

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NİSİN ÜRETİCİSİ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 SUŞUNUN BEYAZ
PEYNİRDE *Listeria monocytogenes*'in GELİŞİMİNİN ENGELLENMESİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Ramazan YILDIRIM

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

ANKARA

2010

Nisin Üreticisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunun Beyaz Peynirde *Listeria monocytogenes*'in Gelişiminin Engellenmesi Üzerine Etkisi

ÖZET

Bu araştırmada dört farklı *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşu (LL2, LL23, LL9 ve LL27) kullanarak üretilen beyaz peynirlerde 90 gün boyunca proteoliz ve lipoliz düzeyleri ile *Listeria monocytogenes*'in kalıcılığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, beyaz peynirdeki proteoliz ve lipoliz düzeyinin suşa bağlı olduğunu göstermiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* LL23 ile yapılan peynirde kazein fraksiyonlarının proteoliz düzeyi daha yüksek bulunurken *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 ile üretilen peynirde serbest yağ asitleri (özellikle orta ve uzun zincirli yağ asitleri) düzeyi çok daha yüksek saptanmıştır. Farklı suşlar kullanarak üretilen peynirler arasında toplam bakteri sayısı ve pH gelişimi açısından önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte *L. lactis* subsp. *lactis* LL9 suşu kullanılarak üretilen peynirdeki laktik asit düzeyi diğer peynirlere oranla daha düşük saptanmıştır. Öte yandan beyaz peynir örneklerinde 90 günlük depolama sonunda sadece *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun *Listeria monocytogenes*' in gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Araştırma sonucunda incelenen *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarından en az iki tanesinin (LL23 ve LL27) beyaz peynir üretiminde starter kültür olarak kullanıma uygun olduğu tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Beyaz peynir, *L. lactis* subsp. *lactis*, Lipoliz, Proteoliz, Nisin, *Listeria monocytogenes*

The Effect of Nisin Producer Strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 on the Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Beyaz Cheese

ABSTRACT

The development of proteolysis and lipolysis and persistence of *Listeria monocytogenes* in white brined cheese made using four three wild-type strains *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (namely LL2, LL9, LL23 and LL27) were monitored for a period of 90 days. Result obtained indicated that developments of proteolysis and lipolysis in white-brined cheese were strain-dependent. While the proteolytic degradation of casein fractions was more evident in the cheeses made using *L. lactis* subsp. *lactis* LL23, the level of free fatty acids (especially medium and long chain fatty acids) was much higher in the cheese produced using *L. lactis* subsp. *lactis* LL27. No marginal difference was noted among the wild type strains in terms of total bacteria counts and pH development. However in the cheese made using *L. lactis* subsp. *lactis* LL9 the development of lactic acid was more limited compared to the other cheeses. On the other hand, it was determined that only the strain LL27 was inhibited *Listeria monocytogenes* in white-brined cheeses end of the 90 days period. To conclude at least two of the wild-type strains of *L. lactis* subsp. *lactis* (LL23 and LL27) were found to be suitable as, starter culture for white-brined cheese making.

Key Words: White-brined cheese, *L. lactis* subsp. *lactis*, Lipolysis, Proteolysis, Nisin, *Listeria monocytogenes*

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince beni yönlendiren, araőtırmamın her aşamasında kıymetli görüőlerinden, deneyimlerinden ve bilgisinden yararlandığım değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)'e en içten duygularıyla teşekkür ediyorum.

Gösterdiği anlayıő ve yardımlarından dolayı sevgili eőim Ayőegöl YILDIRIM ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yardımları için Arő. Gör. Nefise AKKOÇ ve çalışma arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Ramazan YILDIRIM

Ankara, Ocak 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. <i>Lactococcus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	4
2.2. Laktik asit Bakterilerinin Ürettiği Bakteriyosinler.....	5
2.2.1. Bakteriyosinlerin Tarihçesi ve Tanımı.....	5
2.2.2. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması.....	6
2.2.3. Bakteriyosinlerin Biyosentezleri.....	9
2.2.4. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etki Mekanizması.....	11
2.2.5. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etki Spektrumları.....	13
2.2.6. Nisin.....	15
2.3.1. Peynirde Listeriozis.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Çiğ Süt.....	20
3.1.2. Beyaz Peynir.....	20
3.1.3. Starter Kültür.....	20
3.1.4. Peynir Mayası.....	21
3.1.5. Kalsiyum Klorür (CaCl ₂).....	21
3.1.6. Salamura.....	21
3.1.7. Ambalaj Malzemesi.....	21
3.1.8. Bakterilerin Kökeni ve Gelişme Ortamları.....	21
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Bakteriyosin Aktivite Testi.....	23
3.2.2. Beyaz Peynir Yapımı.....	24
3.2.3. Kimyasal Analizler.....	24

3.2.4. Serbest Yağ Asitlerinin Belirlenmesi.....	25
3.2.5. Üre-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Üre-PAGE).....	25
3.2.6. Beyaz Peynir Örneklerinde Bakteri Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Mikrobiyel Yöntemler.....	26
3.2.7. Plazmid İçeriklerinin Belirlenmesi.....	27
3.2.7.1. Plazmid İzolasyonu.....	27
3.2.7.2. Elektrofrez.....	29
3.2.8. İstatiksel Analizler.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1. Peynirlerin Kuru Madde, Yağ, pH ve Titrasyon Asitliği Karakteristikleri.....	31
4.2. Peynirlerde Olgunlaşma Süresince Starter Bakteri Sayısındaki Değişimler.....	34
4.3. Peynirlerde Proteoliz.....	35
4.4. Peynirlerde Lipoliz.....	39
4.5. Starter Kültür Suşlarının Peynir Üretiminde <i>Listeria monocytogenes</i> 'in İnhibisyonu Üzerine Etkisi.....	43
5. SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Nisinin Primer Yapısı.....	16
Şekil 4.1	Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince kuru maddelerindeki tuz konsantrasyonunda meydana gelen değişmeler.....	32
Şekil 4.2	Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince pH değerlerinde meydana gelen değişmeler.....	33
Şekil 4.3	Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince titrasyon asitliği değerlerinde meydana gelen değişmeler.....	33
Şekil 4.4	Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince starter bakteri içeriklerinde meydana gelen değişmeler.....	35
Şekil 4.5	Peynirlerin pH 4,6' da çözünmeyen fraksiyonların elektroporetogramları.....	37
Şekil 4.6	Peynirlerin %70 etanol de çözünmeyen fraksiyonların elektroporetogramları	38
Şekil 4.7	Peynirlerin serbest uçucu yağ asitlerindeki değişmeler.....	41
Şekil 4.8	Peynirlerin toplam yağ asidi içeriklerindeki değişmeler.....	42
Şekil 4.9	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 suşunun plazmidlerinin peynir üretim süreçlerindeki stabilitesi.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Laktokok türlerinin karakteristik özellikleri.....	5
Çizelge 2.2	Farklı sınıflara ait bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar.....	8
Çizelge 4.1	Olgunlaşma süresi boyunca peynir örneklerinde <i>Listeria monocytogenes</i> sayısındaki (kob/g) değişim.....	45

SİMGELER DİZİNİ

cm	Santimetre
CN	Kazein
Da	Dalton
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonukleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik asit
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
GRAS	İnsan ve Hayvan Tüketiminde Güvenilir
kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
kob/mL	Mililitredeki Koloni Oluşturma Birimi
<i>L</i>	<i>Lactococcus</i>
log	Logaritma
M	Molar
mb	Megabaz
mg	Miligram
mL	Mililitre
N	Normal
nm	Nanometre
rDNA	Ribozomal Deoksiribonukleik Asit
RNA	Ribonukleik Asit
rpm	Dakikada Devir Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
UV	Ultraviyole
Üre-PAGE	Üre-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
v/v	Hacim/Hacim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

1. GİRİŞ

Gıda endüstrisinde güvenli gıda üretimi ve üretim tasarımları esastır. Son yıllarda gıda üretim teknolojilerinde ve gıda güvenliği alanında kaydedilen gelişmelere rağmen, patojen mikroorganizmalarla kontamine olmuş gıdaların tüketimi her geçen yıl artmaktadır. Bu durum insan sağlığının üzerine olumsuz etkilerinin yanında, ekonomik olarak önemli kayıplara da neden olmaktadır. Gıdalardan *Listeria*'nın izolasyonu ve idenfikasyonu yöntemlerindeki ilerlemeler ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, insanlarda önemli gıda kaynaklı enfeksiyon ve zehirlenme etkenlerinden birinin de *Listeria monocytogenes* enfeksiyonları olduğunu ortaya koymuştur (Schlech 1988, Farber and Peterkin 1991, Reij et al. 2004). Psikrofil bir mikroorganizma olan *Listeria monocytogenes* buzdolabı sıcaklığında gelişebilmesi nedeniyle öne çıkan bir bakteridir. Genellikle sporatik olarak seyreden listeriozis etkeni olan *Listeria*'nın doğada yaygın olarak bulunması ve toprak kökenli olması gıdalardaki kontaminasyon riskini artırmaktadır (Seeliger and Jones 1986, Clevaland et al. 2001).

Birçok ülkede yapılan epidemiyolojik çalışmalarda özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde görülen listeriozis vakalarının, pastörize süt, yumuşak peynir ve diğer süt ürünleri ile bağlantılı olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir. Ayrıca, hayvansal gıdalardan kaynaklanan listeriozisin hamile kadınlarda düşüklere, bağışıklık sistemi baskılanmış kadın ve erkeklerde menenjitte neden olduğu, ölüm riskinin de % 30 gibi yüksek oranlara ulaştığı belirlenmiştir. Bu yönü ile *Listeria monocytogenes* gıda endüstrisinde ciddi endişeler doğurmuş ve hükümetlerin gıda koruma yöntemlerini sorgulamalarına neden olmuştur (Farber and Peterkin 1991, Zottola and Smith 1991, Bersot et al. 2001).

Listeriozis enfeksiyonları hayvansal gıdalar arasında özellikle *Listeria monocytogenes* ile kontamine peynir tüketiminden kaynaklanmaktadır. Bu kontaminasyonun peynir yapımı, olgunlaştırılması, depolanması ya da nakledilmesi aşamalarında, başta sıcaklık ve pH olmak üzere değişik koşullara bağlı olarak gerçekleştiği, *Listeria*'nın değişen düzeylerde canlı kalabildiği ve bu ürünlerin listeriozis yönünden potansiyel sağlık riski oluşturduğu saptanmıştır (Maisnier-Patin et al. 1992, Bersot et al. 2001).

Biyoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak, biyokoruyuculardan faydalanma oranları her geçen gün artmaktadır. Biyokoruma yöntemleriyle hem gıdanın depolama

ömrü hem de güvenilirliği artmaktadır. Biyokoruma yöntemlerinden birisi de laktik asit bakterileri veya bunların üretmiş oldukları antimikrobiyel bileşiklerin kullanılmasıdır. Laktik asit bakterileri bu amaç doğrultusunda starter kültür, yardımcı kültür veya koruyucu kültür olarak gıda endüstrisinde kullanım alanı bulmuşlardır. Laktik asit bakterileri organik asitler, hidrojen peroksit, antimikrobiyel enzimler, alkol, diasetil, asetaldehit, reuterin, karbondioksit ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyel aktiviteye sahip metabolitlerin biri veya birkaçını üreterek diğer mikroorganizmaların gelişimini önlemektedirler (O'Sullivan et al. 2002, Carminati et al. 2004).

Bakteriler tarafından üretilen protein yapısında antimikrobiyel bileşikler olan bakteriyosinler, duyarlı bakterilere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik etki göstermektedirler. Doğal kaynaklı olmaları, insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın gıda kaynaklı bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etme özellikleri ile bakteriyosinler önemli biyokoruyucular arasında yer almaktadırlar. Laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri mikrobiyel gıda bozulmalarını önleme ve gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaları inhibe etme potansiyeline sahiptirler. Gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilen ve ilk ticari kullanım olanağı bulunan bakteriyosin *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisindir (E234). Oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olan nisin, FDA (Food and Drug Administration) tarafından GRAS (İnsan ve hayvan tüketiminde güvenilir ajan) metabolitler kapsamına alınmış ve gıda koruma ajanı olarak belirlenmiştir (Anonymous 1988a, Nel et al. 2004). Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gıdalarda kullanımına onay verilmiş tek bakteriyosindir (Bouttefroy and Milliere 2000, Nel et al. 2004). Bugün Türkiye de dahil olmak üzere birçok ülkede gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. 50 Avrupa ülkesi yanında Çin'de ve Amerika'da gıdaların korunması amacı ile nisin kullanılsa da üretim maliyetinin yüksek olması nedeniyle, gıda üreticileri tarafından sınırlı düzeyde tercih edilmektedir (Cleveland et al 2001, De Vuyst and Leroy 2007, Bizani et al. 2008).

Yüksek düzeyde antimikrobiyel aktivitesi yanında, fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı gösterdiği stabilite, nisinin gıda koruma ajanı olarak kullanımını öne çıkarmaktadır. Saflaştırılmış ya da yarı saflaştırılmış nisinin doğrudan gıdalara ilavesi yanında, fermente gıdaların üretiminde nisin üreticilerinin starter kültür olarak kullanımı üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

Bu araştırmada dört farklı *L. lactis* subsp. *lactis* suşu (LL2, LL23, LL9 ve LL27) kullanarak üretilen beyaz peynirlerde 90 gün boyunca proteoliz ve lipoliz düzeyi ile *Listeria monocytogenes*'in inhibisyonu incelenerek söz konusu suşların endüstriyel kullanım potansiyellerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Lactococcus* Cinsinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB); Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmayan, çubuk ve koklar şeklinde, katalaz testi negatif, mikroaerofilik, aerotolerant, fakültatif anaerobik, aside dayanıklı, karbonhidratları ve yüksek alkollerini homofermentatif veya heterofermentatif yolla fermente ederek başlıca son ürün olarak laktik asit üreten bakterilerdir. Gelişme ortamlarında tek, çift veya kısa zincirler halinde bulunup boyutları ortalama 0,5-1,5 µm arasındadır. LAB'leri içinde yer alan cinsler *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Enterococcus* ve *Aerococcus*'dur (Axelsson 1993, Stiles and Holzaphel 1997).

LAB'leri içerisinde yer alan laktokoklar, starter kültür olarak fermente süt ürünlerinde yıllardır kullanılmaktadır. Laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmaktadırlar. Ayrıca kazeini hidroliz (proteolitik aktivite) etme ve bakteriyosin üretme aktivitesine de sahiptirler. Bugüne kadar starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri arasında insanlarda kronik yada enfeksiyöz tipte hastalık etmeni suş tanımlanmamıştır. Gıda endüstrisindeki önemleri nedeniyle biyokimyasal ve genetik araştırmaların odağı haline gelen laktokok türleride evrimsel pozisyonları ile patojenik cinslerden ayrılmaktadır (Erlandson and Batt 1997).

Enzimatik analizler, % G+C oranları, lipit ve lipotaykoik asit kompozisyonu, immünolojik karakteristikler ve 16S rDNA analizleri gibi taksonomik çalışmalar sonucunda *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinin ortak özellik gösteren türleri *Lactococcus* cinsi altında toplanmıştır. Katalaz negatif, mikroaerofilik ve N grup antijenik yapıda tanımlanan *Lactococcus* cinsi üyeleri, genellikle hemolitik reaksiyon göstermezler. Ancak bazı *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında zayıf da olsa α-hemoliz görülebilir. Bu bakterilerin en iyi geliştiği ortam sıcaklığı 30°C' dir. Ayrıca grup üyeleri 10°C'nin altında, 45°C'nin üzerinde, % 6,5 NaCl varlığında ve pH 9.6 ve üstünde gelişme yeteneği gösteremezler (Çizelge 2.1). Bu cins beş türden oluşmaktadır. Bunlar: *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. raffinolactis*, *L. lactis* ve *L. plantarum* dur. Bu türler arasında gıda teknolojisi açısından önem taşıyan tek tür *L. lactis*'dir. *L. lactis*'in iki alt türü (*L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis*

subsp. *cremoris*) ile bir biyovaryetesi (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) starter kültür suşları olarak kullanılmaktadır (Axelsson 1993, Boumerdassi et al. 1997, Carr et al. 2002, de Vos and Hugenholtz 2004).

Çizelge 2.1. Laktokok türlerinin karakteristik özellikleri

Test	<i>L. garvieae</i>	<i>L. lactis</i> spp.			<i>L. piscium</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. raffinolactis</i>
		<i>cremoris</i>	<i>hordniae</i>	<i>lactis</i>			
40°C'de gelişim	+	-	-	+	-	-	-
% 4 NaCl'de gelişim	+	-	-	+	ND	+	-
Arjinin hidrolizi	+	-	+	+	-	-	-
Laktoz'dan asit	+	+	-	+	+	-	+
Mannitoldan asit	+	-	-	-	+	+	ND
Raffinozdan asit	-	-	-	-	+	-	+
Pirolidoniamidaz	+	-	-	-	ND	-	-

+ : Pozitif reaksiyon;

- : Negatif reaksiyon;

ND: Belirlenmedi

LAB'leri fermente süt, et, meyve, sebze ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır. Çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda muhafaza metotlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Günümüzde modern işleme ve koruma yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen, tüketicilerin minimum miktarda işlenmiş gıdalara yönelik tercihlerinin artması kimyasal koruyucuların gıdalarda kullanımlarını kısıtlamaya başlamıştır. Kimyasal koruyuculara karşı güçlü bir alternatif olmalarından dolayı, starter kültür suşu seçiminde antimikrobiyel aktivite özelliği gösteren LAB üyelerinin tanımlanması kritik bir aşama haline gelmiştir (De Vuyst and Leroy 2007).

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Bakteriyosinler

2.2.1. Bakteriyosinlerin tarihçesi ve tanımı

İlk kez Gratia (1925), *E. coli* V suşunun, diğer bazı *E. coli* suşlarının gelişimini inhibe eden bir antibakteriyel madde ürettiğini bildirmiştir. Bu antimikrobiyel madde büyük moleküler ağırlığa sahip bir protein olarak tanımlanmış ve kolisin olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 17 kadar kolisin farklı *E. coli* türleri tarafından üretildiği bulunmuştur. Bakteriyosinlerin aynı yada farklı bakteri grupları tarafından sentezlenen yüzden fazla

çeşidi bulunmaktadır. *E coli* suşlarının yanı sıra *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* ve *Enterococcus* gibi birçok mikroorganizma bakteriyosin üretmektedir (Chen and Hoover 2003). Bakteriyosinler biyokimyasal özellikleri, molekül ağırlıkları, etki spektrumları, etki mekanizmaları ve genetik yapıları bakımından heterojen büyük bir sınıf oluştururlar. Bakteriyosinler, polipeptid yapıda olup bakteriyel ribozomlarda sentezlenen, katyonik, genellikle düşük molekül ağırlığa (3-10 kDa) sahip, pH aralıkları geniş, izoelektrik noktaları yüksek, hidrofobik veya amfipatik antimikrobiyel maddelerdir. Etki spektrumları farklılık gösterse de birçok Gram pozitif bakteri ve yakın suşlar üzerinde antimikrobiyel aktiviteye sahiptirler (Klaenhammer 1993, De Martinis et al. 2002, De Vos and Hugenholtz 2004).

