kũspesi ve glikoz şurubu gibi gıda sanayii atıklarından dũřũk maliyetli antimikrobiyal ȳzellikte fermentler ũretilbileceđi gũsterilmiř olup, ileri çalışmalarla konsantrasyon dışında diğer fermentasyon parametrelerinin de optimize edilmesiyle elde edilecek antimikrobiyal fermentlerin ticarileşme potansiyelleri bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Lactococcus lactis*, nisin, antimikrobiyal aktivite, atık yȳnetimi, sũrdũrũlebilirlik

NATURAL GROWTH MEDIUM FORMULATION AND OPTIMIZATION OF FERMENTATION CONDITIONS FOR BACTERIOCIN PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA

Aslı POLAT

Department of Food Engineering
Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Furkan DEMİRGÜL

This thesis aims to optimize the fermentation conditions effective for producing antimicrobial fermentation powders using *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 strain. Optimization processes were carried out in a bioreactor environment. The obtained liquid fermentations were loaded onto suitable carriers in specific proportions and then converted into powder form using a spray dryer.

In the first phase of the study conducted in the bioreactor, the concentrations of demineralized whey powder (DPST), soy flour, and glucose syrup that affect antimicrobial activity were optimized using response surface methodology. The boundary values for the independent variables for optimizing the fermentation conditions were set at 50 to 100 g/L for DPST concentration, 20 to 50 g/L for soy flour concentration, and 5 to 50 g/L for glucose syrup concentration. A design of experiments consisting of a total of 20 trials, including six replications of the center point, was created using the Central Composite Design (CCD) method. During the fermentation process, glucose levels in the fermentation medium,

microbial growth, and antimicrobial activity were monitored through samples taken from the fermentation environment.

It was observed that increasing the DPST concentration from 50 g/L to 100 g/L resulted in a slight increase in antimicrobial activity, which then decreased. Increasing the soy flour concentration from 20 g/L to 50 g/L led to an increase in antimicrobial activity, and increasing the glucose syrup concentration from 5 g/L to 50 g/L also resulted in higher antimicrobial activity. The optimum fermentation medium concentrations were determined to be 100 g/L for DPST, 50 g/L for soy flour, and 50 g/L for glucose syrup. The antimicrobial activity of the liquid fermentation produced under optimal conditions was found to be 9120 IU/mL against *M. luteus*.

In the second phase of the study, the liquid fermentation showing the highest antimicrobial activity was loaded onto DPST in the ratios of 5-10-15-20-30% and onto maltodextrin in the ratios of 1-3-5-10-15-20-30%, then dried using a spray dryer. It was determined that the loading with 5% maltodextrin had the highest antimicrobial activity.

This study demonstrates that antimicrobial fermentations with low cost can be produced from food industry wastes such as DPST, soy flour, and glucose syrup. Further research and optimization of other fermentation parameters, in addition to concentration, may enhance the commercial potential of the antimicrobial fermentations obtained.

Keywords: *Lactococcus lactis*, nisin, antimicrobial activity, waste management, sustainability

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Laktik Asit Bakterileri

Fermentasyon işlemi, henüz mikroorganizmaların varlığı bilinmiyorken dahi gıda üretiminde kullanılan en eski yöntemler arasında yer almaktadır. Ekmek, yoğurt, peynir, soya sosu, sirke, bira ve şarap gibi birçok fermente gıda uygarlığın gelişiminden bu yana insan beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Gıdaların raf ömrünün uzatılmasını ve aynı zamanda gıdalara istenilen özelliklerin kazandırılmasını sağlamak noktasında fermentasyon teknolojileri gıda endüstrisi için oldukça önemlidir [1]. Dünya mutfaklarına ait olan pek çok fermente gıdanın üretiminde laktik asit bakterileri (LAB) tarafından gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundan yararlanılmaktadır.

GRAS (Genel Olarak Güvenilir) olarak kabul edilen LAB türleri arasında bazıları insan bağırsaklarının doğal mikroflorasında yer almakta ve gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır [2]. LAB, en genel tanımıyla glukoz, laktoz ve sükroz gibi çeşitli karbonhidratları fermente ederek laktik asit üretebilen mikroorganizmalar olup, şu anda fermente gıda üretiminde starter veya koruyucu kültür olarak yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. LAB türleri genellikle kısa ve uzun çubuk veya kok şekilli olmak üzere farklı morfolojik özellikler göstermektedir [3]. LAB, 10-45°C sıcaklık aralığında ve nispeten yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilen, asit veya alkali koşullara tolerans gösterebilen mikroorganizmalar olarak bilinmektedir [4].

Tüketicilerin sentetik koruyucular ve sağlık üzerindeki olumsuz etkileri konusunda artan ön yargıları nedeniyle, mikroorganizmalar ve bunların ürettiği metabolitlerin gıda korumasında “doğal koruyucu” olarak kullanımı son yıllarda önemli bir ilgi görmektedir [5]. Gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimi ve istenmeyen bileşiklerin oluşumu, fermentasyon süresince fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmaların faaliyetleri ve üretmiş oldukları çeşitli metabolitler aracılığıyla engellenebilmektedir. Bu durum gıdalara sentetik

koruyucuların eklenmesini engellemekte ya da kullanım miktarlarının azaltılmasına neden olabilmektedir [6] . Bu kapsamda LAB türlerinin ürettiği çeşitli metabolitler son yıllarda oldukça önem kazanmıştır [7].

LAB tarafından üretilen çeşitli metabolitler bozulma ve hastalık yapıcı mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite sayesinde hem gıda güvenliği hem de gıda güvencesi açısından büyük öneme sahiptir [8] . Fermente gıdaların üretiminde starter veya koruyucu kültür olarak kullanılan çeşitli LAB türlerinin, gıdaların normal depolama koşullarında üretebildikleri organik asitler (laktik asit ve asetik asit gibi), düşük molekül ağırlıklı bileşikler (diasetil ve yağ asitleri gibi), antifungal bileşikler (fenil laktat, propiyonat ve hidroksifenil laktat gibi), bakteriyosinler (nisin, pediosin ve enterosin gibi), alkoller, karbondioksit, ve hidrojen peroksit gibi metabolitler sayesinde ürünün duyuusal özelliklerini bozmadan gıdada gelişmesi istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini önleyebildiği bilinmektedir [9, 10] . Konuyla ilgili yapılan çalışmalar, LAB ve/veya LAB tarafından üretilen metabolitlerin, *Listeria monocytogenes*, [11], *Bacillus cereus* [12] ve *Salmonella enterica serovar Typhimurium* [13] gibi çeşitli gıda kaynaklı patojenlere ve ayrıca gıda sanayiinde önemli sorunlara neden olmasının yanında antibiyotik dirençliliğin artmasına da katkıda bulunan patojenik biyofilmlere [14] karşı etkili olduğunu göstermektedir. LAB tarafından üretilen organik asitlerin, hücre zarındaki yağı çözerek hücre zarına nüfuz ettiği ve hücre içinin normalde nötr olan pH'ını düşürüp hücrenin inaktivasyonuna sebep olarak etki gösterdiği bilinmektedir [15] . Bununla birlikte, LAB tarafından üretilen antimikrobiyal metabolitlerden bazılarının etki mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamış olup, konuyla ilgili yapılacak ileri çalışmalarla bu metabolitlerin patojenlerle mücadelede daha etkin kullanılmaları sağlanabilir.

LAB, fermentasyon son ürünlerine göre iki gruba ayrılmaktadır. Homofermantatif LAB, son ürün olarak yalnızca laktik asit üretirken, heterofermantatif LAB, laktik asitle birlikte karbondioksit, etanol ve asetik asit gibi farklı bileşikler de üretebilmektedir. Homofermantatif LAB Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolunu, heterofermantatif LAB ise pentoz fosfat yolunu tercih etmektedir [5] . 60'tan fazla cins içermesine rağmen [3] LAB cinsleri arasında *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*,

Streptococcus, *Enterococcus* ve *Weissella* gibi cinsler gıda fermentasyonlarında önemli yere sahiptir [16]

1.1.2 Bazı Önemli Laktik Asit Bakterileri

1.1.2.1 *Lactobacillus* spp.

Gram pozitif ve mikroaerofilik bakterilerdir. Genel olarak katalaz negatif özellik göstermektedir [17]. Spor oluşturmazlar ve hareketsizdirler. Homofermentatif türleri laktik asit üretirken, heterofermantatif türleri eş molar miktarda laktik asit, CO₂, etanol ve asetik asit üretmektedir. Gıdaların fermentasyonunda sıklıkla kullanılan bu bakterilerin kullanıldığı en yaygın ürün grupları hububat ürünleri, meyve ve sebzeler, süt ve bazı süt ürünleridir [18].

1.1.2.2 *Lactococcus* spp.

Fakültatif anaerobik ve mezofilik özellik gösteren bu cinse üye türler, Gram pozitif, katalaz negatif, homofermentatif ve sporsuz bakterilerdir. Özellikle peynir ve tereyağı gibi fermente gıdalarda büyük rol oynayan bu bakteriler güvenli bir geçmişe sahip olmalarından ve aynı zamanda bazı türlerinin nisin ve laktisin gibi bakteriyosinleri üretebilmesinden dolayı gıdalarda koruyucu kültür olarak da kullanılabilmektedir [19, 20].

1.1.2.3 *Pediococcus* spp.

Gram pozitif, katalaz negatif ve homofermantatif olan bu türler spor oluşturmamaktadır. Bazı türleri, çeşitli sebze turşularında ve zeytin fermentasyonlarında starter kültür olarak kullanılmalarının yanında gıda patojenleri için de kontrol bariyeri olarak kullanılabilmektedir. Bazı türleri geniş bir pH aralığında aktivite gösteren antimikrobiyal özelliğe sahip pediosin adlı bakteriyosin üretmektedir. Bu bakteriyosin istenmeyen mikroorganizmaların inhibe edilmesinde rol oynamaktadır [21].

1.1.2.4 *Enterococcus* spp.

Gram pozitif, katalaz negatif ve fakültatif anaerob bakterilerdir. İnsan ve sıcak kanlı hayvan bağırsaklarında bulunabilmesi, bu bakterilerin fekal indikatör olarak kullanılmasına neden olmuştur. *E. faecalis* gibi bazı türleri fırsatçı patojen olarak değerlendirilmektedir. Sucuk, peynir ve turşu gibi gıdaların üretiminde starter

veya koruyucu kültür olarak kullanılmaktadır. Bazı türleri enterosin isminde bakteriyosinler üretebilmektedir [22].

1.1.2.5 *Leuconostoc* spp.

Gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerob, heterofermantatif ve sporsuz olan bu bakteriler, glukozun fermentasyonu sonucu laktik asit, etanol, karbondioksit ve diasetil gibi bileşikler üretebilmektedir. Bazı türlerinin leukosin isminde bakteriyosin üretebilmesi, bu türlerin biyokoruyucu olarak kullanılabileceğini göstermektedir [23].

1.1.2.6 *Streptococcus* spp.

Bu cinsin üyeleri, katalaz negatif, Gram pozitif, hareketsiz, genellikle fakültatif anaerobik ve homofermentatiflerdir. Yoğurt fermentasyonunda rol alan bir *Streptococcus* türü (*S. thermophilus*) olmasına rağmen öldürücü ya da ciddi hastalıklara da sebep olabilen patojen türleri (*S. mutans*, *S. pneumoniae* gibi) de mevcuttur [24].

1.1.3 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bazı Antimikrobiyal Bileşikler

Fermentasyon, diğer uygulamaların yanı sıra gıda, çevre, enerji ve tıbbi destekleyen endüstriyel biyoteknolojinin temel teknolojilerinden birisidir. Daha düşük çevresel etki ile yüksek verimlilikte gıda bileşenleri üretmek için mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Fermentasyon işlemi ile gıdaların korunmasının yanı sıra değerli biyoaktif bileşikler de üretilmektedir [25]. Uygun mikroorganizmaları seçerek fermentasyon süreçlerini optimize etmek, enzimler, vitaminler, katkı maddeleri ve antimikrobiyaller gibi bileşiklerin daha az çevresel etki ile üretilmesine olanak tanımaktadır. Bu bağlamda, gerekli kaynakları ve üretilen atıkları azaltarak sürdürülebilir teknolojilere katkı sağlamak amacıyla mikroorganizmaların ve ortamların uygun olarak seçilmesi önem arz etmektedir [26].

LAB türleri tarafından başta laktik ve asetik asit gibi organik asitler olmak üzere farklı antimikrobiyal bileşikler üretilmektedir.

1.1.3.1 Organik Asitler

Organik asitler, sebzeler, et ve süt gibi birçok gıdada doğal olarak bulunabildikleri gibi fermentasyon süreci boyunca mikroorganizmalar tarafından da sentezlenebilmektedir. Bu asitler, gıdanın pH değerini düşürerek hem doğal olarak var olan hem de çevreden bulaşan mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyici bir etki göstermektedir. Bu durum, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini sınırlandırarak, gıda güvenliğinin artırılmasına ve gıdanın raf ömrünün uzatılmasına katkıda bulunmaktadır [27].

Mikroorganizmalar tarafından üretilen asetik asidin diğer organik asitlere göre daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Asetik asidin pKa değeri (3,86) laktik asidin pKa değerine (4,75) kıyasla daha yüksek olduğu bilinmektedir [28] . Ancak LAB tarafından asetik asit üretimi diğer organik asitlere kıyasla en düşüktür [29].

Organik asitlerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi üç etkiye bağlanmaktadır:

1. Güçlü asitler, düşük pH seviyeleri nedeniyle hücresel enzimler üzerinde denatürasyon etkisi göstererek inhibitör bir etki oluşturmaktadır. Bu etki, enzimlerin işlevlerini bozarak hücre üzerinde olumsuz bir etki yaratmaktadır. Ayrıca, hücre içi ve dışı arasında büyük bir pH gradienti olduğunda, hücre zarının proton geçirgenliği sonucunda sitoplazmik pH'nın düşmesine neden olabilmektedir. Bu durum, hücre içi ve dışı pH dengesizliklerinin neden olduğu hücresel homeostazın bozulmasına yol açabilmektedir.

2. Zayıf asitler; sitoplazmik pH'ı düşürerek antimikrobiyal etki göstermektedir. Fakat disosiye olmamış formları da metabolizma üzerinde inhibitör etkiye sahip olmaktadır.

Organik asitlerin pH'ı düşürmesiyle sülfid, nitrat ve karbonat gibi iyonlar antimikrobiyal etki gösterebilmektedir [29].

1.1.3.2 Hidrojen Peroksit

LAB, oksijen, laktat, pirüvat ve NADH'nin bulunduğu ortamlarda antimikrobiyal bir bileşik olan hidrojen peroksiti sentezleyebilmektedir [30] . Bu bileşik, çeşitli gıdalardaki istenmeyen mikroorganizmaların inaktivasyonu için etkili ve basit bir

yöntem olarak kullanılmaktadır. Hidrojen peroksitin geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu, mayalar, küfler, virüsler ve bakteri sporları gibi çeşitli mikroorganizmalara karşı antogonistik etki gösterdiği bilinmektedir. Bu etkinin, hidrojen peroksidin metabolik işlemlerde rol alan enzimlerin sülfidril gruplarını etkileyerek disülfid köprüleri oluşturmasıyla meydana geldiği düşünülmektedir [31].

