



**TÜRKİYE'NİN FARKLI YÖRELERİNDEN TEMİN EDİLEN
SUCUK ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE BAKTERİYOSİN
ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elif ERKAYA

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2019
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRKÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYE’NİN FARKLI YÖRELERİNDEN TEMİN EDİLEN
SUCUK ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE BAKTERİYOSİN
ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elif ERKAYA

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Biyoteknoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2019**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**TÜRKİYE'NİN FARKLI YÖRELERİNDEN TEMİN EDİLEN SUCUK
ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU,
İDENTİFİKASYONU VE BAKTERİYOSİN ÜRETME POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Prof.Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Elif ERKAYA tarafından yapılan bu çalışma ~~27.../06.../2019~~ tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (3./3) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Prof.Dr. Mesut TAŞKIN

İmza :

Üye : Doç.Dr. Serkan Örtücü

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu ~~04.../07.../2019~~ tarih ve ~~27.../.../60~~ nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE’NİN FARKLI YÖRELERİNDEN TEMİN EDİLEN SUCUK ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE BAKTERİYOSİN ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif ERKAYA

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu tez çalışmasında, Gaziantep, Kayseri, Erzurum ve Kahramanmaraş’tan sucuk örnekleri temin edildi. Bu sucuk örneklerinden toplam 103 izolat elde edildi ve rep-PCR genomik parmak izi analiz yöntemi kullanılarak, bunlardan 7 tanesinin farklı olduğu gözlemlendi. Tüm analizler bu 7 suş üzerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla, izolatların gelişme gösterdikleri pH, tuz ve sıcaklık değerleri belirlendi. Bu bakteriyal suşların büyük bir çoğunluğunun, %2-4 tuz konsantrasyonunda, 15-37°C’de ve 5-7 pH’da gelişme gösterdikleri tespit edildi. Daha sonra, suşların 16S rRNA sekans analizleri yapıldı ve bu izolatların, *Aerococcus urinaeequi*, *Streptococcus salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Macrococcus caseolyticus*, *Lactococcus garvieae*, *Staphylococcus saprophyticus* ve *Lactobacillus sakei* türlerine ait izolatlar olduğu tespit edildi. En son adımda ise, bu türler içerisinde yer alan LAB’ların bakteriyosin üretme potansiyelleri araştırıldı. Bu amaçla test suşlarının antagonistik etkileri disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelendi. Sonuçta, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactobacillus sakei*’nin; *Enterococcus faecalis*, *Shigella dysenteriae* ve *Escherichia coli* O157:H7 üzerinde antagonistik etki gösterdiği belirlendi.

2019, 73 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sucuk, izolasyon, laktik asit bakterileri, bakteriyosin, disk difüzyon metodu

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM FERMENTED SAUSAGE SAMPLES COLLECTED FROM DIFFERENT REGIONS OF TURKEY AND INVESTIGATION OF THEIR BACTERIOCIN- PRODUCING POTENTIALS

Elif ERKAYA

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

In this thesis study, isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented sausages obtained from different city of Turkey (Gaziantep, Kayseri, Erzurum and Kahramanmaraş) and their bacteriocin-producing potentials were investigated. A total of 103 isolates were obtained from these sausage samples and 7 of them were observed to be different by using the rep-PCR genomic fingerprint analysis method. All analyzes were performed on these 7 strains. For this purpose, pH, salt and temperature values at which the isolates would grow were determined. It was detected that the majority of these bacterial strains would grow at 2-4 % salt concentration, 15-37 °C and 5-7 pH values. According to, 16S rRNA sequence analyzes of the strains were performed and it was determined that these isolates were identified as *Aerococcus urinaeequi*, *Streptococcus salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Macrococcus caseolyticus*, *Lactococcus garvieae*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Lactobacillus sakei*. In the final step, the bacteriocin-producing potential of those isolates was investigated. In parallel with this purpose, the antagonistic effects of the test strains were examined by using disc diffusion method. As a result, it was seen that *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus sakei* showed an antagonistic effect on *Enterococcus faecalis*, *Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli* O157: H7.

2019, 73 pages

Keywords: Sausage, isolation, lactic acid bacteria, bacteriocin, disc diffusion method

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca, bana her türlü desteği sağlayan, her konuda yardımcı olan ve her alanda ışık tutan değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgilerini benimle paylaşan, sıkıntılarımда ilk danıştığım kıymetli hocalarım Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI ve Sayın Arş. Gör. Sümeyya AKBULUT'a

Desteklerini esirgemeyen, tüm stresimi çeken ve iyi ki tanıdım dediğim değerli arkadaşlarım Esra ÖZTÜRK, Fatma ALTINOK, Meryem DOYMUŞ ve Selman MUSLU'ya,

Tüm hayatım boyunca maddi manevi desteklerini yanımda hissettiğim, her anımda yanı başımda olan, dualarını esirgemeyen canım babam Mehmet ERKAYA, canım annem Dilek ERKAYA, canım kardeşlerim Şeyma Nur ERKAYA ve Hüseyin Emre ERKAYA'ya

Erzurum'a geldiğimden beri bana evlerinin kapılarını açan ikinci anne babam canım amcam Ahmet ERKAYA, yengem Elif ERKAYA ve tüm akrabalarımа teşekkürü bir borç bilirim.

Elif ERKAYA

Haziran, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sucuk	4
1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri	5
1.2.1. Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanılması	6
1.2.2. Laktik asit bakterilerinin gıda korumasında etkileri.....	8
1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması.....	9
1.4. Önemli Laktik Asit Bakterileri.....	10
1.5. Laktik Asit Bakterilerinin Tanınması	12
1.6. Tanılamada Kullanılan Başlıca Genotipik Yöntemler	13
1.6.1. 16S rRNA sekans analizi.....	13
1.6.2. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP-PCR)	13
1.6.3. Genomik parmak izi analizi	14
1.6.4. Filogenetik analiz	14
1.7. Bakteriyosinler	15
1.7.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması	17
1.7.2. Bakteriyosinlerin mikroorganizmalar üzerindeki etki mekanizması.....	20
1.7.3. Bakteriyosinlerin gıda korumasında kullanımı	22
1.7.4. Bakteriyosin sentezi	24
1.7.5. Bakteriyosinlerin antibiyotiklerden farkı	25
2. KAYNAK ÖZETLERİ	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Tez çalışmasında kullanılan laktik asit bakterileri	31

3.2. Yöntem	31
3.2.1. Örneklerin Toplanması.....	31
3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	31
3.2.3. Seçilen İzolatların Konvensiyonel Analizleri.....	32
3.2.3.a. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	32
3.2.4. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanılarının Yapılması.....	35
3.2.4.a. Genomik DNA'nın izolasyonu.....	35
3.2.4.b. rep-PCR yöntemi kullanılarak izolatların gen profillerinin belirlenmesi	36
3.2.4.c. 16S rRNA PCR işlemi	39
3.2.4.d. Kompetent hücrenin hazırlanması.....	41
3.2.4.e. Ligasyon işlemi.....	41
3.2.4.f. Transformasyon işlemi.....	42
3.2.4.g. Koloni seçme ve sıvı kültüre alma	42
3.2.4.h. Koloni PCR	42
3.2.4.i. Plazmit izolasyonu	44
3.2.4.j. Plazmitlerin kontrol edilmesi ve konsantrasyonlarının ayarlanması.....	44
3.2.4.k. Sonuçların değerlendirilmesi.....	44
3.2.5. Bakteriyosin Varlığının Tespiti	44
3.2.6. Agar Disk Difüzyon Testi	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	48
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	48
4.2. Seçilen İzolatların Konvensiyonel Analizleri.....	49
4.2.1. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi	49
4.3. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılarının Yapılması.....	54
4.4. Bakteriyosin Varlığının Tespiti	59
4.5. Test İzolatlarının Antagonistik Özelliklerinin Araştırılması.....	64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

bç	: Baz Çifti
BSA	: Bovin Serum Albumin
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotittrifosfat
gr	: Gram
IPTG	: İzopropil β -D-1- tiyogalaktopiranosid
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
M	: Molar
Mm	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rep-PCR	: Genomik Parmak İzi Analiz Yöntemi
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
sn	: Saniye
μ g	: Mikrogram
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bakteriyosinlerin fosfolipidlere bağlanarak por oluşturması	21
Şekil 1.2. Bakteriyosinlerin Lipid II molekülüne bağlanarak por oluşturması.....	21
Şekil 4.1. EK7 bakterisine ait petri görüntüsü	48
Şekil 4.2. EK1 izolatına ait hareketlilik test sonucu	50
Şekil 4.3. Heterofermentatif EK4 bakterisine ait bir görüntü	53
Şekil 4.4. İzolatlara ait (GTG) ₅ -PCR bant profilleri (M:DNA Markır).....	55
Şekil 4.5. İzolatlara ait 16S rRNA PCR bant profilleri (M: DNA Markır)	56
Şekil 4.6. Mavi beyaz kolonilerin petri görüntüsü.....	57
Şekil 4.7. Bazı kolonilere ait bant profilleri (M:DNA Markır).....	57
Şekil 4.8. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan sucuk örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA gen analiz sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining filogenetik ağacı	59
Şekil 4.9. EK7'nin Sakasin gen bölgesinin bant profili (M:DNA Markır)	60
Şekil 4.10. Disk difüzyon testi sonucu meydana gelen zonlar	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı fermente gıdalar.....	2
Çizelge 1.2. Gıda fermantasyonunun etkileri	3
Çizelge 1.3. Başlıca laktik asit bakterileri	11
Çizelge 1.4. Bakteriyosin üreten bazı mikroorganizmaların, çeşitli kaynaklardan izolasyonu.....	16
Çizelge 1.5. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması	19
Çizelge 1.6. Gıdalarda biyokoruyucu olma potansiyeli olan bakteriyosin örnekleri.....	23
Çizelge 1.7. Antibiyotik ve bakteriyosin arasındaki farklar	25
Çizelge 3.1. BOX-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları	37
Çizelge 3.2. (GTG) ₅ -PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları	38
Çizelge 3.3. 16S rRNA gen bölgesinin PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları	40
Çizelge 3.4. Koloni PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları.....	43
Çizelge 3.5. Bakteriyosin gen bölgesinin PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları	45
Çizelge 3.6. Agar disk difüzyon testinde kullanılan patojen mikroorganizmalar.....	47
Çizelge 4.1. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonu	50
Çizelge 4.2. İzolatların gelişebildiği sıcaklık değerleri	51
Çizelge 4.3. İzolatların gelişebildikleri pH değerleri.....	52
Çizelge 4.4. İzolatların gaz üretim potansiyelleri	53
Çizelge 4.5. Test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları.....	58
Çizelge 4.6. Çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı test izolatlarının antagonistik etkisi.....	61

1. GİRİŞ

Et ve et ürünleri insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği'ne göre; et; sığır, koyun, manda, keçi gibi küçükbaş ve büyükbaş hayvanlar; tavuk, kaz, ördek, hindi gibi evcil kanatlı hayvanlar ile domuz ve tavşandan elde edilen, insan tüketimine uygun tüm parçalar olarak tanımlanmaktadır (TGK 2000).

Et önemli bir protein kaynağı olup, içeriğindeki vitamin ve mineraller patojenik mikroorganizmalar için gereklidir ve bu mikroorganizmalar, insan sağlığı için çok tehlikeli sonuçlar doğurabilir (Gaspar and Fraqueza 2016). Et ve et ürünleri ile ilişkili önemli patojenik bakterilerden bazıları aşağıda verilmiştir (Woraprayote *et al.* 2016):

- *Salmonella* spp.
- *Campylobacter jejuni*
- *Escherichia coli* O157: H7
- *Clostridium perfringens*
- *Clostridium botulinum*
- *Listeria monocytogenes*
- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus cereus*
- *Yersinia enterocolitica*

Et ve et ürünlerinin kokuşmasını, bozulmasını önlemek, buna neden olan mikroorganizmaların üreme koşullarını elverişsiz duruma getirmek amacıyla, birçok saklama koşulu belirlenmiştir. Bu sayede mikroorganizmaların yanı sıra, et ve et ürünlerinin bozulmalarına neden olan fiziksel, kimyasal, enzimatik faktörlerin etkileri de büyük ölçüde yavaşlatılabilir veya durdurulabilir. Et ve et ürünlerinin dayanıklılığının artırılmasında kullanılan en önemli yöntemlerden biri de fermantasyon tekniğidir (Adıgüzel 2008).

Sucuk, fermantasyon teknolojisi kullanılarak üretilen en önemli besin kaynaklarından biridir. Sucuğun üretimi esnasında laktik asit bakterileri (LAB) önemli rol oynamakta olup, bu bakteriler; laktik asit üretiminden sorumludur. Fermantasyon sırasında; asetik asit, etanol, asetoin, karbon dioksit ve pirüvik asiti de az miktarda üretirler (Aymerich *et al.* 2003). Özellikle asidik gıda fermantasyonu (Rhee *et al.* 2011):

- Mikrobiyal bozulmaya dayanıklı gıdaların elde edilmesini sağlar.
- Patojenik mikroorganizmaların gıdalara bulaşma olasılığını azaltır.
- Üretim ve tüketim arasında geçen sürede gıdaların raf ömrünü uzatır.
- Gıdaların besin değerini iyileştirir.

Dünya üzerinde tüketilen önemli bazı fermente gıdalar Çizelge 1.1’de verilmiştir (Adams and Moss 2004).

Çizelge 1.1. Bazı fermente gıdalar

Gıda	İçindekiler	Coğrafi dağılım
Busa	Pirinç, arpa, şeker	Türkiye
Bira	Arpa	Yaygın
Peynir	Süt	Yaygın
Chicha	Mısır	Güney Amerika
Dawadawa	Parkia	Batı Afrika
Gari	Manyok	Nijerya
Idli / dosa	Pirinç ve siyah mercimek	Hindistan
Injera	Tef tohumu	Etiyopya
Suşi	Balık	Japonya
Kefir	Süt	Doğu Avrupa
Kenkey	Mısır, sorgum	Gana
Kimchi	Sebze	Kore
Koko	Mısır, sorgum	Gana
Mayalanmış ekmek	Buğday	Avrupa, Kuzey Amerika

Çizelge 1.1. (devam)

Lambik birası	Arpa	Belçika
Mahewu	Mısır	Güney Afrika
Nam	Et	Tayland
Ogi	Mısır, sorgum, darı	Nijerya
Zeytin		Akdeniz bölgesi
Palmiye şarabı	Palmiye	Yaygın
Poi	Gölevez (Taro)	Havai
Puto	Pirinç	Filipinler
Sucuk	Et	Yaygın
Salatalık	Salatalık	Avrupa, Kuzey Amerika
Sauerkraut (Lahana turşusu)	Lahana	Avrupa, Kuzey Amerika
Sorgum birası	Sorgum	Güney Afrika
Ekşi ekmek	Buğday, çavdar	Avrupa, Kuzey Amerika
Soya sosu, miso	Soya fasülyesi	Güneydoğu Asya
Tempeh	Soya fasülyesi	Endonezya
Tibi	Meyve	Meksika
Yoğurt	Süt	Yaygın

Özellikle fermantasyon teknolojisinin, üretim prosesinde kullanımının sağlamış olduğu avantaj ve dezavantajlar Çizelge 1.2’de verilmiştir (Adams and Moss 2004).

Çizelge 1.2. Gıda fermantasyonunun etkileri

Hammadde	Dayanıklık	Koruyuculuk	Besin değeri	Uygunluk
Et	++	+	-	(+)
Balık	++	+	-	(+)
Süt	++	+	(+)	(+)
Sebze	+	(+)	-	(+)
Meyve	+	-	-	++
Baklagiller	-	(+)	(+)	+
Tahıllar	-	-	(+)	+

(++ Kuvvetli pozitif, + Pozitif, (+) Bazen gelişim, - Negatif)

Et fermantasyonları; bakteri, maya ve küflerden oluşan karmaşık mikrobiyal ekosistemler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Fermantasyon işlemi sırasında zengin bir mikrobiyal flora gözlemlenir ve farklı cinslere ait türlerle beraber, aynı türlerin suşları da bu çeşitlilikte önemli rol oynar. Fermantasyon işlemi ile, et ve yağ gibi yüksek oranda bozulabilen hammaddeler, sodyum klorür takviyesi ve kurutma işlemine bağlı olarak geliştirilmiş, belirli bir duyuşal yöntemle karakterize edilen, mikrobiyolojik olarak stabil olan, son ürüne dönüştürülür. Fermantasyon ve kurutma sırasında meydana gelen değişiklikler fermente edilmiş sucuklarda aroma gelişimini önemli ölçüde etkiler (Franciosa *et al.* 2018).

Fermente sucukların üretimi genellikle Çin ve Güneydoğu Asya'daki birkaç bölgede olduğu düşünülse de, Akdeniz bölgesinde de yaygın şekilde üretilmektedir. Peynir üretimine benzer olarak, et fermantasyonu da çabuk bozulan bir ürünün daha dayanıklı olmasını sağlayan bir yöntemdir (Adams and Moss 2004; Adıgüzel 2008).

Sucuk fermantasyonu, karmaşık biyokimyasal ve fiziksel reaksiyonları içerir. Bu reaksiyonlara şunlar örnek verilebilir (Casaburi *et al.* 2016):

- Ortamın pH'sını düşürme,
- Nitratın önce nitrite, sonra nitrik oksite indirgenmesi,
- Nitrozomiyogloblin oluşumu,
- Miyofibrillerin, sarkoplazmik proteinlerin, proteolitik, lipolitik, oksidatif fenomenlerin çözünmesi ve jelleştirilmesi,
- Dehidrasyon reaksiyonları.