2.2.2. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, molekül büyüklüğü kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve ısı stabiliteleri temel alınarak dört sınıfa ayrılmışlardır (çizelge 2.2). Ancak biyokimyasal özellikleri tanımlanması bakımından daha çok ilk üç sınıf dikkate alınmaktadır (Klaenhammer 1993).

Sınıf I bakteriyosinleri, yapılarında diğer amino asitlere oranla daha çok lantionin içermeleri nedeniyle lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Bunlar, küçük moleküler ağırlıklı (<5 kDa) membran aktif peptitler olup, yapılarında bilinen amino asitlerden farklı olarak lantionin ve metillantionin amino asit türevleri içermektedir. Ayrıca yapılarında biyokimyasal özelliklerini etkileyen dehidroalanin ve dehidrobutirin de bulunmaktadır (Klaenhammer 1993, Twomey et al. 2002). Lantibiyotikler kimyasal yapılarına ve antimikrobiyel aktivitelerine göre tip A ve tip B olmak üzere iki alt gruba ayrılmışlardır. Tip A lantibiyotikler esnek, lineer, uzun ve net pozitif yüke sahip hidrofobik yapıdaki polipeptitlerdir. *L. lactis* tarafından üretilen laktisin 481 ve *L. lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin bu grubun en belirgin örnekleridir. Grubun diğer üyeleri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 tarafından üretilen nisin benzeri peptit subtilin ve *Staphylococcus epidermidis* tarafından üretilen epidermin, Pep5 ve epilansin K7'dir. Tip B lantibiyotikler globüler yapıda olup yaklaşık 2 kDa molekül ağırlığına sahip yüksüz yada negatif yüklü enzim inhibitörleridir. Rijit ve globüler olan tip B lantibiyotikleri yaklaşık 20 amino asit içerirler. Tip B lantibiyotiklere sinnamisin, mersasidin, ankovenin, aktagardin örnek olarak verilebilir (Papagianni 2003, Koponen 2004, Bauer and Dicks 2005, Fontana et al. 2006).

Sınıf II bakteriyosinlerinin Sınıf I bakteriyosinlerinden farkı lanthionin içermemelerinden kaynaklanmaktadır. Düşük moleküler ağırlıklara sahiptirler (<10 kDa). Amfilik helikse, değişik oranlarda hidrofobiteye, β -tabakalı yapıya sahiptirler. Bu sınıftaki bazı bakteriyosinler 100 °C'den 121 °C'ye kadarki sıcaklıklara karşı dayanıklıdır (De Martinis et al. 2002, Fontana 2006). Sınıf II bakteriyosinleri 3 alt grup altında toplanmaktadır: Grup IIA *Listeria*'ya karşı aktiftir. Ayrıca içerdikleri peptid'in N-terminalinde Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizisini içermektedirler. Grup IIA bakteriyosinleri disülfid köprüleriyle bağlı en az iki sisteine sahip sistibiyotiklerdir. Disülfid bağları bu bakteriyosinlerin aktivitesi için çok önemlidir. Örnek olarak; pediosin PA-1, pediosin AcH, sakasin A, mezenterisin Y105, kurvasin A, diversin V41 ve leusin A verilebilir. Grup IIB bakteriyosinlerinin aktivite gösterebilmeleri için genellikle iki farklı polipeptit gerekmektedir. Bu polipeptidler tek tek aktivite gösterebilirler fakat etkin bir şekilde çalışabilmeleri için ikisinin de aktif hale gelmesi gereklidir. Bu gruba laktasin F, laktokoksin G ve M örnek olarak verilebilir. Grup IIC bakteriyosinlerine tiol'la aktif edilen peptitler denilmektedir. Bu grupdakilerin çoğu sistein amino asit dizisi içerirler ve aktivitesi için indirgenmiş sistein dizilerine ihtiyaç duyarlar. Asidosin B ve enterosin P en bilinen üyeleridir (Tagg et al. 1976, Klaenhammer 1993, De Martinis et al. 2002, Papagianni 2003, Fontana et al. 2006).

Sınıf III bakteriyosinler büyük molekül ağırlığa sahip (>30 kDa), ısıya dayanıksız proteinlerdir. Helvetisin J, helvetisin V-1829, asidophilus A, laktosin A ve B bu grubun tanımlayıcı örnekleridir (De Martinis et al. 2002). Çizelge 2.2' de farklı sınıflara ait bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar verilmiştir (De Martinis et al. 2002, Chen and Hoover 2003, De Vuyst and Leroy 2007).

Çizelge 2.2. Farklı sınıflara ait bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar (Klaenhammer 1993, De Vuyst and Leroy 2007)

Bakteriyosin	Üretici Mikroorganizma
<p>Sınıf I</p> <p><u>TipA- lantibiyotik</u> Nisin Laktosin S Epidermin Gallidermin Laktisin 481</p> <p><u>TipB- lantibiyotik</u> Duramisin Mersasidin Aktagardin Ankovenin</p>	<p><i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus gallinarum</i> <i>Lactococcus lactis</i></p> <p><i>Streptomyces cinnamoneus</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Actinoplanes</i> spp. <i>Streptomyces</i> spp.</p>
<p>Sınıf II</p> <p><u>Sınıf IIa</u> Lökosin A-UAL 87 MesenterisinY105 Diversin V41 Enterosin A Sakasin A</p> <p><u>Sınıf IIb</u> Laktokoksin G Laktokoksin M Plantarisin A Plantarisin EF</p> <p><u>Sınıf IIc</u> Asidosin B Enterosin P Enterosin B Divergisin A</p>	<p><i>Leuconostoc gelidum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus sake</i></p> <p><i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lacti.</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantar.</i></p> <p><i>Lactobacillus acidophilu.</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faeciu.</i> <i>Carnobacterium divergens</i></p>
<p>Sınıf III</p> <p>Helvetisin J Helvetisin V-1829</p>	<p><i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i></p>

2.2.3. Bakteriyosinlerin biyosentezi

Bakteriyosinlerin gıda endüstrisindeki kullanım alanları ile önemleri arttıkça araştırmacıların dikkatleri üretici suşların genetik materyalleri üzerinde toplanmış ve geniş bir şekilde ele alınmıştır. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenmektedir. Ancak sınıf I bakteriyosinlerin aktif formunun oluşması için post-translasyonel modifikasyona uğramaları gerekmektedir. Bakteriyosin üretimini kodlayan genler kromozom, plazmid yada transpozonlar üzerinde yer alabilir. Operonda bakteriyosinin yapısal geni, bağışıklık geni, bakteriyosinin olgunlaşması, işlenmesi, taşınması ve regülasyonunu sağlayan genler bulunmaktadır. Çoğu bakteriyosinin yapısal genleri operona benzer bir yapı gösterir (Klaenhammer 1993). Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin sentezlenebilmesi için dört farklı gene ihtiyaç vardır: (I) prepeptidi kodlayan yapısal gen, (II) immünite geni, (III) ABC taşıyıcısını kodlayan gen ve (IV) bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan aksesuar proteinini kodlayan gen (Garneu et al. 2002, Chen and Hoover 2003).

Bakteriyosinler, yapısal genler tarafından prepeptit olarak kodlanmaktadır. Bu peptit, bir N-terminal uzantısı veya lider dizisiyle başlayan olgun bakteriyosinin ön maddesidir. Prebakteriyosinler biyolojik olarak inaktif olup N-terminalinde lider peptit ve C-terminalinde propeptit içermektedirler. Propeptit domain lider peptidin proteolitik parçalanmasından sonra aktifleşir ve ardından modifikasyon işlemlerine uğrayarak olgun bakteriyosine dönüşür. Lider peptit genellikle net negatif yüke sahiptir. Lider peptidin görevleri; (I) Üretici bakteriyi yüksek konsantrasyondaki intraselüler bakteriyosine karşı korumak, (II) biyosentezde prepeptidin olgunlaşmasını ve taşıma proteinlerine yönelmesini sağlamak ve (III) propeptidin domaini ile reaksiyona girerek enzim-substrat interaksyonu için uygun konformasyonun oluşmasını sağlamak olarak tanımlanmıştır (Sahl et al. 1995, McAuliffe et al. 2001, Rodriguez et al. 2003).

Sınıf I bakteriyosinlerin biyosentezi, sınıf II ile sınıf III bakteriyosinlerin biyosentezi ile üretim aşamaları bakımından aynıdır. Yalnız sınıf I bakteriyosinlerin aktifleşmesi için propeptidin post-translasyonel modifikasyona uğraması zorunludur. Propeptit (prebakteriyosin) sentezlendikten sonra dehidrasyon ve çapraz bağlanma (kimyasal modifikasyon) reaksiyonlarına uğramakta ve bunun sonucunda anormal amino asitler (lantibiyotikler, dehidreamino asitler vb.) oluşmaktadır. Sınıf II ve sınıf III

bakteriyosinlerin biyosentezinde propeptidin kimyasal modifikasyonlara uğramasına gerek yoktur. Sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin üç bileşenli regülatör sisteminden biri olan indüksiyon faktörü (IF), membranda bulunan histidin protein kinaz (HPK) enzimini uyarır. Bu uyarının ardından HPK enzimi de sitoplazmada bulunan yanıt regülatörünü (RR) fosforilize ederek bu uyarıyı hücreye iletir ve böylece biyosentez başlatılmış olur (Montville and Winskowski 1997, Ishizaki et al. 1999, Ennahar et al. 2000, İşleroğlu ve ark. 2005). Sentezlenen prebakteriyosinin hücre dışına taşınması işlemi membrana bağlı olan iki protein (ABC-taşıyıcı ve aksesuar proteini) tarafından gerçekleştirilir. ABC-taşıyıcılarının N-terminal ve C-terminal bölgeleri yapısal olarak farklı olup C-terminal kısmı ATP-bağlama bölgesini içerirken, N-terminal bölgesi hidrofobik yapıda olup proteaz aktivite özelliğine sahiptir. Proteaz aktivitesi prebakteriyosini C-terminalindeki çift glisin motifinden parçalayarak lider peptidi uzaklaştırmaktadır. Sonuçta lider peptit uzaklaşmakta ve olgun bakteriyosin sitoplazmik membrandan dışarıya taşınmaktadır. Bakteriyosinlerin taşınmasında aksesuar proteinleri rol oynamaktadır. Aksesuar proteinlerinin membran translokasyonunu teşvik ettiği ve lider peptidin işlenmesinde rol oynadığı belirtilmektedir (Klaenhammer 1993, Havarstein et al. 1995 Montville and Winskowski 1997, Ishizaki et al. 1999, Ennahar et al. 2000, Rodriguez et al. 2003, İşleroğlu ve ark. 2005).

İmmünite proteinlerini kodlayan genler diğer bakteriyosin yapı ve işlem genlerine genetik benzerlik gösterir. Yapısal bakteriyosin geni ve immünite geninin aynı operonda bulunması ve genellikle bir birini takip etmesi yaygındır. Lantibiyotik üretici bakterilerin kendi bakteriyosinine karşı immünesinin ilk önce bir immünite geninden kaynaklandığı düşünülmüştür (örneğin nisin için *nisI*, subtilin için *spaI*). Fakat diğer genlerin silinmesinde konak immünetisini değiştirdiği görüldüğünden beri bu bakteriyosinlerin immünesinin birçok proteinin etkisinin bir sonucu olduğu kararına varılmıştır. Örneğin; nisin üretmeyen nisin dirençli *L. lactis* suşlarının NisI proteinini kodlayan genetik elementleri yoktur. Fakat nisF, nisE ve nisG'ye benzer dizileri vardır. Belirtilen genlerin, bu suşları nisine karşı direncine yardım ettiği kabul edilmektedir. nisG'nin silinmesi hücreleri nisine karşı daha az dirençli hale getirmektedir (Cleveland et al. 2001, Savagado et al. 2006).

Lantibiyotik olmayan bakteriyosinlerin immünesi ise daha basittir. İmmünite proteinini bir gen kodlamaktadır. İmmünite proteinleri üretici bakteriyi kendi bakteriyosinine karşı

tamamen, diğer bakteriyosinlere karşı kısmen korumaktadır. İmmünite proteinleri arasında amino asit dizi benzerliği düşük olmasına karşın ortak bazı özellikler taşımaktadırlar. Bunlar katyonik ve hidrofilik moleküller olup α -heliks yapısına sahiptirler. Transmembran bölmelerine (hidrofobik) sahip olmamaları bunların hem hücre dışına salgılanabildiklerini hem de hücre içinde kalabildiklerini göstermektedir (Jack et al. 1995, Montville and Winskowski 1997, Ishizaki et al. 1999, Ennahar et al. 2000).

Hücre mebranında gözenek (por) oluşturan bakteriyosinlere (örneğin nisin ve pediosin) karşı immünite birkaç değişik yolla sağlanabilir. İmmünite proteini bakteriyosinin membrana adsorpsiyonunu önleyebilir, membrana adsorbe olan bakteriyosini dış ortama geri gönderebilir veya bakteriyosini hücre içine alınarak parçalayabilir (Erinç ve ark. 2006, Bizani et al. 2008).

2.2.4. Bakteriyosinlerin antimikrobiyel etki mekanizması

LAB bakteriyosinleri duyarlı bakterilerin sitoplazmik membranına etki gösteren peptitlerdir. Duyarlı bakterilerin hücre membranında porlar oluşturarak membran geçirgenliğini değiştirir. Buna bağlı olarak hedef hücreden K^+ iyonu ve ATP bileşiklerin sızmasına neden olurlar. Bunun sonucunda transmembran potansiyeli ($\Delta\Psi$) ve pH gradyentinin (ΔpH) kısmen veya tamamen yok olması ile proton itici gücü (PMF) ortadan kalkmaktadır. PMF, hücre içinde iyonların ve metabolitlerin birikmesi ile ATP sentezi gibi sitoplazmik membranda enerjiye bağlı birçok hayati işlemleri yürütmektir. PMF'nin yok olması veya bozulması ATP'nin kaybına, besin maddelerinin aktif transportla taşınamamasına, hücre içi pH değerinin korunmasında rol oynayan K^+ ve kofaktör olarak rol oynayan Mg^{2+} iyonlarının hücre dışına akışına ve duyarlı bakterinin enerji rezervlerinin tükenmesine yol açar. Buna paralel olarak DNA, RNA ve protein gibi makromoleküllerin sentezi azalarak bakterilerin inhibisyonuna ve ölümlerine sebep olmaktadır (Bauer and Dicks 2005).

Bakteriyosinlerin duyarlı hücreler üzerindeki etkisi iki aşamalı bir şüreçtir. İlk aşamada, bakteriyosinler konak bakterilerin hücre duvarlarındaki spesifik yada spesifik olmayan reseptörlere tutunmaktadır. Geri dönüşümsüz ikinci aşamada ise, her bir bakteriyosin, spesifik hedef hücresinde patolojik değişimler meydana getirmektedir. Gram pozitif bakterilerin ürettiği bakteriyosinlerin bu şekilde olan etki mekanizması, LAB

bakteriyosinlerinde biraz farklılık göstermektedir. Bunların Gram pozitif bakterilere tutunması spesifik değildir. Diğer bir ifade ile, hem duyarlı hem de dayanıklı hücre yüzeylerine tutundukları gözlenmiştir. LAB bakteriyosinlerinin hücre duvarına spesifik olmayan bir tutunma eğilimi göstermelerinin, spesifik reseptörlerin varlığını gizleyebilen hidrofob nitelikteki yapıları ile bağlantılı olabileceği öne sürülmektedir (Bhunja et al. 1991, Koponen 2004, Pongtharangkul and Demirci 2006).

Bakteriyosinlerin duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranında por oluşturmaları “Barrel-Stage”, “Wedge-Model” ve “Lipit Model” olmak üzere 3 model ile açıklanabilir. Barrel-Stage mekanizmasının membranda por oluşumunu; bakteriyosinlerin katyonik yük taşıyan C-terminalinin fosfolipitlerin negatif yüklü bölgesi ile elektrostatik interaksiyona girmesi şeklinde açıklanmaktadır. Membran potansiyeli varlığında membran içine girerek oligomerize olmakta ve membranda iyonik por oluşturmaktadır. Peptitler merkezi kanalın etrafına dizilmekte ve hidrofobik yüzeyler membrana doğru, hidrofilik yüzeyler ise porun merkezine doğru yönelmektedir (McAuliffe et al. 2001, Kopenon 2004, Hamon et al. 2006).

Wedge modelinde bakteriyosinlerin pozitif yüklü C-terminali anyonik fosfolipitlerle elektrostatik olarak interaksiyona girip membran yüzeyine sıkıca tutunmakta ve lipit dinamiğinin bozulmasına neden olmaktadır. Bakteriyosin molekülleri anyonik fosfolipitlerle interaksiyon halindeyken membran içine girerek membranda bükülmelere ve dolayısıyla porların oluşmasına yol açmaktadır (Kopenon 2004, Bauer and Dicks 2005, Ireton 2007).

Lipit II modeline göre por oluşumunda ise bir peptidoglikan öncüsü olan lipit II önemli bir rol oynamaktadır. Bu modelde bakteriyosin ilk olarak 1:1 oranında lipit II nin karbonhidrat kısmına bağlanmaktadır. Bakteriyosinin N-terminal kısmı bu bağlanmada rol oynamakta ve negatif bir yüzey gerekmemektedir. Lantibiyotiğin C-terminali membran içine girip membranın karşı tarafına geçmektedir. Por oluşumu için birkaç bakteriyosin/lipit II kompleksi gereklidir (Kopenon 2004, Papagianni et al. 2007).

2.2.5. Bakteriyosinlerin antimikrobiyel etki spektrumları

LAB'lerinin ürettikleri bakteriyosinler genellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde inhibitör aktivite gösterirler (Jack et al. 1995). Ancak son zamanlarda Gram negatif bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip bakteriyosinler de tespit edilmiştir (Lee and Paik 2001, De Kwaadsteniet et al. 2005). LAB'lerinde en iyi tanımlanmış ve en yaygın kullanım alanına sahip bakteriyosin, bazı *L. lactis* subsp. *lactis* suşları tarafından üretilen nisindir. Nisin, aralarında *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* ve *Listeria* cinslerinin de dahil olduğu birçok türe karşı aktivite gösteren geniş etki spektrumuna sahip bir bakteriyosindir. Ancak Gram-negatif bakterilere karşı etkili değildir. Dış membranını uzaklaştırılmış veya zarar görmüş (EDTA ile muamele edilmiş, ısı şoku veya soğuk şoka uğramış) Gram negatifler üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Liu and Hansen 1990, Schved et al. 1994, Hauben et al. 1996, De Kwaadsteniet et al. 2005).

Pediosin AcM *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus*' un bazı türlerine karşı inhibisyon etkinliği gösterirken *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* ve *Aeromonas hydrophila* ya karşı etkili olmadığı saptanmıştır (Kwon et al. 1997).