Hidrojen peroksitin bakteri membranlarını bozma kabiliyeti, özellikle Gram pozitif bakterilerde önemli bir etkiye sahiptir. Örneğin, *Escherichia coli* gibi bakterilerde DNA üzerinde denatüre edici etkiye sahip olabilmekte ve kromozomik replikasyonu engelleyerek nükleotit bazlarını açığa çıkararak DNA zincirinde kırılmalar meydana getirebilmektedir [32].

1.1.3.3 Diasetil

Streptococcus, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Oenococcus* gibi belirli türlerin ve suşların ürettiği diasetil, tereyağı kokusuyla tanınan sıvı bir bileşiktir. Bu bileşik, tereyağı ve diğer süt ürünlerinin yanı sıra kırmızı ve beyaz şarap, kavrulmuş kahve gibi çeşitli fermente gıdalarda da bulunabilmektedir [33].

Diasetil, mayalar, Gram negatif bakteriler ve LAB haricindeki Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermektedir. GRAS statüsünde olmasına rağmen, gıda katkı maddesi olarak kullanımı sınırlıdır. Antimikrobiyal etkinin sağlanabilmesi için yüksek miktarlarda kullanılması gerekmektedir. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda diasetil kullanımı ürünün duyu özelliklerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle, yüksek uçuculuğu nedeniyle diasetilin yüzey temizliğinde kullanılması önerilmektedir [34].

1.1.3.4 Reuterin

Reuterin, heterofermantatif *Limosilactobacillus reuteri* türü tarafından üretilen, düşük molekül ağırlıklı ve yüksek çözünürlüklü bir maddedir. Reuterin, DNA sentezi üzerinde etkili olan ribonükleotid redüktazın alt birimini bağlayıcı bir inhibitör olarak rol oynamaktadır. Bu özellikleriyle *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* ve *Trypanosoma* gibi çeşitli cinsler üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir [35].

L. reuteri suşları probiyotik olarak kullanıldığında, konakçıyı mikrobiyolojik, kimyasal ve fiziksel streslere karşı koruma sağlamaktadır. Bu suşların kullanımı, kolesterol seviyelerinin düşürülmesine, bağışıklık sisteminin düzenlenmesine ve çeşitli olumlu sağlık etkilerinin elde edilmesine yardımcı olmaktadır [36].

1.1.3.5 Karbondioksit

Karbondioksit, anaerobik bir ortam oluşturarak enzimatik dekarboksilasyonu inhibe etmekte ve lipid membran yapısında birikerek membranın geçirgenliğini bozmaktadır [36]. Karbondioksitin potansiyel antimikrobiyal etkisi onu et ürünlerinin ambalajlanması için kuvvetli bir bileşen haline getirmektedir. *Pseudomonas* spp gibi bazı aerobik Gram-negatif bakterilerin büyümesini önemli ölçüde inhibe edebilir [37].

1.1.3.6 Bakteriyosinler

Çeşitli bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen ve antimikrobiyal etkiye sahip olan peptitler, bakteriyosin olarak adlandırılmaktadır. Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenerek çevreye salgılanmakta ve genellikle üretici türe yakın türlerin inhibisyonunda etkili olmaktadır. Kısa ve uzun zincirli yapıdaki peptitlerden oluşan bu moleküller, gastrointestinal sistemde proteaz enzimlerinin etkisiyle inaktif hale gelmektedir [38].

1925 yılında Gratia, *E. coli*'nin bir suşunun diğer kültürlerine karşı bir madde ürettiğini keşfetmiştir. Bu madde daha sonra 1946 yılında Gratia ve Fredricq tarafından "colicine" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, 1953 yılında genel bir terim olarak "bakteriyosin" terimi kullanılmıştır [36].

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar, bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak faydalı özellikler sergilediğini ortaya koymuştur. Bakteriyosin ilavesi ile gıdaların raf ömrünün uzatılabildiği ve gıdalarda mikrobiyal bozulmalardan kaynaklanan ekonomik kayıpların azaltılabildiği gözlemlenmiştir [39].

Lactobacillus acidophilus tarafından üretilen acidophilin ve lactocidin, *L. plantarum* tarafından üretilen lactolin veya *L. lactis* tarafından üretilen nisin gibi bakteriyosinler, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *B. cereus*, *Clostridium perfringens* gibi gıda kaynaklı patojen bakterileri inhibe etmektedir. Ayrıca, bazı Gram negatif bakteriler üzerinde de etkili oldukları rapor edilmiştir [40].

Bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanılmasının temel nedenleri arasında, bu maddelerin GRAS statüsünde olmaları, ökaryotik hücrelere karşı toksik etki göstermemeleri ve bakterilerin direnç geliştirmelerinin zor olması gibi nedenler yer almaktadır [41].

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar yapılabilmektedir. Ancak genel olarak, Klaenhammer [42] tarafından önerilen ve Nes vd [43] , tarafından modifiye edilen sınıflandırma, birçok araştırmacıdan kabul görmüştür. Bu sınıflandırmada bakteriyosinler dört ana gruba ayrılmaktadır. Ancak biyokimyasal olarak ilk üç sınıf genellikle daha çok dikkate alınmaktadır.

1.1.4 Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Sınıflandırma ve bakteriyosinlerin taksonomisi yıllar içinde hızlı bir şekilde değişmiştir. İlk sınıflandırılan grup kolisinlerdir ve Fredericq (1957), tarafından önce reseptöre tutunma sonra da spesifik immunitelerine göre gruplara ayrılmıştır. Pek çok bakteriyosin, detaylı olarak incelenmiş ve sonuç olarak, direnç spektrumlarına göre alt sınıflara ayrılmışlardır [44].

Reeves [45] , bakteriyosin üreten türleri temel alarak, 16 ayrı bakteriyosin sınıfı oluşturmuştur. Bu sınıflandırma, aktivite spektrumuna göre değil, üretici organizmaya göre yapılmıştır.

Bradley [46] , bakteriyosinleri temel yapılarını baz alarak sınıflandırmıştır. Buna göre, bakteriyosinleri düşük ve yüksek molekül ağırlıklı bileşikler olmak üzere iki sınıfa ayırmıştır. İlk grup, küçük, ısıya dayanıklı, ultrasantrifügasyon ile çökmeyen ve elektron mikroskopuyla saptanmayan olurken, diğer grup ise, daha büyük, kolayca çökebilen, ısıya dayanıksız, tripsine dirençli ve elektron mikroskopuyla saptanabilir.

Klaenhammer [47] , Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinleri dört grupta sınıflandırmıştır.

Jack ve arkadaşları [48] bakteriyosinleri aktivite spektrumlarındaki disülfid ve monosülfid bağlarını temel alarak sınıflandırmıştır. Bu durumda bakteriyosinleri 4 grupta sınıflandırmıştır.

Cotter vd. [49] , yayınladıkları çalışmada bu sınıflandırma sistemini düzeltmeyi önermiştir. Önerilen sınıflandırmaya göre, bakteriyosinleri başlıca iki grup altında sınıflandırmışlardır. Sınıf 1 lantionin içeren lantibiyotikler iken, sınıf 2 ise

lantionin içermeyen bakteriyosinlerdir. Önceki sınıflandırmada yer alan ve sınıf 3 olarak bilenen hidrolazlar ise ‘Bakteriyolizinler’ olarak ayrıca sınıflandırılmıştır. Klaenhammer sınıflandırmasında yer alan 4. grupta yer alan bakteriyosinler ise aktivite için peptid olmayan bir kısma ihtiyaç duyan bakteriyosinlere ayrılmıştır. Fakat bu grupla ilgili yeterince bilgi olmadığından bu grup sınıflandırmaya dahil edilmemiştir.

1.1.4.1 Grup I Bakteriyosinler

Bu grupta yer alan bakteriyosinler daha fazla ‘lanthionine’ içermelerinden dolayı lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. 19-38 amino asit uzunluğunda küçük peptitlerdir. Yapılarında lanthionine (Lan) ve methyllanthionine (MeLan) amino asit türevlerini içermektedir. Bu kısımlar, amino asitler arasında kovalent köprüler oluşturmaktadır. Bunun sonucunda yapıda iç halkalar oluşmakta ve lantibiyotiğe kendine özgü özelliklerini kazandırmaktadır [46].

Molekül ağırlıkları 5kDa’dan daha düşüktür. Bu grubun en yaygın örneği nisindir. Nisinin iki varyasyonu nisin A ve nisin Z’dir. İki nisin varyasyonu da bir amino asit hariç benzer molekül yapıya sahiptir ve benzer bir antimikrobiyal aktivite göstermektedir [50]. Birçok çalışma nisinin *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *B. cereus* dahil olmak üzere farklı mikroorganizmalar ve LAB türleri üzerinde geniş bir antimikrobiyal etki sergilediğini göstermiştir. Nisin, geniş antimikrobiyal etki yelpazesi nedeniyle çeşitli teknolojik uygulamalarda kullanılabilir. 1969’da FAO/WHO, gıda uygulaması için güvenli olan tek bakteriyosin olarak nisini onaylamıştır. Nisin ayrıca Avrupa Birliği ülkelerinde E234 numaralı biyokoruyucu bileşen olarak kullanılmaktadır [51].

1.1.4.2 Grup II Bakteriyosinler

30-100 amino asit içeren, ısıya dirençli, lanthionine içermeyen peptitlerden oluşmaktadır. Molekül ağırlıkları 10kDa’dan küçüktür. Bu grupta yer alan bakteriyosinler grup 2a, grup 2b, grup 2c ve grup 2d olmak üzere dört alt gruba ayrılmıştır. Bu sınıfın en önemli grubu *Listeria spp.* üzerine inhibitör etkisi olan pediosindir [52]. Grup 2b bakteriyosinler, iki peptit içermekte ve tam aktivite göstermek için bu iki peptite de ihtiyaç duymaktadır. Grup 2c bakteriyosinleri siklik bakteriyosinlerdir. Grup 2d üyesi bakteriyosinler ise sözü edilen ilk üç grup içerisinde yer almayan diğer grup 2 üyesi bakteriyosinleri içermektedir [53].

Bu grupta yer alan bakteriyosinlerin çoğu membran geçirgenliğini arttırarak inhibitör etki göstermektedir. Bu sınıf için pek çok sınıflandırma yapılmış olsa da heterojen yapılarından dolayı sağlıklı bir sınıflandırma yapmak zor olmuştur. Tüm sınıflandırma sistemlerinde kabul gören 2 grup bulunmaktadır. Bunlar sınıf 2a pediosin benzeri ve sınıf 2b iki peptitli bakteriyosinlerdir [49]. Pediosin benzeri bakteriyosinler, *L. monocytogenes*'e karşı yüksek bir aktivite göstermesine rağmen aktivite spektrumu dardır [54]. İki peptitli bakteriyosinler her iki bakteriyosinin kombine çalışmasına gereksinim duymaktadır. Membran potansiyelini bozarak, iyonların kaçışına veya hücre içi ATP konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır [55].

1.1.4.3 Grup III Bakteriyosinler

Isıya duyarlı ve büyük moleküler ağırlığa sahip bakteriyosinlerdir. Moleküler büyüklükleri 30 kDa ve üzerindedir. Bu grubun bazı üyeleri *L. helveticus* tarafından üretilen helvetisin J ve helvetisin V-1829 ve *L. acidophilus* tarafından üretilen laktisin B'dir [53].

1.1.4.4 Grup IV Bakteriyosinler

Bu grupta yer alan bakteriyosinlerin biyolojik olarak aktif olabilmeleri için polipeptit yapısı dışında karbonhidratlar veya lipidler gibi ilave bazı yapılar içermeleri gerekmektedir. Plantarisin S, laktosin 27 ve lekonosin S bu grubun bazı üyeleridir [38].

1.1.5 Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması

Bakteriyosinlerin bakterisidal etkisi, bakteriyosinin uyguladığı etki mekanizması ve bakterinin hücre zarındaki spesifik bir reseptörü hedeflemesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Lantibiyotiklerin çoğu için geçerli olan ortak mekanizma peptidoglikan biyosentezinin inhibisyonudur. Hücre duvarı öncülü olan lipid II'ye bağlanarak peptidoglikan zincirinin büyümesi engellenmektedir [56].

Birçok bakteriyosin, hedef bakterilerin hücre zarı ile etkileşime girmelerini sağlayan fizikokimyasal ve yapısal özelliklere sahiptir [57]. Gözenek oluşumu, bakteriyosinler tarafından kullanılan en yaygın etki şekli olarak kabul edilmektedir. Gözenek oluşumu bakteriyosinler (pozitif yüklü) ile fosfolipitler (negatif yüklü) arasındaki elektrostatik çekim kuvveti ile gerçekleşmektedir. Bu konuda *L. lactis* tarafından elde edilen bir lantibiyotik olan nisin araştırılmıştır

[58] . Nisin, elektrostatik kuvvetler yoluyla negatif yüklü lipidlerle etkileşime girerek peptit agregasyonuna neden olmaktadır [59]. Negatif membran potansiyeli, nisinin C-terminal kısmının membran fosfolipit boyunca taşınmasını teşvik ederek gözenek oluşumuna neden olmaktadır [58] . Gözenek oluşumu membran geçirgenliğinde kaymaya neden olmakta, bu da proton itici kuvvetin kısmen ya da tamamen dağılmasına neden olarak hücre ölümüne yol açmaktadır [56].

1.1.6 Biyokoruma Kapsamında Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler

Çeşitli ekosistemlerde bulunan mikroorganizmalar, sulama suları, çiftlik çalışanları, böcekler, hayvanların dışkıları, hasat sonrası kaynaklar ve diğer gıdalardan kaynaklanan çapraz kontaminasyon dahil olmak üzere çeşitli şekillerde gıdaları kirletebilmektedir [60] . Mikrobiyal kontaminasyon nedeniyle gıda güvenliği ile ilgili sorunlar artmıştır. Gıdaları korumak, gıda kaynaklı enfeksiyonları azaltmak, gıdaların bozulmasından kaynaklanan ekonomik kayıpları azaltmak ve artan dünya nüfusunun gıda ihtiyaçlarını karşılamak için oldukça önemlidir [61].

Gıdaları korumak amacıyla kullanılan sentetik koruyucular mikrobiyal gelişmeyi yavaşlatabilmekte ve hatta durdurabilmektedir [62] ancak son yıllarda sentetik katkı maddeleri tüketicilerin ön yargılı tepkilerine maruz kalmakta ve tüketiciler sentetik katkı maddesi içermeyen doğal gıdalara yönelmektedir. Bu durum, minimum işlenmiş gıdalara yönelik artan taleple birlikte, araştırmacıları doğal koruyucu arayışına itmektedir [63].

Gıda işletmecileri ve tüketiciler, sentetik koruyucuları kullanmak yerine daha doğal alternatifler olarak fermentasyon işlemlerinden sonra elde edilen doğal antimikrobiyalleri kullanmayı tercih etmektedir [64].