1.1. Sucuk

Fermente et ürünleri, düşük pH ve su aktivitesi, yüksek tuz konsantrasyonu, düşük nem içeriği ile uzun raf ömrüne sahip dayanıklı ürünler olup, bunların en önemlilerinden biri de sucuktur (Adıgüzel 2008).

Türk Standartlar Enstitüsü, TS-1070'e göre; Türk sucuğu, 'büyükbaş ve küçükbaş hayvan etlerinin, yağ, kemik, kıkırdak, lenf yumruları, tendo, fascia ile büyük sinir ve damarlarından ayrılmasından sonra kıyma makinesinden geçirilerek içerisine tuz, kimyon, karabiber, kırmızıbiber başta olmak üzere çeşitli baharatlar katılarak hazırlanan; kuyruk yağı, gövde yağı, böbrek yağı, iç yağ gibi katkı maddelerinin bir ya da birkaçının starter kültüre eklenip, kılıflara doldurularak fermantasyon işlemine tabi tutulan geleneksel et ürünüdür' şeklinde tanımlanmıştır (Pehlivanoglu vd 2015).

Türk Standartlar Enstitüsü verilerine göre, sucuk üretiminde kullanılması önerilen bazı mikroorganizmalar; Mikrokoklar (*Kocuria varians*), Stafilkoklar (*Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus*), Pedikoklar (*Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*), Laktobasiller (*Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. sakei*) ve Mayalar (*Debaryomces hansenii*) olarak belirtilmiş olup, bunlar; fermantasyon düzenleyicisi ve hızlandırıcısı (starter kültür) olarak ifade edilmiştir (Turhan 2010).

1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB); Gram pozitif, spor oluşturmeyen, kok veya çubuk şekilli, katalaz negatif, düşük pH değerlerine tolerans gösteren, aero-tolerant, şekeri fermente eden ve laktik asit üreten fermentatif mikroorganizmalar olarak tanımlanabilir. Bu bakterilere; *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Lactococcus* cinsi örnek olarak verilebilir (Şanlıbaba ve Güçer 2015).

LAB'lar, çözünen karbonhidrat, vitamin ve protein içeren besin açısından zengin ortamlardan izole edilir. Et, meyve, sebze ve süt ürünlerinde bol miktarda bulunmakla beraber; gübrelerde, atık sularda, memelilerin bağırsaklarında ve mukozalarında da yer alırlar (López-Cuellar *et al.* 2016). Ayrıca bu mikroorganizmalar; çevre, gıda ve klinik mikrobiyolojisinde de oldukça önemli bir yere sahiptir (Arbulu *et al.* 2016). LAB'lar aynı zamanda silaj, kahve, şarap, kakao, maya gibi birçok fermente gıdanın üretiminde de yer alır (Perczak *et al.* 2018).

Laktik asit bakterileri, çeşitli biyosentez yollarından yoksun oldukları için, bol miktarda zengin nitrojen kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Çoğu asidik koşulları ve yüksek sıcaklık aralığını da tolere edebilirler (Cubas-Cano *et al.* 2018).

Laktik asit bakterileri ayrıca glikoz fermantasyonunu da gerçekleştirmektedir. Glikoz fermantasyonu sırasında oluşan son ürüne bakılarak, laktik asit bakterileri iki gruba ayrılabilir. Bunlar homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileridir. *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* ve bazı laktobasiller homofermentatif laktik asit bakterileri olup, glikoz fermantasyonu sonucunda ana ürün olarak laktik asit üretir. Homofermentatif laktik asit bakterileri, bir glikoz başına iki mol laktat üretmek için Embden-Meyerhof-Parnas yolunu kullanır ve heterofermentrik laktik asit bakterilerine kıyasla yaklaşık iki kat daha fazla enerji üretir. *Weissella*, *Leuconostoc* ve bazı laktobasiller heterofermentatif laktik asit bakterileri olup, heksoz monofosfat veya pentoz yolunu kullanır. Glikoz fermantasyonu sonucunda; laktat, CO₂ ve etanol üretir (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn 2010).

1.2.1. Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanılması

'Starter kültür' terimi, fermente gıda üretiminde, lezzet, yapı ve görünüm bakımından ürüne özgü istenen üstün özellikleri kazandırmak amacıyla, bilinçli olarak gıda ürününe eklenen, zararsız, belirli mikroorganizmalar olarak tanımlanabilir (Erkmen (ed.) 2010). Starter kültürler; kaliteyi artırarak, çeşitliliği azaltarak ve fermente et ürünlerinin organoleptik özelliklerini geliştirerek, daha istikrarlı bir ürün üretmek için kullanılmaktadır (Todorov *et al.* 2017).

Laktik asit bakterileri, fermente et ürünlerinin üretiminde uzun zamandır starter kültür olarak kullanılmaktadır. Et fermantasyonlarında, LAB'nin ana işlevi şu şekilde sıralabilir (Ammor and Mayo 2007):

- Et üretiminde pH'yı hızlı bir şekilde düşürerek, patojen mikroorganizmaları etkisiz hale getirip ürün güvenliğini desteklemek,

- Gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmaları veya abiyotik reaksiyonların neden olduğu istenmeyen değişiklikleri önleyerek, ürün stabilitesini sağlamak ve raf ömrünü uzatmak,
- Hammaddelerin modifikasyonu ile oluşan olgun ürünlerin yeni duyuşal özelliklerini elde etmek için, gerekli biyokimyasal koşulları oluşturmak.

Bununla beraber bakteriyosinogenik LAB'nin starter kültür olarak kullanımını sınırlayan bazı faktörler; stabil olmayan seviyede bakteriyosin üretimi ve gıda matrisinin aktivitesinin azalması sayılabilir. Sıcaklık, pH gibi çevresel koşullar ile tuz ve sodyum nitrit gibi et ürünlerinin spesifik bileşenleri, bakteriyosin üretimini ve starter kültürün gelişimi ve bakteriyosin üretimini etkiler (Papagianni and Sergelidis 2013).

Starter kültür olarak laktik asit bakterilerinin tercih edilmesinin temel sebebi, probiyotik özelliğe sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. "Probiyotik" terimi, Yunancadan köken almaktadır ve "yaşam için" anlamına gelir. İlk kez, 1954 yılında "probiyotik" terimini Ferdinand Vergin bulmuştur. 'Anti-und Probiotika' başlıklı makalesinde; antibiyotiklerin ve diğer antibakteriyel ajanların, bağırsak mikrobiyotası üzerindeki zararlı etkileri ile bazı faydalı bakterilerin yararlarını karşılaştırmıştır. Daha sonra, 1965 yılında Lilly ve Stillwell, probiyotikleri, diğer mikroorganizmaların büyümesini uyaran mikroorganizmalar olarak tanımladılar. Zamanla probiyotiklerin tanımı birçok kez değiştirildi. Mikrobiyal kökenlerini vurgulamak amacıyla Fuller 1989 yılında, probiyotiklerin yaşayan mikroorganizmalar olduğunu ve konakçılarını üzerinde olumlu bir etki göstermesi gerektiğini vurguladı. Öte yandan, Guarner ve Schaafsma 1998 yılında, beklenen etkiyi elde etmek için uygun dozda probiyotik organizmaların kullanılması gerektiğini belirtti (Markowiak and Śliżewska 2017). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre probiyotiklerin, yeterli miktarda uygulandığında konakta yararlı etkiler ortaya koyan canlı mikroorganizmalar olduğu belirtilmiştir (Desriac *et al.* 2010). Bu tanım daha sonra, 2013 yılında Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Birliği (ISAPP) tarafından da kabul edilmiştir (Markowiak and Śliżewska 2017).

Probiyotikler, 21. yüzyılda sağlık sektörü için oldukça önemli bir kavram haline gelmiştir. 2016 yılında, küresel probiyotik pazar büyüklüğü 35,9 milyar ABD doları olarak belirlenmiştir. Asya ve Avrupa'da, probiyotikler gıda ve ilaçlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Küresel probiyotik pazarında; Avrupa pazarı, %20 civarında ortalama yıllık büyüme oranı ile en büyük ve en hızlı büyüyen pazardır. Verimli probiyotik suşlarının geliştirilmesi oldukça önemlidir. Önümüzdeki birkaç yıl boyunca; probiyotiklerin sağlığa olan faydalarının ve tüketiciler arasında artan farkındalığın, sektördeki büyümeyi yönlendirmesi beklenmektedir. Probiyotikler pazarından elde edilen küresel gelir, 2018 sonunda yaklaşık 6,762.2 milyon ABD Dolarını bulmuş ve yakın gelecekte de artması beklenmektedir (Zielińska and Kolożyn-Krajewska 2018).

Özellikle probiyotik olarak son yıllarda laktik asit bakterileri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar gastrointestinal (GIT) kanalın önemli mikroflorasıdır ve güvenli olarak kabul edilir. Bu bakteriler, fermentasyonda önemli bir yere sahiptir ve fermente ürünlerdeki en baskın mikroflorayı teşkil ederler. LAB; laktik asit, asetik asit, H₂O₂, bakteriyosin, diasetil ve CO₂ üretimi sayesinde gıdaların korunmasında da önemli bir rol oynarlar (Angmo *et al.* 2016).

Probiyotik suşlar; genellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsinin üyelerini içermekle beraber, *Pediococcus* cinsine ait bakteriler de bu grupta yer alırlar (Zommiti *et al.* 2018). Bu izolatların; koruyucuları (antibakteriyel veya antifungal), tat vericileri (aromalar), dokusal maddeleri, antioksidanları, vitaminleri ve fonksiyonel polimerleri (doku için EPS (ekzopolisakkarit), ağır metal gibi toksik bileşiklerin adsorpsiyonu) üretebilme potansiyeli bulunduğundan, yeni suşların moleküler karakterizasyonu daha etkin probiyotiklerin tespitine olanak sağlayacaktır (Champagne *et al.* 2018).

1.2.2. Laktik asit bakterilerinin gıda korumasında etkileri

LAB suşlarının ve / veya antimikrobiyal ürünlerin, gıdalardaki patojen bakterilerin gelişimini engellediği bilinmektedir (Díaz-Ruiz *et al.* 2012). Özellikle bu izolatlar, üretmiş oldukları doğal antimikrobiyal ürünlerle zararlı mikroorganizmaları kontrol

ederek, fermente sucukların güvenilirliğini arttırmaktadır (Gao *et al.* 2014). Biyolojik koruma, gıda ve et sistemlerinde dört temel yöntemle uygulanabilir (Hugas 1998):

1. Bakteriyosin üreten LAB'nin saf kültürünün eklenmesi,
2. Bakteriyosin üreten LAB'nin, kompleks bir substrat üzerinde büyütülmesiyle elde edilen ham bakteriyosin-preparasyonuna, fermantasyon sıvısı veya konsantrelerin eklenmesi,
3. Saflaştırılmış veya yarı saflaştırılmış antagonistik maddelerin eklenmesi,
4. Mezofilik LAB'nin, yüksek sıcaklıklara karşı “güvenli” koruma olarak eklenmesi.

1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Laktik asit bakterilerinin birçok fermente ürünün (peynir, yoğurt ve fermente sebzeler) üretiminde, yani gıda endüstrisinde oldukça önemli bir yeri vardır. Bu mikroorganizmaların probiyotik aktivitelerinden dolayı, sağlık alanındaki potansiyelleri giderek artmaktadır (Kimoto-Nira 2018).

Son literatür verilerine göre belirlenen LAB cinsleri şunlardır (Mokoena 2017):

- ✓ *Lactobacillus*,
- ✓ *Lactococcus*,
- ✓ *Leuconostoc*,
- ✓ *Pediococcus*,
- ✓ *Streptococcus*,
- ✓ *Aerococcus*,
- ✓ *Alloiococcus*,
- ✓ *Carnobacterium*,
- ✓ *Dolosigranulum*,
- ✓ *Enterococcus*,
- ✓ *Oenococcus*,
- ✓ *Tetragenococcus*,

- ✓ *Vagococcus*
- ✓ *Weissella* olarak sınıflandırılabilir.

LAB birçok yerde bulunmaktadır. Örneğin (Kurhan ve Çakır 2017):

- *Lactobacillus plantarum*,
- *Lactobacillus rhamnosus*,
- *Lactobacillus paracasei*,
- *Lactobacillus acidophilus* ve
- *Lactobacillus salivarius* türleri mukozada yaygın olarak bulunurken,
- ❖ *Lactobacillus paracasei* ve
- ❖ *Lactobacillus rhamnosus* türleri daha çok süt ürünlerinde,
- ✓ *Lactobacillus plantarum* ise daha çok bitkisel fermente gıdalarda bulunmaktadır

1.4. Önemli Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri hem insanlarda, hem böceklerde hem de hayvanlarda bulunabilir. Bunlar, gıda endüstrisi ve süt ürünlerinin fermantasyonunda oldukça önemli olan mikroorganizmalardır. Ek olarak, LAB içindeki suşlar, genellikle güvenli (GRAS) gıda sınıfı mikroorganizmalar olarak kabul edilir ve probiyotikler olarak kullanılır. LAB içerisindeki cinsler sağlıklı bireylerde yaygın olarak bulunan faydalı organizmalar olarak kabul edilir. LAB'nin konakçılarını, antimikrobiyal metabolitler ve konakçı immün yanıtının modülasyonu sayesinde koruduğu bilinmektedir (Vásquez *et al.* 2012).

Başlıca laktik asit bakterileri ve özellikleri Çizelge 1.3'te verilmiştir (Adams and Moss 2004).

Çizelge 1.3. Başlıca laktik asit bakterileri

Cins	Hücre morfolojisi	Fermantasyon	Laktat izomeri	DNA (mol %GC)
<i>Lactococcus</i>	Kok	Homofermentatif	L	33-37
<i>Leuconostoc</i>	Kok	Heterofermentatif	D	38-41
<i>Pediococcus</i>	Kok	Homofermentatif	DL	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Çubuk	Homofermentatif /heterofermentatif	DL, D, L	32-53
<i>Streptococcus</i>	Kok	Homofermentatif	L	40*

**Streptococcus thermophilus*

Üzerinde en fazla bilimsel çalışma yapılan bazı önemli cinslere ait özellikler aşağıda verilmiştir.

Lactococcus cinsleri; oval şekilli hücrelerden oluşmuş (0.5-1.0 μ), ikişer ikişer ya da kısa zincirler meydana getiren, hareketsiz, laktik asit üreten, fakültatif anaerob ve mezofilik mikroorganizmalardır. Birçok gıda üretiminde, özellikle fermente süt ürünlerini üretmek için kullanılırlar. Çiğ süt ve bitkilerde bulunan *Lactococcus lactis* ve *L. cremoris* gibi birkaç suş; Gram-pozitif bakterilere karşı nispeten geniş bir konak aralığına sahip olup, bakteriyosin üretirler (Ray 2004).

Lactobacillus cinsleri; Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen ve aerotolerant çubuk şeklindeki bakterilerdir. *Lactobacillus* cinsine ait 224 tür bulunmaktadır ve bu nedenle laktik asit bakterileri içerisinde en geniş grubu *Lactobacillus* cinsleri oluşturmaktadır. Bu bakteriler süt ürünleri, çürüyen bitkiler ve kuşlar da dahil olmak üzere insan ve hayvanların mukozalarında bol miktarda bulunur. Aynı zamanda bu mikroorganizmalar; tavuk, kaz, ördek, güvercin ve GIT (gastrointestinal sistem)'den izole edilmişlerdir. Kuşlarda en yaygın olarak tanımlanan türler ise, *Lactobacillus salivarius*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. reuteri* ve *L. agilis*'dir (Dec et al. 2016).

Pediococcus cinsleri; Gram pozitif ve homofermentatif laktik asit bakterileridir. Bu organizmalar bitkisel materyalde saprofit olarak bulunur. Aynı zamanda pediokoklar, sebzelerin ve etlerin fermantasyonunda da önemlidir (Gonzalez and Kunka 1987). Bu laktik asit bakterileri ticari olarak, fermente sucukların üretiminde başlangıç kültürleri olarak kullanılır (Hoover *et al.* 1988).

Enterococcus cinsleri; Gram pozitif, ovoid şekilli, hareketsiz, mezofilik ve fakültatif anaerobturlar. Bazı türleri düşük sıcaklıklara (pastörizasyon sıcaklığı gibi) dayanıklıdır. İnsan, kuş ve hayvan bağırsaklarında yaşarlar. Gıda bozulmalarında oldukça önemli bakterilerdir (Erkmen 2010). *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* gıdalarda patojen olarak bulunan iki türdür.

Leuconostoc cinsleri; doğal yeşil habitatlarda bulunan bir mikroorganizma grubudur. Gıda endüstrisinde başlangıç kültürleri olarak kullanılan Gram-pozitif, heterofermentatif bir bakteridir. Aynı zamanda bazı gıdaların bozulmasından da sorumludur. Bu cinsin 23 türü tespit edilmiş olup, bunların arasında en önemlilerinden biri *Leuconostoc mesenteroides*'dir (Kaur *et al.* 2017).