L. lactis subsp. *lactis* CNRZ481 tarafından üretilen laktisin 481'in diğer laktokoklara, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Clostridium tyrobutyricum*'a karşı bakterisidal etki gösterdiği belirlenmiştir (Carolissen-Mackay et al. 1997).

L. lactis subsp. *cremoris* R'nin ürettiği laktokoksin R'nin inhibitör spektrumunun geniş ve *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Pediococcus*'un bazı türlerine karşı inhibitör etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Yildirim and Johnson 1998).

Bulgaristan'da üretilen bozadan izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* B14'ün ürettiği bakteriyosin laktis B14'ün bazı *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb casei* subsp. *pseudopantarum*, *Lb. delbrueckii* spp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* spp. *delbrueckii*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc dextranicum*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* tür ve suşları üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu, ancak *P. fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiela pneumoniae*,

Clostridium sporogenes ve *Cl. butyricum*'a karşı inhibitör etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Ivanova et al. 2000).

L. lactis NK24 tarafından üretilen laktisin NK24'ün çoğu LAB'lerine karşı geniş bir antimikrobiyel spektruma sahip olduğu, Gram negatif bakterilerden *E.coli* KCMM32396 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442'nin gelişimlerin inhibe ettiği ve bunun yanında mayalara karşı hiçbir intibitör etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir (Lee and Paik 2001).

L. lactis subsp. *lactis* CCM tarafından üretilen bakteriyosinin test edilen tüm *L. monocytogenes* türlerine karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu ancak *Micrococcus flavus*, *L. lactis* subsp. *lactis* biov. *diacetylactis* ve *Bacillus* türlerine karşı inhibitör etki göstermediği belirlenmiştir (Benkerroum et al. 2002).

Rigouta peynirinden izole edilen *L. lactis* MMT24 tarafından üretilen laktokoksin MMT24'ün *Lactobacillus* spp. ve *L. lactis*'e karşı inhibitör etki gösterdiği, peynirde bozulma etmeni ve fermantasyon süreçlerinde yaygın bir kontaminant olan *E. faecalis* ve *E. faecium*'a karşı aktivite göstermediği belirlenmiştir (Ghraiiri et al. 2005).

L. lactis subsp. *lactis* IPLA 729 tarafından üretilen nisin Z' nin dar bir antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu ve sadece Gram pozitif bakterilerden birkaç tür ve suşu üzerinde inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Rodriguez et al. 2003).

E. mundtii ST15 tarafından üretilen bakteriyosinin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu ortaya konmuştur. Söz konusu bakteriyosinin test edilen *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* ve *Clostridium*'un bazı suşları ile *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Str. caprinus*'un gelişimlerini inhibe ettiği tanımlanmıştır (De Kwaadsteniet et al. 2005).

Lb. plantarum ST23LD ve ST341LD, *E. faecium* ST311LD ve *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ST33LD tarafından üretilen bakteriyosinlerin bazı Gram pozitif bakterilere (*E. faecalis*, *Lb. casei* ve *Str. pneumoniae*) ve Gram negatif bakterilere (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) karşı inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır (Todorov and Dicks 2005).

Yapılan bir çalışmada, bozadan izole edilen *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. paracasei* türlerinin ürettiği bakteriyosinlerin *Lb. casei*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis*'e karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Todorov and Dicks 2006).

Boza'dan izole edilen *Lb. plantarum*'un JW3BZ ve JW6BZ suşları ile *Lb. fermentum*'un JW11BZ ve JW15BZ suşlarının ürettiği oldukları JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ ve JW15BZ bakteriyosinlerinin Gram pozitif bakteriler üzerinde geniş bir inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyosin JW15BZ'nin Gram-negatif bakterilerden *Klebsiella pneumoniae*'ya karşı aktif olduğu da belirlenmiştir (Von Mollendorff et al. 2006).

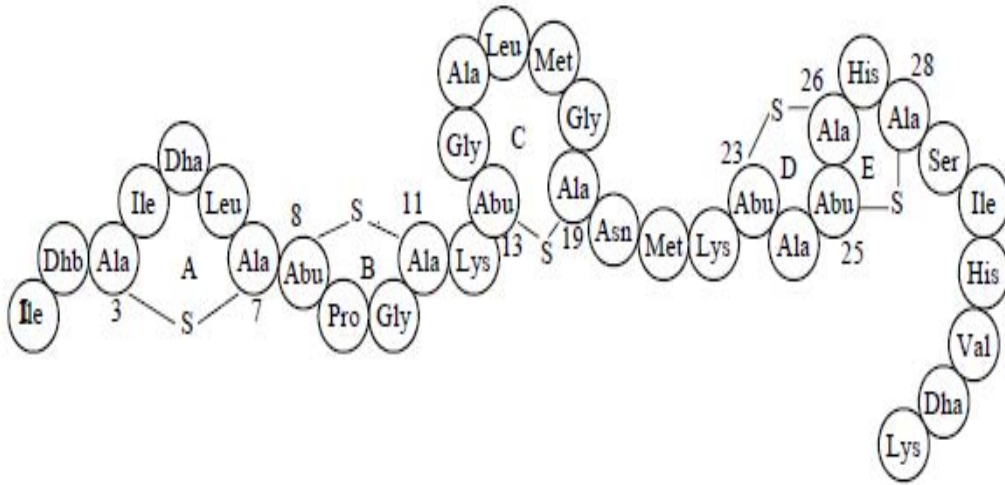
Lb. plantarum AMA-K tarafından üretilen bakteriyosin AMA-K'nın bazı Gram pozitif bakterilerden *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* ile Gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ya karşı inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Todorov et al. 2007).

LAB bakteriyosinlerinin Gram negatif bakterilere karşı inhibisyon etkisi, zarar görmemiş hücreler için halen tartışmalı bir durumdur. Ancak bu grup bakteriyosinlerin büyük çoğunluğunun konak hücrelere karşı spesifik olmayan bir bağlanma göstermesi, Söz konusu etkinliğin mümkün olabileceği yönünde değerlendirilmektedir (De Vuyst and Lerey 2007, Akkoç et al. 2009).

2.2.6. Nisin

Nisin, lantibiyotik sınıfının en iyi tanımlanmış üyesidir. *L. lactis* subsp. *lactis*' in bazı suşları tarafından üretilen ve ribozomlarda kodlanan peptid yapısındaki bakteriyosindir. Nisin 1947 yılında Mattick ve Hirsch tarafından tanımlanarak adlandırılmıştır. Molekül formülü $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ve molekül ağırlığı 3354,25 Da'dır. Olgun bakteriyosin yapısında 34 adet amino asit bulunmaktadır (Şekil 2.1). Bu amino asitlerden 8 tanesi kükürt içerir ve en önemlisi lantiyonin ve 3-metil lantiyonin'dir. Bu amino asitlerin yanında dehidroalanin ve dehidrobutirin gibi diğer amino asit kalıntılarını da içermektedir (Bruno et al. 1992, Wessels et al. 1998). Nisin, kuru formda özelliğini yitirmeden yıllarca kalabilir. pH 2,0-10,0 gibi geniş pH aralığında stabildir, düşük pH' lı çözeltilerde kolaylıkla çözülür, 121 °C'de 15 dakika ısıtma dayanıklı, α -kemotripsin ve proteinaz K uygulamasına karşı ise duyarlıdır (De Vuyst and Vandamme 1994, Zendo et al. 2003).

Nisinin; nisin A, nisin Z ve son yıllarda izole edilen nisin Q olmak üzere üç doğal varyantı bulunmaktadır (Zendo et al. 2003). Nisin A ve nisin Z, polipeptidin 27. pozisyonundaki bir amino asitin farklılaşması sonucu oluşur. Eğer bu pozisyonundaki amino asit aspartik asit ise Nisin Z, histidin amino asiti ise Nisin A olarak adlandırılır. Nisin A ve nisin Q, polipeptit zincirindeki dört amino asitin değişimi sonucu farklılaşmıştır. Nisin Q, nisin A'dan; polipeptidin 15. pozisyonundaki alanin yerine valin, 21. pozisyonundaki metiyonin yerine lösin, 27. pozisyonundaki histidin yerine asparajin ve 30. pozisyonundaki izolösin yerine valin amino asitlerini içermesi ile ayrılmaktadır. Nisin A ile nisin Q arasında tanımlanan bu farklılıklar, 27. pozisyonda yer alan asparajin hariç, nisin Z ile nisin Q arasında da ortaktır (Zendo et al. 2003, Koponen 2004).



Şekil 2.1. Nisinin Primer Yapısı (Koponen 2004)

Dha = dehidroalanin, Dhb = dehidrobutirin, Abu = α -aminobutirik asit, Ala-S-Ala = mezo-lantiyonin, Abu-S-Ala = threo-metillantiyonin ve diğer L-amino asitler (İzolösin, Alanin, Lösin, Prolin, Glisin, Lizin, Metiyonin, Asparajin, Serin, Histidin, Valin)

L. lactis subsp. *lactis* suşları tarafından üretilen nisin, letal etkisi ve geniş aktivite spektrumu nedeniyle en çok çalışılan ve halen doğal gıda koruyucusu olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosindir (Hurst 1981, Delves-Broughton et al. 1996, Zendo et al.

2003, Samelis et al. 2005). Nisin ilk olarak peynirlerde koruyucu olarak kullanılmış ancak sadece peynirlerle sınırlı kalmayıp diğer süt ürünleri, et, kanatlı ve deniz ürünleri gibi çeşitli gıdalarda, biyokoruyucu olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu bakteriyosin, *L. lactis* subsp. *cremoris* gibi yakın akraba türlere ilave olarak, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *S. aureus* ve *Streptococcus* türlerinin de dahil olduğu geniş bir konakçı spektrumunda inhibisyon etkisi göstermektedir (Mohamed et al. 1984, Noonpakdee et al. 2003, Samelis et al. 2005).

Yapılan çalışmalarda nisinin sitratlar, etilen diaminotetraasetik asit gibi şelat ajanlarıyla, ayrıca, sodyum laktat, lizozim, EDTA, NaCl gibi maddelerle kombine edilmesinin, *Salmonella spp.* ve *E. coli* gibi önemli diğer gıda patojenlerini de inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Elliason and Tatini 1999, Chung and Hancock 2000).

Bir araştırmada Bolonya sosisleri ve jambonları *Brochetrix thermosphacta*, *E.coli* O157:H7, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium* ile deneysel olarak kontamine edildikten sonra, değişen oranlarda nisin, EDTA ve lizozimi kombine ederek paketlenmiştir. Analizler sonucunda sözü edilen patojenlerin sayısında belirgin bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Gill and Holley 2000).

L. monocytogenes ile kontamine (10^3 - 10^4 kob/g) edilen balık örneklerine nisin (4000-6000 IU/mL) ve nisinin % 60'lık sodyum laktat ile 1:1 oranındaki kombinasyonu enjekte edilginde, nisinin balık örneklerindeki *L. monocytogenes* ve toplam mezofil bakteri sayısını düşürdüğü, fakat sodyum laktatla kombinasyon halinde uygulanmasının daha etkin sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Nykanen et al. 2000).

Dilimlenmiş domuz etleri 10^2 – 10^3 kob/cm² oranında *L. monocytogenes* ile kontamine edildikten sonra, 5000 IU/mL oranında nisini, farklı oranlardaki laktik asit, asetik asit, sodyum asetat, sodyum diasetat ve potasyum benzoat ile kombine ederek ürünler ambalajlanmıştır. Nisin ile kombine edilmiş gruplarda *L. monocytogenes* sayısında 1.0-1.5 log kob/cm² oranında bir azalma olduğu saptanmıştır (Samelis et al. 2005).

2.3. Peynirlerde Listeriozis

Listeria'lar ilk olarak 1911 yılında Hulphers tarafından hasta tavşanların karaciğerinde oluşan nekrotik odaklardan izole edilmiş ve *Bacillus hepatitis* olarak isimlendirilmiştir (Beuhat et al. 1997). *Corynebacteriaceae* familyasında yer alan *Listeria*, fakültatif anaerob ve mikroaerofil, basit boyamada çubuk ve kokobasil, Gram pozitif, spor oluşturmeyen ve kapsülsüz psikrofil bir bakteridir. Yaşlı kültürlerde hücreler ardı ardına dizilerek uzun zincirler oluştururlar. Katalaz pozitif ve oksidaz negatiftir. D- glukoz ve diğer şekerlerden asit oluştururlar. Voges-Proskauer ve metil kırmızısı reaksiyonları pozitifdir. Üre ve jelatini parçalayamazlar. *Listeria* cinsi içinde yer alan türler *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* ve *L. grayi*'dir. *Listeria* türleri içinde sadece *L. monocytogenes* insan patojeni olmasına rağmen çok nadiren de olsa *L. ivanovii*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri*'nin insanlarda hastalığa neden olduğu belirlenmiştir (Akçelik et al. 2000, Vazquez-Boland et al. 2001, Biberoglu ve ark., 2003).

İnsanlar için dominant patojen suş olan *L. monocytogenes* insanlarda listeriozis olarak adlandırılan enfeksiyon hastalığının etmeni olup son yılların en önemli gıda kaynaklı patojenidir. *Listeria monocytogenes*, Gram pozitif, intraselüler fakültatif anaerob, sporsuz, birkaç hücreden oluşan kısa zincirli kokobasil veya bazen filamentöz formda bulunabilen bir bakteridir. Bu bakteriler küçük, 0.4-2 mm boy ve 0.5 mm ende, hafif kıvrık, uçları yuvarlak, uçları bazen şiş olarak görülen tekli veya kısa zincir formunda basillerdir. Sıvı besiyerindeki hücreler veya 36 saatten sonra katı besiyerindeki koloniler Gram negatif reaksiyon verebilir (Turantaş ve Ünlütürk 2002). *Listeria monocytogenes* hareketli bir organizma olmasına karşın hareketliliği gelişme sıcaklığına bağlıdır. Hücreler 25 °C'de hareketli olmalarına karşın 37 °C' de hareketsizdirler. Optimum 30-37 °C, minimum 1-3 °C (süt içinde 0,1-0,4 °C'lerde), maksimum 45 °C'de gelişebilmektedir. Psikrofil bakteri olduğundan buzdolabı sıcaklığında gelişebilir. Buna karşın, düşük dozdaki radyasyon uygulamalarına ve gıda korumadaki yeni eğilim olan biyokoruyuculara örneğin nisin, pediosin gibi bakteriyosinlerine karşı duyarlıdır (Vazquez-Boland et al. 2001, Ekici ve ark. 2004, Hamon et al. 2006).

Listeria monocytogenes doğada yaygın olarak bulunmakta olup toprak, su, gıda (süt, et, sebze vb.), insan ve hayvanlar izole edildiği ortamlardır. *L. monocytogenes*, gıdalar aracılığıyla insana geçebildiği gibi, insandan insana bulaşma da söz konusudur.

Enfeksiyonlarda en çok rol oynayan gıdalar; çiğ süt, süt ürünleri ve sebzelerle birlikte et, kümes hayvanları ve deniz ürünleridir (Hamon et al. 2006).

Listeria monocytogenes, kontamine olmuş çiğ gıdaların tüketilmesiyle vücuda alınır. Oral yolla alınan *L. monocytogenes* bağırsakta kolonize olur. Mikroorganizma yüzeyinde bulunan internalin proteini ile konak hücrenin epitel hücrelerine ve makrofajlara tutunur. *L. monocytogenes* makrofajlar'da çoğalır. Salgıladığı listeriosin O (hemoliz) proteinleri vasıtasıyla makrofaj membranında gözenek (por) oluşturarak fagositlerin membranını parçalar ve konak hücre içinde serbest kalır. Yani bakterinin fagositik parçalanmaya uğramadan fagozomdan çıkmasını sağlar. Fagositik parçalanmada katalaz, süperoksit dismutaz ve fosfolipaz enzimleri de rol oynamaktadır. Katalaz ve süperoksit dismutaz oksidatif enzimleri serbest radikalleri nötralize ederek, fosfolipazlar ise membran lipitlerini parçalayarak bakterinin makrofaj içinde lize olmasını engeller. Act A geni konak hücrenin aktin proteinlerinin polimerizasyonunu sağlayarak bakteri hücre yüzeyinin aktin filamenteri ile kaplanmasında ve kuyruk oluşturmasını sağlayarak bakterinin hücreden hücreye aktarılmasında itici bir güç olarak rol oynar (Vazquez-Boland et al. 2001, Archambaud et al. 2006, Ireton 2007).

L. monocytogenes optimum 7,2-7,6 pH' da gelişmesine karşın geniş pH (5-10 pH) aralığında çoğalabilmektedir. Minimum pH istemi ise 4,4-4,6' dır (Ekici ve ark. 2004). *L. monocytogenes* tuza karşı oldukça dayanıklı bir mikroorganizmadır. % 10 NaCl varlığında çoğalabilir. Etkenin % 25 NaCl' de 132 gün canlı kalabildiği bildirilmiştir. *L. monocytogenes* birçok vejetatif mikroorganizmaya oranla ısıtma işlemine karşı daha dayanıklıdır. Ayrıca, *L. monocytogenes* soğuğa da oldukça dayanıklı bir mikroorganizmadır (Anonymous 2004).

Bu bakterinin neden olduğu hastalıklar gebelerde düşük ve bebek ölümü, meningoensefalit, menenjit (beyin zarı ve omurilik iltihaplanması), septisemi (kan zehirlenmesi) ve lokal enfeksiyonlar olarak sıralanabilir (Ireton 2006 ve 2007). *L. monocytogenes* toplumdan edinilen menenjitlerin dördüncü sırada en sık nedeni olan bakteri olarak bildirilmiştir (Doganay ve ark. 2002). *Listeria* menenjitinde ölüm oranı % 30 dolaylarındadır. Tedavi edilmeyen veya tedavisi geciken kişilerde menenjitin neden olduğu ölümlerin oranı % 79'a kadar çıkmaktadır. Genel olarak, *Listeria* enfeksiyonu geçirdiği bildirilen kişilerin ise % 30'unun öldüğü saptanmıştır (Biberoğlu ve ark. 2003, Ireton 2007).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çiğ süt

Peynir yapımı için Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği (İkizce/Haymana) Hayvancılık İşletmesi'nden Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Araştırma ve Uygulama İşletmesi'ne getirilen inek sütü kullanılmıştır.

3.1.2. Beyaz peynir

Beyaz peynir Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır. Araştırmanın ilk bölümü için dört farklı peynir üretilmiştir. Kontrol peyniri, endüstriyel düzeyde peynir yapımı için kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* LL2 (PK1, bakteriyosin üreticisi olmayan) suşu ile üretilmiştir. Diğer üç çeşit peynirin yapımında ise sırasıyla *L. lactis* subsp. *lactis* LL9 (laktisin 481 üreticisi), *L. lactis* subsp. *lactis* LL23 (laktisin 3147 üreticisi) ve *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 (nisin üreticisi) suşları kullanılmıştır.