Bakterilerde artan antibiyotik direnci küresel olarak ciddi bir sorun haline almıştır. Bu durum patojen bakterileri inhibe etmek için kullanılan antibiyotiklerin işlevselliğinin azalmasına yol açmıştır [65] . Tüketicilerin talepleri, gıda maddelerindeki patojenlerle etkili bir şekilde savaşabilecek yeni antimikrobiyal bileşiklerin keşfedilmesi için bakteriyosinler üzerine yoğun çalışmalara yol açmıştır. Gıda koruması, gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir endişe haline geldiğinden, gıda üzerinde olumsuz etkilere sebep olmadan gıdanın bozulmasını veya patojenlerin gelişmesini kontrol etmeyi amaçlayan bakteriyosin uygulamalarına büyük önem verilmektedir [66].

L. lactis subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin, FDA onayına sahip tek gıda koruyucu bakteriyosindir. Diğer bakteriyosinler arasında pediosin, sakasin, reuterin, laktisin, makedosin ve kolisin bulunur. Bunların çoğu Gram pozitif bakterileri inhibe eder bu nedenle nisinden çok daha dar antimikrobiyal spektruma sahiptir [67].

1.1.7 Laktik Asit Bakterilerinin Doğal Ortamda Geliştirilmesi

Günümüzde LAB'ın geliştirilmesi için kompleks ortamlar mevcuttur. Bunlar arasında De man Rogosa ve Sharpe (MRS), brain heart infusion (BHI), sodium laktat (NaLa), M17 ve trypticase soy broth yeast extract (TSBYE) bulunmaktadır. Bu ortamlar LAB'ın gelişmesini hızlandırmakta ve bakteriyosin üretimini arttırmaktadır. Ancak bu ortamların kullanımı, yüksek maliyet ve uzun inkübasyon süreleri gibi nedenlerle endüstriyel kullanımda zorluk oluşturmaktadır. Maliyet açısından yüksek olan yeast extract ve pepton gibi azot kaynakları aynı zamanda bakteriyosinlerin saflaştırılmasını da zorlaştırmaktadır [68].

Geniş bir bakteri yelpazesi için gelişme ortamı sağlayan bu kompleks ortamlar, belirli suşlar için bakteriyosin üretim süreçlerinde bileşim ve konsantrasyon açısından optimal değildir. Bu sınırlamalar arasında, hücre metabolizması için gerekli olan belirli temel moleküllerin varlığı, Fe^{+2} ve Ca^{+2} gibi gerekli olan minerallerin eksikliği söylenebilir. Bu nedenlerle bakteriyosin üretim verimliliğinin artırılması için ortam formülasyonunun optimize edilmesi gerekmektedir [69].

Gıda endüstrisinden kaynaklanan atık ürünler, çevreye atılmaları durumunda yüksek biyokimyasal oksijen ihtiyacı nedeniyle çevresel bir sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle LAB kullanılarak bakteriyosin üretiminde kültür ortamlarına azot açısından zengin gıda atıklarının dahil edilmesi atık bertarafı sorununu çözmede önemli bir rol oynayacaktır. Aynı zamanda ticari ölçekte bakteriyosin üretimi için teknoloji ve ekonomi açısından uygulanabilir bir yaklaşım benimsenebilecektir [70].

Gıda atıklarının işlenmesiyle üretken ve sürdürülebilir bir döngü mümkün olacaktır. Bu atıkların geri dönüştürülmesi yüksek katma değerli ürünler üretilmesine olanak sağlayacaktır [71].

LAB tarafından bakteriyosin üretimi için şeker pancarı veya şeker kamışı melası, soya küspesi, peynir altı suyu gibi endüstriyel atıklar kullanılabilir [72]. Fermantasyon ortamının formülasyonunda endüstriyel atıklar kullanılırken bir dizi kriter göz önünde bulundurulmalıdır. Bu kriterler arasında karbon/azot içeriği, fiyat ve ulaşılabilirlik yer almaktadır. Karbon/azot açısından zengin ve düşük maliyetli gıda bazlı endüstriyel yan ürünler LAB tarafından bakteriyosin üretimi için uygun kaynaklar olarak değerlendirilmiştir. Bu ortamlar yüksek safsızlık seviyelerine rağmen, ucuz ve gıda kökenli olmaları gibi nedenlerle gıda endüstrisinde bakteriyosin üretimini uygulama açısından en uygun hale getirmiştir [73].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, gıda sistemlerinde kullanıma hazır geniş spektrumda antimikrobiyal etkiye sahip fermantasyon tozlarının üretilmesidir. Bu amaç doğrultusunda çalışmanın hedefleri ise şu şekilde sıralanabilir:

- ✚ Gıda sanayii yan ürünlerinden antimikrobiyal metabolit üretimi için *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 suşu kullanılarak en yüksek verimde üretim sağlayacak optimum fermentasyon ortam koşullarının (DPST konsantrasyonu, soya küspesi konsantrasyonu ve glikoz şurubu konsantrasyonu) biyoreaktör ortamında optimize edilmesi,
- ✚ En yüksek verimde üretim yapılan ortam için tekrar üretim yapılarak fermentasyon ortam koşullarının doğrulanması ve
- ✚ Elde edilen fermentlerin uygun taşıyıcılara yüklenerek kurutulması ve toz ferment üretilmesidir.

2.1 Materyal

2.1.1 Bakteri Suşları ve Kültür Ortamları

Çalışmada kullanılan nisin üreticisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 suşu (Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mikrobiyal Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir) %0,5 glukoz içeren M17 besiyeri (GM17, Condalab, İspanya) ortamında 30°C'de 24 saat geliştirilmiştir. Nisin aktivitesinin belirlenmesi için indikatör olarak kullanılan *Micrococcus luteus* NCIMB 86100 (Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mikrobiyal Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir) suşu, LB besiyeri (Condalab, İspanya) ortamında 37°C ve 250 rpm karıştırma hızında 24 saat geliştirilmiştir. Çalışma boyunca kullanılan tüm suşlar son konsantrasyonu %30 olan gliserol içerisinde -80°C'de muhafaza edilmiştir. Araştırma kapsamında kullanılan tüm besiyeri malzemeleri ve kimyasal maddeler, mikrobiyolojik ve analitik saflıklarda temin edilmiştir. Bu çalışma kapsamında üç farklı fermantasyon ortamı (DPST, soya küspesi ve glikoz şurubu) kullanılmıştır.

2.1.2 Fermantasyon Ortamı Olarak Kullanılan Gıda Bileşenleri

Bu çalışmada kullanılan %70 DPST, Enka Süt ve Gıda Mamulleri Sanayi ve Ticaret AŞ'den (Konya, Türkiye), soya küspesi Promar Gıda'dan glikoz şurubu ise metro marketten temin edilmiş ve denemeler yapılınca kadar nemsiz ve serin ortamda kapalı bir şekilde muhafaza edilmiştir.

2.2 Metot

2.2.1 Araştırma Planı ve Örneklem

Bu tez kapsamında *L. lactis* subsp. *lactis* N8 suşu kullanılarak gıda yan sanayi ürünlerinden yüksek verimle antimikrobiyal metabolit üretimini sağlayacak fermentasyon koşullarının optimize edilmesi amaçlanmıştır. Optimizasyon denemeleri biyoreaktör ölçeğinde gerçekleştirilmiştir.

Antimikrobiyal özellikli fermantasyon tozlarının üretiminde; DPST konsantrasyonu, soya küspesi konsantrasyonu ve glikoz şurubu konsantrasyonu faktör olarak seçilerek Minitab 19 yazılımı ile oluşturulmuş olan deneme tasarımına göre fermantasyon tozu üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, DPST konsantrasyonu, soya küspesi konsantrasyonu ve glikoz şurubu konsantrasyonu bağımsız değişken olarak belirlenmiş ve bunların bağımlı değişken olan antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi araştırılmıştır. Fermentasyon tozu üretimi için 3 seviye, 3 faktör olacak şekilde CCD (Central Composite Design, Merkezi Bileşik Tasarımı) ile deneme desenleri kurulmuştur.

Deneme deseninden elde edilen verilerden bağımsız değişkenler ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin belirlenmesi için regresyon analizi sonucu 2. dereceden modeller oluşturulmuştur. Oluşturulan modelin gerçeğe uygun bir yaklaşım olup olmadığına ‘Lack of fit’ (model uyumsuzluğu)’den kaynaklanan hatanın önemsiz, regresyondan kaynaklanan varyasyonun %95 güven aralığı seviyesinde önemli olması ile karar verilmiştir [74].

Fermentasyon tozu üretimi için deneme tasarımında faktörlerin kodlanmış değerleri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2. 1. Fermantasyon tozu üretimi için faktörlerin kodlanmış seviyeleri

Parametreler	En düşük nokta	Orta nokta	En yüksek nokta
DPST konsantrasyonu (g/L)	50	75	100
Soya küspesi konsantrasyonu (g/L)	20	35	50

Glikoz şurubu konsantrasyonu (g/L)	5	27,5	50
------------------------------------	---	------	----

Çalışmada prosesi etkileyen 3 faktör olan DPST, soya küspesi ve glikoz şurubu değerleri sisteme tanıtılmıştır. Bağımsız değişkenlerin parametre aralıkları ön denemeler sonucu belirlendi.

Tablo 2.2’de optimizasyonu gerçekleştirmek amacıyla program tarafından verilen ve orta noktanın 6 kez tekrar edilmesiyle oluşan 20 adet deneme deseni gösterilmiştir.

Tablo 2. 2. Deneme Deseni Tablosu

Parametreler	DPST (g/L)	Soya Küspesi (g/L)	Glikoz Şurubu (g/L)
1	100	35	27,5
2	50	35	27,5
3	50	20	50
4	100	50	50
5	75	35	27,5
6	100	20	5
7	75	35	27,5
8	50	50	5
9	75	35	27,5
10	75	50	27,5
11	100	50	5
12	75	35	27,5
13	75	35	27,5
14	100	20	50
15	75	35	5

16	75	35	27,5
17	50	20	27,5
18	75	20	27,5
19	75	35	50
20	50	50	50

2.2.2 Biyoreaktör Çalışma Koşulları

Kesikli çalışan karıştırmalı biyoreaktörde farklı bileşenler içeren ortamlar kullanılarak antimikrobiyal metabolit üretimi gerçekleştirilmiştir. 1 L hacimde Minifors 2 (İnfors, İsviçre) markalı biyoreaktör kullanılmıştır. Proses süresince karıştırma hızı, sıcaklık ve pH değerleri kontrol edilmiştir. Çalışmalar steril koşullarda yapıldığından dolayı besiyerinin hazırlanmasından sonra biyoreaktör 121°C’de 15 dk otoklavlanmıştır. Ortamın sterilliğini bozmamak adına aşılama ve numune alma işlemleri aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir.

24 saat inkübe edilen *L. lactis* N8 ön kültüründen biyoreaktöre %1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Antimikrobiyal metabolit üretimleri 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Ortamının pH’sı 5N NaOH ile 6,0’a ayarlanmıştır.

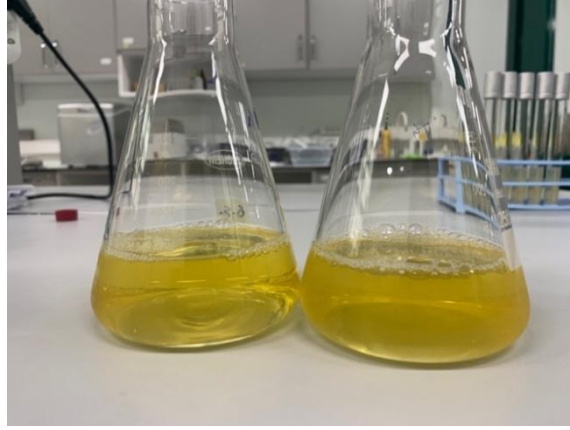
Tüm fermantasyonlar 24 saat gerçekleştirilmiştir. Denemelerde 24. saatlerde aseptik koşullarda 5 mL örnek alınmıştır. Bakteriyel gelişimi belirlemek için alınan örneklerin mikrobiyal ekimi yapılmıştır. Ayrıca ortamda kalan glukoz miktarının belirlenmesi için, GOPOD Megazyme D-Glukoz (K-GLUC) analiz kiti kullanılarak glukoz tayini ve antimikrobiyal aktivite tayini yapılmıştır.

Denemeler boyunca başlangıç pH değeri, sıcaklık ve karıştırma hızı sabit tutulmuştur. Deneme deseninde gerçekleştirilen her bir denemenin 24. saatinden elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları yanıt olarak kullanılmış ve elde edilen sonuçlarla Minitab 19 kullanılarak optimum başlangıç DPST konsantrasyonu, soya küspesi konsantrasyonu ve glikoz şurubu konsantrasyonu değerleri belirlenmiştir. Fermantasyon çalışmalarına ilişkin görüntüler Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2. 1. Çalışmada gerçekleştirilen biyoreaktör uygulamaları

Fermentasyon sonucu elde edilen fermentin, 9500 rpm’de 25 dk santrifüjlenmesiyle (Hitachi, Japonya) elde edilen süpernatant 80°C’de 15 dk pastörize edilmiştir. Fermentlere ait görseller Şekil 2.2’de verilmiştir.

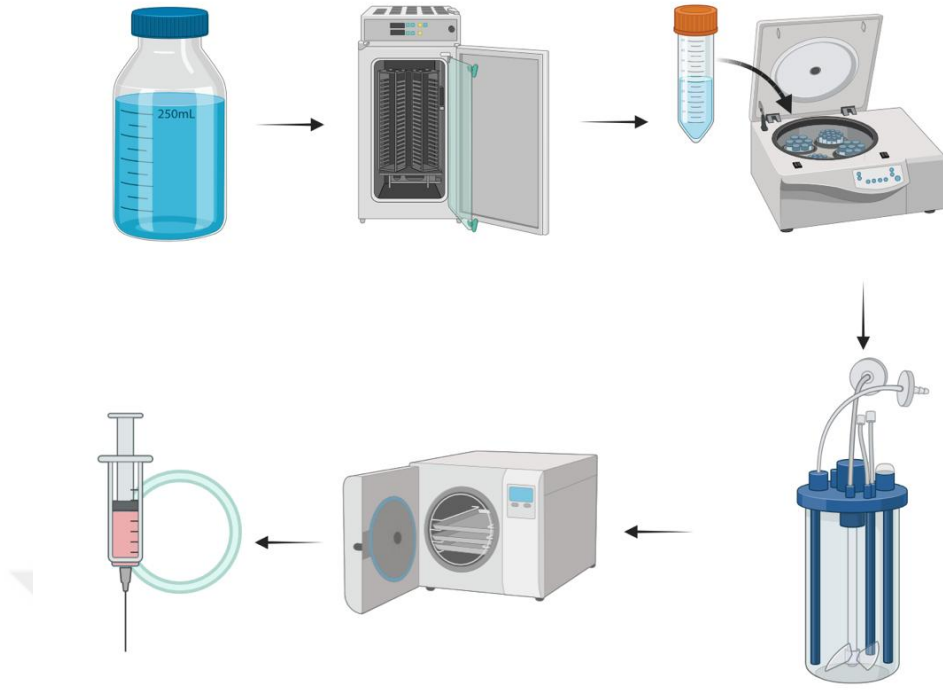


Şekil 2. 2. Fermantasyon sonucu elde edilen fermentler

Gliserol stok içerisinde -80°C 'de saklanan *L. lactis* N8 ve *M. luteus* NCIMB 86100 suşları öncelikle tüpler içerisinde aktive edilip, çoğaltılarak ön kültür elde edilmiştir. Bu işlem için kültür koşullarına uygun olacak şekilde LB (Condalab, İspanya) ve GM17 (Condalab, İspanya) ön kültür besiyeri hazırlanıp, otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edildikten sonra GM17 besiyerine *L. lactis* N8 GM17 ve LB besiyerine *M. luteus* NCIMB 86100 suşu inoküle edilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrası geliştirilen kültür aynı ortama pasajlanarak tazelenmiştir.