Streptococcus cinsleri; patojen türlerin de bulunduğu oval ya da küresel şekilli hücrelerden oluşur. Gram pozitif, fakültatif anaerob, hareketsiz, tek, çift ya da zincir şeklindeki koklardır. Gıdalarda zararlı etkileri olan *Streptococcus* üyeleri; *Streptococcus mitis*, *S. aralis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *S. songus* bakterileridir (Şahin ve Başoğlu 2011). *Streptococcus cremoris*, *S. lactis* ve *S. thermophilus* özellikle süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan bakterilerdir (Tayar ve Hecer 2010).

1.5. Laktik Asit Bakterilerinin Tanınması

Laktik asit bakterileri, genotipik ve fenotipik yöntemler kullanılarak tanınmaktadır (Arslan 2017).

1.6. Tanılamada Kullanılan Başlıca Genotipik Yöntemler

1.6.1. 16S rRNA sekans analizi

16S rRNA bölgesi evrimsel olarak korunmuş olup, filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. 5S, 16S ve 23S rRNA gen bölgeleri içerisinde bakteri sistematigi açısından en önemli birim, 16S rRNA gen bölgesidir. Carl Woese 1970'li yıllarda rRNA gen bölgesini kullanarak, organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya koymaya çalışmıştır. Bu amaçla, bakteriler ve arkelerin 16S rRNA ve ökaryotik organizmaların 18S rRNA bölgelerinin dizi analizini ortaya koyarak, canlıları; Bacteria, Archea ve Eukarya olmak üzere 3 domaine ayırmıştır. 1977 yılından bu zamana kadar 2.3 milyondan fazla SSU rRNA (rRNA küçük alt birimi) dizi analizi yapılarak, dünyanın mikrobiyal açıdan büyük bir çeşitliliğe sahip olduğu ortaya konulmuştur (Madigan *et al.* 2017).

2000'li yıllardan itibaren PCR kullanımı ve sekans analizinin yaygınlaşmasıyla birlikte, 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi; bakteriyal izolatların tanımlanmasında, gıda, klinik ve temel mikrobiyoloji laboratuvarlarında, yeni suşların literatüre kazandırılmasında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. 16S rRNA gen dizileri ile yapılan sınıflandırma, konvensiyonel yöntemler kullanılarak yapılan sınıflandırmayla karşılaştırıldığında, çok daha objektif ve güvenilir olduğu tespit edildi. Özellikle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında Gram boyama ve biyokimyasal testler gibi geleneksel yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde, sonuçların kültür şartlarından ve büyüme özelliklerinden etkilendiği gözlemlendi (Baltacı 2015). Genel olarak, 16S rRNA gen bölgesi Bacteria domaini içerisindeki organizmaları, cins ve tür seviyesindeki ayırımına olanak sağlamaktadır (Clarridge III 2004).

1.6.2. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP-PCR)

RFLP-PCR yöntemi oldukça hızlı ve avantajlı bir yöntem olup, bakteri sistematiginde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntemde, seçilen hedef bölgeler spesifik primerlerle çoğaltıldıktan sonra, restriksiyon enzimleriyle kesilir. Restriksiyon enzimleri

çift zincirli DNA molekülündeki belirli nükleotit dizilerini tanıyıp, kesen enzimler olup, bakteri ve arkelerde bulunmakla beraber, virüslerle mücadelede oldukça önemlidir (Arslan 2017).

RFLP-PCR yönteminde; restriksiyon enzimi belirlenen hedef bölgeye spesifik olarak seçilir. Yöntemde elde edilen fragmentlerin ayrımı, jel elektroforeziyle sağlanır. Jel elektroforezi ile elde edilen bantlar birbirleriyle karşılaştırılır. RFLP-PCR yöntemiyle, tür içi varyasyonlar, antimikrobiyal dirençlilik ve genomik profiller arasındaki farklılıklar ortaya konulur (Arslan 2017).

1.6.3. Genomik parmak izi analizi

Genomik yapıda türden türe farklılık gösteren, korunmuş tekrar dizileri bulunmaktadır. Bu diziler özellikle bakterinin sınıflandırılmasında önemli rol oynar. Bu yöntemin genel adı rep-PCR olup, REP, ERIC, BOX ve (GTG)₅-PCR çeşitlerinden oluşur. Bu analiz yöntemi kullanılarak, bakteri tür ve tür altı seviyede tanınır (Versalovic *et al.* 1994; Arslan 2017).

1.6.4. Filogenetik analiz

Türlerin evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılmakta olup, filogenetik ağaç, bu tarihin grafiksel bir özeti olarak kabul edilir. Bu ağaç kullanılarak, hangi organizma veya organizma grubunun birbirine daha yakın olduğu, hangilerinin ise uzak olduğu tespit edilir. Filogenetik analiz yöntemleri aşağıda verilmiştir (Baltacı 2015).

NJ Neighbor-joining (Komşu katılımı-bağlama) yöntemi; genetik mesafe matrisinden yararlanılarak kümelemeyi gerçekleştiren bir yöntem olup, filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının farklı olabileceğini kabul eder. Bu yöntem, OTU (Operational Taxonomic Units; Üzerinde çalışılan taksonomik birimler)'lar arasındaki genetik mesafenin hesaplanmasına olanak sağlar. **UPGMA Unweighted pair-group method using arithmetic averages (Aritmetik ortalamaları kullanan ağırlıksız eş-**

grup yöntemi) yöntemi; OTU arasındaki benzerlik algoritmasına dayalı bir gruplama yöntemidir. **Maksimum-parsimoni (tutumluluk) yöntemi;** muhtemel ağaç topolojileri içinde en parsimonik ağacı bulmak için kullanılır. En parsimonik olan ağaç tüm değişim sayısının en az olduğu ağaçtır. **Bootstrapping (Seç-bağla testi) yöntemi;** belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir teknik olup, ağaçların güvenilirlik derecesini istatistiksel olarak ortaya koymak için kullanılır. Filogenetik analizler temelde üç başlık altında toplanır. Bunlar (Arslan 2017):

- 1.Bilgisayar destekli filogenetik:** Bu yöntemde, bilgisayar algoritmaları, metotları ve programları filogenetik analizlere uygulanır.
- 2.Geleneksel filogenetik:** Bu yöntemde, organizmaların fenotipik özellikleri ölçülerek, miktarları belirlenir ve morfolojik bilgilere dayandırılır.
- 3.Moleküler filogenetik:** Bu yöntemde ise, organizmanın genlerini kodlayan nükleotid dizileri ya da proteinlerini kodlayan aminoasit sekans verilerini kullanılır.

1.7. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler; insan sağlığını korumak ve gıdaların sürdürülebilirliğini arttırmak için gıda endüstrisinde biyokoruyucu olarak kullanılan doğal antimikrobiyal peptidlerdir (Moraçanın *et al.* 2013).

Bakteriyosinler, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler tarafından üretilir. Gram-pozitif bakterilerde, bakteriyosinlerin büyük bir kısmı (20–70 amino asit) hem küçüktür, hem de katyonik özelliklere sahiptir (Diep *et al.* 2009). Özellikle Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin, diğer türler ve cinsler üzerinde bakteriyosidal veya bakteriyostatik etkisi vardır. Ancak bu etki genellikle Gram-pozitif mikroorganizmalar üzerinedir (Meera and Devi 2012).

Bakteriyosinler, gıda endüstrisinde, veterinerlikte ve tıpta yaygın olarak kullanılan diğer antimikrobiyal ajanlara göre çeşitli avantajlar sunarlar. Bu avantajlar (Bédard *et al.* 2018):

1. Mide-bağırsak sisteminde tamamen sindirildiklerinden tüketim için güvenli olmaları,
2. Konvansiyonel antibiyotikler dahil olmak üzere, birkaç farklı antimikrobiyal ajana göre 10^3 - 10^6 kat daha güçlü olmaları,
3. Pastörizasyon veya sterilizasyonda kullanılan sıcaklık uygulamalarına dirençli olmaları şeklinde sıralanabilir.

Oldukça etkili ve büyük bir potansiyele sahip bakteriyosinlerin, yüksek üretim maliyetlerinden dolayı, bazen kullanımı sınırlı kalmaktadır (Bédard *et al.* 2018). Endüstriyel açıdan bu kadar önemli olan bakteriyosinleri üreten mikroorganizmaların, farklı kaynaklardan (Çizelge 1.4) izolasyonu ve karakterizasyonu günümüzde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Gautam and Sharma 2009).

Çizelge 1.4. Bakteriyosin üreten bazı mikroorganizmaların, çeşitli kaynaklardan izolasyonu

KAYNAK	İZOLATIN ADI
Hamur Mayası	<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>L. bavaricus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>
Olgunlaştırılmış Yumuşak Peynir	<i>Chryseobacterium piscicola</i>
Tavuk Eti	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Peynir	<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 917520
Vakumlu Paketlenmiş Et	<i>Lactobacillus sakei</i>
Peynir Altı Suyu	<i>Lactobacillus helveticus</i> G51, <i>Bacillus mycoides</i>
Sucuk	<i>Lactobacillus brevis</i> SB27, <i>L. curvatus</i> SB
Keçi Eti	<i>Enterococcus faecium</i>
Gajani Sikhe	<i>Lactobacillus</i> SPY21
İşlem Görmemiş Arpa	<i>Lactobacillus</i> sp.
Bira	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>

Çizelge 1.4. (devam)

Acı Biber Turşusu	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Salata	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Pediococcus</i> sp.
Tempeh (Fermente Soya Fasülyesi)	<i>Lactobacillus</i> sp.
Toprak	<i>Bacillus thuringiensis</i>
İnsan Eli	<i>Bacillus</i> sp. strain 8a
Vari Kandal	<i>Lactobacillus brevis</i>
Khameera yoghurt (Mısırlıların ev yapımı yoğurdu)	<i>Bacillus lentus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>

Bu çalışmada temel materyal olan sucuğun bünyesine bakteriyosinler 3 şekilde uygulanır. Bunlar (Woraprayote *et al.* 2016):

- Bakteriyosin üreten LAB hücrelerinin et ve et ürünlerine doğrudan ya da koruyucu kültür olarak aşılınması,
- Hücre içermeyen süpernatantın doğrudan uygulanması (CFS),
- Ambalaj şeklinde saflaştırılmış/kısmen saflaştırılmış bakteriyosinlerin kullanımı şeklinde özetlenebilir.

Özellikle bu amaçla kullanılan LAB bakteriyosinleri; moleküler kütle, aktivite spektrumu, modifiye amino asitlerin varlığı, genetik orijin, kimyasal yapı ve etki şekilleri bakımından farklılık göstermektedir (Chen *et al.* 2017).

1.7.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

Bakteriyosinler temelde iki ana sınıfa ayrılırlar. Sınıf I bakteriyosinler (moleküler ağırlığı 5 kDa dan az olan bakteriyosinler) lantibiyotikleri içerir ve post-translasyonel modifikasyon geçirmelerinden ötürü sınıf II bakteriyosinlerinden ayırt edilebilirler (Martinez *et al.* 2013). Lantibiyotikler iki gruba ayrılır. A tipi lantibiyotikler pozitif yüklü, gözenek oluşumunu gerçekleştirerek, bakteriyel zarlara etki eden uzun ve esnek

moleküllerdir. Bu grubun en bilinen üyesi, 1928'de tanımlanmış olan nisindir (Guder *et al.* 2000). B tipi lantibiyotikler daha küçük küresel peptitlerdir ve negatif yüklü veya yüksüzdür. Konakçı hücrenin spesifik enzimlerini inhibe ederek, antimikrobiyal aktivite gösterir (Chen and Hoover 2003).

Sınıf II bakteriyosinler, dört alt gruba ayrılan modifiye edilmemiş peptitlerdir. Sınıf IIa (veya pediosin PA1-benzeri) peptitler, genellikle 37- 48 amino asit içerirler (Martinez *et al.* 2013). Fermente et, fermente sebze, süt ürünleri, füme somon ve insan gastrointestinal sisteminden yaklaşık 50 farklı sınıf IIa bakteriyosini izole edilmiştir. Sınıf IIb bakteriyosinler, antimikrobiyal aktivite gösterebilmek için iki tamamlayıcı peptide ihtiyaç duymaktadır. Bu sınıfın bazı peptitleri ayrı ayrı antimikrobiyal aktivite gösterebilse de, tamamlayıcı maddenin ilave edilmesi, aktiviteyi büyük ölçüde artırır. Sınıf IIb bakteriyosinleri, amfifilik ve hidrofobik bölgeler içerir ve çoğunlukla katyoniktir (Mokoena 2017).

Bu iki sınıf dışında sınıf III ve sınıf IV vardır. Sınıf III ısıya duyarlı ve hücre duvarını degrades eden enzimleri içerir (Sánchez-Hidalgo *et al.* 2011). *Escherichia coli* tarafından üretilen kolisin, sınıf III bakteriyosinlere örnek olarak verilebilirken, *Lactobacillus crispatus*, *L. helveticus* ve *Enterococcus faecalis* tarafından üretilen helvetisin M, helvetisin J ve enterolisin A da sınıf III bakteriyosinlere örnektir. Helveticin M, yakın zamanda karakterize edilmiş ve Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarını ve Gram-negatif bakterilerin dış zarını bozduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu bakteriyosinin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğu ifade edilmiştir (Kumariya *et al.* 2019).

Sınıf IV bakteriyosinleri ise, 35-70 aminoasitten oluşan küresel, ısıya duyarlı, sarmal ve post-translasyonel olarak değiştirilmiş proteinleri içermektedir (Sánchez-Hidalgo *et al.* 2011). Bakteriyosinlerin sınıflandırılması Çizelge 1.5'te verilmiştir (Kurt ve Zorba 2005; Akkoç vd 2009; Zheng and Sonomoto 2018).

Çizelge 1.5. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

SINIF	BAKTERİYOSİN ADI	TAŞIYICI GEN	TÜRÜ	ORGANİZMA
Sınıf I (modifiye edilmiş)				
Lantibiyotikler	Nisin A	NisT	NisT	<i>Lactococcus lactis</i> N8
	Nukasin ISK-1	NukT	SunT	<i>Staphylococcus warneri</i> ISK-1
	Duramisin	–	Sec-bağımlı	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> ATCC 12686
Glycocins	Sublansin 168	SunT	SunT	<i>Bacillus subtilis</i> W168
Bottromycins	Bottromisin A2	BotT	Diğerleri	<i>Streptomyces</i> sp. BC16019
Thiopeptides	Thiosillin	TclW/TclX	Diğerleri	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
Sactibiotics	Subtilosin A	AlbC	Diğerleri	<i>Bacillus subtilis</i> 168
Linaridins	Cypemisin	CypT	Diğerleri	<i>Streptomyces</i> sp. OH-4156
Sınıf II (modifiye edilmemiş)				

Çizelge 1.5. (devam)

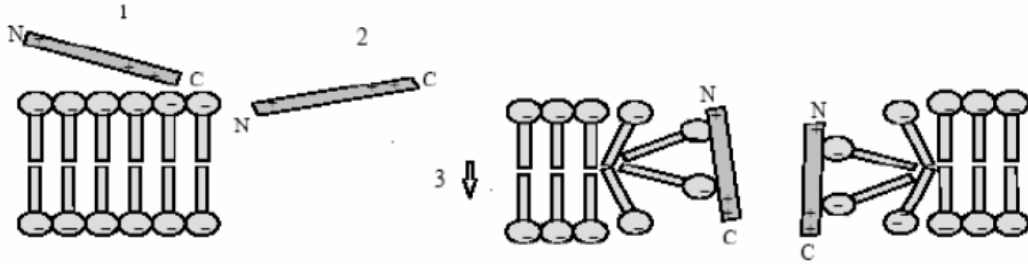
Ila peptides	Pediosin PA-1	PedD	SunT	<i>Pediococcus acidilactici</i> LMGT2351
	Enterosin P	–	Sec-bağımlı	<i>Enterococcus faecium</i> P13
	Sakasin A	–	–	<i>Lactobacillus sakei</i>
I Ib peptides	Laktokokin G	LagD	SunT	<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2081
I Ic peptides	Enterosin AS-48	EntBCC1D	Diğerleri	<i>Enterococcus faecalis</i> S-48
I Id peptides	Laktokokin A	LcnC	SunT	<i>Lactococcus lactis</i> WM4
SINIF III				
	Helvetisin J	–	–	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	Helvetisin V-1829	–	–	<i>L. helveticus</i>

1.7.2. Bakteriyosinlerin mikroorganizmalar üzerindeki etki mekanizması

Bakteriyosinler, genellikle katyonik bir karaktere sahiptir ve hücre zarında yüksek miktarda anyonik lipid içeren Gram-pozitif bakteriler ile kolayca etkileşime girer. Bu etkileşim ile hücre zarında gözeneklerin oluşmasına neden olur. Zarda bulunan gözenekler, hücrenin enerji durumunu değiştirerek, hücrelerde bakteriyosidal etki gösterir (Settanni and Corsetti 2008).

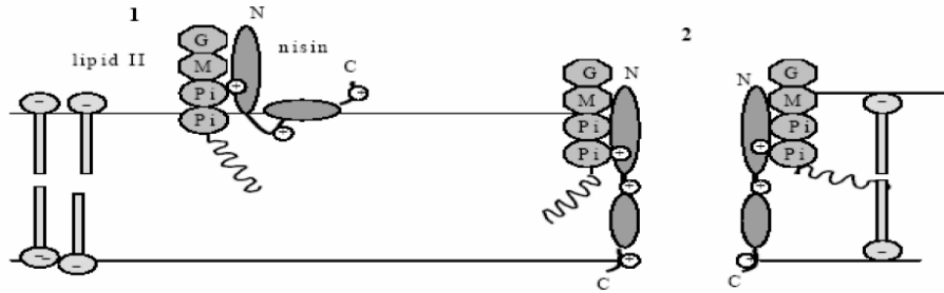
Bakteriyosinler mikroorganizmalar üzerinde 2 farklı etki mekanizmasına sahiptir.