Araştırmanın ikinci bölümünde ise starter kültür olabilme potansiyelleri incelenen *L. lactis* subsp. *lactis* LL27, LL23 ve LL9 suşlarının peynirlerde *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'ün gelişimini engelleme yeteneğini incelemek üzere beş farklı peynir üretilmiştir. *L. lactis* LL27, LL23 ve LL9 suşlarının tek tek kullanıldığı üç peynir çeşidine ilave olarak iki adet kontrol peyniri üretilmiştir. Kontrol olarak starter kültür ilave edilmemiş ancak *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş ve bakteriyosin üretmeyen LL2 suşu ile birlikte *L. monocytogenes* ilave edilerek üretilen peynirler kullanılmıştır. Tüm sütlere peynir yapımı sırasında 10^7 kob/g oranında *L. monocytogenes* ATCC 7644 inoküle edilmiştir.

3.1.3. Starter kültür

Starter kültür olarak dört farklı laktokok suşu kullanılmıştır. Bunlar bakteriyosin üreticisi olmayan *L. lactis* subsp. *lactis* LL2 (PK1) ve bakteriyosin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* LL9 (laktisin 481 üreticisi), *L. lactis* subsp. *lactis* LL23 (laktisin 3147 üreticisi) ve *L. lactis*

subsp. *lactis* LL27 (nisin üreticisi) suşlarıdır. Starter kültürler süte % 1,5 oranında (hacim/hacim) ilave edilmiştir.

3.1.4. Peynir mayası

Peynir mayası olarak, kuvveti 1/10000 civarında olan, ticari sıvı mikrobiyel enzim kullanılmıştır.

3.1.5. Kalsiyum klorür (CaCl₂)

Üretimde kalsiyum klorür (Merck) 100 litre süte 20 g olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.1.6. Salamura

Peynirlerin tuzlanması için kullanılan salamura, ticari rafine iyotsuz tuzun (Billur tuz) su içerisinde % 12 oranında çözündürülüp 95 °C'de 15 dakika ısıtılması ve soğutulması ile hazırlanmıştır.

3.1.7. Ambalaj malzemesi

Peynirlerin saklanması için piyasada ticari olarak satılan kapaklı plastik bidonlar kullanılmıştır.

3.1.8. Bakterilerin kökeni ve gelişme ortamları

Bu çalışmada starter kültür olarak kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* LL2 (bakteriyosin üretmeyen), *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 (nisin üreticisi), *L. lactis* subsp. *lactis* LL9 (laktisin 481 üreticisi), *L. lactis* subsp. *lactis* LL23 (laktisin 3147 üreticisi) ve kontaminant bakteri olarak kullanılan *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.

Laktokok suşları M17 broth ve agar ortamlarında, indikatör bakteri olan *L. monocytogenes* Palcam besiyerinde geliştirilmiştir. Laktokok suşları 30 °C, *L. monocytogenes* suşu 37

°C’de inkübe edilmiştir. Çalışmada kullanılan bütün bakteriler -80 °C’de % 40 steril gliserol içeren uygun besiyerlerinde muhafaza edilmiştir.

M17 Broth ve Agar

Polipepton	5,0 g
Fitopepton	5,0 g
Maya ekstraktı	2,5 g
Et ekstraktı	5,0 g
B-disodyum gliserofosfat	19,0 g
Laktoz (% 19)	50,0 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 mL
Askorbik asit	0,5 g
Agar	15,0 g
Distile su	950 mL
pH 7,15 ± 0,02 (sterilizasyondan önce)	

Ortam içerikleri 950 mL distile su içerisinde çözülüp 121 °C’ de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan besiyeri su banyosunda soğutulup (45 °C), ayrı sterilize edilen laktoz çözeltisi (50 mL) ilave edilmiştir (Terzaghi and Sandine 1975).

Palcam Listeria Selektif Agar

Pepton	23,0 g
Maya ekstraktı	3,0 g
Nişasta	1,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Agar agar (columbia agar)	13,0 g
D(-) mannitol	10,0 g
Amonyum demir(III) sitrat	0,5 g
Eskülin	0,8 g
Dekstroz	0,5 g
Lityum klorür	15,0 g
Fenol kırmızısı	0,08 g
pH 7,2 ± 0,02	

Selektif Katkı:

Polimiksin B Sulfat	5,0 mg
Seftazidim	10,0 mg
Akriflavin	2,5 mg

Katkı maddelerini içeren şişeye 1 mL steril damıtık su ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilize edilen ve 45-50 °C’ye soğutulan 500 mL Palcam agar besiyerine hazırlanan 1 şişe selektif katkı maddeleri ilave edilmiştir. Besiyeri ile katkının homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra steril petri kutularına dökülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteriyosin aktivite testi

L. lactis subsp. *lactis* suşlarında bakteriyosin üretim özelliğinin belirlenmesinde iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bakteriyosin üretim özelliğinin tanısında kullanılan birinci yöntemde, M17 sıvı besiyerinde geliştirilen aktif *L. lactis* subsp. *lactis* suşları öze yardımıyla M17 agar ortamlarına sürme ekim yapılmış ve bakteriler bu ortamlarda 30 °C’de 18 saat geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan kolonilerden, steril kürdan aracılığıyla M17 agar ortamına nokta ekim yapılmış ve 30 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Uygun besiyeri ve inkübasyon sıcaklığında 18 saat geliştirilen indikatör bakterilerden *L. monocytogenes*’ den 100 µL alınarak, % 0.7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar (TSA) üzerine aktarılmış ve bu ortamlar M17 agar besiyerinde geliştirilen laktokok kolonileri üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Petri kutuları *L. monocytogenes* gelişimi için 37 °C 18 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda, laktokok suşlarının *L. monocytogenes*’e karşı oluşturduğu inhibisyon zonları incelenmiştir (Van Belkum et al. 1989).

L. lactis subsp. *lactis* suşlarının bakteriyosin üretme yeteneğinin belirlenmesinde ikinci yöntem olarak kuyucuk yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, test edilecek *L. lactis* suşları M17 sıvı besiyerinde 30 °C’de 18 saat süreyle geliştirilmiş ve santrifüj edilmiştir (6000 g’de 15 dk). Santrifüj işleminden sonra üst sıvı, membran filtre (0,45 µm gözenek çaplı)

kullanılarak sterilize edilmiştir. İndikatör bakteri içeren agar ortamlarında kuyucuklar oluşturulduktan sonra hazırlanan üst sıvıdan 100 µL aktarılmış ve 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda laktokok suşlarının oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir (Geis et al. 1983).

3.2.2. Beyaz peynir yapımı

Laboratuvara getirilen sütler kaba süzme işlemine tabi tutularak tüy ve benzeri partiküllerden arındırılmıştır. Sütler sürekli karıştırılarak 68 °C'de 10 dakika ısıtılma işlemine tabi tutulmuş ve pastörizasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yaklaşık 32 °C'ye soğutulan süt, 10'ar litrelik gruplara ayrılmıştır. Mayalama kazanlarına aktarılan sütlere iyonik kalsiyum dengesini yeniden sağlamak için % 0,02 oranında kalsiyum klorür (CaCl₂) eklenmiştir. Ardından % 1,5 oranında starter kültür ve/veya ~10⁷ kob/g düzeyinde *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ilave edilip 60 dakika bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra 90 dakikada pıhtı kesim olgunluğu elde edilebilecek şekilde ticari peynir mayası (32±1°C) ilavesi gerçekleştirilmiştir. Mayalama süresi sonunda pıhtı bıçaklar yardımıyla yaklaşık 0,5-1,0 cm³'lük parçalar halinde kesilmiş ve peynir altı suyunun ayrılması için 15 dakika kadar beklenmiştir. Ardından içinde cendere bezi bulunan kalıplara aktarılmış ve kırk beş dakika kadar kendi halinde süzölmeye bırakılmıştır. Sonra kademeli olarak arttırılan ağırlıklar (0,5 kg'dan 1,5 kg' kadar) kullanılarak baskılı süzme işlemine alınmıştır. Baskı işleminin bitiminden sonra teleme 8 cm x 8 cm x 8 cm'lik boyutlarda kesilmiştir (Anonymous 1983). Kesilen peynir kalıpları % 12 konsantrasyonlarındaki salamuralara alınmış ve steril plastik kutulara koyularak 4 °C de çalışma bitimine kadar saklanmıştır.

3.2.3. Kimyasal analizler

Peynir örneklerinin toplam kurumadde (Anonymous 2001), titrasyon asitliği (Anonymous 2006), yağ (Anonymous 1978), ve tuz içeriği (Anonymous 1988b) belirlenmiştir. pH ölçümlerinde pH metre (Model Kent EIL, 7045/46) kullanılmıştır.

3.2.4. Serbest yağ asitlerinin belirlenmesi

Toplam serbest yağ asitleri ve her bir serbest yağ asidinin belirlenmesinde Deeth et al. (1983) yöntemi kullanılmıştır. 5 g peynir örneği 2,5 g Na₂SO₄ ile ezilmiştir. Üzerine 5 mL iç standart (C₇) ve 300 µL H₂SO₄ eklenip, 1 dakika süreyle iyice karıştırılmıştır. Karışıma 5 mL hekzan eklenerek bir saat bekletilmiştir. Bir saatin sonunda karışımın sıvı fazı alınıp 2 mL % 6'lık formik asit/eter çözeltisi ile karıştırılmıştır. Bu karışım santrifüj edilip (2000 g, 10 dakika) üst sıvı viallere aktarılmıştır. Vialler kullanılana kadar -18 °C'de saklanmıştır. Hazırlanan peynir örneklerinden analiz için 5 µL kullanılmıştır. Çalışmada alev iyonlaşmalı detektörü (FID) bulunan Agilent 6890 kromatografi sisteminden yararlanılmıştır. Sistemde Agilent-FFAP 300 mm x 250 µm x 0,25 µm kapiller kolon kullanılmıştır. Analiz koşulları: enjeksiyon sıcaklığı, 250 °C; ayırma oranı, 1/10; örneğin akış hızı, 2 mL dak⁻¹; H₂, hava ve işlem gazının akış hızı sırasıyla 33 ml dak⁻¹, 30 ml dak⁻¹, 30 ml dak⁻¹ olarak kullanılmıştır.

3.2.5. Üre-Poliakrilamid jel elektroforezi (Üre-PAGE)

Peynir örneklerinde proteolizin izlenmesinde, üre-poliakrilamid jel elektroforez analizi, yöntemi kullanılmıştır (Hayaloğlu et al. 2004). Peynir kalıpları rendelenerek örnekleme için homojen yapılması sağlanmıştır. 20 g rendelenmiş peynir alınıp 40 mL distile su ile karıştırıldıktan sonra stomacher (Lab Blender 80; Seward Medical, London, England) cihazında 5 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş örneklerin pH değeri 4,6'ya 1,0 M HCl kullanılarak ayarlanmış ve 20 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda pH kontrol edilerek yeniden aynı düzeye getirilmiştir. Homojenizat, 40 °C'de 1 saat bekletilmiş ve pH 4,6'da çözünmeyen maddeler 3000 g'de 30 dakika süreyle 4 °C'de santrifüj edilerek ayrılmıştır. Çökelti (pH 4,6'da çözünmeyen maddeler) üre-PAGE ile analiz edilmek üzere dondurularak kurutulmuştur. Hidrofobik peptidleri belirlemek için pH 4,6'da çözünen fraksiyonun 20 mL'sine 46,67 mL saf etanol ilave edilerek etanol konsantrasyonu % 70 (v/v) ayarlanmıştır. Karışım 20 °C'de 30 dakika tutulup ardından santrifüj (3000 g, 30 dakika, 4 °C) edilmiştir. Çökelti fazı Whatman No.1 filtre kağıdı ile ayrılarak daha sonra kullanılmak üzere dondurularak kurutulmuştur.

Elektroforez analizi Power Pac 200 güç kaynağına sahip Bio-Rad mini jel sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bio Rad Laboratories Ltd., Bio Rad House, Maylands Avenue Hemel Hempsted, Herts, HP2 7TD, UK). pH 4,6'da çözünmeyen örnekler (10 g dondurularak kurutulmuş örnek) % 49 üre içeren örnek tamponunda çözündürülmüş, 50 °C'de 3 dakika tutulup hızla 20 °C'ye soğutulmuştur. Daha sonra örnekler (10 µL) jellere yüklenerek 270-300 volt akım altında yürütülmüştür. Jele marker olarak uygulanan brom fenol blue'nun jelin sonuna gelene kadar akım uygulanmıştır. Blakesley and Boezi (1977) tarafından tanımlandığı gibi jeller Coomassie Brilliant Blue G-250 ile bir gece boyandıktan sonra fazla boya uzaklaşmaya kadar distile su içerisinde bekletilmiştir.

3.2.6. Beyaz peynir örneklerinde bakteri varlığının belirlenmesinde kullanılan mikrobiyel yöntemler

Mikrobiyolojik analizler için, analiz edilecek beyaz peynir örneğinden 10 g alınıp 90 mL steril dilüsyon sıvısı (% 2 sodyum sitrat çözeltisi) ile karıştırılmıştır. Sonra karışım stomacherde (Lab Blender 80; Seward Medical, London, England) 3 dakika süreyle homojenize edilmiştir.

Daha sonra steril % 0.9 sodyum klorür içerisinde dilüsyonlar hazırlanarak, Laktokok suşları M17 agar ortamına, *L. monocytogenes* ise Palcam Listeria Selektif agara (Merck) steril pipetlerle (100 µL) aktarılmıştır. Daha sonra dilüsyon oranları dikkate alınarak 1 g peynir örneğindeki mikroorganizma sayıları belirlenmiştir (Benech et al. 2002). Bu sayımlar her bir bakteri için üç paralelli olacak şekilde yürütülmüştür.

L. monocytogenes'in sayımı için; yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan peynir örneklerinden seri dilüsyonlar yapılarak Listeria selektif agara inoküle edilmiştir. 37 °C de 48 saat inkübasyondan sonra bakteri sayımları yapılmıştır. Seyreltme oranları dikkate alınarak 1 gram peynir örneğindeki mikroorganizma sayıları belirlenmiştir (Benech et al. 2002).

Palcam agarda istenmeyen mikroorganizmaların üremesini engellemek için besiyerine eklenen selektif katkı maddesinin içinde polimiksin B sülfat, sefasidim ve akriflavin bulunmaktadır. Eklenen antibiyotikler rakabetçi flora yı baskılayarak etkisini gösterir. *L. monocytogenes* besin ortamında bulunan eskülini glukoz ve eskülinetine parçalayarak

ortamda bulunan Fe-(III) iyonları ile kompleks oluşturur ve ortamın renginin siyaha dönmesine neden olur (Griffiths 1989).

3.2.7. Plazmid içeriklerinin belirlenmesi

3.2.7.1. Plazmid izolasyonu

M17 broth ortamında 30 °C'de 18 saat geliştirilen *L. lactis* subsp. *lactis* kültürlerinden, 10 mL' lik M17 broth ortamlarına birer mL' lik inokülasyonlar yapılarak, tüpler 30 °C'de üç saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre bitiminde bakteri kültürleri, 6000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak hücre çökeltisi kurutulmaya bırakılmıştır. Daha sonra, üzerine 379 µL sakkaroz tamponu eklenip çözülmüş ve steril mikrofüj tüplerine aktarılmıştır. 37 °C'ye kadar ısıtılan bu karışıma, 96.5 µL lizozim çözeltisi ilave edilip 37 °C su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. 48.2 µL Tris-EDTA-1 eklendikten sonra, mikrofüj tüplerine % 20 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 27.6 µL eklenerek karıştırılmıştır. Bu aşamada ortamda viskozitenin artışı, lizinin başladığını göstermektedir. Lizinin tamamlanması için, mikrofüj tüpleri 37 °C su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler mekanik karıştırıcıda ve yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA'nın kırılması sağlanmıştır. Ortama, yeni hazırlanmış 3N NaOH çözeltisinden 27.6 µL ilave edilmiş ve tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dakika süre ile yavaş bir şekilde karıştırılarak kromozomal DNA'nın alkali denatürasyonu sağlanmıştır. Denatürasyon aşamasının sonunda mikrofüj tüplerine 49.6 µL 2M Tris-HCl çözeltisi eklenerek 3 dakika boyunca yine düz bir zeminde karıştırılmıştır. Mikrofüj tüplerine, +4 °C'de tutulan 5M NaCl çözeltisinden 71.1 µL ve % 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 µL ilave edilip +4 °C'de 15000 devirde 20 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerde oluşan üst faz, mikropipet ile alınarak yeni mikrofüj tüplerine aktarılıp deproteinasyonun sağlanması için kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisinden 700 µL ilave edilmiştir. Tüpler +4 °C'de 15000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek üst faz alınıp, eşdeğer hacimde izopropanol eklenmiştir. Ekstraktlar -20 °C'de 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra plazmid DNA, 15000 devirde 20 dakika santrifüj edilmek suretiyle çöktürülmüştür. Son aşamada sıvı faz akıtılarak DNA çökeltisi kurutulmuştur. Çökeltiler, 20 µL Tris-EDTA-2 içerisinde çözülmüş ve elektroforez uygulamasından önce RNaz A stok çözeltisinden 2 µL ilave edilerek 37 °C'de 45 dakika inkübe edilmiştir (Anderson and McKay 1983).

Sakkaroz Cözeltisi

Tris	0,655 g
EDTA	0,0372 g
Sakkaroz	6,7 g
Destile su	100 mL
pH 8,0 ± 0,02	

Lizozim Cözeltisi

Tris	0,3 g
Lizozim	0,1 g
Destile su	10 mL
pH 8,0 ± 0,02	

Tris-EDTA-1

Tris	0,6 g
EDTA	9.31 g
Destile su	100 mL
pH 8,0 ± 0,02	

SDS Cözeltisi

Tris	0,6 g
EDTA	0,74 g
SDS	20 g
Destile su	100 mL
pH 8,0 ± 0,02	

Tris-HCl

Tris-HCl	31,52 g
Destile su	100 mL
pH 7,0 ± 0,02	

Tris-EDTA-2

Tris	0,121 g
EDTA	0,037 g
Destile su	100 mL
pH	7,5 ± 0,02

% 3 NaCl ile Doymulmuş Fenol Cözeltisinin Hazırlanışı: 100 g fenol üzerine 20 mL destile su ve 3 g NaCl aktarılarak 45 °C'deki su banyosunda çözülmüştür. Ortama 0,1 g hidroksiguinolin ilave edilmiş, karıştırılarak oda sıcaklığında tutulmuştur.