2.2.3 Besiyeri Hazırlanması

Bu çalışmada DPST, soya küspesi ve glikoz şurubu kullanılarak özel bir besiyeri ortamı hazırlanmıştır. İlk olarak, aşılama işlemi yapılmadan 24 saat önce belirli oranlarda peynir altı suyu tozu ve soya küspesi ile besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu besiyerine proteaz enzimi (Stern enzim, Almanya) ilave edilerek soya küspesindeki proteinlerin parçalanması sağlanmıştır. Hazırlanan besiyeri pH 6,0'da ve 50°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, besiyeri 5000 rpm de 20 dk santrifüjlenerek süpernatant ve katı faz ayrılmıştır. Santrifüjleme işlemi sonrası elde edilen süpernatanta deneme deseninde belirlenen oranlarda glikoz şurubu ilave edilmiştir. Daha sonra 5N NaOH çözeltisi kullanılarak pH'sı 6,0'a ayarlanan bu karışım, biyoreaktör ile birlikte otoklavlanarak sterilizasyon sağlanmıştır. Sterilizasyon sonrası %1 oranında aşılama yapılarak fermantasyon işlemi başlatılmıştır. Besiyerinin hazırlanması süresince gerçekleştirilen basamaklar Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



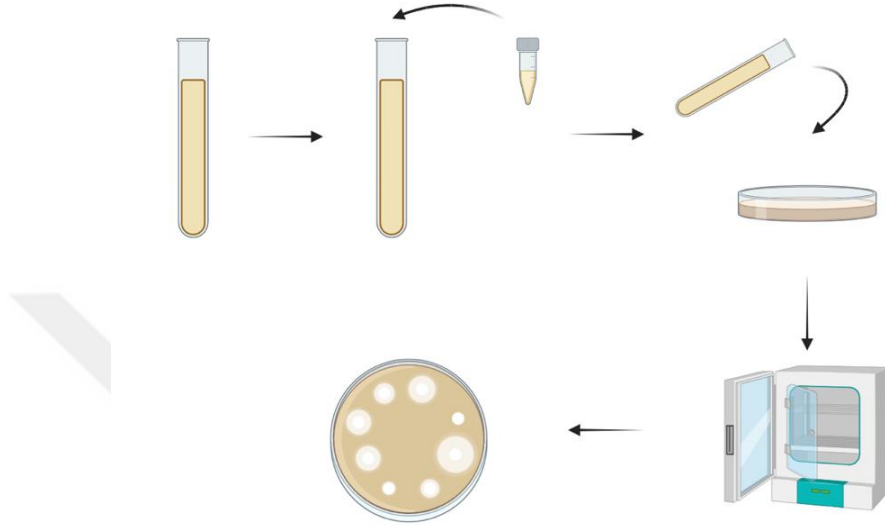
Şekil 2. 3. Besiyerinin hazırlanması süresince gerçekleştirilen basamakların şematik gösterimi (Yazar tarafından BioRender.com kullanarak oluşturulmuştur)

2.2.4 Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Fermentlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için Tramer ve Fowler [75] tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Standart nisinden (Sigma, Almanya) 0,001 gr tartılarak 10 mL pH'sı 2,5 olan ve %0,1 Tween 80 (Merck, Almanya) içeren saf suda çözündürülmüştür. Ardından 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/125, 1/250, 1/500 oranlarında seyreltmeler yapılmıştır. Aktivitesinin belirlenmesi istenen örnekler de aynı şekilde hazırlanarak dilüsyonlar hazırlanmıştır.

İndikatör patojen mikroorganizmanın LB besiyerinde gelişen 24 saatlik aktif kültüründen 70 µL alınarak içerisinde 7 mL yumuşak LB (%0.75 agar içeren) bulunan tüplere aktarıldıktan sonra tüpler vortex yardımıyla karıştırılmıştır. Vortekslenen karışım Nutrient agar (Condalab, İspanya) içeren plakların üzerine ikinci bir tabaka halinde homojen bir şekilde dökülmüştür. Agarın donması için 30 dakika bekledikten sonra standart nisin ve ferment ürünleri 5 µL oranında petrilere damlatılmıştır. Petriler 37°C'de 18 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon bitiminde koloniler etrafında zon oluşumuna bakılarak sonuçlar

değerlendirilmiştir. Standart nisin konsantrasyonu ve zon çapları kullanılarak Şekil 2.8’de gösterilen standart nisin grafiği denklemi elde edilmiştir. Standart nisin eğrisi kullanılarak fermentlerin nisin içerikleri hesaplanmıştır. Antimikrobiyal aktivite analizi süresince gerçekleştirilen basamaklar Şekil 2.4’te gösterilmiştir. Analizler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. 4. Antimikrobiyal aktivite analizi süresince gerçekleştirilen basamakların şematik gösterimi (Yazar tarafından BioRender.com kullanarak oluşturulmuştur)

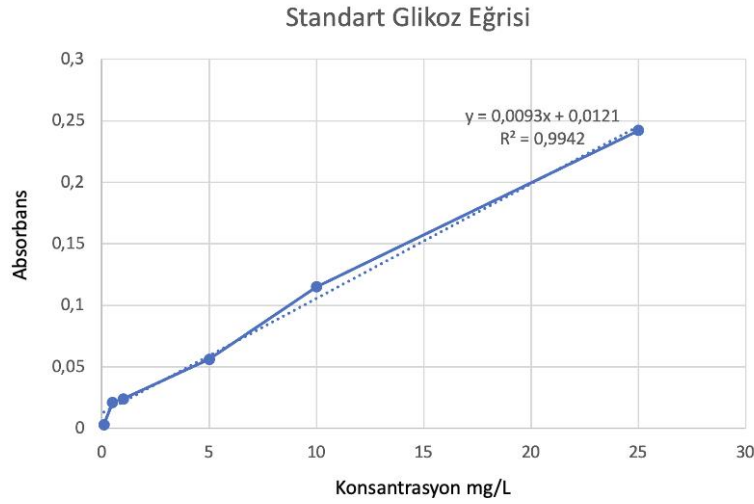
2.2.5 Mikrobiyal Ekim

Fermentasyon kültürlerindeki bakteri sayıları standart mikrobiyolojik sayım yöntemlerine göre belirlenmiştir [76] . Buna göre, 1 mL alınarak 9 mL FTS bulunan tüplere koyulmuş ve karıştırılmıştır. GM17 agar petrileri üzerine yayma plak yöntemi ile paralelli ekimler yapılmış ve 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 30-300 koloni arasındaki petriler sayılmış ve koloni sayısı hesaplanmıştır. Analizler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.6 Glikoz Tayini

Üretim ortamında kalan glukozun belirlenmesi için GOPOD Megazyme D-Glukoz (K-GLUC) analiz kiti kullanılmıştır. Fermentasyon ortamından alınan örnekler öncelikle 9500 rpm’de 25 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz

80°C’de 15 dk pastörize edilerek analizde kullanılmıştır. Üretici tarafından önerilen protokol izlenerek analiz için kör, standart ve örnek hazırlanmıştır. Kör için, 3 mL GOPOD reagent üzerine 100 µL saf su eklenmiştir. Standart, 3 mL GOPOD reagent ve 100 µL glukoz standart solüsyonu (1 mg/mL) ile hazırlanmıştır. Biyoreaktörden alınan örnekler için 3 mL GOPOD reagent üzerine 100 µL glukoz içeren örnek eklenerek tüm örnekler 50°C su banyosunda 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örneklerin 510 nm dalga boyunda absorbansları UV spektrofotometrede okunmuştur. Şekil 2.5’de verilen standart glukoz eğrisi kullanılarak örneklerin glukoz miktarları hesaplanmıştır. Analizler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. 5. Standart glikoz eğrisi

2.2.7 Optimum Koşullarda Üretim

Minitab 19 programı kullanılarak oluşturulan 20 deneme deseni rastgele sırayla denenmiş ve elde edilen antimikrobiyal aktivite verileri sisteme yanıt olarak girilmiştir. En yüksek aktivite gösteren denemeye göre optimum bir deneme planı oluşturulmuştur. Optimum plan doğrultusunda üretim 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 24 saat süren fermentasyon sürecinde 4, 8, 16, 20 ve 24. saatlerde örnekler alınarak antimikrobiyal aktivite analizi, GOPOD Megazyme D-Glukoz (K-GLUC) analiz kiti kullanılarak rezidü glukoz tayini yapılmış ve biyokütle miktarları tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, optimum koşullar

altında antimikrobiyal aktivitenin ve metabolit üretiminin zamana bağlı değişimlerinin değerlendirilmesi sağlanmıştır.

2.2.8 Metabolitlerin Taşıyıcıya Yüklenmesi ve Kurutulması

Pastörize edilmiş ve hücre içermeyen numuneler DPST ve maltodekstrine yüklenerek kurutulmuştur. Püskürtmeli kurutma tekniği ile fermentasyon tozu eldesinde mini püskürtmeli kurutucu (Buchi B-290, İsviçre) kullanılmıştır. Öncelikle farklı konsantrasyonlardaki maltodekstrin ve DPST çözeltileri metabolit içerisinde manyetik karıştırıcıda çözündürülerek hazırlanmıştır. Belirlenen parametre aralıkları ön denemeler sonucu belirlenmiştir. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki bu çözeltiler giriş sıcaklığı 80°C olacak şekilde püskürtmeli kurutucuya beslenmiştir. Kurutma cihazına ait çalışma parametreleri giriş sıcaklığı 80°C, çıkış sıcaklığı 60°C, pompa %50 ve aspiratör %100 olacak şekilde ayarlanmıştır. Püskürtmeli kurutma sonucunda elde edilen tozlar falkon tüplere doldurularak, nem absorpsiyonunu önlemek amacıyla +4°C’de muhafaza edilmiştir. Üretimlere ait üretim plan çizelgesi Tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2. 3. Üretim plan çizelgesi

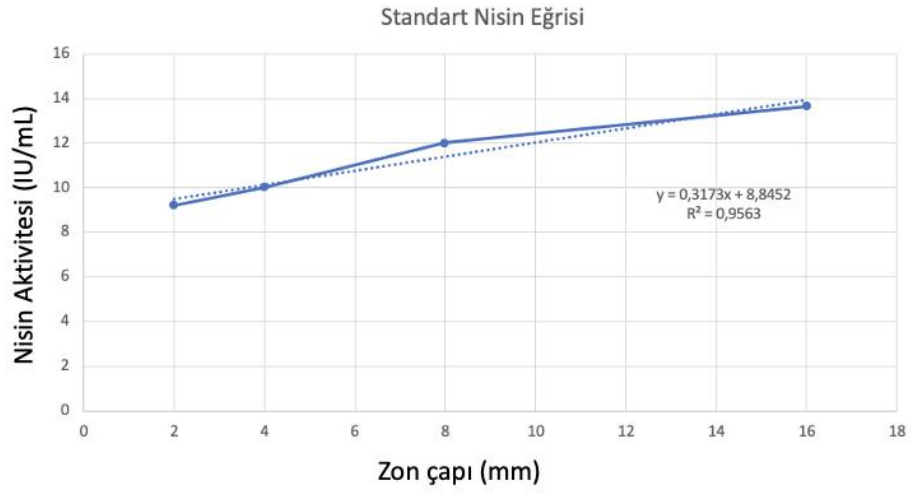
Kaplama Materyali	Konsantrasyon (%)
--------------------------	--------------------------

	1
	3
	5
Maltodekstrin	10
	15
	20
	30
	5
	10
DPST	15
	20
	30

2.2.9 Fermantasyon Tozlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti

Fermentasyon tozlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için Tramer ve Fowler [75] tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Standart nisinden 0,001 gr tartılarak 10 mL pH'sı 2,5 olan ve %0,1 Tween 80 içeren saf suda çözündürülmüştür. Ardından 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/125, 1/250, 1/500 oranlarında seyreltmeler yapılmıştır. Antimikrobiyal aktivitesi belirlenmek istenen örneklerden 1 gr tartılarak standart nisine uygulanan aynı çözündürme ve seyreltme işlemleri uygulanmıştır.

İndikatör patojen mikroorganizmaların LB besiyerinde gelişen 24 saatlik aktif kültürlerinden 70 µL alınarak içerisinde 7 mL yumuşak LB (%0,75 agar içeren) bulunan tüplere aktarıldıktan sonra tüpler vortex yardımıyla karıştırılmıştır. Vortekslenen karışım Nutrient agar içeren plakların üzerine ikinci bir tabaka halinde homojen bir şekilde dökülmüştür. Agarın donması için 30 dakika beklendikten sonra standart nisin ve ferment ürünleri 5 µL hacimde petrilere damlatılmıştır. Petrilere 37°C'de 18 saat inkübe edilmiş ve inkübasyona bitiminde koloniler etrafında zon oluşumuna bakılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Standart nisin konsantrasyonu ve zon çap oranları kullanılarak standart nisin grafiği denklemi elde edilmiştir. Şekil 2.8'de verilen standart nisin eğrisi kullanılarak fermentlerin nisin içerikleri hesaplanmıştır. Analizler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. 6. Standart nisin eğrisi

3

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Araştırma Planı ve Örnekleme

Denemelerin sonuçları Minitab 19 programı kullanılarak yorumlanmıştır. Modelin fit edilmesi için gerekli deneysel veriler CCD deneme planı takip edilerek elde edilmiştir. Çalışmada;

DPST konsantrasyonu için 50 ile 100 g/L değerleri,

Soya küspesi için 20 ile 50 g/L değerleri,

Glikoz şurubu içinse 5 ile 50 g/L değerleri seçilmiştir.

Modellerin deneysel veriyi ne kadar iyi karşıladığını belirlemek için R^2 ve $\text{adj-}R^2$ değerleri kullanılmıştır. R^2 , modelin deneysel veride açıklayabildiği varyasyonun toplam varyasyona oranı olarak tanımlanır. Modelin uygunluğunu değerlendirirken R^2 değerlerinin %90'ın üzerinde olması önerilmektedir [77]. Tablo 3.2'de model için hesaplanmış R^2 , $\text{adj-}R^2$ ve $\text{Pred-}R^2$ ve desirability değerleri gösterilmiştir. $\text{Adj-}R^2$ ve $\text{Pred-}R^2$ değerlerinin birbirine yakın olması (%20), oluşturulan modellerin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir [78].