İlk mekanizmada; bakteriyosinlerin pozitif yüklü N ve C uçları, membranlarda bulunan negatif yüklü fosfolipidlerle birleşerek, porlar oluşturur. Bunun sonucunda da yapıyı bozar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Bakteriyosinlerin fosfolipidlere bağlanarak por oluşturması (Üstündağ ve Özdoğan 2011)

İkinci mekanizmada ise; hücre duvarı sentezinin ön maddesi olan Lipid II molekülünün, peptidoglikan zincirine bağlanmasını önler. Bunun sonucunda da hücre duvarı sentezi durur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Bakteriyosinlerin Lipid II molekülüne bağlanarak por oluşturması (Üstündağ ve Özdoğan 2011)

1. Nisin ilk adımda Lipid II nin karbonhidrat parçasına dış kısımdan bağlanır. (N-terminal bağlanma için gereklidir.)
2. C- terminal kısmı ise membranı geçerek, por yapısını tamamlar.

1.7.3. Bakteriyosinlerin gıda korumasında kullanımı

Gıdaların korunmasında laktik asit bakterileri önemli olmakla beraber, bu bakterilerin sentezlemiş oldukları bakteriyosin gibi metabolitler de oldukça önemlidir (Kurt ve Zorba 2005). Gıda korumasında bakteriyosinlerde aranan özellikler (Gálvez *et al.* 2007):

- Genellikle güvenilir olarak kabul edilmek,
- Ökaryotik hücrelerde etkin olup, toksik etki göstermemek,
- Bağırsak mikrobiyotası üzerinde oldukça az etkiye sahip olup, proteazlar tarafından inaktif hale gelmek,
- Genellikle pH ve ısıya dayanıklı olmak,
- Birçok gıda kaynaklı patojene karşı nispeten geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olmak,
- Bakteriyal sitoplazmik zara etki ederek, bakteriyosidal etki göstermek,
- Genetik belirleyicileri genellikle plazmid kodlu olup, genetik manipülasyonu kolaylaştırmak olarak sayılabilir.

Bunun yanında gıda korumasında bakteriyosin uygulamasının birçok yararı bulunmaktadır. Bunlar (Messaoudi *et al.* 2013):

- 1) Gıda zehirlenmesi riskini azaltmak,
- 2) Gıda zincirlerindeki çapraz kontaminasyon riskini azaltmak,
- 3) Gıdaların raf ömrünü uzatmak,
- 4) Gıdaları yüksek sıcaklıklardan korumak,
- 5) Gıda bozulmasına bağlı ekonomik kayıpları en aza indirmek,
- 6) İlave kimyasal koruyucuların miktarını azaltmak,
- 7) Gıdaların işleme maliyetini düşürmek,
- 8) Tüketicilerin taleplerini karşılayacak yeni gıdalara alternatif koruma sağlamak şeklinde sıralanır.

LAB üyeleri tarafından üretilen ve gıdalarda biyokoruyucu olma potansiyeli olan bakteriyosin örnekleri Çizelge 1.6’da verilmiştir (O’Sullivan *et al.* 2002).

Çizelge 1.6. Gıdalarda biyokoruyucu olma potansiyeli olan bakteriyosin örnekleri

ÜRETİCİ MİKROORGANİZMA	BAKTERİYOSİN	İNHİBİSYON SPEKTRUMU
<i>Lactococcus</i> sp.		
	Nisin	Geniş spektrum
	Laktisin 3147	Geniş spektrum
	Laktisin 481	Orta spektrum
	Laktokokin A, B ve M	Dar spektrum
<i>Lactobacillus</i> sp.		
	Laktosin 27	Dar spektrum
	Sakasin A	Dar spektrum
	Sakasin B	Dar spektrum
	Plantarisin C	Geniş spektrum
<i>Pediococcus</i> sp.		
	Pediosin A	Geniş spektrum
	Pediosin AcH (PA-1)	Geniş spektrum
<i>Leuconostoc</i> sp.		
	Leukokin A-UAL187	Geniş spektrum
<i>Enterococcus</i> sp.		
	Enterosin A	Dar spektrum
<i>Carnobacterium</i> sp.		
	Carnosin U149	Geniş spektrum
	Piscikolin 126	Geniş spektrum
	Diversin V41	Geniş spektrum

1.7.4. Bakteriyosin sentezi

Bakteriyosin biyosentezi ile ilgili genler genellikle toplu halde bulunur ve plazmid, kromozom veya transpozonlarda kodlanır. Bakteriyosinler, genellikle C-terminal propeptidine bağlanmış bir N-terminal lider peptidi içeren, biyolojik olarak inaktif prepeptid şeklinde sentezlenir. Lider peptid (Perez *et al.* 2014):

- Prepeptidi, olgunlaşma ve taşıma proteinlerine doğru yönlendiren bir tanıma bölgesi görevi yapar,
- Üretilen bakteriyosini, üretici suş içinde inaktif halde tutarak, üretici suşu korur,
- Modifikasyon sırasında enzim-substrat bağlantısının uygun bir konformasyonda olmasını sağlamak için propeptid ile etkileşime girer.

Bakteriyosinlerden Lantibiyotik sentezi; lider bir peptid ve propeptidden oluşan prepeptidin translasyonu ile başlar. Daha sonra modifikasyona uğrayan prepeptid, sitoplazmik membran boyunca yer değiştirirken, lider peptid ise spesifik enzimler tarafından proteolitik olarak ayrılır (Perez *et al.* 2014).

Bakteriyosin üreten organizmalar, spesifik bağışıklık proteinlerine sahip olmalarından ötürü, üretmiş oldukları bakteriyosinlerine karşı dirençlidirler (Martinez *et al.* 2013). Bakteriyosin üreten hücrede iki ayrı bakteriyolojik bağışıklık sistemi tanımlanmıştır. Bunlar; bağışıklık proteini ve iki veya üç alt birimden oluşan özel bir ABC taşıyıcı sistemidir. Bu iki bağışıklık sistemi, bakteriyosin üreten hücreleri kendi bakteriyosinlerinden korumak için birlikte çalışırlar. Lantibiyotikler, sitoplazmik zarı lokalize olan protein LanI ile bakteriyosin tarafından gözenek oluşumunu engelleyerek, bakteriyosin üreten hücreye bağışıklık kazandırır. ABC taşıyıcı sistemi ile ilgili LanEFG, zarı yerleşmiş bakteriyosinleri dışarı atarak, zarıdaki bakteriyosin konsantrasyonunu kritik bir seviyede tutar. Bakteriyosin üretimine ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesine, iki bileşenli sinyal iletim sistemleri ile aracılık eder (Šušková *et al.* 2010).

Bakteriyosin üretimi, hücre yoğunluğuna ve indükleyicinin konsantrasyonuna bağlıdır. İndüksiyon faktörünün gıda matrisi ile etkileşimi (adsorpsiyon veya inaktivasyon gibi), bakteriyosin üretimi üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahiptir (Reis *et al.* 2012).

1.7.5. Bakteriyosinlerin antibiyotiklerden farkı

Bakteriyosinler ve antibiyotikler arasındaki en büyük fark, bakteriyosinlerin aktiviteleri, üretici türlerle yakın ilişkili türlerin suşları ve özellikle aynı türlerin suşları ile sınırlıdır. Öte yandan antibiyotikler, daha geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir ve aktiviteleri kısıtlı olsa bile, bu yakından ilişkili suşlar üzerinde herhangi bir etki göstermez. Ek olarak, antibiyotikler genellikle sekonder metabolitler olarak adlandırılırken, bakteriyosinler büyümenin primer evresinde ribozomal olarak sentezlenir ve üretilir (Zacharof and Lovitt 2012).

Antibiyotik ve bakteriyosin arasındaki genel farklar Çizelge 1.7’de verilmiştir (Cleveland *et al.* 2001).

Çizelge 1.7. Antibiyotik ve bakteriyosin arasındaki farklar

Özellik	Bakteriyosinler	Antibiyotikler
Kullanım Alanı	Gıda	Klinik
Sentez	Ribozomal	Sekonder metabolit
Aktivite	Dar spektrum	Değişken spektrum
Konak Hücre Bağışıklığı	Var	Yok
Hedef Hücre Direnci veya Tolerans Mekanizması	Genellikle hücre zarının kompozisyonunu etkileyen adaptasyon	Genellikle farklı bölgeleri etkileyen ve genetik olarak transfer edilebilir bir belirleyici faktör
Etkileşim	Bilinmiyor	Özel hedef
Görevi	Çoğunlukla gözenek oluşumu, ancak birkaç durumda hücre duvarı biyosentezi	Hücre zarı veya hücre içi hedefler
Toksosite / Yan etki	Bilinmiyor	Var

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Laktik asit bakterileri endüstriyel ve gıda biyoteknolojisi açısından oldukça önemli mikroorganizmalar olup, bunların karakterizasyonu, bakteriyosin üretme potansiyellerinin araştırılması ve antimikrobiyal etkilerinin tespitine yönelik çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Lewus *et al.* (1991) tarafından yapılan çalışmada, bakteriyosin üreten laktik asit bakteri suşları, et ürünlerinden izole edilmiştir. Elde edilen 10 suş, diğer 11 bakteriyosin üreten laktik asit bakteri ile birlikte, dört *Listeria monocytogenes*, iki *Aeromonas hydrophila*, iki *Staphylococcus aureus*'a ve psikrotrofik patojenlere karşı inhibe edici aktivite gösterip göstermediği test edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda, etten izole edilen suşların sekiz tanesinin, dört *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* ve *S. aureus* suşuna karşı inhibe edici etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Villani *et al.* (2001) tarafından yapılan çalışmada, inek sütünden bakteriyosin üreten bir lakokok suşu izole edilmiştir. Klindamisine dirençli olan türün, 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda *Lactococcus garvieae* ile benzediği tespit edilmiştir. Garviesin L1-5 olarak tanıladıkları, düşük pH ve ısı işlemlerden etkilenmeyen bakteriyosinin, *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium spp.*'ye karşı bakteriyosidal bir etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Adıgüzel ve Atasever (2009) tarafından yapılan çalışmada, Türk fermente sucuğundan 45 laktik asit bakterisi izole edilerek, fenotipik ve genotipik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus* ssp. *curvatus*, *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. collinoides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Weisella viridescens*, *W. confusa* ve *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* türlerinin baskın florayı oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Müller *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada, Arjantin'in kuru fermente sucuğundan *Lactobacillus plantarum* LP 31 suşu izole edilmiştir ve bu bakterinin sentezlemiş olduğu yeni bir bakteriyosinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca RP (ters faz) katı faz ekstraksiyonu, jel filtrasyon kromatografisi ve RP-HPLC yöntemleri ile bakteriyosin saflaştırılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda, üretilen bakteriyosinin, *Pseudomonas* sp. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı bakteriyosidal etkisi olduğu gösterilmiştir.

Alvarez-Cisneros *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada, enterokok suş tarafından üretilen anti-bakteriyel aktiviteye sahip bakteriyosin benzeri bir inhibe edici maddeyi (BLIS) karakterize edilmiştir. Yapılan karakterizasyon işlemleri sonucunda, Meksika fermente sucuklarından izole edilen suşun *Enterococcus faecium*'a benzediği tespit edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda; BLIS, güçlü bir anti-*Listeria* aktivitesi göstermiş ve proteinaz K tarafından etkisizleştirildiği gözlemlenmiştir. *E. faecium* MXVK29 tarafından üretilen BLIS'in biyokimyasal özelliklerine bakılarak, Klaenhammer'ın yaptığı sınıflandırmada bunun Ila Sınıfına dahil edilebileceği belirtilerek, yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmasına rağmen, yine de doğal bir gıda koruyucu olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür.

Díaz-Ruiz *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada, poto-poto olarak adlandırılan fermente bir gıdadan, plantarisin üreten *Lactobacillus plantarum* EC52 suşu izole edilmiştir. Bu bakterinin, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7 gibi patojen mikroorganizmalar üzerinde güçlü asidifikasyona neden olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda; bu suşun, *Escherichia coli* O157:H7'nin gelişimini en az 6 gün boyunca inhibe ettiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda; EC52 suşunun, *L. monocytogenes* seviyesini azalttığı ve *E. coli*'nin çoğalmasını önlediği gözlemlenerek, fermente edilmiş sucukların üretiminde gıda koruyucusu olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

de la Fuente-Salcido *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, Meksika Tuba (M-Tuba) ve Tepache olarak bilinen Meksika fermente içeceklerinde bakteriyosin üretme yeteneğine sahip laktik asit bakterilerinin (LAB) bulunup bulunmadığını incelemişlerdir.

Bu çalışmada; iki fermente içeceğin mezofilik aerobik bakterisi, LAB ve maya içerdikleri belirlenmiş, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* ve *Salmonella* spp.'nin bakteriyel izolatlar tarafından üretilen metabolitlere en duyarlı mikroorganizmalar olduğu gözlemlenmiştir. M-Tuba ve Tepache'nin, nisin ve enterosini kodlayan genleri içerdiği, pediosin kodlayan genleri içermediği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, izole ettikleri *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus faecium* bakterilerinin sırasıyla ~3.5 kDa ve 4.0-4.5 kDa büyüklüğünde bakteriyosinleri ürettiklerini tespit etmişlerdir. Ayrıca bakteriyosinlerin Well-difüzyon uygulaması sonucunda; *Micrococcus luteus*, *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *S.agalactiae*, *S.aureus*, *Bacillus cereus*, *B.subtilis*, *Enterococcus faecalis* ve *K.pneumonia patojenlerine* karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. İlk defa bu çalışma ile M-Tuba ve Tepache içeceklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin gıda koruyucu fonksiyonu bulunan antimikrobiyal peptitleri sentezledikleri ortaya konulmuştur.

Vasilev *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, Sırp geleneksel fermente sucukları Sremski ve Lemeski kulen'in mikrobiyal bileşimi incelenmiştir. Bu ürünlerdeki baskın laktik asit bakterilerinin *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait türler olduğu belirlenmiştir. Bunlar arasında en fazla *Lactobacillus brevis* bulunmakla beraber, *L. pentozus*, *L. Salivarius*, *L. paracasei*, *L. plantarum* ve *L. fermentum* türlerinin de bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir.

Lv *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, altın sazan balığının bağırsağından izole edilen ve yeni bir bakteriyosin ürettiği tespit edilen, JY22 kodlu izolatın fizikokimyasal özellikleri belirlenmiş ve moleküler karakterizasyon çalışması (16S rRNA sekans analizi) sonucunda *Lactobacillus plantarum* türüne benzediği saptanmıştır. Plantarisin JY22 olarak adlandırılan bu bakteriyosin, etil asetat ekstraksiyonu ve jel filtrasyonu kullanılarak saflaştırılmış, çalışma sonucunda, plantarisin JY22'nin, *Bacillus cereus* bakterisinin hücrelerine ve sporlarına zarar verdiği tespit edilmiştir.

Rzepkowska *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, Polonya çığ fermente et ürünlerinden *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerine ait toplam 21 suş izole edilmiş ve probiyotik özellikleri (simüle edilmiş mide ve bağırsak koşullarına direnç, güvenlik değerlendirmesi ve antimikrobiyal özellikler) açısından incelenmiştir. Suşların, mide enzimlerine ve düşük pH'ya (3-6 log CFU/mL düşüş), bağırsak enzimlerine, safra tuzlarına (1-3 log CFU/mL düşüş), gentamisine, streptomisine, vankomisine, tetrasikline, siprofloksasine ve kanamisine dirençli olduğunu tespit edilmiştir. İzolatlardan üçünün (*Lb. brevis* BAL1, BAL10 ve KL5) β -glukuronidaz ürettiği için bu bakterilerin güvenli olmadığı belirlenmiştir. Yedi türün ise bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri maddeler üretme kabiliyetine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, *Lactobacillus brevis* SCH6, *Pediococcus pentosaceus* BAL6 ve KL14'ün diğer LAB suşlarına kıyasla gastrointestinal şartlar, güvenlik değerlendirmesi ve antimikrobiyal özellikler dikkate alındığında daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Chiorean *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, Griffon akbabalarından (*Accipitridae* ailesine mensup bir av kuşu) *Enterococcus faecium* M3K31 izole edilmiş, daha sonra *Enterococcus faecium* M3K31'in genom dizilimi yapılarak; enterosin P, enterosin HF ve SRCAM 602 benzeri bakteriyosinleri kodlayan üç sekansın varlığı ortaya konulmuştur. Ayrıca bu çalışma ile faerosin MK adını verdikleri SRCAM 602 benzeri yeni bir bakteriyosini literatüre kazandırmışlardır. Faerosin MK ve SRCAM 602, kimyasal olarak sentezlenmiş ve aktiviteleri test edilmiş, yapılan araştırmalar sonucunda; Faerosin MK'nin farklı Gram-pozitif organizmalara karşı aktif olduğu, SRCAM 602'nin ise test edilen herhangi bir organizmaya karşı aktif olmadığı gözlemlenmiştir.