RNaz A Cözeltisi: 5 mL steril destile su içerisinde hazırlanan 0,05 M sodyum asetat çözeltisinin pH'sı asetik asit ile 5,0'a ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A (Sigma, Chem. Co., USA) ilave edilmiştir. Kaynar su içerisinde ortam 5 dakika tutulduktan sonra, -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.7.2. Elektroforez

Plazmid DNA örneklerinin elektroforezi için kullanılan jeller % 0,7 agaroz kullanılarak hazırlanmıştır (Meyers et al. 1976). Yatay jel sistemleri için agaroz, kullanılan jel plaka sisteminin büyüklüğüne göre 30-35 ya da 150-200 mL tris-fosfat elektroforez tamponu içerisinde kaynar su banyosunda çözülerek hazırlanmıştır. 45 °C'ye kadar soğuması beklenen jel, elektroforez plakalarına dökülmüş ve jel tarakları yerleştirilerek bir saat kadar katılaşması beklenmiştir. Bu süre sonunda katılaştıran jel, elektroforez tankına alınmış ve jeli zedelemeyen taraklar ortamdaki uzaklaştırılarak jelin üzerini kapatacak biçimde tampon çözelti ilave edilmiştir. DNA örneklerine RNaz A uygulamasından sonra örnekler su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örneklere 2 µL marker boya çözeltisi eklenmiş ve mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına aktarılmıştır (20 µL). Jellerde örnekler 100 voltta 2-2,5 saat süreyle yürütülmüştür. Marker boyanın jel sistemini terk etmesinden sonra elektrik akımı kesilmiş ve ortamdaki jeller, kullanılan elektroforez tamponuna yeni hazırlanmış 0,2 µg/mL etidyum bromit içeren ortamda bir saat bekletilerek DNA boyanmıştır. Boyama işleminin sonunda jellere, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışık uygulanmış ve numuneler incelenmiştir (Macrina et al. 1982). Fotoğrafların çekiminde

Kodak Gel Logic 200 jel dökümantasyon sistemi (Eastman Kodak Co., USA) kullanılmıştır.

Tris-Fosfat Tampon (10X)

Tris	108	g
% 85 fosforik asit (1,679 µg/mL)	15,5	mL
EDTA (0.5 M)	100	mL
pH 8,0 ± 0,02		

Marker Boya

Brom fenol blue	0,25	g
Sakkaroz	40	g
Destile su	100	mL

3.2.8. İstatistiksel analizler

Veriler tek yönlü varyans analiz yöntemi ile SPSS paket programı (version 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Peynir yapımında dahil tüm çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

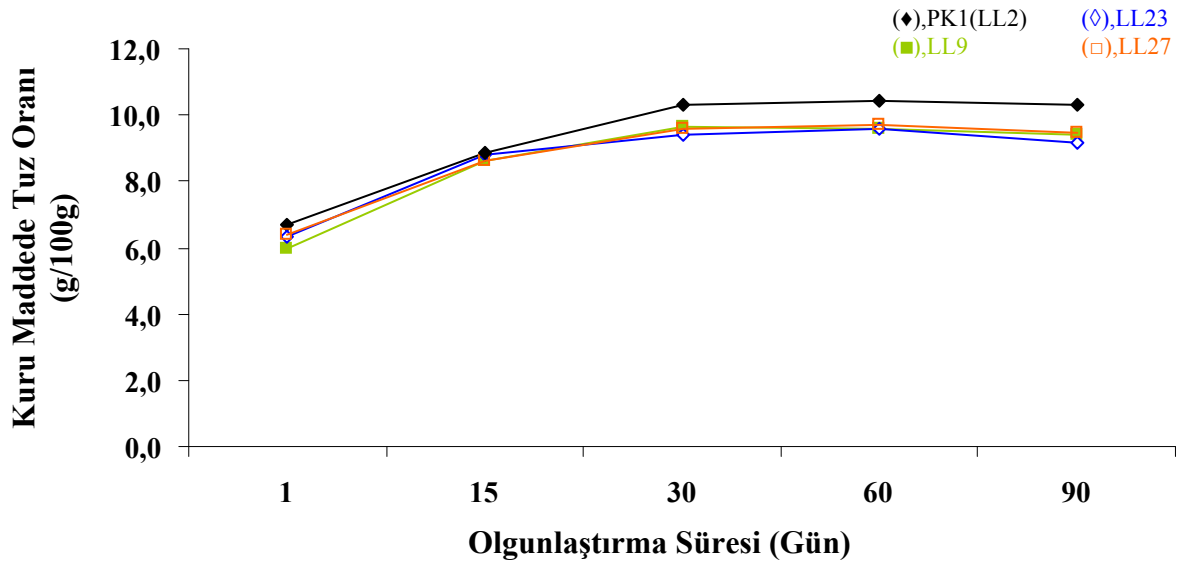
4.1. Peynirlerin Kuru Madde, Yağ, pH ve Titrasyon Asitliği Karakteristikleri

Araştırmada kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 (nisin üreticisi), LL9 (laktisin 481 üreticisi), ve LL23 (laktisin 3147 üreticisi) suşlarının peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılıp kullanılmayacağı, bu suşların ilavesi ile üretilen peynirlerin karakteristikleri incelenerek saptanmıştır. Bu amaçla yukarıda ifade edilen üç suş yanında, bakteriyosin üreticisi olmayan LL2 (PK1) suşu ile üretilen peynir kontrol olarak kullanılmıştır. Üretilen peynirlerin kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik özellikleri olgunlaşma süresi (90 gün) boyunca izlenmiştir.

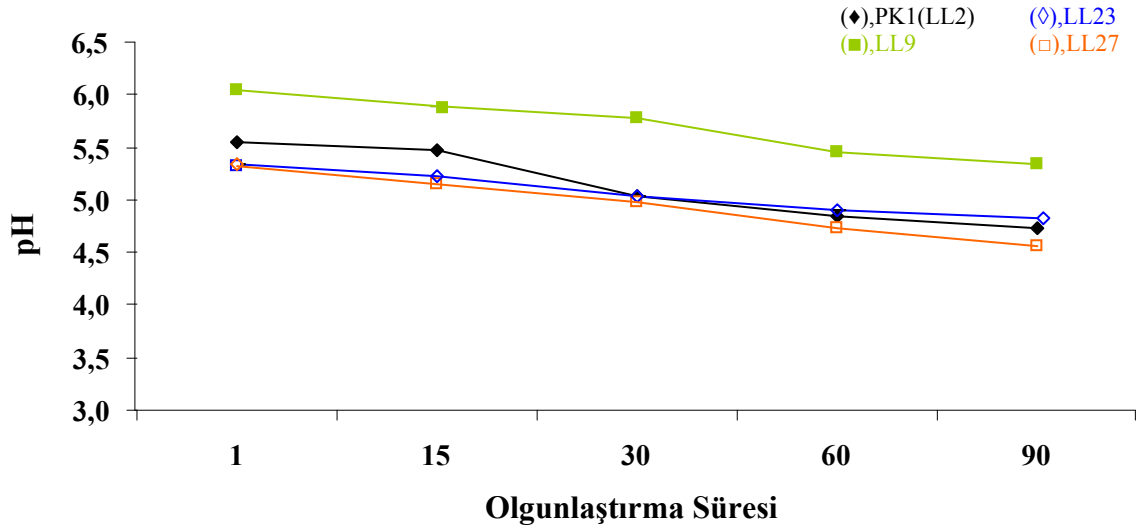
Üretilen peynirlerin tümünde toplam kurumadde oranı olgunlaşma süresince belirgin bir değişme göstermemiştir. Olgunlaşmanın ilk gününde tüm deneme peynirleri için toplam kuru madde oranı 39,54-40,14 g/100 g arasında bulunmuştur. Bu oranlar 90 gün olgunlaştırma süresi sonunda 40,68-40,85 g/100 g arasında tespit edilmiştir. Benzer şekilde kurumaddedeki yağ içerikleri de olgunlaştırma süresince sabit kalmıştır. Ancak, olgunlaştırma süresinin ilk iki haftasında kuru maddeye tuz geçişi hızlı bir şekilde gerçekleşmiş, daha sonra ise yavaşlayarak devam etmiştir (Şekil 4.1) Deneme peynirlerinde pH, olgunlaşma süresi boyunca düşüş göstermiştir (Şekil 4.2). pH düzeyleri bakımından kontrol peyniri (PK1) ile LL23 kullanılarak üretilen peynirler arasında bir farklılık tespit edilmemiştir. En yavaş pH gelişimi LL9 peynirinde, en hızlı pH gelişimi ise LL27 peynirinde gerçekleşmiştir. pH değerlerindeki varyasyon ile paralel bir şekilde, % laktik asit olarak ifade edilen titrasyon asitliği de tüm peynirlerde 90 gün olgunlaştırma süresi boyunca artış göstermiştir (Şekil 4.3). Olgunlaşmanın erken aşamalarında (ilk iki hafta) titrasyon asitliği, kontrol peynir örneği ve LL9 kullanılarak üretilen peynirde, diğer deneme peynirlerinden önemli oranda düşük bulunmuştur. Kontrol peynir örneğinde titrasyon asitliği olgunlaşma süresince doğrusal bir şekilde artış göstermiştir. Bununla birlikte LL9 peynirinde titrasyon asitliğinde sınırlı bir artış belirlenmiştir. LL27 peynirinde ilk 30 gün süresince titrasyon asitliği çok yavaş bir artış göstermiştir. Bu bulgu, peynirde kalıntı haldeki laktozun LL27 tarafından yavaş metabolize edildiğini kanıtlamaktadır. Nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında laktoz metabolizmasının limitli olduğu görüşünü doğrulayan bu bulgular, özellikle yavaş olgunlaştırılan peynirler için söz konusu suşun ideal bir starter suşu olabileceğine işaret etmektedir (Prieto et al. 2000, Atasoy et al.

2008). Bunun aksine LL23 peynirinde titrasyon asitliği artışı ilk 60 gün boyunca aşamalı olarak artmış, 60-90 gün arasında ise sabit kalmıştır.

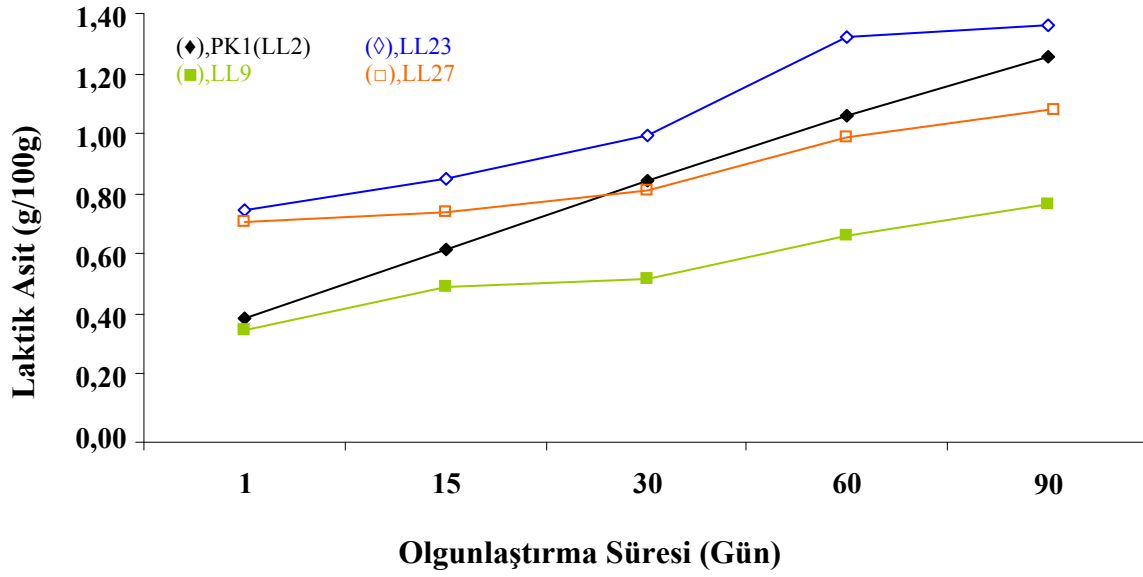
Peynirlerin toplam kurumadde, kurumadde yağ oranları, salamuradan tuz geçişi, pH ve titrasyon asitliği gelişim özelliği dikkate alındığında; denemede kullanılan tüm bakteriyosin üreticisi suşların, beyaz peynir üretiminde kullanılabileceği belirlenmiştir. Zira olgunlaşma süresi boyunca bu özelliklerin belirli sınırlar içerisinde gelişimi, peynir aroma ve tat bileşiklerinin de arzu edilen düzeylerde olacağına işaret etmektedir (Urbach 1995, Morales et al. 2003, Özkalp et al. 2007, Atasoy et al. 2008).



Şekil 4.1. Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince kuru maddelerindeki tuz konsantrasyonunda meydana gelen değişimler



Şekil 4.2. Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince pH değerlerinde meydana gelen değişimler

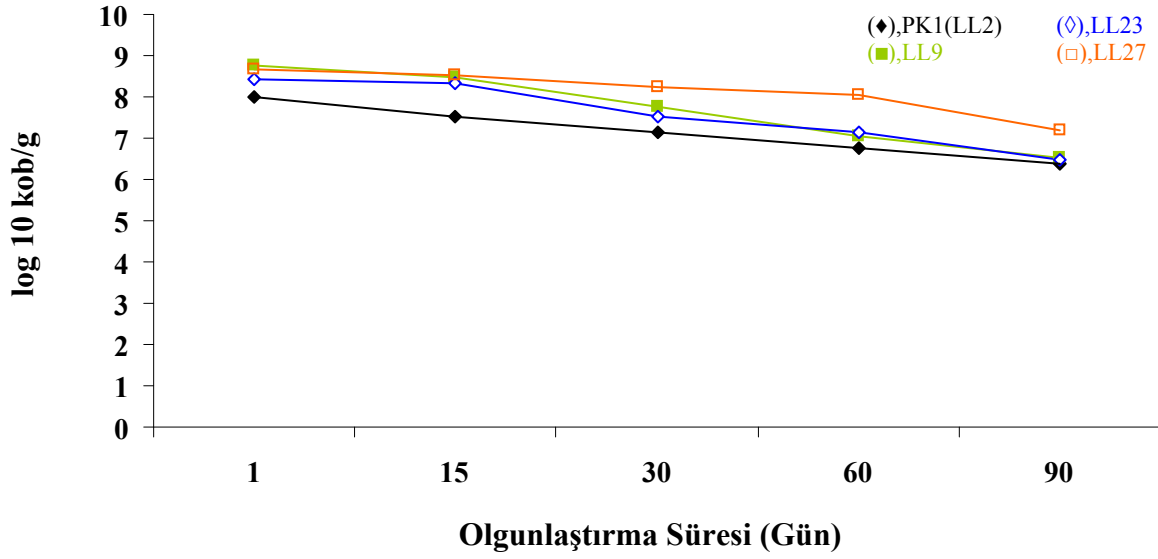


Şekil 4.3 Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince titrasyon asitliği değerlerinde meydana gelen değişimler

4.2. Peynirlerde Olgunlaşma Süresince Starter Bakteri Sayısındaki Değişmeler

Peynirlerin olgunlaştırma süresi (90 gün) boyunca, ilave edilen starter bakteri sayısında meydana gelen değişmeler Şekil 4.4'de verilmiştir. Hiçbir peynir örneğinde, toplam olgunlaştırma süresi boyunca starter bakteri oranında önemli bir değişme meydana gelmemiştir. İlk günde peynir örneklerinde canlı bakteri sayısı 7.97 (PK1) ile 8.78 (LL9 peyniri) \log_{10} kob/g arasında saptanmıştır. Olgunlaşmanın 30. ve 60. günlerinde *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 peynirinde (LL27 peyniri) canlı bakteri sayısı diğer peynirlerden yaklaşık 1,5 log yüksek bulunmuştur. Kontrol peynir örneği PK1' de ise canlı bakteri sayısı, özellikle olgunlaşmanın erken aşamalarında, en düşük düzeyde belirlenmiştir. Bu durum büyük olasılıkla kontrol peynirinde kullanılan laktokok suşunun düşük tuz toleransından ileri gelmektedir. Ancak 90 gün sonunda peynirlerdeki laktokok sayıları arasında istatistiki açıdan ($p < 0,05$) önemli bir farklılık tespit edilmemiştir.

Peynir olgunlaştırma süresi boyunca, beyaz peynirlerde starter kültür aktivitesini engelleyen en önemli etken salamuradaki tuz oranıdır (Guo et al. 1997). Bu sorunun çözümünde en ideal yaklaşım, tuz toleransı yüksek starter kültür suşlarının tanımlanması ve kullanımınıdır. Bu açıdan bakıldığında en ideal starter kültür suşu olarak nisin üreticisi LL27 suşu öne çıkmaktadır. Ancak LL9 ve LL23 suşları da tuz toleransları bakımından potansiyel starter kültür bileşenleri olarak değerlendirilecek nitelikleri taşımaktadır.



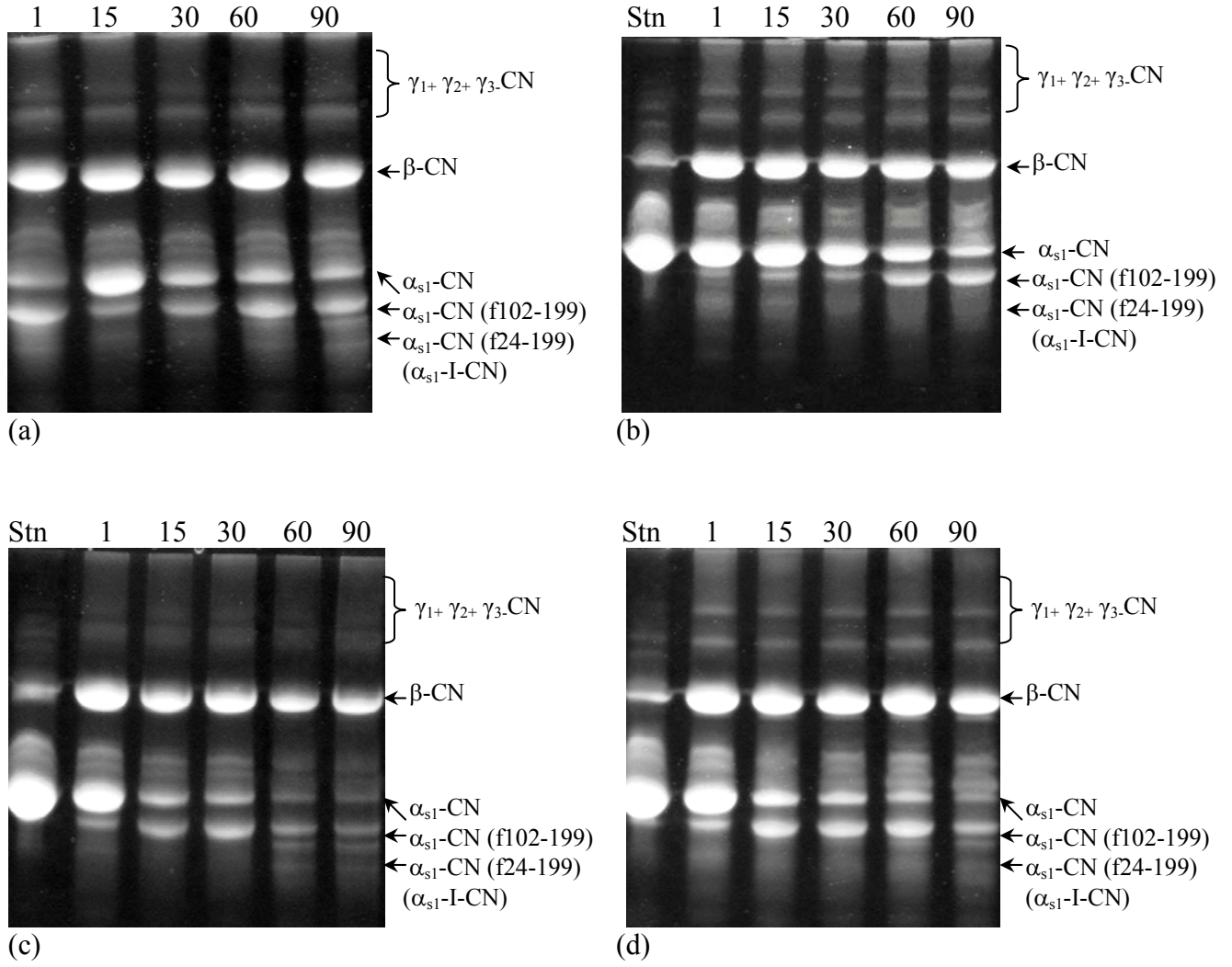
Şekil 4.4 Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince starter bakteri sayısında meydana gelen değişimler

4.3. Peynirlerde Proteoliz

Peynir örneklerinde 1., 15., 30., 60. ve 90. günlerde pH 4,6 'da çözünmeyen fraksiyonların üre sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforetogramı Şekil 4.5'te verilmiştir. Bütün örneklerde β -kazeinin (β -CN) yoğun bir parçalanması meydana gelmemiştir. β -CN bant yoğunlukları incelendiğinde özellikle 60'ıncı günde LL23 peynirinden hazırlanan örneklerde daha geniş bant alınmıştır. Bu bulgu LL23 suşunun, diğer suşlara oranla daha düşük bir proteolitik aktivite içerdiğini işaret etmektedir. Diğer yandan salamurada olgunlaştırılan peynirlerde (örneğin; feta peynirleri) β -CN parçalanmasının, yüksek tuz ve düşük pH etkisiyle enzimatik aktivitenin inhibisyonu sonucu düşük düzeyde gerçekleştiğine (Alichanidis et al.1984, Moatsou et al. 2002) dair literatür verileri, bu denemede elde edilen bulgularla paralellik taşımaktadır.