Tablo 3. 1. Model için hesaplanan istatistiksel değerler

Parametreler	Antimikrobiyal Aktivite
R^2	0,993
$\text{Adj-}R^2$	0,996
$\text{Pred } R^2$	0,896
Desirability	1,00

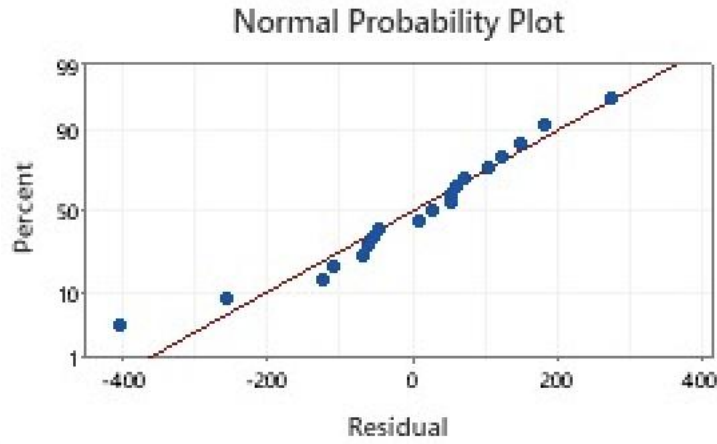
Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen antimikrobiyal aktivite verileri kullanılarak gerçekleştirilen analiz ile önemsiz olan değişkenler çıkarılıp, önemli olan bağımsız değişkenlerle oluşturulan modelin genel regresyon eşitliği, Eşitlik 3.1'de verilmiştir.

$$\text{Antimikrobiyal aktivite (IU/mL)} = 3604-132A-1781B-382C-115,3AA-110,6CC+394,3AB+223,8AC \quad (3.1)$$

A: DPST konsantrasyonu

B: Soya küspesi konsantrasyonu

C: Glikoz şurubu konsantrasyonu



Şekil 3. 1. Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler

Tasarımdaki bağımsız değişkenlere bakıldığında p değerinin $<0,0001$ olduğu görülmektedir. Aynı zamanda bu faktörlerin p değerlerinin 0,05'den küçük olduğu ve faktörlerin modeli anlamlı bir şekilde açıkladığı söylenebilmektedir. Tablo 3.3'de modele ait veriler gösterilmiştir.

Tablo 3. 2. Modele ait istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	DF	Kareler Ortalaması	F-Değeri	P-Değeri
Model	63132860	9	7014762	141,96	0,000
DPST	761306	1	761306	15,41	0,003
Soya küspesi	28775585	1	28775585	582,34	0,000
Glikoz şurubu	20781363	1	20781363	420,56	0,000
DPST*DPST	1389643	1	1389643	28,12	0,000
Soya küspesi*soya küspesi	4596	1	4596	0,09	0,767
Glikoz şurubu*glikoz şurubu	839522	1	839522	16,99	0,003
DPST*soya küspesi	10904161	1	6058150	122,60	0,000
DPST*glikoz şurubu	7904209	1	7904209	159,96	0,000
Soya küspesi*glikoz şurubu	39018	1	39018	0,79	0,397
Hata	100	9	49414		
Lack of fit	75	4	53256	1,15	0,431

DPST*DPST: DPST konsantrasyonunun karesini, Soya küspesi*Soya küspesi: Soya küspesi konsantrasyonunun karesini, Glikoz şurubu*Glikoz şurubu: Glikoz şurubu konsantrasyonunun karesini, DPST*Soya küspesi: DPST ve soya küspesi interaksiyonunu, DPST*Glikoz şurubu: DPST ve glikoz şurubu interaksiyonunu, Soya küspesi*Glikoz Şurubu: Soya küspesi ve glikoz şurubu interaksiyonunu, DF: Serbestlik derecesini ifade etmektedir.

3.2 Yumuşak Agar Yöntemi ile Sıvı Fermentlerde Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

Bu çalışma kapsamında üretilen antimikrobiyal karışımların indikatör mikroorganizmaya (*M. luteus* NCIMB 86100) karşı antimikrobiyal aktivitesi yumuşak agar yöntemiyle araştırılmış ve elde edilen antimikrobiyal aktivite değerleri (IU/mL) Tablo 3.3'te verilmiştir.

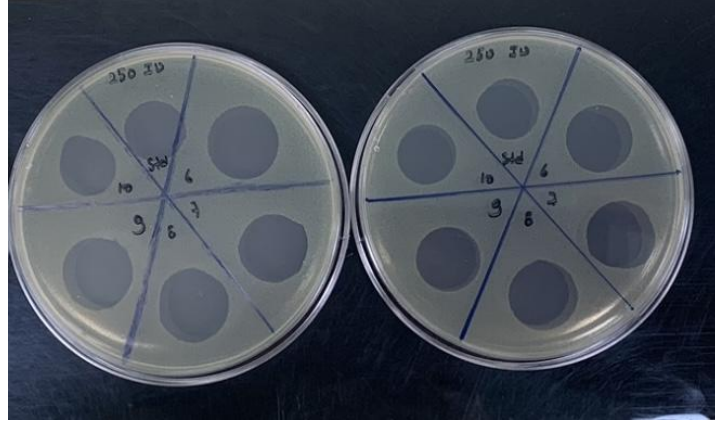


Tablo 3. 3. Antimikrobiyal aktivitenin deneysel verileri

Parametreler	DPST (g/L)	Soya Küspesi (g/L)	Glikoz Şurubu (g/L)	Deneysel Veriler (IU/mL)
1	100	35	27,5	3098
2	50	35	27,5	2581
3	50	20	50	1640
4	100	50	50	9092
5	75	35	27,5	3561
6	100	20	5	1002
7	75	35	27,5	3410
8	50	50	5	1757
9	75	35	27,5	3510
10	75	50	27,5	5840
11	100	50	5	3002
12	75	35	27,5	3050
13	75	35	27,5	3580
14	100	20	50	2006
15	75	35	5	1200
16	75	35	27,5	3200
17	50	20	27,5	940
18	75	20	27,5	1363
19	75	35	50	4800
20	50	50	50	3000

Sonuçlar, antimikrobiyal aktivitenin farklı deneme koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur. Üretilen antimikrobiyal karışımlardan en fazla antimikrobiyal etki gösteren denemenin 100g/L DPST, 50 g/L soya

küspesi ve 50 g/L glikoz şurubu kullanılarak gerçekleştirilen 4 numaralı deneme olduğu tespit edilmiştir. Denemelere ait temsili görsel Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3. 2. Denemelere ait zon görüntüleri. Std: standard nisin, 6, 7, 8, 9 ve 10 örneğinin *M. luteus*’a karşı oluşturduğu zonları göstermektedir.

3.3 Mikrobiyal Ekim Sonuçları ve Glikoz Tayini

Fermentasyon ortamından 24 saat sonunda alınan örneklerde *L.lactis* N8 sayısının $2,6 \times 10^9$ KOB/mL (50 g/L DPST, 50 g/L soya küspesi ve 50 g/L glikoz şurubu) ile $2,9 \times 10^{13}$ KOB/mL (100 g/L DPST, 50 g/L soya küspesi, 50 g/L glikoz şurubu) arasında değiştiği görülmüştür. Üretim ortamında kalan glukozun belirlenmesi için GOPOD Megazyme D-Glukoz (K-GLUC) analiz kiti kullanılmıştır. Biyoreaktörden 24. saatte alınarak analizi yapılan örnekler ait sonuçlar Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3. 4. 24 saatlik fermentasyonun ardından biyoreaktörden alınan örneklerin bakteri sayıları ve rezidü glikoz miktarları

Parametreler	DPST (g/L)	Soya küspesi (g/L)	Glikoz şurubu (g/L)	<i>L. lactis</i> N8 (KOB/mL)	Rezidü glikoz miktarı (g/L)
1	100	35	27,5	$1,4 \times 10^{10}$	0,038
2	50	35	27,5	$4,9 \times 10^{10}$	0,016
3	50	20	50	$2,8 \times 10^{10}$	0,071
4	100	50	50	$2,9 \times 10^{13}$	0,042
5	75	35	27,5	$2,4 \times 10^{11}$	0,022
6	100	20	5	$1,2 \times 10^{11}$	0,012
7	75	35	27,5	$2,4 \times 10^{11}$	0,023
8	50	50	5	$2,6 \times 10^{11}$	0,011
9	75	35	27,5	$2,9 \times 10^{11}$	0,021
10	75	50	27,5	$2,2 \times 10^{11}$	0,029
11	100	50	5	$1,5 \times 10^{12}$	0,018
12	75	35	27,5	$2,8 \times 10^{11}$	0,023
13	75	35	27,5	$2,1 \times 10^{11}$	0,024
14	100	20	50	$3,1 \times 10^{11}$	0,038
15	75	35	5	$3,2 \times 10^{10}$	0,015
16	75	35	27,5	$2,2 \times 10^{11}$	0,022
17	50	20	27,5	$2,3 \times 10^{10}$	0,007
18	75	20	27,5	$1,2 \times 10^{10}$	0,031
19	75	35	50	$1,8 \times 10^{11}$	0,033
20	50	50	50	$2,6 \times 10^9$	0,079

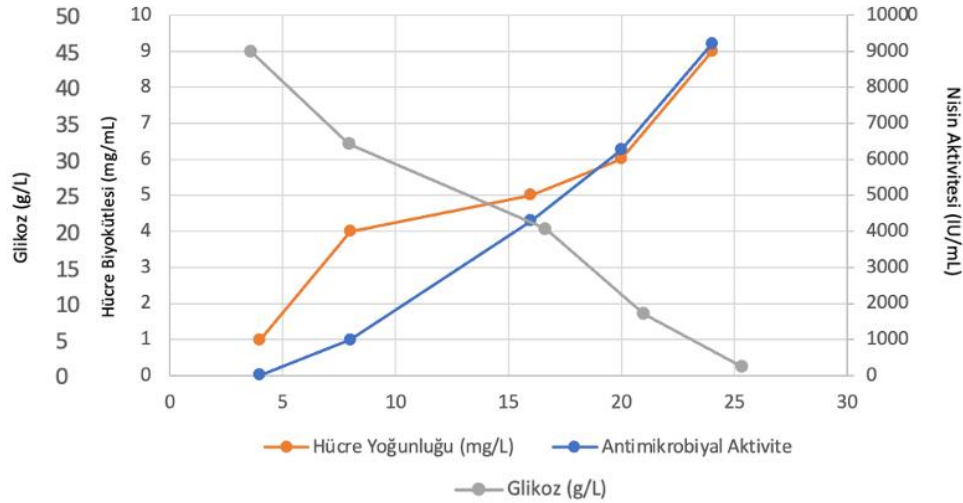
3.4 Optimum Üretim Sonuçları

Optimizasyon sonucu ortaya çıkan optimum değerler 3 deneme üretimi ile tekrarlanmıştır. Optimum üretime ait tekerrür denemelere ilişkin detaylar Tablo 3.5 ve Şekil 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3. 5. Optimum üretime ait sonuçlar

Fermentasyon süresi	Antimikrobiyal Aktivite (IU/mL)	Biyokütle (mg/mL)	Rezidü Glikoz (g/L)
4. saat	0	1,10 ± 0,26	44,9 ± 0,26
8. saat	984 ± 11,50	4,06 ± 0,15	32,6 ± 0,41
16. saat	4280 ± 6,50	5,10 ± 0,11	20,5 ± 0,50
20. saat	6250 ± 6,55	6,13 ± 0,15	8,06 ± 0,41
24. saat	9120 ± 10,06	8,73 ± 0,30	0,55 ± 0,03

Sonuçlar 3 üretimin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. 3. Optimum üretime ait sonuçlar

Optimum üretim ile CCD modellerinin birbirine yakın sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Optimizasyon sonucunda DPST konsantrasyonunun 100 g/L, soya küspesi konsantrasyonunun 50 g/L, glikoz şurubu konsantrasyonunun ise 50 g/L olması durumunda antimikrobiyal aktivitenin 9120 IU/mL oranında olduğu bulunmuştur.

Tablo 3. 6. Fermentasyon süresine göre kinetik değerler

Fermentasyon süresi	Biyokütle miktarı başına nisin üretimi (IU/mg)	Tüketilen glikoz miktarı başına nisin üretimi (IU/mg)	Birim zamanda üretilen nisin miktarı (IU/mL)
8. saat	242,36	57,29	104,87
16. saat	839,22	145,08	267,50
20. saat	1019,41	149,880	214,00
24. saat	1044,33	184,142	380,00

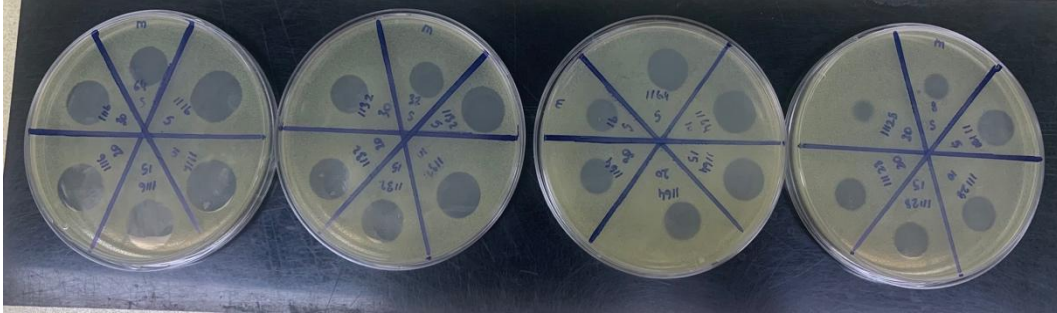
3.5 Yumuşak Agar Yöntemi ile Fermentasyon Tozlarının Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

Üretim süresince elde edilen antimikrobiyal metabolit karışımları, belirli koşullar altında püskürtmeli kurutucu kullanılarak toz forma dönüştürülmüştür. Kurutma işlemi yapılırken taşıyıcı olarak DPST ve maltodekstrinin farklı oranları kullanılmıştır. Bu taşıyıcılar biyoaktif bileşenlerin oksidasyon ve termal degradasyonuna karşı korunmasına yardımcı olur. Bu durum, aktif bileşenlerin stabilitesini artırmaya ve raf ömrünü uzatmaya yardımcı olur [79, 80]. Bu tozların indikatör mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktiviteleri yumuşak agar yöntemi ile araştırılmış ve antimikrobiyal aktivite değerleri (IU/gr) Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3. 7. Fermentasyon tozlarına ait antimikrobiyal aktivite sonuçları

Kullanılan Konsantrasyon	Antimikrobiyal Aktivite (IU/gr) DPST	Antimikrobiyal Aktivite (IU/gr) Maltodekstrin
%1	-	20780
%3	-	28830
%5	24130	41000
%10	33050	23020
%15	17770	13060
%20	6380	18230
%30	7910	8120

Üretilen fermentasyon tozlarından en yüksek aktivitenin %5 oranında maltodekstrin yüklemesi yapılarak elde edildiği belirlenmiştir. Toz ürünlerin indikatör suşa karşı inhibisyon zonlarının görüntüsü Şekil 3.4’te verilmiştir.