Čanak *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus plantarum* O1, çipura (*Sparus aurata*) bağırsağından izole edilerek, API biyokimyasal testi ve MALDI-TOF MS ile tanılanmıştır. *L. plantarum* O1 nin patojenik test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Daha ileri araştırmalarda ise bu bakterinin plantarisin bakteriyosininin üreticisi olduğu kanıtlanmıştır. Bu türün ayrıca, %3,5'lik NaCl varlığında, geniş bir sıcaklık (4-45°C) ve pH aralığında (2-12) büyüme gösterdiği tespit edilmiştir. Son olarak bu türün ürettiği probiyotiğin gelecek vadettiği ve

Özellikle taze balık, kabuklu deniz hayvanlarının raf ömürlerinin uzatılmasında önemli rol oynayacağı sonucuna varılmıştır.

Khodaei and Nezhad (2018) tarafından yapılan çalışmada, Kerman (İran)'daki yerel işletmelerden izole edilen bakteriyosinler, amonyum sülfat yöntemi ile saflaştırılarak, pH ve sıcaklığın üretilen bakteriyosin üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Ayrıca bu bakteriyosinin farklı patojenik bakteriyal türler üzerine olan antimikrobiyal aktivitesi de incelenmiştir. Daha sonra moleküler analiz yöntemleri kullanılarak, bakteriyosin üreten *Enterococcus* cinsine ait 15 suş tespit edilmiştir. Bunlardan *Enterococcus faecium* C-2 ve Y-1 izolatlarının bakteriyosin ürettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışma sonucunda; bakteriyosinlerin pH 2-12 arasında stabil olduğu, otoklav işleminden sonra antibakteriyel aktivitelerini sürdürdüğü, *Listeria monocytogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı maksimum bakteriyosidal etki gösterdiği ve bakteriyosinlerin kimyasal antibiyotiklerin yerine kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tez çalışmasında kullanılan laktik asit bakterileri

Bu çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri, Türkiye'nin farklı yörelerinden (Gaziantep, Kayseri, Erzurum, Kahramanmaraş) temin edilen 10 sucuk örneğinden izole edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada, Türkiye'nin farklı yörelerindeki kasaplardan temin edilen sucuk örnekleri uygun koşullarda laboratuvara getirildi. Örnekler kullanılmaya kadar +4°C'ye bırakıldı.

3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Farklı şehirlerden temin edilen sucuk örneklerinden laktik asit bakterilerinin izole edilmesi için, 30 gr deney numunesi alındı ve üzerine 200 ml steril fizyolojik su (%0.9 NaCl) eklendi. Daha sonra stomacherde numuneler homojenize edildi. Fizyolojik su kullanılarak 7 farklı dilüsyon hazırlandı, bunlardan 100'er µL alınarak MRS ve M17 agara yayma ekim yapılarak 37°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan kolonilerden, koloni morfolojisi farklı olanlar seçilerek hem MRS hem de M17 agara 3 faz ekim yöntemiyle aktarıldı ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Koloniler, uzun süreli muhafaza için gliserol içeren besiyerine alındı ve stok kültürler, kullanılmaya kadar – 86°C'ye bırakıldı.

3.2.3. Seçilen İzolatların Konvensiyonel Analizleri

3.2.3.a. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

1. Hücre ve koloni morfolojisi

Test izolatlarının koloni morfolojileri binoküler mikroskopta incelendi. Hücre morfolojilerinin tespiti için, petriden öze ile bir miktar bakteri alınarak, üzerinde bir damla su bulunan lamaların üzerine yayma preparasyon yapıldı. Ardından, kristal violet kullanılarak basit boyama işlemi gerçekleştirilerek, mikroorganizmaların hücre morfolojileri incelendi.

2. Gram boyama

Gram reaksiyon testlerinin ilki ve yaygın olanı; lam üzerine, bakterilerin yayılması ile hazırlanan preparat üzerine, kristal violet boyasının ilavesi ile gerçekleştirilen ilk boya uygulaması sonucunda hem Gram (-), hem de Gram (+) bakteriler mor renge boyandı. 1 dakikalık inkübasyon sonucunda boyanın fazlası su ile uzaklaştırıldı. Ardından lamın üzerine lügol solüsyonu eklenerek, 1 dk inkübe edildi. (Lügol, mordan olarak kullanılır). Daha sonra preparat, %96'lık etil alkol kullanılarak yıkandı. Yıkama sonrası Gram (-) bakterilerin dış membranları bozulduğundan ve peptidoglikan tabakaları ince olduğundan boyayı tutamayarak renksizleşti. Gram (+) bakterilerin ise peptidoglikan tabakaları kalın olduğundan kristal violet-lügol kompleksini tutarak mor renkli boyandı. Yıkama işleminden sonra preparat saf sudan geçirilerek, safranin kullanılarak 20 saniye daha boyandı ve preparat su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Son olarak ışık mikroskobunda preparatlar incelendi. Pembe-kırmızı renk oluşturanlar Gram (-), mor renkli olanlar ise Gram (+) olarak değerlendirildi (Baltacı 2015).

Bu metodlardan ikincisinde ise; bakteriler %3'lük potasyum hidroksit (KOH) ile muamele edildi. Gram (-) bakterilerin %3'lük KOH çözeltisi ile muamelesi sonucunda, hücre duvarının parçalanması ile sitoplazma ve nükleer materyal açığa çıkar ve viskoz bir

yapının oluşmasına sebep olur. İlk olarak lam üzerine damlatılan %3'lük KOH solüsyonu üzerine 24-48 saatlik kültürden bir öze konarak, KOH solüsyonu ile 5–10 saniye muamele edildi. Daha sonra öze aşağı ve yukarıya doğru hareket ettirildiğinde, hareket sonucunda sakız gibi uzayanlar Gram (-), uzamayanlar ise Gram (+) olarak değerlendirildi (Arslan 2017).

3. Hareketlilik testi

İzolatlar, MRS ve M17 Broth + %0,6 agar içeren tüplere iğne öze ile inoküle edilerek, 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Oluşan ekim çizgisi hattı boyuncaki gelişim durumuna göre pozitif veya negatif olarak değerlendirildi (Arslan 2017).

4. İzolatların gelişme gösterdikleri tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri tuz aralığının belirlenmesi için; farklı tuz konsantrasyonlarına (%2, %4, %6, %8, %10 ve %12) sahip MRS ve M17 Broth besiyerleri hazırlandı. İzolatlar, besiyerlerine inoküle edildikten sonra, 37°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda laktik asit bakterilerinin büyüebildikleri maksimum, minimum ve optimum tuz konsantrasyon değerleri, spektrofotometrede (OD₆₀₀) ölçüm yapılarak tespit edildi.

5. İzolatların gelişebildikleri sıcaklıkların belirlenmesi

İzolatların büyüebildikleri sıcaklıklarının belirlenmesi için; M17 ve MRS Broth besiyerleri hazırlandı ve bu bakteriler test tüplerine inoküle edildi. Daha sonra farklı sıcaklıklara (10°C, 15°C, 25°C, 35°C, 37°C ve 45°C) ayarlı çalkalamalı inkübatörlerde 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda izolatların gelişebildikleri maksimum, minimum ve optimum sıcaklık değerleri, spektrofotometrede (OD₆₀₀) ölçüm yapılarak belirlendi.

6. İzolatların gelişme gösterdikleri pH aralıklarının belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri pH aralığının belirlenmesi için; öncelikli olarak MRS ve M17 Broth besiyerleri hazırlandı ve farklı pH değerlerine (pH:3, pH: 5, pH:7, pH:9 ve pH:11) ayarlandı. Daha sonra, test izolatları bu tüplere inoküle edildi ve 37°C’de 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kültürlerdeki gelişim spektrofotometrede (OD₆₀₀) incelenerek, organizmaların gelişebildikleri maksimum, minimum ve optimum pH değerleri tespit edildi.

7. Katalaz testi

Katalaz enzimi; ETS (Elektron transfer zinciri)’nin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit (H₂O₂)’i parçalayarak, H₂ ve O₂ gaz çıkışına sebep olan bir enzimdir. Özellikle oksijenli solunum ve fakültatif solunum yapan mikroorganizmalarda bulunan bu enzim reaksiyon sonucunda lam üzerinde köpürmeye sebep olur. Bu amaçla, temiz bir lam üzerine %5’lik H₂O₂’den bir damla damlatıldıktan sonra, üzerine kürdanla alınan bakteriyal kültürden bir miktar aktarıldı ve homojenize hale gelmesi sağlandı. İşlem sonucunda köpük oluşumu katalaz (+), oluşmaması ise katalaz (-) olarak değerlendirildi (Sarı 2016).

8. Oksidaz testi

Elektron transferinde görevli sitokrom c proteinine sahip olan bakteri suşları bu test kullanılarak belirlendi. Sitokrom c proteini (oksidaz c), mitokondride bulunmakta ve solunum olayında görev almaktadır. Dört sitokrom c molekülünün her birinden birer elektron alarak, oksijen molekülüne transfer etmekte ve böylece moleküler oksijeni iki su molekülüne çevirmektedir. Bu testte; eğer organizma sitokrom-c oksidaz enzimine sahip ise, bu enzim kitte bulunan substrat ile reaksiyona girerek mavi renk oluşumuna neden olur. Bu amaçla %1 Tetramethyl-p-phenyldiamine dihydrochloride içeren kit halindeki diskler kullanıldı. Disklerin üzerine 1 damla steril saf su damlatıldı ve üzerine MRS ve M17 agarda büyütülen 24-48 saatlik kültürden bir miktar bakteri bırakıldı. Eğer mikroorganizmada sitokrom c proteini varsa, bu protein diskte substratıyla reaksiyona

girerek, mavi-mor bir renk oluşumuna neden olur. Bu durum, oksidaz pozitif olarak değerlendirilirken, renk değişiminin görülmemesi ise negatif olarak yorumlandı.

9. Glikozdan gaz üretim testi

Bu testin ilk aşamasında, 9'ar ml glikoz içeren MRS ve M17 Broth besiyerleri hazırlandı ve içerisine Durham tüpleri ters çevrilerek yerleştirildi. Ardından bu tüpler, otoklavlanarak sterilize edildi. Sterilizasyon işleminden sonra, deney tüplerine steril öze kullanılarak bakteriler inoküle edildi ve 37°C'de 24-48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda bakterilerin gaz üretilip üretilmediği kontrol edildi. Gaz üreten bakteriler pozitif yani heterofermantatif olarak değerlendirilirken, gaz üretmeyen bakteriler ise negatif yani homofermantatif olarak değerlendirildi (Arslan 2017).

3.2.4. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanılarının Yapılması

3.2.4.a. Genomik DNA'nın izolasyonu

MRS ve M17 agar besiyerlerine üç faz ekim yöntemi kullanılarak ekilen bakteriler, 37°C'de 24-48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Petrilerde gelişim gösteren organizmalardan tek koloni alınarak, MRS ve M17 Broth besiyerlerine inoküle edildi. 24-48 saatlik sürenin sonunda, Promega Wizard^R genomic DNA purification kit (A1125) kit prosedürüne uygun olarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

DNA konsantrasyonlarının ölçümü ve çalışma solüsyonunun hazırlanması

DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması Adıgüzel (2008) tarafından belirtilen yöntemle göre gerçekleştirildi.

DNA'nın ve DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

$\mu\text{g/ml}$ cinsinden DNA Konsantrasyonu= $A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} (500) \times 50$ (DNA için sabit değer) formülü ile hesaplandı ve stok solüsyon konsantrasyonu tespit edildi.

Çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ise; İstenen Konsantrasyon ($100\text{ng}/\mu\text{l}$) \times İstenen Hacim ($200 \mu\text{l}$)/Stok DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) formülü ile belirlendi. Elde edilen miktar kadar stok solüsyondan alınarak bir Eppendorf tüpe aktarıldı ve son hacmi TE ile $200 \mu\text{l}$ 'ye tamamlandı. $100 \text{ng}/\mu\text{l}$ konsantrasyonda hazırlanan DNA çalışma solüsyonları kullanılıncaya kadar -86°C 'de muhafaza edildi (Adıgüzel 2008).

3.2.4.b. rep-PCR yöntemi kullanılarak izolatların gen profillerinin belirlenmesi

rep-PCR mikroorganizmaların tür ve tür altı ayırımında kullanılan genomik parmak izi analiz yöntemidir. Başlıcaları; ERIC, REP, BOX ve $(\text{GTG})_5$ -PCR'dır (Adıgüzel 2008).

1. BOX-PCR

BOX-PCR, evrensel primer kullanılarak bakterilerin identifikasyonunun gerçekleştirildiği bir rep-PCR yöntemidir.

BOX-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. BOX-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
ddH ₂ O	12,7
G Buffer	5
DMSO	2,5
BSA	1,25
dNTP	1,25
BOX A1R primeri (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')	4
Taq DNA polimeraz	0,3
Kalıp DNA	3

PCR PROGRAMI

- ✓ Ön denatürasyon basamağı; 95°C'de 7 dakika
- ✓ Denatürasyon; 94°C'de 1 dakika
- ✓ Bağlanma; 53°C'de 1 dakika
- ✓ Uzama; 65°C'de 8 dakika olmak üzere bu üç basamak için toplam 35 tekrar olacak şekilde programlandı.
- ✓ Son uzama; 65°C'de 16 dakika olacak şekilde PCR cihazı programlandı ve ilgili bölge amplifiye edildi.

BOX-PCR ürünlerinin elektroforezi

Jel elektroforezi yapılırken, öncelikle 0,8 gr agaroz tartılarak üzerine 80 ml 1X TAE (%1'lik agaroz jel) tamponu eklendi ve mikrodalga fırında karışım iyice çözününceye dek kaynatıldı. Ardından jel 50°C'ye kadar soğutulurken, üzerine 4 µg/ml etidyum bromür

eklendi. Jel, içerisine tarak yerleştirilmiş elektroforez küvetine döküldü ve donması sağlandı.

İlk çukura 10 kb'lık DNA markırından [100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000-4000-5000-6000-8000-10000] (BioLabs N0550S) 10 µl konulduktan sonra, diğer çukurlara 2,5 µl 6X yükleme tamponu + 5 µl PCR ürününden oluşan karışım yüklendi ve 90 voltta 120 dakika süre ile yürütüldü. Süre sonunda etidyum bromür ile boyanan jel, Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System kullanılarak, bilgisayar ortamında analiz edildi (Baltacı 2015).

2.(GTG)₅-PCR

(GTG)₅-PCR, test suçlarının genomik parmak izi analizinde kullanılan bir diğer yöntemdir.

(GTG)₅-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. (GTG)₅-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
ddH ₂ O	12,7
G Buffer	5
DMSO	2,5
BSA	1,25
dNTP	1,25
(GTG) ₅ Primeri (GTG GTG GTG GTG GTG)	4
Taq DNA Polimeraz	0,3
Kalıp DNA	3

PCR PROGRAMI

- ✓ Ön denatürasyon basamağı; 95°C’de 7 dakika
- ✓ Denatürasyon; 94°C’de 1 dakika
- ✓ Bağlanma; 53°C’de 1 dakika
- ✓ Uzama; 65°C’de 8 dakika olmak üzere bu üç basamak için toplam 35 tekrar olacak şekilde programlandı.
- ✓ Son uzama; 65°C’de 16 dakika olacak şekilde PCR cihazı programlandı ve ilgili bölge amplifiye edildi.

(GTG)₅-PCR ürünlerinin elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri %1’lik (1X TAE) Agaroz jelde yürütüldü. Bu amaçla, pozitif kontrol olarak BioLabs N0550S firmasına ait 10 kb’lık DNA marker [100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000-4000-5000-6000-8000-10000] kullanıldı. Sonraki adımda jel tanktan çıkarılarak, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenerek, bilgisayar ortamında analiz edildi (Arslan 2017).

3.2.4.c. 16S rRNA PCR işlemi

Bakteri sistematigi açısından oldukça önemli olan ve aynı zamanda evrimsel açıdan korunmuş bölge olma özelliği bulunan 16S rRNA bölgesi, evrensel primerler kullanılarak in vitro şartlar altında çoğaltıldı.

16S rRNA gen bölgesinin PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. 16S rRNA gen bölgesinin PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
ddH ₂ O	14,1
10X PCR Buffer (Sigma)	3
dNTP	0,6
MgCl ₂	1,8
DMSO	1,2
27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3')	3
1492R (reverse 5' - GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3')	3
Taq DNA polimeraz	0,3
Kalıp DNA	3

PCR PROGRAMI

Örnekler termal döngü cihazına konarak;

- Ön denatürasyon; 94°C'de 2 dk
- Denatürasyon; 94°C'de 1 dk,
- Bağlanma; 49°C'de 1 dk
- Uzama; 72°C'de 2 dk olmak üzere bu üç basamak için toplam 36 tekrar olacak şekilde programlandı.
- Son uzama; 72°C'de 5 dk olacak şekilde PCR cihazı programlandı ve ilgili bölge amplifiye edildi.

16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi

Elde edilen veriler %1'lik (1X TAE) Agaroz jelde yürütüldü. Bu amaçla pozitif kontrol olarak BioLabs N0550S firmasına ait 10 kb'lık DNA marker [100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000-4000-5000-6000-8000-10000] kullanıldı.

Daha sonra jel tanktan çıkarıldı ve jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında analiz edildi (Arslan 2017).