α_s -CN parçalanması ise, tüm peynirlerde yüksek düzeyde meydana gelmiştir. En yüksek α_s -CN parçalanma düzeyi LL23 peynirinde saptanmıştır. Bu peynir örneğinde olgunlaşma süresindeki artış ile paralel bir şekilde α_s -CN parçalanması da artış göstermiştir. α_s -CN'in parçalanması; kontrol, LL9 ve LL27 peynirlerinde olgunlaşmanın 30. gününe kadar sınırlı bir şekilde meydana gelmiş, proteoliz bu süreçten sonra belirgin bir artış göstermiştir. Bu durum LL2, LL9 ve LL27 suşlarında hücre duvarı ile ilişkili proteazların peynir matriksine

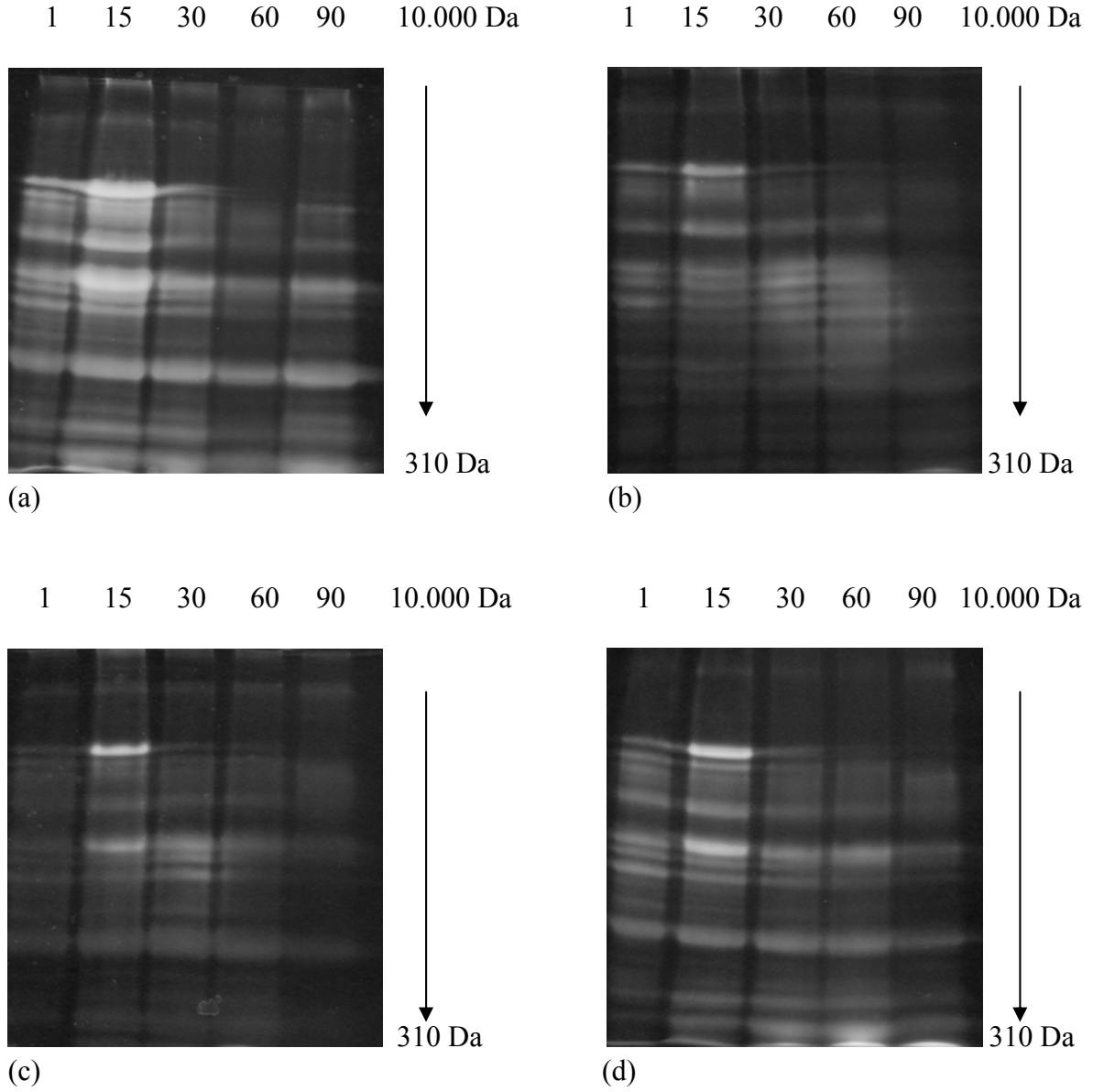
salınımının yavaş olduğuna işaret etmektedir. LL23 peynir örneğinde 30 günden sonra α_s -CN'in parçalanması sonucu, rennet enzimi tarafından oluşturulan α_{s1} -I-CN'den daha hızlı elektroforetik hareketliliğe sahip küçük peptitler meydana gelmiştir. Bu küçük moleküler ağırlığa sahip peptidler [(f102-199) ve (f24-199)] α_{s1} -CN'in ileri düzeyde parçalandığının kesin kanıtlarıdır. Peynirlerde kazeinin başlangıç aşamasında parçalanmasından genellikle koagülant (rennet) sorumludur. Ancak daha sonra oluşan α_{s1} -CN' in parçalanması [(f102-199), α_{s1} -I-CN (α_{s1} -CN, f24-199)] starter bakteri enzimleri tarafından katalize edilmektedir (Hayaloğlu et al. 2004). Bundan dolayı peynir örneklerinde tespit edilen α_{s1} -CN parçalanma ürünlerindeki elektroforetik farklılıklar, bu peynirlerin üretiminde kullanılan *L. lactis* suşlarının farklı peptidaz ya da aminopeptidaz enzim içeriklerine işaret etmektedir. Değişik araştırmacılar α_s -CN parçalanmasının NaCl konsantrasyonundaki artışa paralel olarak inhibe edilmediğini saptamıştır (Awad et al. 1998, Saldamlı and Kaytanlı 1998, Ortigosa et al. 2005, Randazzo et al. 2005). Deneme peynirlerinin tümünde γ_1 -CN (β -CN, f29-209), γ_2 -CN (β -CN, f106-209) ve γ_3 -CN (β -CN, f108-209) bantlarının saptanması (LL23 peynirinde daha düşük olmasına rağmen) NaCl konsantrasyonundan bağımsız bir α_{s1} -CN parçalanmasının gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. LL23 suşunun kullanımı sonucu üretilen peynir örneğinde α_{s1} -CN parçalanmasının daha yavaş oluşu, daha öncede ifade edildiği gibi, bu peynirde düşük plazmin aktivitesine işaret etmektedir. Zira laktokok suşlarında plazmin aktivitesi suştan suşa değişiklik gösteren bir özelliktir (Centeno et al. 2002, Hynes et al. 2005).



Şekil 4.5 Peynirlerin pH 4,6' da çözünmeyen fraksiyonların elektroporetogramları
Peynirler: a) PK1 (LL2), b) LL9, c) LL23, d) LL27, Stn: Standart

Proteolizin daha detaylı anlaşılabilmesi için, %70 etanolde çözünmeyen amino asitler ve peptitler elektroforetik analize tabi tutulmuştur (Şekil 4.6). Bu işlem sonucunda % 70 etanolde çözünmeyen çok küçük azot fraksiyonlarının hidrofobik amino asitler içerdiği saptanmıştır. Düşük moleküler ağırlığa sahip peptit ve amino asitlerin konsantrasyonu, kontrol peynirinde daha az yoğun olmakla birlikte, tüm peynirlerde olgunlaşma süresi boyunca düşmüştür. pH 4,6'da çözünmeyen fraksiyonda olduğu gibi, % 70 etanol de çözünmeyen fraksiyonda da düşük moleküler ağırlığa sahip kazein parçalanmasının en hızlı olduğu peynir örneği LL23 bakterisi kullanılarak elde edilen peynir örneğidir. Özetle en hızlı proteoliz gelişimi LL23 peynirinde tespit edilmiş, diğer örnekler arasında ise proteoliz bakımından anlamlı bir farklanma saptanmamıştır. En düşük proteolitik aktivite görülen LL9 peynirinde bile, endüstriyel üretim süreçlerine uygun bir aktivitenin

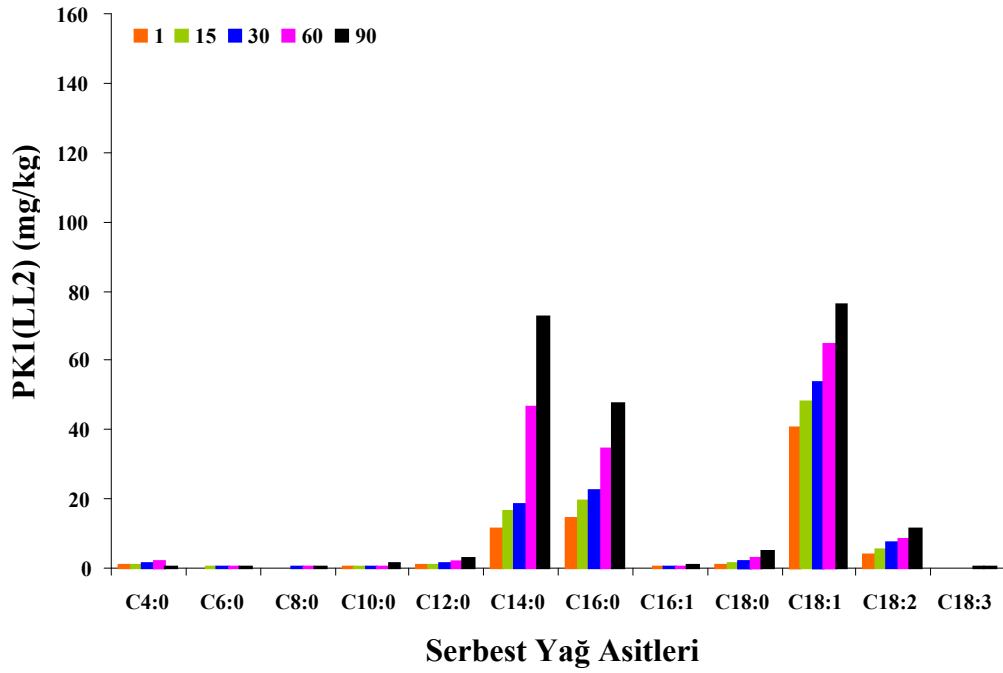
saptanması (Farkye et al. 1990, Law et al. 1993, Hynes et al. 2005) denemede kullanılan tüm laktokok suşlarının bu özellik bakımından uygun starter kültür potansiyeli gösterdiklerine işaret etmektedir.



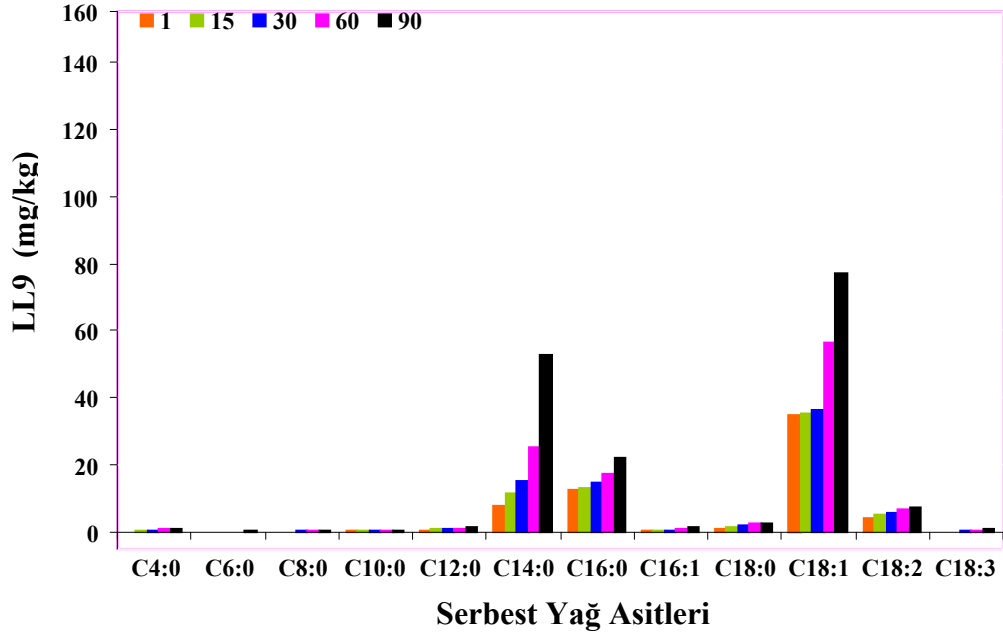
Şekil 4.6. Peynirlerin %70 etanol de çözünmeyen fraksiyonların elektroporetogramları
Peynirler: a) PK1 (LL2), b) LL9, c) LL23, d)LL27

4.4. Peynirlerde Lipoliz

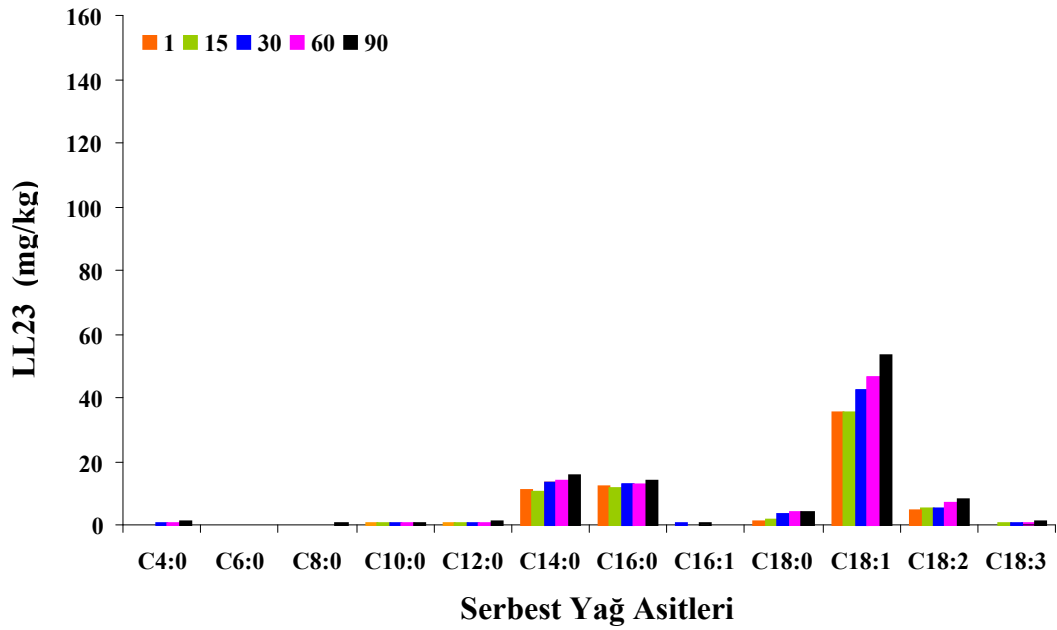
Peynirlerde aroma ve tat bileşiklerinin oluşumunun proteolitik aktivite dışındaki bir diğer önemli unsuru starter kültürlerden kaynaklanan lipolitik aktivitedir (Collins et al. 2003). Deneme peynirlerinde lipolitik aktivite, serbest yağ asitlerindeki değişimler incelenerek belirlenmiştir (Şekil 4.7a, b, c ve d).