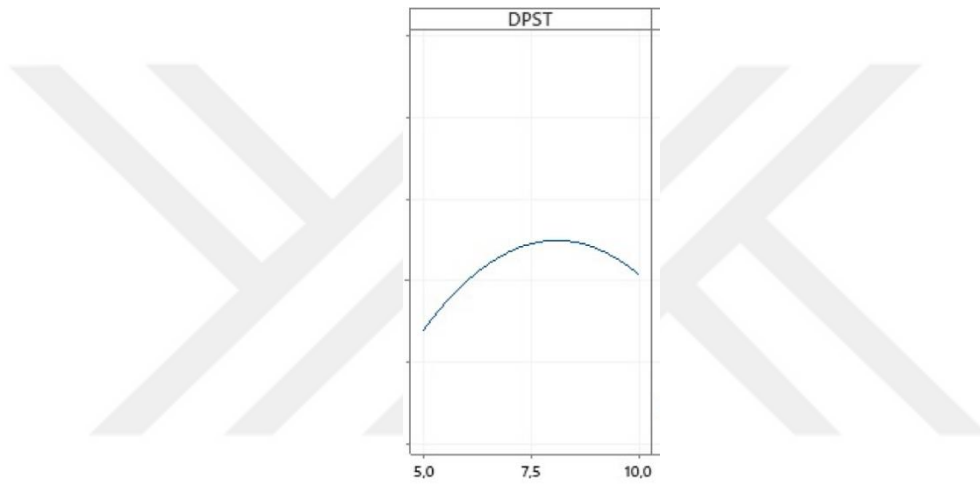
Şekil 3. 4. Farklı yüklemelere ait zon görüntüsü

Sıvı fermente, %5 oranında maltodekstrin ilave edilerek püskürtmeli kurutucu ile toz haline getirildi. Bu işlem sonucunda kurutma verimi %87,7 olarak bulundu. Toz formundaki fermentin antimikrobiyal aktivite analizi yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi. Sonuç olarak, üretilen nisin %19,8 oranında maltodekstrine yüklendi.

3.6 Bağımsız Değişkenlerin Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi

3.6.1 DPST Konsantrasyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi

CCD kullanılarak biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinde DPST değişkenine ait en düşük ve en yüksek noktalar 50-100 g/L olarak belirlenmiştir. DPST konsantrasyonunun pH 6,00 değerinde, 30°C sıcaklıkta ve 100 rpm çalkalama hızında gerçekleşen denemelerde antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3. 5. DPST konsantrasyonunun antimikrobiyal aktiviteye etkisi (g/L)

Şekil 3.5'e göre DPST konsantrasyonunun 50 g/L değerinden 100 g/L değerine artırılması ile antimikrobiyal aktivitenin bir miktar yükseldiği ancak daha sonra düştüğü gözlemlenmiştir. Denemeler sonucunda DPST konsantrasyonu ve DPST konsantrasyonunun karesinin istatistiksel açıdan önemli bir etkisinin olduğu bulunmuştur ($P \leq 0,05$).

Peynir altı suyu, süt ve süt ürünleri endüstrisinin önemli bir yan ürünü olarak tanımlanmaktadır. Peynir altı suyu, besleyici bir içeriğe sahiptir. Bu besinler arasında laktoz (%4,5-5,0 [w/v]), çözünür proteinler (%0,6-0,8 [w/v]) ve mineral tuzlar (%0,5-0,7 [w/v]) bulunmaktadır. Bununla birlikte, bir atık olarak yüksek biyolojik oksijen ihtiyacı ve kimyasal oksijen ihtiyacı seviyeleri nedeniyle büyük bir kirlilik sorunu teşkil etmektedir [70]. Bu nedenle peynir altı suyu için çevre dostu ve ekonomik bir bertaraf yöntemi bulmak süt endüstrisi için büyük önem

taşımaktadır. Mikrobiyal gelişim için doğal besiyeri ortamı oluşturarak katma değerli ürünler üretmek, bu soruna karşı çözüm olarak görülmektedir [81].

Saf nisin maliyetinin yüksek olduğu bilinmektedir. Yüksek maliyet nedeniyle daha ucuz substratlar kullanılmasıyla üretim maliyeti düşürülerek nisin ticari kullanımı teşvik edilmelidir [82].

Nisin üretimi genellikle karmaşık ortamlar, sıcaklık ve pH gibi kontrol edilen parametreler gerektirir [83]. Laktik asit birikimine bağlı olarak pH'nın düşmesi, mikrobiyal gelişmeyi sınırlayıcı faktör olarak bilinmektedir [84]. Bu nedenle, *L. lactis*'in geliştirilmesi için ticari ortamların kullanılması önerilmektedir. Ancak bu ortamların yüksek maliyeti, nisin gibi bileşiklerin büyük ölçekli üretimi için önemli bir kısıttır. Ayrıca, bu ortamlar fazla miktarda protein içermektedir ve bunların önemli bir kısmı tüketilmeden kalmaktadır. Bu durum gereksiz maliyet oluşturmakla birlikte bakteriyosin saflaştırılmasını da zorlaştırmaktadır [85]. Bu nedenle nisin üretimi için daha ucuz formülasyonların geliştirilmesi gerekmektedir [82].

Guerra vd. [86] tarafından yapılan çalışmada *L. lactis* CECT 539 suşunun bakteriyosin üretme kabiliyeti konsantre ve seyreltilmiş peynir altı suyunda denenmiştir. Bu ortamlara ait ortalama bileşimler Tablo 3.7'de verilmiştir.

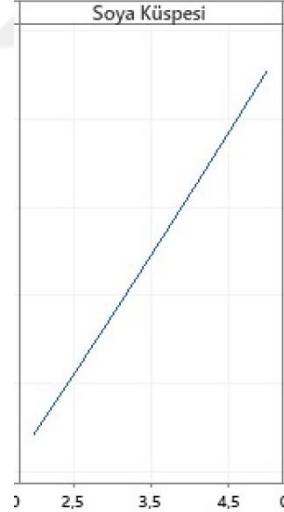
Tablo 3. 8. Peynir altı suyu ortamlarının bileşimi [82]

	Konsantre Peynir Altı Suyu (CW)	Seyreltilmiş Peynir Altı Suyu (DW)
Toplam Şeker	48,11	20,54
İndirgen şekerler	32,13	16,86
Proteinler	5,02	2,04
Toplam azot	1,05	0,45
Toplam fosfor	0,43	0,25
Kül	5,10	3,00
Katı kalıntı	62,70	26,60

Maksimum biyokütle ve nisin üretimleri 12 saat (DW'de 0,42 g/L) ve 15 saat (CW'de 0,34 g/L) sonra elde edilmiştir. Ayrıca metabolik aktivitenin CW'de daha yüksek olmasına rağmen nisin üretimi CW'de (8 BU/mL) DW'ye (23 BU/mL) göre daha düşük olduğu bulunmuştur. En iyi sonuçlar DW'de elde edildiğinden, bu ortam ileri üretim çalışmaları için seçilmiştir. Peynir altı suyunda ticari nisin üretim ortamına göre daha düşük miktarda bakteriyosin ve biyokütle üretimi gerçekleşmiştir. Bu durum, bu ortamın büyüme ve bakteriyosin üretimi için bazı temel besinlerden yoksun olduğunu veya peynir altı suyu proteinlerinin azot kaynağı olarak kullanılmak üzere uygun olmayan bir bileşime sahip olduğunu göstermektedir [86].

3.6.2 Soya Küspesi Konsantrasyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi

CCD kullanılarak biyoreaktörde gerçekleştirilen fermantasyon denemelerinde soya küspesi değişkenine ait en düşük ve en yüksek noktalar 20-50 g/L olarak belirlenmiştir. Soya küspesi konsantrasyonunun pH 6,00 değerinde, 30°C sıcaklıkta ve 100 rpm çalkalama hızında gerçekleşen denemelerde antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3. 6. Soya küspesi konsantrasyonu (g/L)

Şekil 3.6'ya bakıldığında soya küspesi konsantrasyonunun 20 g/L değerinden 50 g/L değerine artırılması ile antimikrobiyal aktivitenin yükseldiği gözlemlenmiştir. Denemeler sonucunda soya küspesi konsantrasyonunun istatistiksel açıdan önemli ($P \leq 0,05$) bir etkisinin olduğu bulunmuştur.

L. lactis'in geliştirilmesi genellikle tripton, pepton, maya ekstraktı, mısır likörü veya et ekstraktı gibi büyük miktarlarda pahalı ve yüksek kaliteli azot kaynakları gerektirmektedir. Çoğu durumda, bu azot kaynakları, büyük ölçekli nisin üretiminin maliyetini önemli ölçüde artıran bir etmen olarak görülmektedir [80]. Bu nedenle birçok çalışma *L. lactis* fermantasyonu ve nisin üretiminin maliyetini azaltmak için alternatif azot kaynağı aramaya yönelmiştir [71].

Soya fasulyesi yaklaşık olarak %40 protein içeren ucuz bir tarımsal hammaddedir [87]. Soya yağı endüstrisinde yan ürün olan ve yağdan arındırılmış soya küspesi yüksek besin değeri, arzu edilen amino asit içeriği ve düşük maliyeti nedeniyle *L. lactis* fermantasyonu için azot kaynağı olarak kullanılma potansiyeline sahiptir [88].

Liu vd. [89] tarafından yapılan çalışmada, soya küspesi ortamındaki nisin üretimi, ticari fermantasyon ortamındaki nisin üretiminden %21,3 daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç yağı alınmış soya fasulyesi küspesi (DSM) hidrolizatının *L. lactis* fermentasyonu ve nisin üretimi için uygun bir azot kaynağı olabileceğini göstermiştir. DSM ortamında nisin üretimi 10. saatte zirveye ulaşırken, ticari fermentasyon ortamında bu zirve 8. saatte gerçekleşmiştir. Bu farkın stakioz ve rafinoz gibi DSM oligosakkaritlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu oligosakkaritler, *L. lactis* tarafından üretilen α -galaktozidaz ile galaktoza hidrolize edilebilmektedir. *L. lactis*'in asit stresi altında karbon metabolizması yolunda meydana gelen değişikliklerin artan galaktoz kullanımına yol açtığı bildirilmiştir [90]. Bu nedenle DSM ortamındaki suş, tek karbon kaynağı olarak sükröz içeren suşa göre daha iyi bir aktivite göstermektedir [89].

3.6.3 Glikoz Şurubu Konsantrasyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi

CCD kullanılarak biyoreaktörde gerçekleştirilen fermantasyon denemelerinde glikoz şurubu değişkenine ait en düşük ve en yüksek noktalar 5-50 g/L olarak belirlenmiştir. Glikoz şurubu konsantrasyonunun pH 6,00 değerinde, 30°C sıcaklıkta ve 100 rpm çalkalama hızında gerçekleşen denemelerde antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3. 7. Glikoz şurubu konsantrasyonu (g/L)

Şekil 3.7'ye göre glikoz şurubu konsantrasyonunun 5 g/L değerinden 50 g/L değerine artırılması ile antimikrobiyal aktivitenin yükseldiği gözlemlenmiştir. Denemeler sonucunda glikoz şurubu konsantrasyonu ve glikoz şurubu konsantrasyonunun karesinin istatistiksel açıdan önemli ($P \leq 0,05$) bir etkisinin olduğu bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada [91] 11 farklı karbon kaynağı (ksiloz, arabinoz, glukoz, fruktoz, galaktoz, mannoz, sükroz, maltoz, laktoz, rafinoz ve nişasta), *L. lactis*'in hücre büyümesi ve nisin Z üretimi için karşılaştırılmıştır. Her karbon kaynağı m17 besiyerine %0,5 oranında ilave edilmiştir. 12 saatlik inkübasyon sonrası glukoz, sükroz ve laktoz, *L. lactis*'in gelişmesi için en uygun karbon kaynağı olarak belirlenmiştir. Bu karbon kaynakları üzerinde yapılan çalışmalarda ise en yüksek hücre biyokütlesi sükrozda geliştirilen hücrelerde gözlenmiştir. Glukoz veya laktozda daha az gelişim olurken sükrozda geliştirilen hücrelere benzer bir büyüme profili gözlenmiştir. Ancak galaktoz, inkübasyona süresinden 9-11 saat sonra hücre yoğunluğunda önemli bir azalmaya neden olmuştur. Sükroz en yüksek hücre gelişimini sağlamıştır. Ancak laktoz, sükroz ve glukozdan yaklaşık 3-4 kat daha fazla nisin Z üretmiştir.

Gelişme ortamının optimizasyonu, fermentasyon işleminin iyileştirilmesinde dikkate alınması gereken faktörlerden birisidir. Endüstriyel ölçekli fermentasyonlar için gelişme ortamı uygun maliyet, yüksek ürün verimi, kısa fermentasyon süresi gibi birçok kriteri karşılamalıdır [92]. Bununla birlikte, en yüksek ürün verimini sağlayan ortam çoğu durumda en uygun maliyetli

olmayabilir. Tercih edilen ortamın seçimi bu nedenle duruma ve farklı faktörler arasındaki bir dengeye bağlıdır. Ortamın formülasyonu sadece bakteriyosin üretiminin iyileştirilmesini değil, aynı zamanda üretimini stabilize etmeyi de amaçlamaktadır [93].

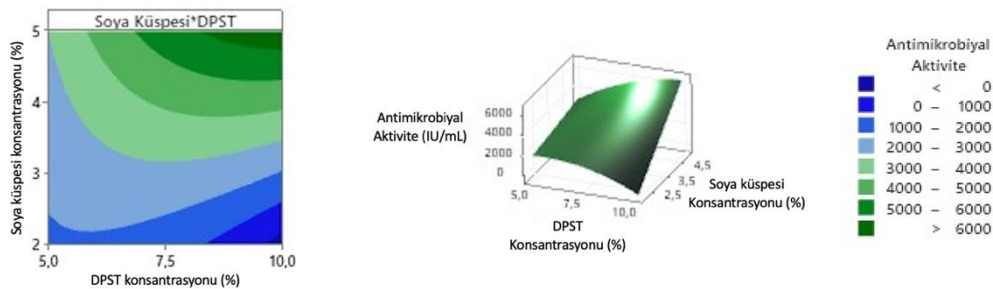
Bakteriyosin üretimini en üst düzeye çıkarmak için kültür ortamına takviye olarak şekerler, vitaminler ve azot kaynakları eklenebilir [94].

L. lactis ve *S. pyogenes* 54 gibi birkaç LAB suşunun, sırasıyla nisin Z ve streptokok SA-FF22 üretiminde tercihen glukoz kullandığı görülmüştür. *L. lactis*'in glukoz ile diğer karbon kaynaklarına kıyasla daha yüksek spesifik büyüme, daha hızlı substrat tüketimi ve daha fazla son ürün oluşturduğu gözlemlenmiştir [95].