3.2.4.d. Kompetent hücrenin hazırlanması

- *Escherichia coli* JM101 suşu 3 faz ekim yapılarak, stoktan canlandırıldı. Petrilere büyüyen kültürden tek bir koloni alındı ve içerisinde LB Broth bulunan 14 ml'lik tüpe inoküle edilerek, 37°C'de 1 gece çalkalayıcı inkübatöre bırakıldı.
- 300 µl kültür 2700 µl su ile seyreltilerek, spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan değer 10 ile çarpılır (seyreltme oranı). 30 (hazırlanacak ml cinsinden miktar) X 0.1 (sabit değer)/Çıkan değer X 10 (seyreltme oranı) formülü kullanılarak elde edilen değer bize kültürden alınması gereken miktarı verir.
- 30 ml LB Broth üzerine, hesaplamadan çıkan değer kadar kültür eklenerek, 37°C'de 60 ila 90 dk arasında inkübasyona bırakıldı.
- İstenilen değere ulaşıncaya kadar kültürden örnek alınarak, OD₆₀₀ ölçümü yapıldı ve bu değer 0,044-0,055 oluncaya kadar, her 10 dk'da bir ölçüme devam edildi.
- İstenen değeri veren kültür 5-10 dk süre ile 4400 rpm'de çöktürüldü.
- Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak, hücre çökeltisi üzerine soğuk 10 ml 100 mM CaCl₂ eklenip, 30–45 dk süre ile buz içerisinde bekletildi.
- Süre sonunda 4°C'de 10 dk 4400 rpm'de karışım çöktürüldü. Daha sonra süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine soğuk 2 ml 100 mM CaCl₂ eklendi ve buzdolabında bir gün bekletildi (Baltacı 2015).

3.2.4.e. Ligasyon işlemi

Ligasyon işlemi için gerekli olan kimyasal maddeler:

- 5 µl 2X Ligasyon buffer
- 1 µl vektör
- 1 µl T4 DNA ligaz
- 3 µl PCR ürünü

0,2 ml'lik tüpler kullanılarak bir araya getirilen karışım 1 gece 16°C'de 13-15 saat bekletildikten sonra, kullanılmaya kadar +4°C'de saklandı.

3.2.4.f. Transformasyon işlemi

- Her bir Eppendorf tüpüne, buzdolabında muhafaza edilen kompotentten 200 µl konuldu.
- Üzerine 2,5 µl ligasyon ürünü eklenerek, 30 dk boyunca buzda bekletildi.
- 2 dk boyunca 42°C'ye ayarlanmış su banyosunda ısı şokuna uğratıldı.
- Üzerlerine 200 µl LB eklenerek, yaklaşık 1 saat 40 dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Buzdolabından alınan ve oda ısısına gelmesi sağlanan, 40 µl X-Gal ve 40 µl IPTG, amfisilinli katı besiyerine yayıldı.
- Petriler yeterince kuruduktan sonra, ligasyon ürünü+kompotent hücre karışımından 150 µl alınarak petriye konuldu ve drigalski özesi ile yayıldı. Son adımda petriler, 37°C'de yaklaşık 14 saat inkübasyona bırakıldı (Baltacı 2015).

3.2.4.g. Koloni seçme ve sıvı kültüre alma

İnkübasyondan sonra, petriler inkübatörden alınarak +4°C'de bir gece bekletildi ve mavi-beyaz koloni oluşumu gözlemlendi. Daha sonra petrilerden 5–10 kadar beyaz koloni kürdan ile dikkatlice alındı ve içerisinde 3 ml amfisilinli LB Broth bulunan tüplere inoküle edildi. Son olarak tüpler 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.2.4.h. Koloni PCR

- ❖ Amfisilinli LB Broth içerisinde gelişen kültürden 4 µl alınarak, 16 µl steril saf su bulunan tüplere aktarıldı.
- ❖ Tüpler, 10 dk su banyosunda bekletildikten sonra, 2 dk buz içerisinde ısı şokuna uğratıldı.

- ❖ Süre sonunda tüpler 5 dk boyunca 12000 rpm'de santrifüjlendi.
- ❖ Son olarak elde edilen süpernatant kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi.

Koloni PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Koloni PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
ddH ₂ O	16,1
PCR Buffer (Sigma)	3
dNTP	0,6
MgCl ₂	1,8
DMSO	1,2
T7	2
SP6	2
Taq DNA polimeraz	0.3
Süpernatant	3

PCR PROGRAMI

- Ön denatürasyon; 94°C'de 2 dk
- Denatürasyon; 94°C'de 30 sn
- Bağlanma; 55°C'de 30 sn
- Uzama; 72°C'de 2 dk olmak üzere bu üç basamak için toplam 35 tekrar olacak şekilde programlandı.
- Son uzama; 72°C'de 10 dk olacak şekilde PCR cihazı programlandı ve ilgili bölge amplifiye edildi.

Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Elde edilen PCR verileri, %1'lik agaroz jelde, 90 voltta 1 saat boyunca yürütüldü (Baltacı 2015).

İstenen geni taşıyan koloniler, plazmit izolasyonu için amfisilin ihtiva eden LB Broth ortamına aktarıldı.

3.2.4.i. Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu; Promega firmasına (A1330) ait kit sistemi kullanılarak, gerçekleştirildi.

3.2.4.j. Plazmitlerin kontrol edilmesi ve konsantrasyonlarının ayarlanması

Koloni PCR ürünleri, ticari olarak satın alınan EcoRI kesim enzimi ile kesilerek, istenilen gen bölgesini içerip içermedikleri agaroz jel elektroforezi yöntemi ile incelendi. Pozitif sonuç verenlerin konsantrasyon ayarlamaları yapıldı.

3.2.4.k. Sonuçların değerlendirilmesi

Elde edilen plazmitler sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi. Gelen sonuçlar anlamlı hale getirildikten sonra, NCBI ve Etaxon'a girilerek, % benzerlik oranları belirlendi. Anlamlı sonuçlar Genbank'a girilerek genbank numaraları alındı (Arslan 2017).

3.2.5. Bakteriyosin varlığının tespiti

16S rRNA sekans verilerine göre elde edilen izolatların, genomik düzeyde ilgili bakteriyosin genlerini (Garvisin A (*lgnA*); *lgnA*-F: 5'-ATTTAATACGGACGGTATTGAT-3' ve *lgnA*-R: 5'-GGAGTAAAAAGATGGAAAACAA-3' (Maldonado-Barragán *et al.* 2013),

Mesenteroisin; MESY-F: 5'-AGTCTGTGGAAGCATATCAGCA-3' ve MESY-R: 5'-TACCAAATCCATTTCACCAT-3', Sakasin; Sak A-F: 5'-ACAGAATTACAAACAATTACCGGC-3' ve Sak A-R: 5'-CATTCCAGCTAAACCACTAGCC-3', Salivarisin; Salivaricin-F: 5'-GTAGAAAATATTTACTACATACT-3' ve Salivaricin-R: 5'-GTAAAGTATTCGTAAACTGATG-3') içerip içermediklerini tespit etmek için, spesifik PCR analizi gerçekleştirildi. Bu amaç için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Bakteriyosin gen bölgesinin PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
ddH ₂ O	14.1
PCR Buffer (Sigma)	3
dNTP	0.6
MgCl ₂	1.8
DMSO	1.2
Primer F	3
Primer R	3
Taq DNA polimeraz	0.3
Kalıp DNA	3

PCR PROGRAMI

Örnekler termal döngü cihazına konarak;

- Ön denatürasyon; 95°C'de 5 dk
- Denatürasyon; 94°C'de 30 sn
- Bağlanma; 55°C'de 1 dk

- Uzama; 72°C'de 2 dk olmak üzere bu üç basamak için toplam 30 tekrar olacak şekilde programlandı.
- Son uzama; 72°C'de 5 dk olacak şekilde PCR cihazı programlandı ve ilgili bölge amplifiye edildi.

PCR ürünlerinin elektroforezi

Elde edilen veriler %1'lik (1X TAE) Agaroz jelde yürütüldü. Bu amaçla pozitif kontrol olarak BioLabs N0550S firmasına ait 10 kb'lık DNA marker [100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000-4000-5000-6000-8000-10000] kullanıldı. Daha sonra jel tanktan çıkarılarak, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında analiz edildi (Arslan 2017).

3.2.6. Agar Disk Difüzyon Testi

Agar disk difüzyon testinde, eküvyon çubuğu kullanılarak TSA besiyerine patojen bakteriler ekildi. Çapı 6 mm olan disklerin üzerine M17 ve MRS Broth besiyerlerinde büyümüş olan bakterilerden 100 µL konarak, iyice emdirildi. Daha sonra bu diskler alınarak, patojen bakterilerin inoküle edildiği petrilerin üzerine belirli aralıklarla yerleştirilerek 37°C'de 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petriler çıkarılarak, inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığı kontrol edildi ve zon çapının ölçümü gerçekleştirildi (Venkadesan and Sumathi 2015, Somarathna *et al.* 2018).

Kullanılan patojen mikroorganizmalar Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Agar disk difüzyon testinde kullanılan patojen mikroorganizmalar

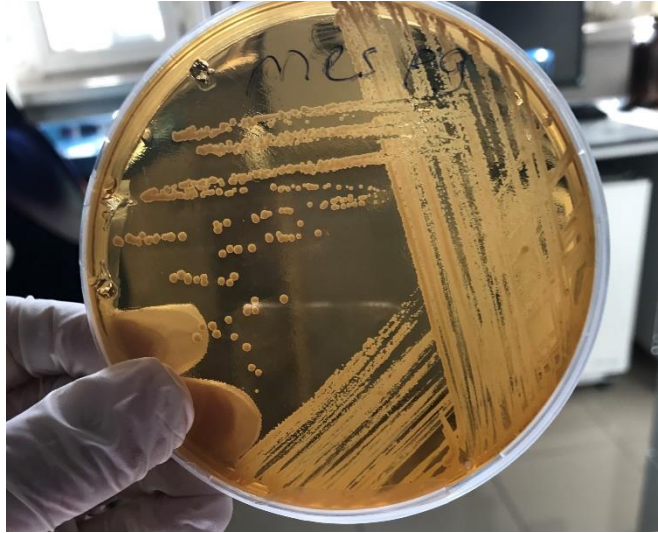
Bakteri Adı	Depozit Numarası
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında, Türkiye'nin farklı yörelerinden (Gaziantep, Kayseri, Erzurum, Kahramanmaraş) sucuk örnekleri temin edilerek, aseptik koşullar altında laboratuvara getirildi. Daha sonra bu örneklerden morfolojik olarak farklı olduğu düşünülen 103 bakteriyal suş saflaştırılarak, konvensiyonel ve moleküler analizlere tabi tutuldu. Ardından bakterilerin bakteriyosin üretme potansiyelleri genomik düzeyde incelendi. Son olarak bakterilerin patojen mikroorganizmalara karşı olan antagonistik etkileri araştırıldı.

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Farklı yörelerden toplanan sucuk örneklerinden toplam 103 bakteriyal suş izole edilerek, saflaştırıldı ve kullanılıncaya kadar -86°C 'de muhafaza edildi. EK7 bakterisine ait petri görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. EK7 bakterisine ait petri görüntüsü

4.2. Seçilen İzolatların Konvensiyonel Analizleri

4.2.1. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

1. Hücre ve koloni morfolojisi

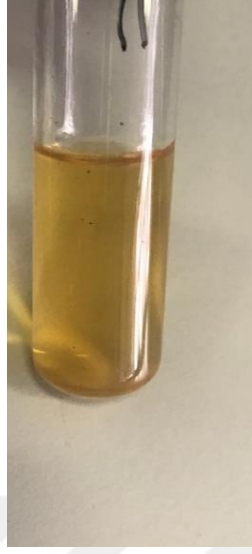
Elde edilen 103 bakteriyal suş, ilk önce genomik parmak izi analizine (rep-PCR) tabi tutularak, tür düzeyinde farklı olduğu düşünülen 7 test suşuna (EK1-EK7) indirildi ve konvensiyonel, moleküler çalışmalar bu bakteriler üzerinde gerçekleştirildi. Yapılan koloni morfoloji analizi sonucunda; test suşlarının tamamının düz morfolojiye, basit boyama sonucunda ise; EK7 hariç (çubuk), tamamının kok hücre morfolojisine sahip olduğu tespit edildi.

2. Gram boyama

İzolatların Gram özellikleri belirlemek amacıyla 2 farklı yöntem kullanılarak incelendi. İlk yöntemde özel boyalar kullanılarak mikroskopta mor olarak görünen hücreler Gram (+), pembe-kırmızı olarak görünenler ise Gram (-) olarak belirlendi. Diğer yöntemde ise, sakız gibi uzayan bakteriler Gram (-), uzamayan bakteriler ise Gram (+) olarak belirlendi. Buna göre test suşlarının tamamının Gram (+) olduğu belirlendi.

3. Hareketlilik testi

Hareketlilik testinde deney izolatları, iğne öze kullanılarak MRS ve M17 Broth+%0,6'lık agar içeren tüplere ekildi ve oluşan ekim çizgisine bakılarak hareketlilikleri hakkında yorum yapıldı. Yapılan test sonucunda tüm bakterilerin hareketsiz olduğu belirlendi. EK1 bakterisine ait test sonucu, Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



EK1 (-)

Şekil 4.2. EK1 izolatına ait hareketlilik test sonucu

4. İzolatların tuz toleransının araştırılması

Elde edilen izolatların, %2, %4, %6, %8, %10 ve %12'lik değişen NaCl konsantrasyonlarına karşı olan tuz toleransları araştırıldı. Bu amaçla, kültürlerin konsantrasyonları ölçüldü ve en iyi gelişebildikleri tuz konsantrasyon değerleri tespit edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonu

İZOLAT	GELİŞEBİLDİĞİ TUZ KONSANTRASYONU (%)
EK1	2-4
EK2	2-4
EK3	4-10
EK4	2-4
EK5	4-6
EK6	4-8
EK7	2-4

5. İzolatların sıcaklık toleranslarının araştırılması

İzolatların gelişebildikleri sıcaklık değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla test suşlarının 10°C, 15°C, 25°C, 35°C, 37°C ve 45°C’de inkübasyon işlemleri gerçekleştirildi. İzolatların geliştiği minimum, optimum ve maksimum sıcaklık değerleri, spektrofotometrede OD₆₀₀ nm’de ölçüm yapılarak tespit edildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. İzolatların geliştiği sıcaklık değerleri

İZOLAT	10°C	15°C	25°C	35°C	37°C	45°C
EK1	-	+	+	+	+	-
EK2	-	-	-	+	+	-
EK3	-	+	+	+	+	-
EK4	-	-	+	+	+	-
EK5	-	+	+	+	+	+
EK6	-	+	+	+	+	-
EK7	-	-	+	+	+	-

6. İzolatların pH toleranslarının araştırılması

Elde edilen izolatların, pH 3, pH 5, pH 7, pH 9 ve pH 11’deki gelişimlerine bakılarak, test suşlarının gelişebildikleri gösterdikleri minimum, optimum ve maksimum pH değerleri, spektrofotometrede OD₆₀₀ nm’de ölçüm yapılarak tespit edildi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. İzolatların gelişebildikleri pH değerleri

İZOLAT	pH: 3	pH: 5	pH: 7	pH: 9	pH: 11
EK1	-	-	+	+	-
EK2	-	+	+	-	-
EK3	-	+	+	+	+
EK4	-	+	+	-	-
EK5	-	-	+	+	-
EK6	-	+	+	-	-
EK7	-	+	+	-	-

7. Katalaz testi

Katalaz testi sonucuna göre; 2 izolatın (EK3 ve EK6) katalaz pozitif, 5 izolatın ise bu enzimi içermeyerek, negatif oldukları gözlemlendi.

8. Oksidaz testi

Oksidaz testi sonucuna göre; sadece 1 izolatın (EK3) oksidaz pozitif olduğu, 6 izolatın ise negatif olduğu belirlendi.

9. Glikozdan gaz üretim testi

Glikozdan gaz üretim testi yapılarak izolatların gaz üretim potansiyellerine bakıldı. Bu teste göre sadece bir bakterinin (EK4) gaz ürettiği, diğer 6 bakterinin ise üretmediği belirlendi. Gaz üreten EK4 bakterisine ait görüntü Şekil 4.3'te verilmiştir. İzolatların gaz üretim potansiyelleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Heterofermantatif EK4 bakterisine ait bir görüntü

Çizelge 4.4. İzolatların gaz üretim potansiyelleri

İZOLAT	GAZ ÜRETİMİ
EK1	Homofermantatif
EK2	Homofermantatif
EK3	Homofermantatif
EK4	Heterofermantatif
EK5	Homofermantatif
EK6	Homofermantatif
EK7	Homofermantatif

4.3. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılarının Yapılması

1. Genomik DNA izolasyonu

İzolatların moleküler yöntemler kullanılarak tanıların yapılabilmesi için, ilk olarak Promega wizard^R genomic DNA purification kit (A1125) kullanılarak, genomik DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra elde edilen DNA'lar agaroz jelde yürütüldü ve jel dökümantasyon sistemi kullanılarak saflıkları incelendi.

2. rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

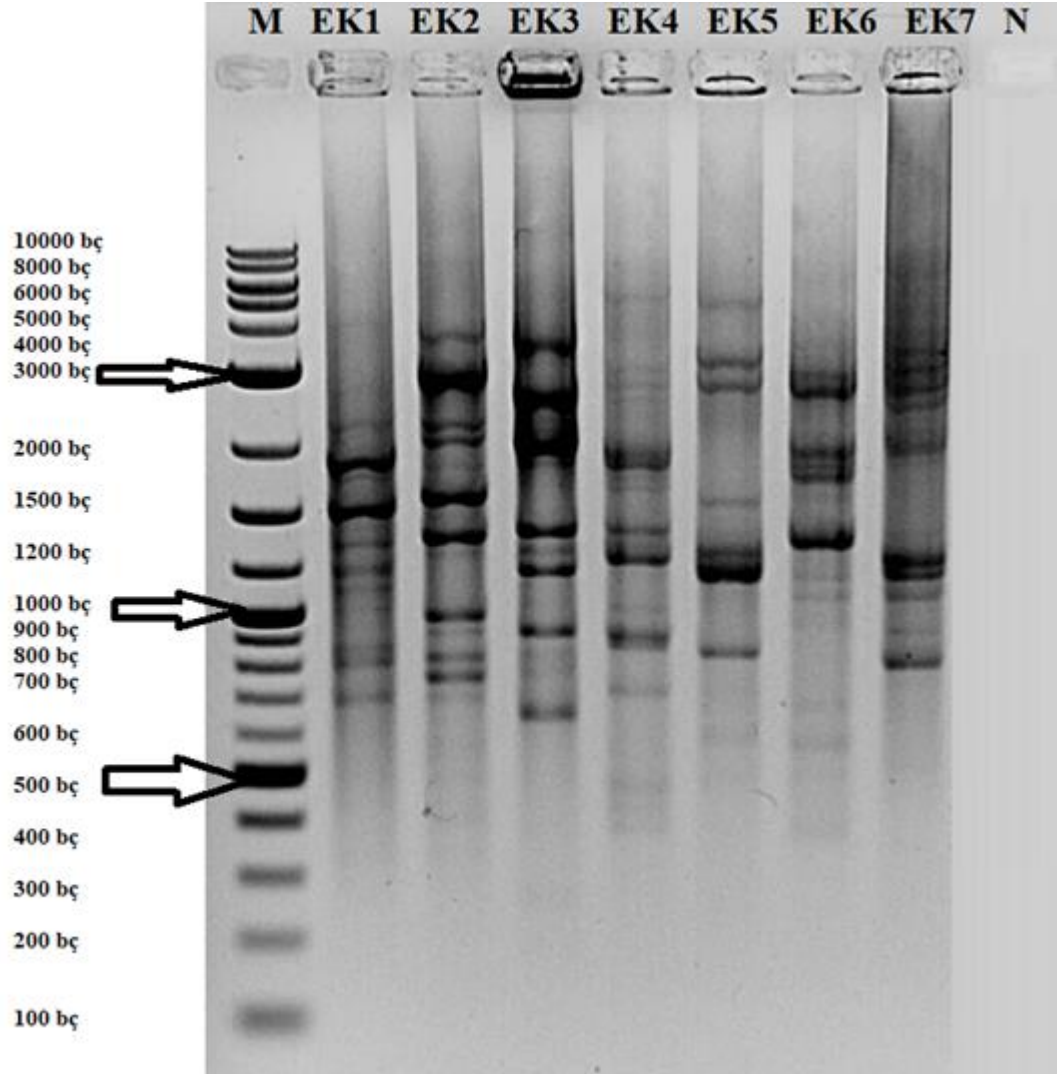
Tez çalışmasının başlangıcında toplanan sucuk örneklerinden izole edilen 103 izolat rep-PCR [(GTG)₅-PCR ve BOX-PCR] analizine tabi tutuldu ve araştırma birbirinden farklı olduğu düşünülen 7 test suşu üzerinde gerçekleştirildi.

a. BOX-PCR

BOX A1R primeri kullanılarak yapılan rep-PCR analizi sonucunda, elde edilen bantlar test suşları arasındaki ayrımı net bir şekilde vermediğinden, bir diğer genomik parmak analizi olan (GTG)₅-PCR'e geçilmiştir.

b. (GTG)₅-PCR

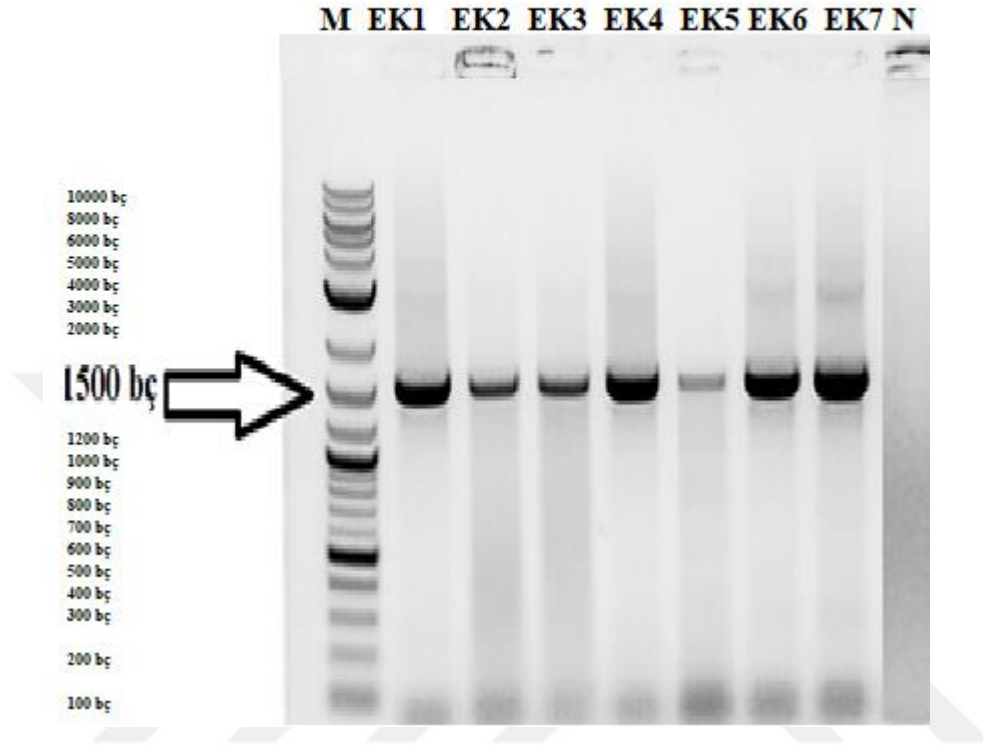
(GTG)₅-PCR analizi sonucunda; 103 test suşundan 7 tanesinin farklı tür olabileceği düşünülmüş ve bu örnekler jelde yürütülerek, genomik parmak izi profilleri belirlenmiştir. Buna göre; bu suşların 600-5000 bp arasında değişen, minimum 12 ve maksimum 15 polimorfik bant içerdiği, gıda kökenli izolatlar arasındaki ayrımı bu yöntemin net bir şekilde ortaya koyduğu tespit edildi. İzolatlara ait (GTG)₅-PCR bant profilleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



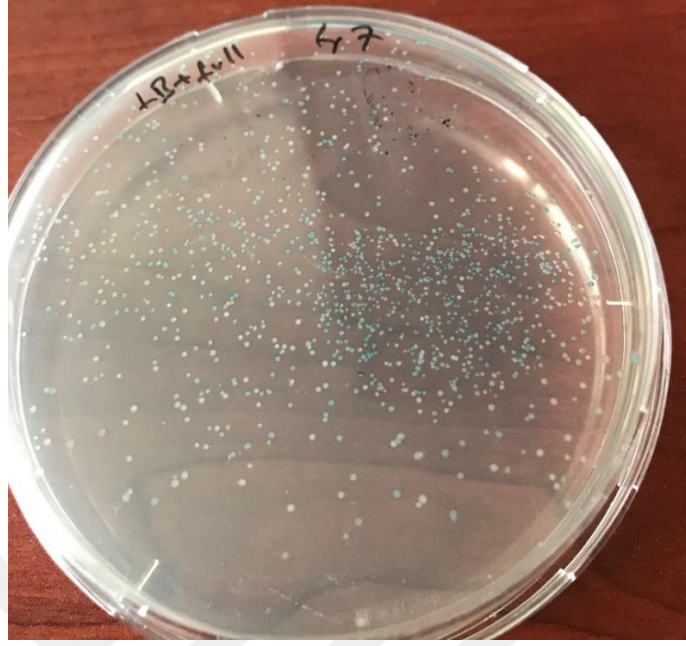
Şekil 4.4. İzolatlara ait (GTG)₅-PCR bant profilleri (M:DNA Markır; N:Negatif Kontrol)

3. 16S rRNA PCR işlemi ve klonlama

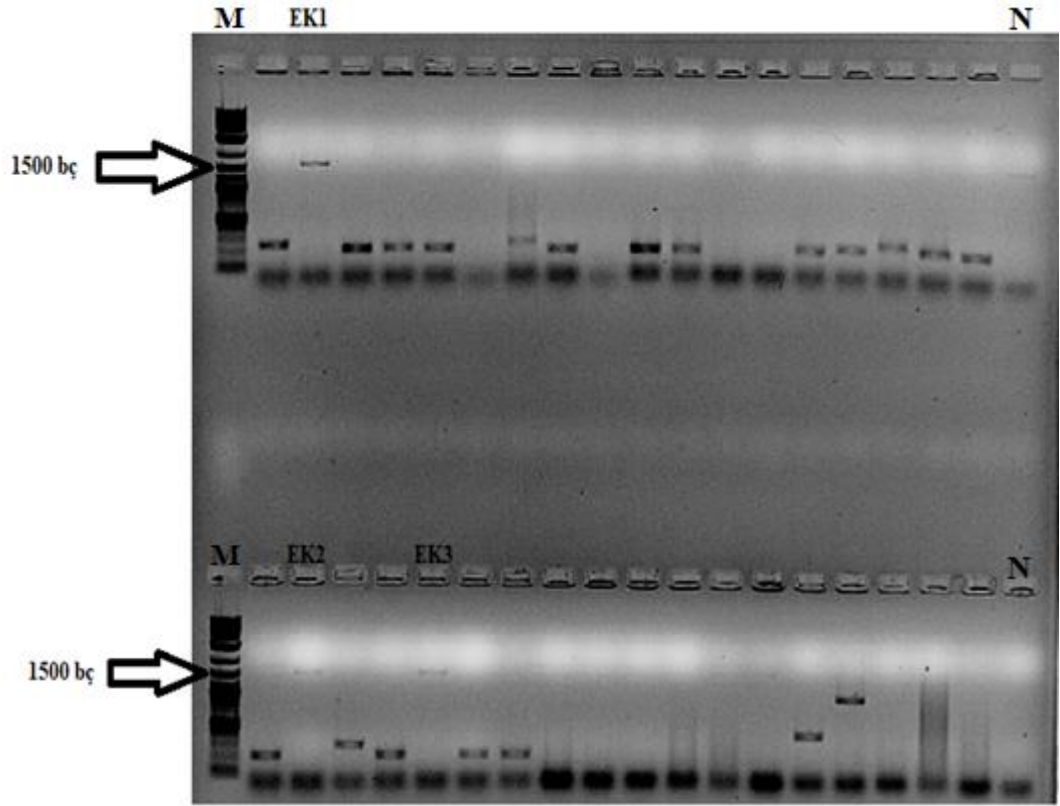
Bakterilerde bulunan 16S rRNA gen bölgesi, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak çoğaltıldı. İkinci adımda elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek, bant profilleri incelendi. Sonuç olarak tüm izolatların 1500 bç büyüklüğünde tek bir bant içerdiği gözlemlendi (Şekil 4.5). pGEM®-T vektör sistemi ile istenen bölge klonlanarak (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7), sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.



Şekil 4.5. İzolatlara ait 16S rRNA PCR bant profilleri (M:DNA Markır; N:Negatif Kontrol)



Şekil 4.6. Mavi beyaz kolonilerin petri görüntüsü



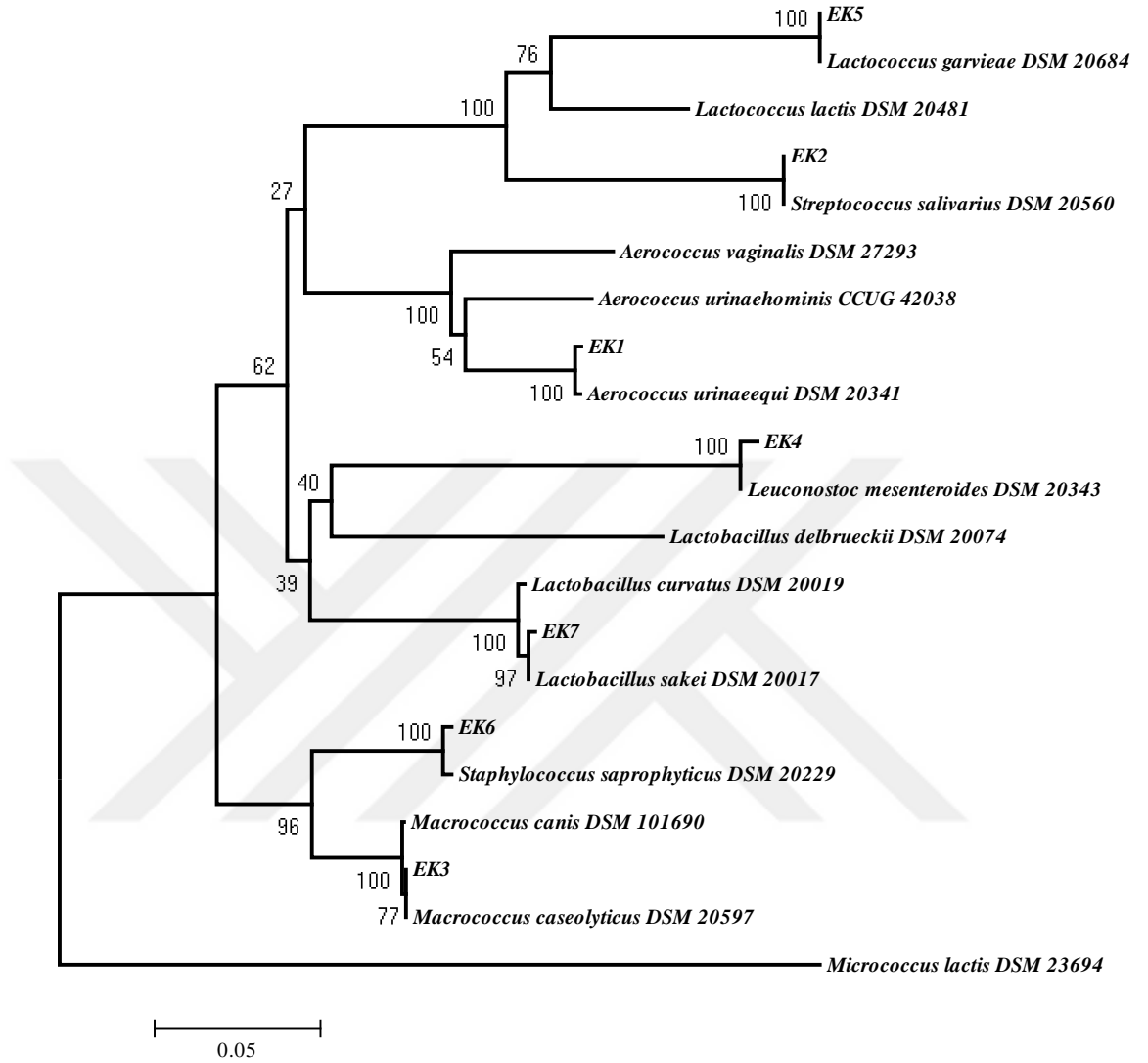
Şekil 4.7. Bazı kolonilere ait bant profilleri (M:DNA Markır; N:Negatif Kontrol)

4. DNA dizi analiz sonuçları

(GTG)₅-PCR analizi sonucunda farklı olduğunu düşündüğümüz 7 izolatın, 16S rRNA sekans analizi yapılarak, GenBank ve EzTaxon'da var olan diğer bakteriyel 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı. EK1'in *Aerococcus urinaeequi*, EK2'nin *Streptococcus salivarius*, EK3'ün *Macrococcus caseolyticus*, EK4'ün *Leuconostoc mesenteroides*, EK5'nin *Lactococcus garvieae*, EK6'nın *Staphylococcus saprophyticus* ve EK7'nin *Lactobacillus sakei*'ye benzediği tespit edildi (Çizelge 4.5). Ayrıca, bu izolatların buldukları taksonomik pozisyonlar dikkate alınarak, gen bankasında yer alan yakın türlerle aralarındaki ilişkileri ortaya koymak amacıyla MEGA 5 paket programı kullanılarak, neighbour-joining programıyla 16S rRNA gen bölgeleri baz alınarak filogenetik analizleri yapıldı (Şekil 4.8).