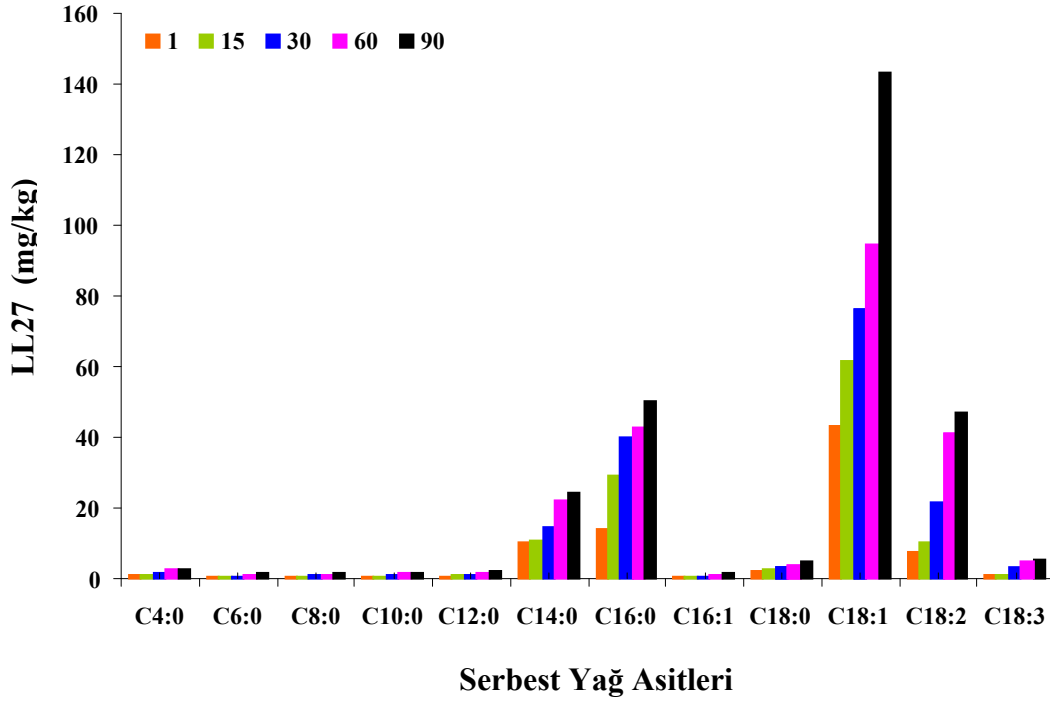
(a)



(b)



(c)

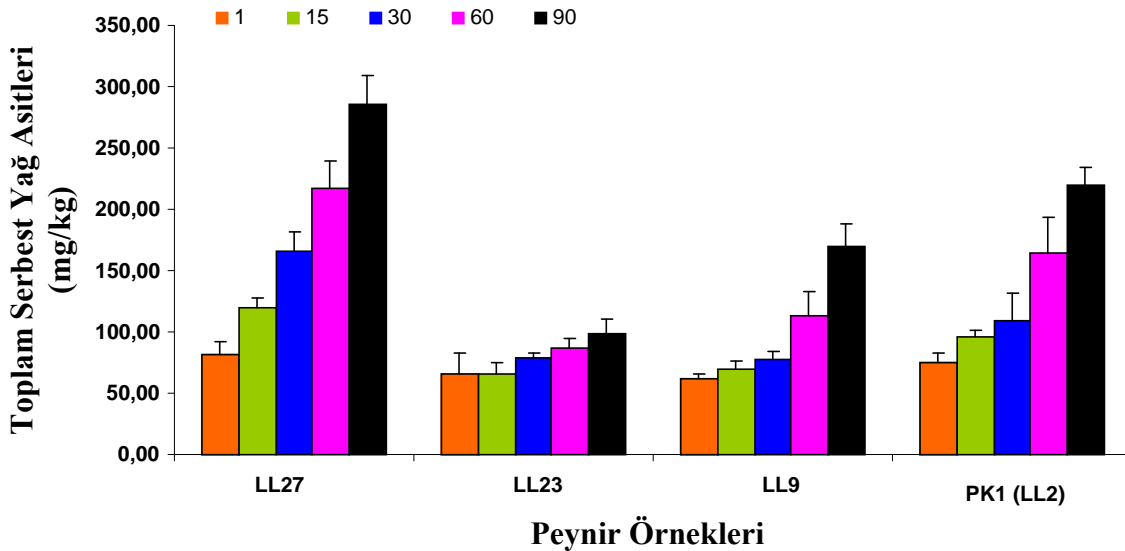


(d)

Şekil 4.7 a, b, c, d. Peynirlerin serbest uçucu yağ asitlerindeki değişimler

Kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin ($C_{4:0}$ – $C_{12:0}$) konsantrasyonu eş zamanlı örneklenen peynirlerde farklılık göstermemiştir. Olgunlaşma süresince tüm peynirlerde (LL27’de en fazla olmak üzere) oleik asit ($C_{18:1}$) en yüksek düzeyde belirlenmiştir. Olgunlaşmanın sonunda (90. gün) oleik asit konsantrasyonu LL27 için 143,37 mg/kg, LL23 için 53,19 mg/kg, LL9 için 76,96 mg/kg ve LL2 için (kontrol) 76,10 mg/kg olarak belirlenmiştir. Oleik asidi, tüm peynirlerde palmitik ($C_{16:0}$) ve miristik asit ($C_{14:0}$) takip etmiştir. Miristik asidin en yüksek olduğu peynir, kontrol örneği olarak saptanmış, bunu LL9, LL27 ve LL23 izlemiştir. Peynir örneklerinde miristik asit, kontrol ve LL9 peynirinde 60. güne kadar önemli ölçüde artış göstermiştir. Palmitik, oleik ve miristik asitler tek suşlu starter kültürler kullanılarak üretilen peynirlerde en fazla tespit edilen serbest uçucu yağ asitleri olarak belirlenmiştir (Christie 1983, Collins 2003). Çalışmamızda elde edilen veriler de bu literatür verilerini desteklemektedir. Peynir örneklerinde en yüksek linoleik asit içeriği, LL27 peynirinde saptanmıştır (47,04 mg/kg). Diğer peynir örnekleri linoleik asit içeriği bakımından benzer bulunmuştur.

Tüm peynirlerde olgunlaşma süresinin 60. gününde lipoliz nerede ise tamamlanmıştır (Şekil 4.8). Peynir aroma ve tat bileşiklerinin ana bileşenlerinin özellikle kısa zincirli yağ asitleri (C_{4:0}–C_{8:0}) olduğu bilinmektedir (Avila et al. 2007). Serbest uçucu yağ asitlerinin mikroorganizmalar aracılığı ile meydana getirilen parçalanma ürünleri; eter, aldehit, (metil-) keton ve laktonları içermektedir (Collins et al. 2003, Avila et al. 2007). Bu çalışmada kısa zincirli uçucu yağ asitlerinin oranı, uzun sürede olgunlaştırılan Cheddar ya da Pecorino Romano peynirlerine oranla düşük düzeyde bulunmuştur. Bu durum laktokok suşlarında esteraz ve lipaz aktivitesinin suş bağımlı bir özellik olduğuna işaret etmektedir. Özer ve ark. (2009) salamurada olgunlaştırılan peynirlerin büyük bir çoğunluğunda esteraz/lipaz aktivitelerinin düşüklüğünün bu peynirlerin bir karakteristiği olduğunu saptamıştır. En yüksek esteraz/lipaz aktivitesi LL27 suşunda belirlenmiştir (serbest Uçucu yağ asidi oranı 285,7 mg/kg). Bunu kontrol (219,36 mg/kg), LL9 (169,58 mg/kg) ve LL23 (98,94 mg/kg) takip etmiştir. Çalışmamız sonuçları da esteraz/lipaz aktivitelerinin laktokok suşlarında önemli ölçüde değişkenlik gösterdiğini doğrulamıştır. Peynirlerde orta zincirli – uzun zincirli serbest uçucu yağ asidi oranları sırası ile % 17,2 - % 35,0 ve % 64,3 - % 81,0 arasında değişim göstermiştir. Bu bulgular Cheddar, Emmental ve Regiano Argentino peynirleri ile uyum göstermektedir (Chamba and Perread 2002, Collins et al. 2003, Perotti et al. 2005, Avila et al. 2007, Özer et al. 2009).



Şekil 4.8 Peynirlerin toplam yağ asidi içeriklerindeki değişimler

Araştırma bulguları ve literatür verileri birlikte değerlendirildiğinde; Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının esteraz/lipaz aktivitelerinin, peynir üretiminde starter kültür suşu olarak kullanım potansiyeline sahip olduklarını göstermektedir.

4.5. Starter Kültür Suşlarının Peynir Üretiminde *Listeria monocytogenes*'in İnhibisyonu Üzerine Etkisi

Starter kültür suşu potansiyelleri incelenen *L. lactis* LL27, LL23 ve LL9 suşlarının peynirlerde *L. monocytogenes*'in gelişimini engelleme yeteneği, 10^7 kob/g oranında *L. monocytogenes* ilave edilen peynir örneklerinde 90 gün boyunca izlenmiştir (Çizelge 4.1.). Kontrol olarak starter kültür ilave edilmemiş ancak *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş ve bakteriyosin üretmeyen LL2 suşu ile birlikte *L. monocytogenes* ilave edilerek üretilen peynirler kullanılmıştır.

Tüm peynir örneklerinde 10^7 kob/g olarak inoküle edilen *L. monocytogenes* sayısı, olgunlaşmanın 1., 3., 10., 20., 30., 40., 50., 60., 70., 80. ve 90. günleri boyunca izlenmiştir. Sadece *L. monocytogenes* ilave edilen peynir örneğinde, canlı *L. monocytogenes* sayısı olgunlaşmanın 20-40. günleri arasında $\sim 10^8$ kob/g oranına ulaşmış 40-90. günler arasında ise başlangıç konsantrasyonuna ($\sim 10^7$ kob/g) gerilemiştir. LL9 ve LL23 suşları kullanılarak üretilen peynirlerde *L. monocytogenes* sayısı ilk 20 günde 10^4 kob/g seviyesine kadar gerilemiş, 20-40. günler arasında 10^6 kob/g düzeyine ulaşmış ve 90 gün boyunca istatistiki açıdan önemli bir değişme göstermemiştir ($p < 0,05$). Nisin üreticisi LL27 kullanılarak üretilen peynirlerde ise LL9 ve LL23 peynirlerinde olduğu gibi *L. monocytogenes* sayısı ilk 20 günde 10^4 kob/g, 30-50. günlerde 10^3 kob/g, 60-70. günler arasında 10^2 kob/g, 80. günde $\sim < 20$ ve 90. gün sonunda $\sim < 10$ seviyesine gerilemiştir (Çizelge 4.1). Bu veriler peynir üretim süresinde patojenin engellenmesinde kullanışlı olan tek suşun nisin üreticisi *L. lactis* LL27 suşu olduğuna işaret etmektedir. Laboratuvar koşullarında *L. monocytogenes* üzerine inhibisyon etkisi belirlenen laktisin 481 (LL9) ve laktisin 3147 (LL23) üreticisi suşların (Akkoç et al. 2009), peynir üretiminde bu etkilerini sürdürmemesi, bu süreçlerin laktisin üretimini engellenmesi ile açıklanabilir. Bu etki büyük bir olasılıkla laktisin üretimi üzerine tuz konsantrasyonunun letal etkisinden kaynaklanmaktadır. Benzer etkiler değişik araştırmacılar tarafından nisin üretimi için de tanımlanmıştır (De Vuyst and Vandamme 1993, Amali et al. 1998, Pongtharangkul and Demirci 2006). Ancak LL27 suşunun bilinen nisin üreticilerden temel farklılığı belirli bir

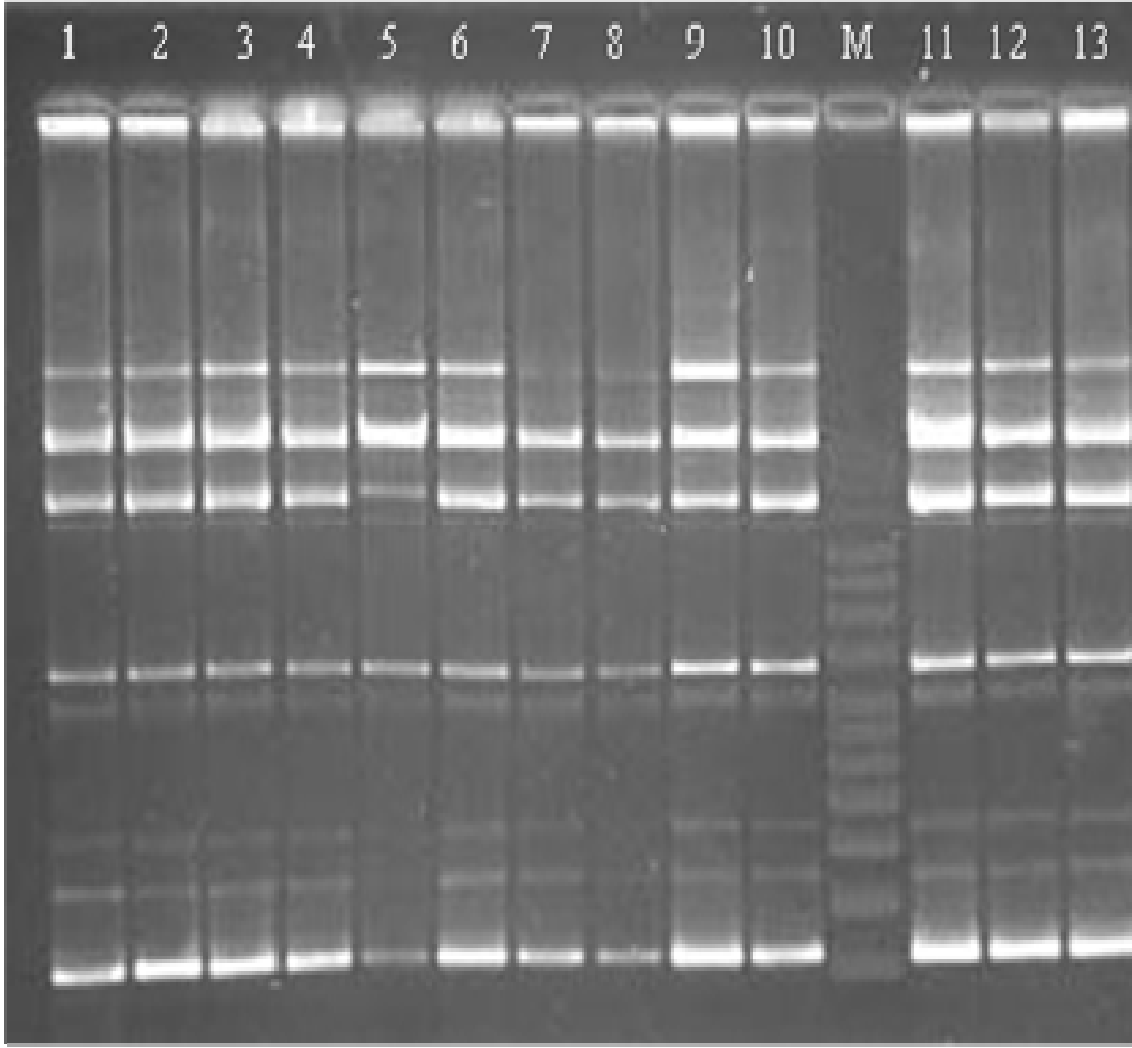
konsantrasyona (% 4) kadar ortam tuz içeriğinin nisin üretimini teşvik etmesidir (Akkoç et al. 2009). Yüksek tuz toleransı gösteren bu suş, bu nedenle peynir üretiminde *L. monocytogenes*'in inhibisyonu üzerinde güçlü bir etkinlik göstermiştir.

Nisinin Gram pozitif bakteriler yanında fiziksel ya da kimyasal ajanlar kullanılarak zayıflatılmış Gram negatif bakterilere karşı da etkinlik gösterdiği saptanmıştır (Wiravan et al. 2006, Papagianni et al. 2007, Şimşek et al. 2009). Bu nedenle özellikle salamurada olgunlaştırılan peynirlerde yüksek tuz oranı ve asitlik gelişimi sonucu zayıflatılacak Gram negatif bakterilere karşı LL27 suşunun da etkinlik göstereceği öngörülebilir.

LL27 suşu kullanılarak üretilen peynirlerden alınan örneklerde ayrıca bu suşta plazmid stabilitesi tanımlanmıştır (şekil 4.9). Bu suşta 90. gün sonunda belirgin bir plazmid kaybı saptanmamıştır. Söz konusu peynirlerde lipolitik/proteolitik aktivite, laktoz fermentasyonu ve nisin üretimi gibi endüstriyel özellikler bakımından da belirgin bir farklanmanın meydana gelmemesi plazmid stabilite verilerini doğrulamaktadır. Zira bu bakterilerde yukarıda sözü edilen endüstriyel öneme sahip özellikler genellikle plazmid kodludur (Pongtharangkul and Demirci 2006, Akkoç et al. 2009).

Çizelge 4.1. Olgunlaşma süresi boyunca peynir örneklerinde *Listeria monocytogenes* sayısındaki (kob/g) değişim

Peynir Örnekleri	Depolama Süresi (Gün)											
	0	1	3	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Tek Başına <i>Listeria</i> sayısı	1,1x10 ⁷	2,5x10 ⁷	3,1x10 ⁷	5,3x10 ⁷	6,8x10 ⁸	7,4x10 ⁸	7,1x10 ⁸	1,6x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,2x10 ⁷	1,2x10 ⁷
LL2 Peynirindeki <i>Listeria</i> sayısı	1,2x10 ⁷	1,4x10 ⁷	2,1x10 ⁷	2,9x10 ⁷	5,3x10 ⁶	4,8x10 ⁶	6,1x10 ⁶	7,1x10 ⁶	5,4x10 ⁶	4,8x10 ⁶	4,2x10 ⁶	3,7x10 ⁶
LL9 Peynirindeki <i>Listeria</i> sayısı	1,1x10 ⁷	4,1x10 ⁶	1,3x10 ⁶	5,1x10 ⁵	2,1x10 ⁴	1,2x10 ⁵	5,1x10 ⁶	6,1x10 ⁶	5,0x10 ⁶	4,5x10 ⁶	3,1x10 ⁶	2,1x10 ⁶
LL23 Peynirindeki <i>Listeria</i> sayısı	1,2x10 ⁷	2,1x10 ⁶	1,5x10 ⁶	7,1x10 ⁵	3,0x10 ⁴	1,6x10 ⁵	5,2x10 ⁶	4,9x10 ⁶	4,7x10 ⁶	4,4x10 ⁶	3,8x10 ⁶	3,4x10 ⁶
LL27 Peynirindeki <i>Listeria</i> sayısı	1,0x10 ⁷	1,3x10 ⁶	1,3x10 ⁶	0,8x10 ⁵	1,0x10 ⁴	3,8x10 ³	1,8x10 ³	1,3x10 ³	3,0x10 ²	2,1x10 ²	<20	<10



Şekil 4.9. *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun plazmidlerinin peynir üretim süreçlerindeki stabilitesi

Hatlar: 1) Doğal Suş (plazmidler. 33.1, 28.7, 23.7, 20.0, 18.3, 9.9, 8.7, 4.4, 3.3 ve 2.1 kb, 2) 0. gün, 3) 1.gün, 4) 3.gün, 5) 10. gün 6) 20. gün, 7) 30. gün, 8) 40. gün, 9) 50. gün, 10) 60. gün, M) DNA Marker, 11) 70. gün, 12) 80. gün, 13) 90. gün plazmid izolatları

5. SONUÇ

Araştırmada kullanılan tüm Türkiye kökenli *L. lactis* subsp. *lactis* suşları, beyaz peynirlerin yapısal ve aromatik gelişimi için uygun sınırlar içerisinde tuz ve asit toleransı yanında, proteolitik ve lipolitik aktivite özellikleri göstermiştir. Bu sonuçlar söz konusu suşların tek suş içeren starter kültürler olarak kullanılabilirliklerine işaret etmektedir.