Papagianni vd. [96], *L. lactis* ile glukoz tüketim oranı ve nisin üretimi arasında doğrudan bir ilişki bildirmiştir.

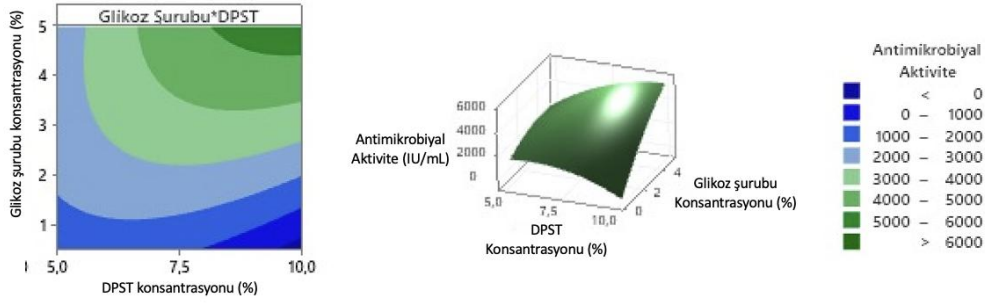
3.6.4 Soya küspesi-DPST, Glikoz Şurubu-DPST, Soya Küspesi-Glikoz Şurubu İteraksiyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteye Etkisi

Soya küspesi-DPST interaksiyonuna ait grafik Şekil 3.8'de, glikoz şurubu-DPST interaksiyonuna ait grafik Şekil 3.9'da ve soya küspesi-glikoz şurubu interaksiyonuna ait grafik Şekil 3.10'da verilmiştir.



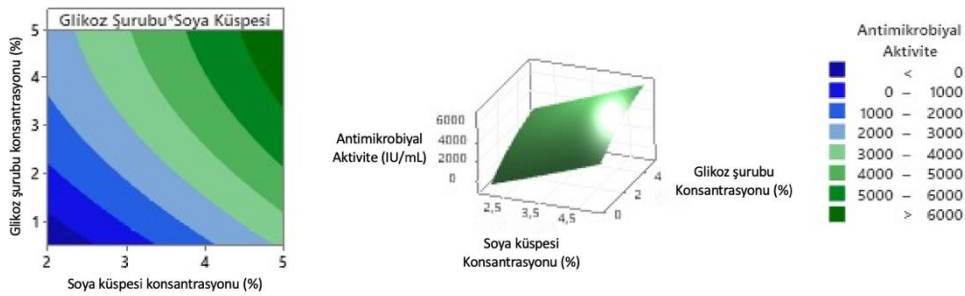
Şekil 3. 8. Antimikrobiyal aktivite üzerine soya küspesi-DPST interaksiyonunun etkisi

Şekil 3.8'e bakıldığında DPST konsantrasyonunun en yüksek, soya küspesi konsantrasyonunun en düşük olduğu değerlerde (100 g/L ve 20 g/L) antimikrobiyal aktivitenin en düşük olduğu, DPST konsantrasyonunun 100 g/L olması ve soya küspesi konsantrasyonunu 50 g/L olması durumunda antimikrobiyal aktivitenin arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. 9. Antimikrobiyal aktivite üzerine glikoz şurubu-DPST interaksiyonunun etkisi

Şekil 3.9'a bakıldığında DPST konsantrasyonunun en yüksek, glikoz şurubu konsantrasyonunun en düşük olduğu değerlerde (100 g/L ve 5 g/L) antimikrobiyal aktivitenin en düşük olduğu, DPST konsantrasyonunun 100 g/L olması ve glikoz şurubu konsantrasyonunu 50 g/L olması durumunda antimikrobiyal aktivitenin arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. 10. Antimikrobiyal aktivite üzerine glukoz şurubu-soya küspesi interaksiyonunun etkisi

Şekil 3.10'a bakıldığında soya küspesi konsantrasyonunun en yüksek, glikoz şurubu konsantrasyonunun en düşük olduğu değerlerde (50 g/L ve 5 g/L) antimikrobiyal aktivitenin düşük olduğu, soya küspesi konsantrasyonunun 50 g/L olması ve glikoz şurubu konsantrasyonunu 50 g/L olması durumunda antimikrobiyal aktivitenin arttığı tespit edilmiştir.

Nisin üretimini iyileştirmeyi amaçlayan yenilikçi çalışmalar, nisin üretimini olumsuz etkileyen faktörleri en aza indirerek çeşitli manipülasyonlarla yüksek

verim sağlayan üretici suşların gelişimini araştırmıştır. Bu yaklaşımlar Tablo 3.8’de verilmiştir [97].

Tablo 3. 9. Nisin üretiminde yenilikçi yaklaşımlar

Nisin Üreticisi	Nisin Üretimi	İnovatif Yaklaşım	Kaynak
<i>L. lactis</i> ATCC11454	7900 IU/mL	<i>aox1</i> geni klonlanmış ve rekombinant nisin üreticisi oksidatif solunuma teşvik edilmiştir.	Papagianni and Avramidis. [98]
<i>L. lactis</i> ATCC11454	14000 IU/mL	<i>aox1</i> geni, glikolitik aktiviteyi ve oksidatif solunumu artırmak amacıyla <i>pfk13</i> ve <i>pkaC</i> genleriyle birlikte klonlanmıştır.	Papagianni and Avramidis. [98]
<i>L. lactis</i> PLAC7	10500 IU/mL	Chitin bağlanma domeni, <i>L. lactis</i> üreticisinde klonlanmış ve chitin varlığında sürekli bir fermentasyon sisteminde kullanılmıştır.	Simsek [99]
<i>L. lactis</i> YF11	4023 IU/mL	Nisin Z üretimini artırmak amacıyla <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> YF11 üzerinde genom karıştırma, yinelemeli protoplast füzyonu ile uygulanmıştır.	Zhang et al. [100]
<i>L. lactis</i> N8	5410 IU/mL	Aerobik koşullarda hemin ile fed batch fermentasyon gerçekleştirilmiştir.	Kordikanlioglu et al. [101]

Nisin,
fermantasyondan

<i>L. lactis</i> ATCC11454	4657 IU/mL	köpük fraksiyonlaması ile çevrimiçi olarak geri kazanılmıştır.	Zheng et al. [102]
Tablo 3. 10. Nisin üretiminde yenilikçi yaklaşımlar (Devamı)			
<i>L. lactis</i> LD2	15400 IU/mL	Nisin, değişken besleme hızıyla aerated fed-batch fermentasyon sisteminde üretilmiştir.	Jiang et al [103]
<i>L. lactis</i> F44	5560 IU/mL	<i>hdeAB</i> , <i>Idh</i> ve <i>murF</i> genleri, <i>L. lactis</i> üreticisinin asidik toleransını artırmak amacıyla aynı anda klonlanıp ifade edilmiştir.	Zhang et al. [104]
<i>L. lactis</i> F44A	5346 IU/mL	Asidik tolerans, nisin üreticisi <i>L. lactis</i> 'te <i>asnH</i> geninin aşırı ekspresyonu ile artırılmıştır.	Hao et al. [105]
<i>L. lactis</i> UTMCI06	10800 IU/mL	Bu üretici, fermantasyon sisteminde <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC18942 ile kullanıldı.	Ariana and Hamedi [106]
<i>L. lactis</i> N8	9120 IU/mL	DPST, soya küspesi ve glikoz şurubu ortamında fermantasyon gerçekleştirilmiştir.	Bu çalışma

4.1 Sonuç

Çalışmada antimikrobiyal özellikli fermantasyon tozlarının *L. lactis* N8 suşu kullanılarak en yüksek verimle üretimini sağlayacak fermantasyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon denemeleri biyoreaktör ölçeğinde uygulanmıştır. Optimizasyon denemelerinden sonra metabolitler uygun taşıyıcılara yüklenerek püskürtmeli kurutucu ile kurutulmuştur.

Çalışmada, DPST, soya küspesi ve glikoz şurubu konsantrasyonlarının antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkilerini belirlemek için yanıt yüzey metodolojisine dayalı CCD kullanılarak toplam 20 deneme içeren bir deneme deseni oluşturulmuştur. DPST konsantrasyonu için sınır değerler 50 ile 100 g/L, soya küspesi konsantrasyonu için 20 ile 50 g/L, glikoz şurubu konsantrasyonu için ise 5 ile 50 g/L olarak belirlenmiştir.

Biyoreaktörde gerçekleştirilen tüm denemelere ait bulgular ve istatistiksel analizlere ait sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Biyoreaktörde 20 farklı koşulda yapılan, 24 saat süren fermantasyon denemeleri sonucunda *M. luteus*'a karşı antimikrobiyal aktivitenin 940-9091 IU/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir.
- Gerçekleştirilen denemelerde en yüksek aktivitenin 100 g/L DPST, 50 g/L soya küspesi ve 50 g/L glikoz şurubu karışımı kullanılarak hazırlanan besiyeri ortamında olduğu belirlenmiştir.
- *L. lactis* N8 suşu kullanılarak antimikrobiyal metabolit üretiminde DPST, soya küspesi ve glikoz şurubu konsantrasyonunun, DPST-soya küspesi, DPST-glikoz şurubu konsantrasyonu interaksiyonlarının, DPST, glikoz

şurubu konsantrasyonunun karelerinin istatistiksel olarak önemli ($P \leq 0,05$) seviyede etkili oldukları tespit edilmiştir.

- DPST konsantrasyonunun 50 g/L değerinden 100 g/L değerine artırılması ile antimikrobiyal aktivitenin bir miktar yükseldiği ancak daha sonra düştüğü, soya küspesi konsantrasyonunun 20 g/L değerinden 50 g/L değerine artırılması ile antimikrobiyal aktivitenin yükseldiği, glikoz şurubu konsantrasyonunun 5 g/L değerinden 50 g/L değerine artırılması ile antimikrobiyal aktivitenin yükseldiği gözlemlenmiştir.
- Antimikrobiyal metabolit üretiminde DPST konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal aktivitenin bir müddet arttığı ancak daha sonra azaldığı, glikoz şurubu ve soya küspesi konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal aktivitenin arttığı belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren ortam seçilerek optimum üretim yapılmıştır. Bu ortamda üretilen ferment püskürtmeli kurutucu ile kurutulmuştur. Kurutularak elde edilen fermantasyon tozuna ait analiz sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

- DPST ve maltodekstrin olmak üzere iki farklı taşıyıcıya %1-%3-%5-10-15-20 ve 30 olmak üzere 7 farklı oranda yükleme yapılmıştır.
- 2 faktör ve 7 farklı koşulda yapılan yüklemeler sonucunda antimikrobiyal aktivitenin 7910-41000 IU/gr arasında değiştiği tespit edilmiştir.
- Yapılan yüklemeler sonucu en yüksek aktivitenin %5 oranında maltodekstrin kullanılarak elde edildiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, peynir altı suyu, soya küspesi ve glikoz şurubu gibi gıda sanayiinin önemli atık ve yan ürünlerinden antimikrobiyal özelliğe sahip değerli ürünlerin düşük maliyetle üretilebileceği gösterilmiş olup, bunun doğal gıda talebi artan tüketici taleplerini karşılamaya yönelik, sürdürülebilir sistemlerin geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Daha ileri çalışmalarla, ortam konsantrasyonuna ek olarak diğer fermantasyon parametrelerinin (pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve havalandırma gibi) de

optimize edilmesi ve ayrıca elde edilen fermentteki antimikrobiyal bileşiklerin (organik asitler ve bakteriyosinler gibi) saflaştırılması ile düşük maliyetli atıklardan katma değeri yüksek ürünlerin büyük ölçekte ticari olarak üretimleri sağlanabilir.

KAYNAKÇA

- [1] M. Admassie, "A Review on food fermentation and the biotechnology of lactic acid bacteria," *World Journal of Food Science and Technology*, vol. 2, no. 1, pp. 19-24, 2018.
- [2] J. C. Hernández-González, A. Martínez-Tapia, G. Lazcano-Hernández, B. E. García-Pérez, ve N. S. Castrejón-Jiménez, "Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine," *Animals*, vol. 11, no. 4, 2021.
- [3] Y. Wang et al., "Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021.
- [4] M. Evren, M. Apan, E. Tutkun, ve S. Evren, "Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri," *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, vol. 9, no. 1, pp. 11-17, 2011.
- [5] C. O. Okoye et al., "Microbial and bio-based preservatives: Recent advances in antimicrobial compounds," in *Microbes for Natural Food Additives*, A. K. Nadda and G. Goel, Eds. Microorganisms for Sustainability, 2022.
- [6] Z. Yu, Y. Su, Y. Zhang, P. Zhu, Z. Mei, X. Zhou, ve H. Yu, "Potential use of ultrasound to promote fermentation, maturation, and properties of fermented foods: A review," *Food Chemistry*, vol. 357, 2021.
- [7] F. George et al., "Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018.
- [8] F. Doğan, Y. Gezginç, ve Ş. N. A. Yavaş, "Molecular determination of antibiotic resistance properties of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated natural yogurts," *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, vol. 28, pp. 86-95, 2022.
- [9] M. Papagianni ve S. Anastasiadou, "Pediocins: The bacteriocins of

- Pediococci. Sources, production, properties and applications," *Microbial Cell Factories*, vol. 8, no. 1, 2009.
- [10] A. K. Seçkin, H. Tosun, ve R. Aritürk, "Biyokorumanın süt endüstrisinde kullanım olanakları," *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, vol. 5, no. 3, pp. 36-46, 2010.
 - [11] S. Morandi, T. Silvetti, V. Vezzini, E. Morozzo, ve M. Brasca, "How we can improve the antimicrobial performances of lactic acid bacteria. A new strategy to control *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheese," *Food Microbiology*, vol. 90, 2020.
 - [12] M. C. Soria ve M. C. Audisio, "Inhibition of *Bacillus cereus* strains by antimicrobial metabolites from *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 and *Enterococcus faecium* SM21," *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, vol. 6, pp. 208-216, 2014.
 - [13] L. Makras et al., "Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds," *Research in Microbiology*, vol. 157, no. 3, pp. 241-247, 2006.
 - [14] M. Aman et al., "Lactic acid bacteria inhibits quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* strain JUPG01 isolated from rancid butter," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 36, 2021.
 - [15] J. Lukic et al., "Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 25, no. 6, pp. 912-922, 2017.
 - [16] M. P. Mokoena, "Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review," *Molecules*, vol. 22, no. 8, 2017.
 - [17] K. C. Fugelsang ve C. G. Edwards, "Identification of Wine Microorganisms," in *Wine Microbiology*, pp. 241-272, 2007.
 - [18] W. P. Hammes ve C. Hertel, "The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*," in *The Prokaryotes*, vol. 4, pp. 320-403, 2006.
 - [19] E. Salvetti, S. Torriani, ve G. E. Felis, "The genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update," *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, vol. 4, no. 4, pp. 217-226, 2012.
 - [20] M. Teuber, "Lactococcus," *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1-21, 2015.
 - [21] S. Skariyachan ve S. Govindarajan, "Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp. towards selected food

samples in comparison with chemical preservatives," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 291, pp. 189-196, 2019.

- [22] G. Klein, "Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, no. 2-3, pp. 123-131, 2003.
- [23] F. J. Chill, D. Maida, ve N. Maida, "The lactic acid bacteria: A literature survey," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 28, no. 4, pp. 281-370, 2002.
- [24] R. A. Whiley ve J. M. Hardie, "Streptococcus," *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1-86, 2015.
- [25] L. Laëtitia, P. D., ve Y. D., "The citrate metabolism in homo- and heterofermentative LAB: a selective means of becoming dominant over other microorganisms in complex ecosystems," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 5, no. 10, pp. 953-969, 2014.
- [26] Y. Haryani et al., "Characterization, molecular identification, and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from selected fermented foods and beverages in Malaysia," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 370, 2023.
- [27] G. Çelikyurt ve M. Arıcı, "Gıda koruyucusu olarak mikrobiyal kaynaklı organik asitler ve önemi," *Gıda*, vol. 10, pp. 1023-1026, 2008.
- [28] Z. Yang, "Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: their structures and properties," Ph.D. dissertation, Helsingin yliopisto, 2000.
- [29] S. Özcelik, E. Kuley, ve F. Özogul, "Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria," *LWT*, vol. 73, pp. 536-542, 2016.
- [30] A. H. Çon ve H. Y. Gökalp, "Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri," *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, vol. 30, pp. 180-190, 2000.
- [31] W. H. Holzapfel, R. Geisen, ve U. Schillinger, "Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 24, pp. 343-362, 1995.
- [32] S. Kılıç, "Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri," *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, 2014.
- [33] S. Clark ve C. K. Winter, "Diacetyl in foods: a review of safety and sensory characteristics," *Comprehensive Reviews in Food Science and*

Food Safety, vol. 14, no. 5, pp. 634-643, 2015.

- [34] M. A. Daeschel, "Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives," *Food Technology*, vol. 43, pp. 164-167, 1989.
- [35] M. Evren, C. Albayram, ve M. Apan, "Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler," *Gıda*, vol. 9, pp. 24-26, 2006.
- [36] V. Cleusix, C. Lacroix, S. Vollenweider, M. Duboux, ve G. Le Blay, "Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria," *BMC Microbiology*, vol. 7, p. 101, 2007.
- [37] S. M. H. Mortazavi, M. Kaur, A. Farahnaky, P. J. Torley, ve A. M. Osborn, "The pathogenic and spoilage bacteria associated with red meat and application of different approaches of high CO₂ packaging to extend product shelf-life," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 63, no. 12, pp. 1733-1754, 2023.
- [38] G. Koral, "Bozadan izole edilen *Lactococcus lactis subsp. lactis* gyl32 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyon," M.S. thesis, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2011.
- [39] L. V. Thomas ve J. W. T. Wimpenny, "Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 6, pp. 2006-2012, 1996.
- [40] E. Dinçer, M. Kıvanç, ve H. Karaca, "Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri," *Gıda*, vol. 35, no. 1, pp. 10-16, 2010.
- [41] A. Gálvez, H. Abriouel, R. L. López, ve N. Ben Omar, "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 120, no. 1-2, pp. 51-70, 2007.
- [42] T. R. Klaenhammer, "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 12, no. 1-3, pp. 39-85, 1993.
- [43] I. F. Nes, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, ve H. Holo, "Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 70, pp. 113-128, 1996.
- [44] M. A. Daw ve F. R. Falkner, "Bacteriocins: nature, function and structure," *Micron*, vol. 27, no. 6, pp. 467-479, 1996.
- [45] P. Reeves, "The Bacteriocins," vol. 29, no. 1, 1965.
- [46] D. E. Bradley, "Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins," vol. 31, no. 4, 1967.

- [47] S. F. Deraz, E. N. Karlsson, M. Hedström, M. M. Andersson, ve B. Mattiasson, "Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079," *Journal of Biotechnology*, vol. 117, no. 4, pp. 343-354, 2005.
- [48] R. W. Jack, J. R. Tagg, ve B. Ray, "Bacteriocins of Gram-positive bacteria," *Microbiological Reviews*, vol. 59, no. 2, pp. 171-200, 1995.
- [49] P. D. Cotter, C. Hill, ve R. P. Ross, "Bacteriocins: developing innate immunity for food," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 10, pp. 777-778, 2005.
- [50] D. Lahiri et al., "Bacteriocin: A natural approach for food safety and food security," in *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10, 2022.
- [51] E. M. Balciunas, F. A. Castillo Martinez, S. D. Todorov, B. D. G. de M. Franco, A. Converti, ve R. P. de S. Oliveira, "Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review," *Food Control*, vol. 32, no. 1, pp. 134-142, 2013.
- [52] E. M. Balciunas, F. A. Castillo Martinez, S. D. Todorov, B. D. G. de M. Franco, A. Converti, ve R. P. de S. Oliveira, "Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review," *Food Control*, vol. 32, no. 1, pp. 134-142, 2013.
- [53] L. M. Cintas, M. P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, ve P. E. Hernández, "Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria," *Food Science and Technology International*, vol. 7, no. 4, pp. 281-305, 2001.
- [54] S. D. Todorov, "Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 40, pp. 209-221, 2009.
- [55] G. Başbülbül, *Çeşitli doğal kaynaklardan izole edilen termofilik bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması*, Ph.D. dissertation, Adnan Menderes Univ., Aydın, Turkey, 2009.
- [56] J. C. P. Santos et al., "Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 48, pp. 179-194, 2018.
- [57] B. Martínez, A. Rodríguez, ve E. Suárez, "Antimicrobial peptides produced by bacteria: The bacteriocins," *New Weapons to Control Bacterial Growth*, pp. 15-38, 2016.
- [58] A. J. M. Driessen et al., "Mechanistic Studies of Lantibiotic-Induced

Permeabilization of Phospholipid," vol. 34, no. 6, 1996.

- [59] A. W. Negash ve B. A. Tsehai, "Current applications of bacteriocin," *International Journal of Microbiology*, vol. 2020, pp. 1-8, 2020.
- [60] P. M. Davidson, H. B. Cekmer, E. A. Monu, ve C. Techathuvanan, "The use of natural antimicrobials in food: an overview," *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, pp. 1-27, 2015.
- [61] V. Fuochi, R. Emma, ve P. M. Furneri, "Bacteriocins, a natural weapon against bacterial contamination for greater safety and preservation of food: a review," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 22, no. 2, pp. 216-231, 2021.
- [62] S. C. Yang, C. H. Lin, C. T. Sung, ve J. Y. Fang, "Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals," *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, 2014. d
- [63] H. Chen ve D. G. Hoover, "Bacteriocins and their food applications," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 2, no. 3, pp. 82-100, 2003.
- [64] R. H. Hernández Figueroa, A. López-Malo, ve E. Mani-López, "Antimicrobial activity and applications of fermentates from lactic acid bacteria – a review," *Sustainable Food Technology*, vol. 2, no. 2, pp. 292-306, 2024.
- [65] T. P. Van Boeckel et al., "Global trends in antimicrobial use in food animals," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, no. 18, pp. 5649-5654, 2015.
- [66] S. Soltani et al., "Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 45, no. 1, 2021.
- [67] C. C. G. Silva, S. P. M. Silva, ve S. C. Ribeiro, "Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018.
- [68] M. Altaf, B. J. Naveena, ve G. Reddy, "Use of inexpensive nitrogen sources and starch for l(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation," *Bioresource Technology*, vol. 98, no. 3, pp. 498-503, 2007.
- [69] S. A. Hayek ve S. A. Ibrahim, "Current limitations and challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 4, no. 11, pp. 73-87, 2013.
- [70] B. Mandal, R. Chowdhury, C. Bhattacharjee, ve R. Haque, "Current developments in probiotic delivery and applications," *International Journal*

of Biomedical Research, vol. 6, pp. 39-51, 2013.

- [71] S. F. Deraz, G. F. El-Fawal, S. A. Abd-Ellatif, ve A. A. Khalil, "Autohydrolysed tilapia nilotica fish viscera as a peptone source in bacteriocin production," *Indian Journal of Microbiology*, vol. 51, no. 2, pp. 171-175, 2011.
- [72] H. W. Ryu, Y. J. Wee, ve J. N. Kim, "Biotechnological production of lactic acid and its recent applications," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 44, no. 2, pp. 163-172, 2006.
- [73] F. Cladera-Olivera, G. R. Caron, ve A. Brandelli, "Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 21, no. 1, pp. 53-58, 2004.
- [74] N. Doğan, "İstiridye mantarından (*Pleurotus ostreatus*) mantar tozu ve cips üretiminin optimizasyonu," M.S. thesis, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, 2016.
- [75] J. Tramer ve G. G. Fowler, "Estimation of nisin in foods," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 15, no. 8, pp. 522-528, 1964.
- [76] K. Halkman, *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, Başak Matbaacılık, Ekim, Ankara, 2005.
- [77] Z. Li, D. Lu, ve X. Gao, "Optimization Of Mixture Proportions By Statistical Experimental Design Using Response Surface Method - A Review," *Journal Of Building Engineering*, vol. 36, 2021.
- [78] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, 2017.
- [79] Y. Andriani, R. I. Pratama, ve R. Safitri, "Probiotic microbes and their growth in different carriers (A review)," *South Asian Journal of Research in Microbiology*, vol. 13, no. 1, pp. 15-23, 2022.
- [80] S. A. Hogan, B. F. McNamee, E. D. O'riordan, ve M. O'sullivan, "Microencapsulating properties of whey protein concentrate 75," *Journal of Food Science*, vol. 66, no. 5, pp. 675-680, 2001.
- [81] S. S. Marwaha ve J. F. Kennedy, "Whey-pollution problem and potential utilization," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 23, 1988.
- [82] L. J. de Arauz, A. F. Jozala, P. G. Mazzola, ve T. C. Vessoni Penna, "Nisin biotechnological production and application: a review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 20, no. 3-4, pp. 146-154, 2009.

- [83] W. Lv, X. Zhang, ve W. Cong, "Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 68, no. 3, pp. 322-326, 2005.
- [84] L. De ve E. J. Vandamme, "Chapter 5 Nisin, a Lantibiotic Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: Properties, biosynthesis, fermentation and applications," in *Food Biotechnol.*, vol. 5, CRC Press, 2004.
- [85] J. A. Vázquez, M. P. González, ve M. A. Murado, "Preliminary tests on nisin and pediocin production using waste protein sources: Factorial and kinetic studies," *Bioresour. Technol.*, vol. 97, no. 4, pp. 605-613, 2006.
- [86] N. P. Guerra, M. L. Rua, ve L. Pastrana, "Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 70, 2001.
- [87] L. K. Karr-Lilienthal, C. M. Grieshop, J. K. Spears, ve G. C. Fahey, "Amino acid, carbohydrate, and fat composition of soybean meals prepared at 55 commercial U.S. soybean processing plants," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 2146-2150, 2005.
- [88] J. M. Hur ve D. H. Park, "Making soy sauce from defatted soybean meal without the meju process by submerged cultivation using thermophilic bacteria," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 8, pp. 5030-5038, 2015.
- [89] J. Liu et al., "Improving nitrogen source utilization from defatted soybean meal for nisin production by enhancing proteolytic function of *Lactococcus lactis* F44," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [90] M. Cretenet et al., "Dynamic analysis of the *Lactococcus lactis* transcriptome in cheeses made from milk concentrated by ultrafiltration reveals multiple strategies of adaptation to stresses," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 1, pp. 247-257, 2011.
- [91] C. I. Cheigh et al., "The effect of carbon sources on nisin Z biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 15, no. 5, pp. 1152-1157, 2005.
- [92] N. P. Guerra et al., "Modelling the fed-batch production of pediocin using mussel processing wastes," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 3-4, pp. 1071-1083, 2005.
- [93] F. Leroy et al., "The stimulating effect of a harsh environment on the bacteriocin activity by *Enterococcus faecium* RZS C5 and dependency on the environmental stress factor used," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 83, no. 1, pp. 27-38, 2003.
- [94] M. Mataragas et al., "Influence of pH and temperature on growth and

- bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442," *Meat Sci.*, vol. 64, no. 3, pp. 265-271, 2003.
- [95] S. Even, N. D. Lindley, ve M. Coccagn-Bousquet, "Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403," *J. Bacteriol. Sci.*, vol. 183, no. 13, pp. 3817-3824, 2001.
- [96] M. Papagianni, N. Avramidis, ve G. Filiouis, "Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*," *Enzyme Microb. Technol. Sci.*, vol. 40, no. 6, pp. 1557-1563, 2007.
- [97] B. Özel et al., "Innovative approaches to nisin production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, pp. 6299-6307, 2018.
- [98] M. Papagianni ve N. Avramidis, "Engineering the central pathways in *Lactococcus lactis*: functional expression of the phosphofructokinase (pfk) and alternative oxidase (aox1) genes from *Aspergillus niger* in *Lactococcus lactis* facilitates improved carbon conversion rates under oxidizing conditions," *Enzym. Microb. Technol.*, vol. 51, no. 3, pp. 125-130, 2012.
- [99] Ö. Şimşek, "Nisin production in a chitin-including continuous fermentation system with *Lactococcus lactis* displaying a cell wall chitin-binding domain," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 41, pp. 535-543, 2014.
- [100] Y. F. Zhang et al., "Genome shuffling of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* YF11 for improving nisin Z production and comparative analysis," *J. Dairy Sci.*, vol. 97, no. 5, pp. 2528-2541, 2014.
- [101] B. Kordikanlioglu, Ö. Şimşek, ve P. E. Saris, "Nisin production of *Lactococcus lactis* N8 with hemin-stimulated cell respiration in fed-batch fermentation system," *Biotechnol. Prog.*, vol. 31, no. 3, pp. 678-685, 2015.
- [102] H. Zheng et al., "Online recovery of nisin during fermentation coupling with foam fractionation," *J. Food Eng.*, vol. 162, pp. 25-30, 2015.
- [103] L. Jiang et al., "Aeration and fermentation strategies on nisin production," *Biotechnol. Lett.*, vol. 37, pp. 2039-2045, 2015.
- [104] J. Zhang et al., "Enhance nisin yield via improving acid-tolerant capability of *Lactococcus lactis* F44," *Sci. Rep.*, vol. 6, 2016.
- [105] P. Hao et al., "Promoting acid resistance and nisin yield of *Lactococcus lactis* F44 by genetically increasing D-Asp amidation level inside cell wall," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, pp. 6137-6153, 2017.
- [106] M. Ariana ve J. Hamedi, "Enhanced production of nisin by co-culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Yarrowia lipolytica* in molasses based

medium," *J. Biotechnol.*, vol. 256, pp. 21-26, 2017.



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. A. Polat ve Ö. Şimşek, 'Production of Fermentation Powders with Natural Antimicrobials Properties' *International Food Innovation and Sustainability Congress*, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 16-18 Mayıs 2024.