Proteolitik ve lipolitik aktiviteleri bakımından öne çıkan suşlar sırasıyla *L. lactis* subsp. *lactis* LL23 ve LL27 olmuştur. LL27 suşunda asitlik gelişiminin diğer laktokoklardan düşük oluşu da göz önünde bulundurulduğunda, LL23 ve LL27 kombinasyonu ile hazırlanacak iki suşlu starter kültürün, hızlı olgunlaştırılan peynirlerin ideal yapısal ve aromatik özelliklerini sağlayacağı ortaya çıkmaktadır.

Bu araştırmada LL27 suşu için tanımlanan *L. monocytogenes*'in peynirlerde inaktivasyonunu gerçekleştirme özelliği, söz konusu bakterinin tek ya da çok suşlu kültürlerin bileşeni olarak kullanımının listeriozisin engellenmesinde önemli bir katkı sağlayacaktır. Özellikle ülkemizde yaygın olarak görülen bu sorunun çözümü için LL27 suşunun pilot ölçekte denenmesi aciliyet taşımaktadır.

Türkiye kökenli starter kültür suşu geliştirme programlarının başlatılması, geleneksel fermente ürünlerimizin korunması için temel hareket noktasıdır. Tez çalışmasında üretim süreçlerine uygunluğu tanımlanan *L. lactis* subsp. *lactis* suşları, bu açıdan da büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, İ., Doğan, H., Gürgün V., Halkman, A. K., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, D. F., Tunail ve N. Tükel, Ç. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Sim Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara.
- Alichanidis, E., Anifantakis, E. M., Polychroniadou, A. and Nanou, M. 1984. Suitability of ome microbial coagulants for Feta cheese manufacture. Journal of Dairy Research, 51; 141-147.
- Amiali, M. N., Lacroix, C. and Simard R. E. 1998. High nisin Z production by Lactococcus lactis UL719 in whey permeate with aeration. World J. Microbiol. Biotechnol., 14; 887–894.
- Anderson, D. G. and McKay, L. L. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol., 46; 549-552.
- Anonymous. 1978. Determination of Fat in Cheese. Turkish Standards Institution, TS 3046, Ankara.
- Anonymous. 1983. Beyaz peynir TS591 UDK637-363 Türk standartları enstitüsü.
- Anonymous. 1988a. FDA. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as direct human.
- Anonymous. 1988b. I.D.F. Determination of salt content, Standard 12 B. Brussels: International Dairy Federationood ingredient. Federal Register, 53;11247.
- Anonymous. 2001. I.D.F. Reference analysis for total solids (AOAC Oven dried method), IDF 20 1-2. Brussels: International Dairy Federation.
- Anonymous. 2004. <http://www.textbookofbacteriology.net>. Todar's Online Textbook of Bacteriology Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.
- Anonymous. 2006. White Cheese Standard. Turkish Standards Institution, TS 591, Ankara.
- Archambaud, C., Nahori, M. A., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P. and Dussurget, O. 2006. Control of *Listeria* superoxide dismutase by phosphorylation. The Journal of Biological Chemistry 281; 31812–31822.
- Atasoy, A. F., Yetismeyen, A., Turkoglu, H. and Ozer, B. 2008. Effects of heat treatment and starter culture on the properties of traditional Urfa cheese (a white-brined Turkish cheese) produced from bovine milk. Food Control, 19; 278-285.

- Avila, M., Calzada, J., Gadre, S. and Nuñez, M. 2007. Effect of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strain and high-pressure treatment on the esterase activity and free fatty acids in Hispánico cheese. *International Dairy Journal*, 17; 1415-1423.
- Awad, S., Luthi-Peng, Q. Q. and Puhan, Z. 1998. Proteolytic activities of chymosin and porcine pepsin on buffalo, cow, and goat whole and β -casein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46; 4997-5007.
- Axelsson, L. T. 1993. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In “ Lactic Acid Bacteria” Salmina, S., Wright, A.V., pp. 1-63, Marcel Dekker Inc. USA.
- Bauer, R. and Dicks, L. M. T. 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Intr. J. Food Microbiol.*, 101; 201– 216.
- Benech, R., O. Kheadr, E. E., Laridi, R. Lacroix, C. and Fliss, I. 2002. Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar Cheese by Addition of Nisin Z in Liposomes or by In Situ Production in Mixed Culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68; 3683-3690.
- Benkerroum, N., Ghouati, Y., Ghalfi, H., Elmejdoub, T., Roblain, D., Jacoques, P. and Thonart, P. 2002. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in the model cultured milk (Iben) by in situ bacteriocin production from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. *Int. J. Dairy Technol.*, 55(3); 145-151.
- Bersot, L. S., Landgraf, M. Franco, B. D. G. M. and Destro M. T. 2001. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. *Meat Sci.*, 57; 13-17.
- Beuhat, L. R., Doyle, M. P. and Montville, T. J. 1997. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. 337-349.
- Bhunja, A., Johnson, M. C., Ray, B. and Kalchanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 70; 25-33.
- Biberoğlu, K., İliçin, G., Süleymanlar, G. ve Ünal, S. 2003. İç Hastalıkları. 3131-3195. Güneş Kitapevi.
- Bizani, D., Morrissy, J. A. C., Dominguez, A. P. M. and Brandelli, A. 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *Intr. J. Food Microbiol.*, 121; 229–233.
- Blakesley, R. W. and Boezi, J. A. 1977. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Chemistry*, 82; 580-581.

- Boumerdassi, H., Monnet, C., Desmazeaud, M. and Corrieu, G. 1997. Isolation and properties of *lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 63; 2293- 2299.
- Bouttefroy, A. and Milliere, J. B. 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *L.monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. of Food Microbiol.*,62;65-75.
- Bruno, M. E. C., Kaiser, A. and Montville, T. J. 1992. Depletion of proton motive force by nisin in *L.monocytogenes* cells. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 8; 2255-2259.
- Carminati, D., Perrone, A., Giraffa, G., Neviani, E. and Mucchetti, G. 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Gorgonzola cheese rinds. *Food Microbiology*, 21 ; 801–807.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G. and Hastings, J. W. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria problems and pointers. *Int. J. of Food Microbiol.*, 34;1-16.
- Carr, F. J., Chill, D. and Miada, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28 (4); 281-370.
- Centeno, J.A. Tomillo, F. J. Fernández-Garcia, E. Gaya, P. and Núñez, M. 2002 Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 85; 3164-3172.
- Chamba, J. F. and Perreard, E. 2002. Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Lait.*, 82; 33-44.
- Chen, H. and Hoover, D. G. 2003. Bacteriosins and their food applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*.
- Christie, W.W. 1983. The composition and structure of milk lipids. In *Development in Dairy Chemistry: Lipids*. P.F.Fox (Ed.), Vol. 2, Applied Science Publication, London, 1-36.
- Chung, W. and Hancock, REW. 2000. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *Int. J. of Food Microbiol.*, 60; 25-32.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71; 1–20.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. and Wilkinson, M. G. 2003. Evidence of relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 70; 105-113.

- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S. D., Knoetze, H. and Dicks, L. M. T. 2005. Characterization Of A 3944 Da Bacteriocin, Produced By *Enterococcus mundtii* ST15, With Activity Against Gram-Positive And Gram-Negative Bacteria Int. J. of Food Microbiol., 105; 433– 444.
- De Martinis, E. C. P., Alves, V. F. and Franco, B. D. G. M. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. Food Reviews International, 18(2-3); 191-208.
- De Vos, W. M. and Hugenholtz, J. 2004. Engineering metabolic highways in lactococci and other lactic acid bacteria. Trends Biotechnol., 22; 72-79.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1993. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40; 17–22.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications. Chapman and Hall. New York, 539 p.
- De Vuyst, L. and Leroy, F. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. Journal Molecular Microbiology Biotechnology, 13; 194–199.
- Deeth, H. C., Fitzgerald, G. H. and Fron, A. J. 1983. A gas chromatography method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 18; 13–20.
- Delves-Broughton, J. Blackburn, P. Evans, R. J. and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie Van Leeuwenhoek, 69; 193-202.
- Doganay, M., Söyletir, G. and Topçu, A. W. 2002. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Kitapevi, 1528-1533.
- Ekici, K., İşleyici, Ö. ve Sağun, E. 2004. Süt ve süt ürünlerinde *Listeria monocytogenes* varlığı. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, 97-101.
- Elliason, D. J. and Tatini, S. R. 1999. Enhanced inactivation of *Salmonella* Typhimurium and verotoxigenic *Escherichia coli* by nisin at 6.5°C. Food Microbiol., 16; 257-267.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev., 24; 85-106.

- Erinç, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. 2006. Lantibiyotikler. Gıda Mühendisleri Odası Kongresi. Kongre Bildiri Kitapçığı. Ankara.
- Erlanson, K. and Batt, C. A. 1997. Strain-specific differentiation of lactococci in mixed populations using RAPD-derived probes. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 63; 2702-2707.
- Farber, J. M. and Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol., Reviews*, 476-511.
- Farkye, N. Y., Fox, P. F., Fitzgerald, G. F. and Daly, C. 1990. Proteolysis and flavor development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase positive and proteinase-negative starters. *Journal of Dairy Science*, 73; 874–880.
- Fontana, M. B. C., Bastos, M. C. F. and Brandelli, A. 2006, Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. *Curr Microbiol.*, 52; 350 -353.
- Garneau, S., Martin, N. I. and Vederas, J.C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.*, 84; 577–592.
- Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. 1983. Potential of lactic Streptococci to produce bacteriocin. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 45; 205-211.
- Ghraiiri, T., Frere, J., Berjeaud, J. M. and Manai, M. 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 105; 389-398.
- Gill, A. O. and Holley R. A. 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and Bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research Int.*, 33; 83-90.
- Gratia, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 93; 1040-1043.
- Griffiths, W. 1989. "Listeria monocytogenes.: Its importance in the dairy industry" *J. Sc. Food Agric.*, 47; 133–158.
- Guo, M. R., Gilmore, J. K. A. and Kindstedt, P. S. 1997. Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 80; 3092.
- Hauben, K. J. A., Wuytack, E.Y., Soontjens, C.C.F. and Michiels, C.W. 1996. High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *J.Food Prot.*, 59; 350–355.

- Havarstein, L. S., Diep, B. D. and Nes, I. F. 1995. A family of bacteriocin abc transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.*, 16; 229-240.
- Hayaloğlu, A. A., Güven, M., Fox, P. F., Hannon, J. A. and Mcsweeney, P. L. H. 2004. Proteolysis in Turkish white-brined cheese made with defined strains of *Lactococcus*. *International Dairy Journal*, 14; 599-610.
- Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Reviews Microbiol* 4; 423–434.
- Hurst, A. 1981. Nisin In *Advances in Applied Microbiology* ed. Perlman, D. and Laskin, A.I., Vol. 27. pp. 85-123. New York: Academic Press.
- Hynes, E., Zalazar, C. A. and McSweeney, P. L. H. 2005. Influence of defined and natural 'wild' thermophilic cultures on proteolysis in reggianito argentino hard cooked cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60; 259-263.
- Ireton, K. 2006. *Listeria monocytogenes*. In *Bacterial Genomes and Infectious Diseases*. Chan, V.L., Sherman, P.M., and Bourke, B. (eds). Totowa, NJ: Humana Press, pp. 125–149.
- Ireton, K. 2007. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. *Cellular Microbiology* 9; 1365–1375.
- Ishizaki, A., Ennahar, S. and Sonomoto, K. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Bio. Bioeng.*, 87; 705-716.
- Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S. and Dousset, X. 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza Bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications* Vol. 41, No; 6 Supplement, pp. 47-53.
- İşleröğlü, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. 2005. Sınıf IIa bakteriyosinlerin biyosentezi, yapısı ve antimikrobiyal aktivitesi. *Gıda Kongresi, Kongre Bildiri Kitapçığı*. İzmir.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 171-200.
- Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology*, 12; 39-86.
- Koponen, O. 2004. Studies of producer self – protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*. Doctoral Dissertation, Institute Of Biotech. And Department Of Appl. Chemistry and Microbiol. Helsinki.

- Kwon, D. Y., Kim, W. J. and Elegado, F. B. 1997. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *Intr. J. Microbiol.*, 37;1-11.
- Law, J., Fitzgerald, G. F., Uniacke-Lowe, T., Daly, C. and Fox, P. F. 1993. The contribution of Lactococcal starter proteinases to proteolysis in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 76; 2455–2467.
- Lee, N. K. and Paik, H. D. 2001. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 Isolated From Jeot-Gal. *Food Microbiol.*, 18; 17-24.
- Liu, W. and Hansen, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 56; 2551-2558.
- Macrina, F. L. Tobian, J. A. Jones, K. R. Evans, R. P. and Clewell, D. B. 1982. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*, 19; 345-353.
- Maisnier-Patin, S. Deschamps, N. Tatini, S. R. and Richard, J. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait.*, 72; 249-263.
- Mattick A. T. R. and Hirsch A. 1947. Further observation on an inhibitor (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* 2; 5-8.
- Mcauliffe, O., Ross, R. P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Reviews*. 25; 285-308.
- Meyers, J. A., Sanches, D., Elwell, L. P. and Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127 (3); 1529-1537.
- Moatsou, G., Massouras, T., Kandarikis, I. and Anifantakis, E. 2002. Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Lait*, 82; 601-611.
- Mohamed, G. E. E., Seaman, A. and Woodbine, M. 1984. Food antibiotic nisin: Comparative effects on *Erysipelothrix* and *Listeria*, in antimicrobials and agriculture (M. Woodbine, Edd.) pp. 435-442, Butterworths, Lodon.
- Montville, T. J. and Winskowski, K. 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In “Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers”, M. P. Doyle, L.R. Beuchat and T. J. Montville (Eds.) ASM, Washington D.C.

- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P. and Núñez, M. 2003. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe's milk cheese. *International Dairy Journal*, 13; 201-209.
- Nel, S., Lues, J. F. R., Buys, E. M. and Venter, P. 2004. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. *Meat Science*, 66; 667-674.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, traditional Thai fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 81; 137-145.
- Nykanen, A., Weckman, K. and Lapvetelainen, A. 2000; Synergistic inhibition of *L.monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *Int. J. of Food Microbiol.*, 61; 63-72.
- Ortigosa, M., Arizcun, C., Torre, P. and Izco, J. M. 2005. Use of wild *Lactobacillus* strains in an adjunct culture for a Roncal-type cheese. *Journal of Dairy Research*, 72; 168-178.
- O' Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.*, 84; 593-604.
- Özer, B. H., Kırmacı, H. A., Şenel, E., Atamer, M. and Hayaloğlu, A. A. 2009. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, 19; 22-29.
- Özkalp, B., Özden, B., Tuncer, Y., Şanlıbaba, P., and Akçelik, M. 2007. Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey. *Lait*, 87; 521-534.
- Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotec. Advances.*, 21; 465-499.
- Papagianni, M., Avramidis, G. and Filiouis, G. 2007. Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch gluco-stat cultures of *Lactococcus lactis*. *Enzym Microb. Technol.*, 40; 1557-1563.
- Perotti, M. C., Bernal, S. M., Meinardi, C. A. and Zalazar, C. A. 2005. Free fatty acid profiles of Reggiano Argentino cheese produced with different starters. *International Dairy Journal*, 15; 1150-1155.

- Pongtharangkul, T., Demirci, A. 2006. Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol Prog.*, 22; 217–224.
- Prieto, B., Urdiales, R., Franco, I., Fresno, J. M. and Carballo, J. 2000. Quesucos de Liebana cheese from cow's milk: biochemical changes during ripening. *Food Chemistry*, 70; 227–233.
- Randazzo, C. L., Pitino, I., Restuccia, C. and Caggia, C. 2005. Evaluation of technological properties of wild strains to be used as starter, both individually and in mixture, for the Pecorino Siciliano cheese making. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 56; 399-408.
- Reij, M. W., Den Aantrekker, E. D., ILSI European Risk Analysis in Microbiology Task Force, 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 91; 1–11.
- Rodriguez, A., Rihla, N., Martiniz, B. and Delgado, T. 2003. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *Inter. J. Food Microbiol.*, 85; 23- 33.
- Sahl, H-G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, 230; 827-853.
- Saldamlı, I. and Kaytanlı, M. 1998. Utilization of Fromase, Maxiren and Rennilase as alternative coagulating enzymes to rennet in Turksih white cheese. *Milchwissenschaft*, 53; 22-25.
- Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K.E., Scanga J. A. and Smith G. C. 2005. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *L. Monocytogenes* on sliced pork Bologna stored at 4°C in vacuum packages. *Leben. Wiss. Technol.*, 38; 21-28.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N. and Traore, S. A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *African J. Of Biotec.*, 5(9); 678-683.
- Schilech, W. 1988. “Virulance characteristics of *Listeria monocytogenes*”, *Food Technol.*, 14 (2); 176-178.
- Schved, F., Henis, Y. and Juven, B. J. 1994. Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *Inter. J. Food Microbiol.*, 21; 305–314.

- Seeliger, H. and Jones, D., 1986. "Genus *Listeria* pirie" In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th Ed. P. Sneath, N. Mair, M. Sharpe and J. Holt, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1235-1245.
- Stiles, M. E., Holzapfel, W. H., 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36; 1- 29.
- Şimşek, Ö., Çon, A. H., Akkoç, N., Saris, P. E. J. and Akçelik, M. 2009. Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered *Lactococcus lactis* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36; 481–490.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins Of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40; 722-756.
- Terzaghi, B. E. and Sandine, W. E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 29; 807-813.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2005. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.*, 45(4); 312–322.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*. 41; 11-19.
- Todorova, S. D., Nyati, H., Meincken, M. and Dicks, L.M.T. 2007. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control*, 18; 656–664.
- Turantaş, F. ve Ünlütürk, A. 2002. Gıda Üretiminde kritik kontrol noktaları. *Dünya Gıda Dergisi*, 73-79.
- Twomey, D. Ross, R. P., Ryan, M., Meany. B., Hill, C. 2002: Lantibiotics produced by actic acid bacteria: structure, function and application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82; 165-185.
- Urbach, G. 1995. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, 5; 877-903.
- Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 55; 1187–1191.

- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G. and Goebel, W. 2001 *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 14; 584–640.
- Von Mollendorff, J.W., Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2006. Comparison Of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from the Balkan Peninsula. Curr. Microbiol., 53(3); 209-216.
- Wessels S, Jelle B, Ingolf F. 1998. Bacteriocins of the Lactic acide Bacteria. An Overlooked Benefit for Food.
- Wirawan, R. E., Klesse, N. A., Jack, R. W. and Tagg J. R. 2006. Molecular characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. Appl Environ Microbiol., 72; 1148–1156.
- Yıldırım, Z. and Johnson, M. G. 1998. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. Lett. Appl. Microbiol., 26; 297-304.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem., 67; 1616-1619.
- Zottola, E. A. and Smith, L. B. 1991. Pathogens in cheese. Food Microbiol., 8;171-182.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ramazan YILDIRIM

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 25.07.1979

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Fatih Sultan Mehmet Lisesi

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Çalıştığı Kurum : Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Pediyatri Biyokimya 2000-