Çizelge 4.5. Test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları

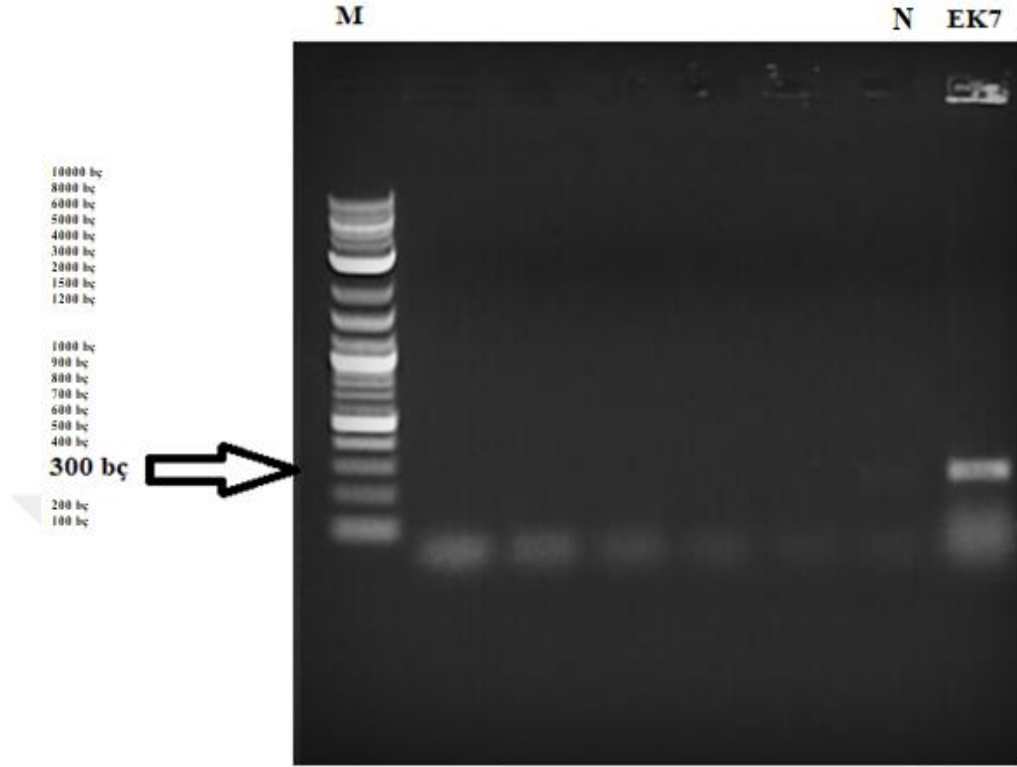
İzolat Kodu	Benzerlik Gösteren Tür	Benzerlik Oranı (%)	GenBank Erişim Numarası
EK1	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	99,86	MN045012
EK2	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	99,86	MN045013
EK3	<i>Macrococcus caseolyticus</i> subsp. <i>hominis</i>	99,32	MN045011
EK4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	99,72	MN045173
EK5	<i>Lactococcus garvieae</i> subsp. <i>garvieae</i>	99,17	MN094108
EK6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	99,93	MN045172
EK7	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	99,93	MN045009



Şekil 4.8. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan sucuk örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA gen analiz sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987) filogenetik ağaç (Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi. Ölçek çubuğu %0.5 sapmayı temsil etmektedir. *Micrococcus lactis* dış grup olarak kullanılmıştır).

4.4. Bakteriyosin Varlığının Tespiti

İzolatların bakteriyosin üretme potansiyelleri spesifik PCR kullanılarak analiz edildi. Yapılan bu PCR işleminin sonucunda elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. EK7'nin Sakasin gen bölgesinin bant profili (M:DNA Markır; N:Negatif Kontrol)

4.5. Test İzolatlarının Antagonistik Özelliklerinin Araştırılması

Agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak, test izolatlarının farklı patojenik mikroorganizmalara karşı olan antagonistik etkileri araştırıldığında, EK4 kodlu organizmanın; *E. faecalis* ATCC 29212, *S.dysenteriae* ATCC 13313, EK7'nin ise *E.faecalis* ATCC 29212 ve *E.coli* O157:H7 ATCC 35150 'nin üzerine etkili olduğu gözlemlendi (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.6).



Şekil 4.10. Disk difüzyon testi sonucu meydana gelen zonlar

Çizelge 4.6. Çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı test izolatlarının antagonistik etkisi

SUŞ	<i>E. faecalis</i>	<i>E.coli</i> O157: H7	<i>S.dysenteriae</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>S.aureus</i>
EK1	-	-	-	-	-	-	-
EK2	-	-	-	-	-	-	-
EK3	-	-	-	-	-	-	-
EK4	+	-	+	-	-	-	-
EK5	-	-	-	-	-	-	-
EK6	-	-	-	-	-	-	-
EK7	+	+	-	-	-	-	-

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Güvenilir gıdalar, insanların büyüme ve gelişmelerinde oldukça önemlidir. Gıdaların güvenilir olması için, proses uygulamalarından uzak durulması ve doğal katkı maddelerinin kullanımı gerekmektedir (Kurt ve Zorba 2005). Bu doğal katkı maddelerinden biri olan bakteriyosinler, hem patojen hem de bozulmaya neden olan mikroorganizmaları inhibe ederek, gıdaların korunmasında rol oynar (Uylaşer vd 2008).

Et ve et ürünlerinin dayanıklılığının ve besin değerinin arttırılmasında kullanılan fermantasyon tekniği önemli bir gıda maddesi olan sucuğun hazırlanmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Adıgüzel 2008). Sucuğun üretiminde, genellikle güvenli (GRAS) gıda sınıfı olarak kabul edilen laktik asit bakterileri (LAB) önemli rol oynamaktadır. Bu mikroorganizmalar, gıdalara kendine has tat, koku ve yapı kazandırmanın yanısıra, ürettikleri metabolitlerle de koruyucu etki gösterirler (Evren vd 2011).

Bu bilgiler ışığında, Türkiye'nin farklı yörelerinden temin edilen sucuk örnekleri kullanılarak 103 adet bakteriyal suş izole edilmiştir. Konvensiyonel analizlere göre farklı olduğu düşünülen 7 bakteri ile yola devam edilip, bu bakterilerin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Konvensiyonel analizlerden olan tuz tolerans testi ile izolatların %2, %4, %6, %8, %10 ve %12'lik değişen NaCl konsantrasyonlarındaki büyümeleri incelendi. İzolatlardan EK1, EK2, EK4 ve EK7 suşlarının %2-4'te, gelişim gösterdiği belirlenirken, EK5'in %4-6, EK6'nın %4-8 ve EK3'ün (*Macrococcus caseolyticus*) ise %4-10 tuz konsantrasyonlarında gelişim gösterdiği belirlendi. Karani *et al.* (2015) bu tez çalışmasına paralel olarak, *M. caseolyticus* suşunun %8 gibi yüksek tuz varlığında gelişim gösterdiğini ortaya koymuştur. Díaz *et al.* (2002) yaptıkları çalışmada; halofilik ya da halo-tolerans mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere etmelerinden ötürü, bu organizmaların remediasyonda oldukça önemli olduklarını belirttiler. Bu bilgi dikkate alındığında, normalde LAB olmayan, insan ve hayvanda patojen etki

göstermeyen, EK3 (*M. caseolyticus*) bakterisinin yüksek tuz konsantrasyonlarında dahi yaşamsal fonksiyonlarını sürdürmelerinden dolayı, biyoteknolojik proseslerde yaygın olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

İzolatların gelişebildiği sıcaklık değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan çalışmada, 10°C, 15°C, 25°C, 35°C, 37°C ve 45°C sıcaklıklar kullanıldı. Bu tezde izolatların hepsi 35°C ve 37°C'de gelişim gösterirken, izolatların hiçbiri 10°C'de gelişim göstermedi. İzolatlardan EK5'in (*Lactococcus garvieae*) 45°C'de gelişim gösterdiği gözlemlendi. Ramirez-Chavarin *et al.* (2013) yaptıkları çalışmada, termotolerant laktik asit bakterilerinin sucuk gibi pişirilen gıdalarda dominant flora haline gelerek, biyokoruyucu ajan olarak görev aldıklarını bildirmiştir. Varsha and Nampoothiri (2016) yaptıkları bir çalışmada, *Lactococcus garvieae* bakterisinin 42°C'de gelişim gösterdiğini tespit etti. Bu tez çalışmasında da literatür verilerine paralel olarak, *L. garvieae*'nin 45°C'de gelişim gösterdiği belirlendi.

İzolatların gelişebildiği pH değerlerini belirlemek amacıyla, pH: 3, 5, 7, 9 ve 11 değerlerinde denemeler yapıldı. Bunun sonucunda; izolatların tamamının pH 7'de gelişim gösterdiği, pH 3'te ise gelişmediği tespit edildi. İzolatlardan EK3'ün (*M. caseolyticus*), diğerlerinden farklı olarak pH 11'de gelişim gösterdiği belirlendi. Bu tezdeki verilere paralel olarak, Schleifer and Kloos (1975) yaptıkları çalışmada, *Staphylococcus saprophyticus*'un optimum pH aralığının 5-6,8 olduğunu, Mataragas *et al.* (2003), *Leuconostoc mesenteroides*'in optimum pH'sını 5.5, Felis *et al.* (2005), *Aerococcus urinaeequi*'nin optimum pH aralığının 8,5-9 olduğunu, Roger *et al.* (2011), *Streptococcus salivarius* bakterisinin optimum pH aralığının 6-7 olduğunu, Rimaux *et al.* (2012), *Lactobacillus sakei*'nin optimum pH'sını 6, Altun vd. (2013), *Lactococcus garvieae*'nin pH'sını 9,6, Karani *et al.* (2015), *Macroccoccus caseolyticus* bakterisinin optimum pH aralığının 6-11 olduğunu tespit ettiler. Dhakar and Pandey (2016) yaptıkları çalışmada, geniş pH aralığında da gelişme potansiyeline sahip olan bakteri, arke ve ökaryot organizmaların endüstriyel açıdan oldukça önemli olan biyoproseslerde kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Bu bilgi dikkate alındığında, EK3 (*M. caseolyticus*)

suşunun geniş pH aralığında gelişim göstermesinden dolayı, önemli bir biyoteknolojik ajan olarak kullanılabilceği sonucuna varıldı.

Yapılan konvensiyonel analizler sonucunda, EK3'ün (*M. caseolyticus*) oksidaz pozitif, EK6'nın (*S. saprophyticus*) ise negatif olduğu, EK3 ve EK6'nın katalaz pozitif özellik gösterdiği, elde edilen literatür bilgileriyle (Schleifer and Kloos 1975, Mašlaňová *et al.* 2018) benzerlik gösterdiği tespit edildi. Test izolatlarının glikozdan gaz üretme potansiyellerini tespit etmek amacıyla yapılan analizlerin sonucunda, EK4 (*L. mesenteroides*) izolatının literatür verilerine (Weymarn *et al.* 2002) paralel olarak gaz ürettiği yani heterofermentatif özellik gösterdiği tespit edildi.

Tür ve alt tür ayırımında kullanılan rep-PCR yöntemlerinden olan BOX-PCR işlemi yapıldıktan sonra, elde edilen bant profillerine bakıldığında, test izolatları arasındaki ayrımı net bir şekilde ortaya koyamadığından dolayı, (GTG)₅-PCR yöntemine geçildi. Literatür verilerine (Gevers *et al.* 2001) paralel olarak, (GTG)₅-PCR'ın BOX-PCR'a göre gıda kökenli test suşları arasındaki ayrımı istenen düzeyde sergilediği gözlemlendi. Švec *et al.* (2011) yaptıkları çalışmada, gıda örneklerinden izole edilen laktobasillerin identifikasyonunda, (GTG)₅-PCR yönteminin oldukça etkin olduğu, yani gıda fermantasyon endüstrilerinde önemli olan laktobasiller ve diğer laktik asit bakterilerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasına imkan sağladığını tespit ettiler.

Test izolatlarının 16S rRNA sekans analizi sonucunda; EK1'in %99,86 *Aerococcus urinaeequi*'ye, EK2'nin %99,86 *Streptococcus salivarius*'a, EK3'ün %99,32 *Macroccus caseolyticus*'a, EK4'ün %99,73 *Leuconostoc mesenteroides*'e EK5'nin %99,17 *Lactococcus garvieae*'ye, EK6'nın %99,93 *Staphylococcus saprophyticus*'a ve EK7'nin %99,93 oranında *Lactobacillus sakei*'ye benzerlik gösterdiği tespit edildi. Literatür verilerine (Madigan and Martinko 2009) paralel olarak %97'nin üzerinde sekans benzerliği gösteren izolatların aynı türe ait olabileceği sonucuna varıldı.

Son aşamada ise elde edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme potansiyelleri araştırıldı. Bunun sonucunda PCR işlemi gerçekleştirilerek, *Lactobacillus sakei* izolatının

sakasin olarak adlandırılan bakteriyosin gen bölgesini taşıdığı belirlendi. Sawa *et al.* (2013) yaptıkları çalışmada, tezimize paralel olarak *L. sakei* bakterisinin sakasin gen bölgesini 240 bç civarında olduğunu ortaya koydular. Daha sonra bu suşların patojenik bakteriler üzerinde antagonistik etki gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Sonuç olarak EK4, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ve *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313), EK7 ise *Enterococcus faecalis* ve *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 35150) üzerinde antagonistik etki gösterirken, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)'a karşı etkili olmadıkları tespit edildi. Savadogo *et al.* (2004) yaptıkları çalışmada, fermente bir süt ürününden *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactococcus* izole etmiş, agar disk difüzyon testi ile de *E. faecalis*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı olan antagonistik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışma ile tezdeki sonuçlarımız karşılaştırıldığında; EK4'ün (*L. mesenteroides*) *E. faecalis*'e karşı literatür verilerine paralel olacak şekilde antagonistik etki gösterdiği belirlendi.

Yapılan bu tez çalışmasına bakılarak elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

- ✓ rep-PCR yöntemlerinden, (GTG)₅-PCR'in BOX-PCR'a göre laktik asit bakterilerin identifikasyonunda daha etkili olduğu,
- ✓ Çalışılan izolatlardan EK1'in (*Aerococcus urinaeequi*) sucuk örneğine bulaşmış olabileceği,
- ✓ Çalışılan izolatlardan EK6 (*Staphylococcus saprophyticus*) ve EK3'ün (*Macroccoccus caseolyticus*) koagülaz negatif olmasından dolayı nitraz redüktaz enzimi ile nitratı nitrite indirgediği ve nitrosomyoglobin oluşumuna neden olarak et ürününde kırmızı rengin oluşumunda ve stabilitesinde önemli rol oynadıkları,
- ✓ Çalışılan izolatlardan EK7'nin (*Lactobacillus sakei*) sakasin gen bölgesini taşıdığı,
- ✓ Çalışılan izolatlardan EK4 (*Leuconostoc mesenteroides*) ve EK7 (*Lactobacillus sakei*)'nin *Enterococcus faecalis*, *Shigella dysenteriae* ve *Escherichia coli* O157:H7 üzerinde antagonistik etki gösterdiği gözlemlendi.

KAYNAKLAR

- Adams, M.R. and Moss, M.O., 2004. Food Microbiology Second Edition. The Royal Society of Chemistry 2000, s 312-313, UK.
- Adams, M.R. and Moss, M.O., 2004. Food Microbiology Second Edition. The Royal Society of Chemistry 2000, s 317, UK.
- Adams, M.R. and Moss, M.O., 2004. Food Microbiology Second Edition. The Royal Society of Chemistry 2000, s 344, UK.
- Adıgüzel, G. ve Atasever, M., 2009. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. Romanian Biotechnological Letters, 14(1), 4130-4138.
- Adıgüzel, G., 2008. Fermente Türk Sucuğundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M., 2009. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 25(1-2), 59-70.
- Altun, S., Onuk, E.E., Çiftçi, A., Büyükekiz, A.G., Duman, M., 2013. Phenotypic, Genotypic Characterisation and Antimicrobial Susceptibility Determination of *Lactococcus garvieae* Strains. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 19(3), 375-381.
- Alvarez-Cisneros, Y.M., Fernández, F.J., Wachter-Rodarte, C., Aguilar, M.B., Sáinz Espuñes, T.R., Ponce-Alquicira, E., 2010. Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* MXVK29, isolated from Mexican traditional sausage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(14), 2475–2481.
- Ammor, M.S. and Mayo, B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Science, 76(1), 138-146.
- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, Bhalla, T.C., 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. Food Science and Technology, 66, 428-435.
- Arbulu, S., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Campanero, C., del Campo, R., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2016. Evaluation of bacteriocinogenic activity, safety traits and biotechnological potential of fecal lactic acid bacteria (LAB), isolated from Griffon Vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*). BMC Microbiology, 16(1), 228.
- Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic *Staphylococci* from artisanal low-acid sausages. Applied and Environmental Microbiology, 69(8), 4583-4594.

- Baltacı, Ö., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I., Biron, E., 2018. Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. *Scientific Reports*, 8, 9029.
- Čanak, I., Markov, K., Melvan, E., Starčević, A., Živković, M., Zdravec, M., Pleadin, J., Jakopović, Ž., Kostelac, D., Frece, J., 2018. Isolation and characterisation of *L. plantarum* O1 producer of Plantaricin as potential starter culture for the biopreservation of aquatic food products. *Food Technology & Biotechnology*, 56(4), 581-589.
- Casaburi, A., Di Martino, V., Ferranti, P., Picariello, L., Villani, F., 2016. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*, 59, 31-45.
- Champagne, C.P., da Cruz, A.G., Daga, M., 2018. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Food Science*, 22, 160-166.
- Chen, H. and Hoover, D.G., 2003. Bacteriocins and Their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 82-100.
- Chen, Y.S., Wu, H.C., Kuo, C.Y., Chen, Y.W., Ho, S., Yanagida, F., 2017. Leucocin C-607, a Novel Bacteriocin from the Multiple-Bacteriocin-Producing *Leuconostoc pseudomesenteroides* 607 Isolated from Persimmon. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 148–156.
- Chiorean, S., Vederas, J.C., van Belkum, M.J., 2018. Identification and heterologous expression of the sec-dependent bacteriocin Faeroicin MK from *Enterococcus faecium* M3K31. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(2), 142–147.
- Clarridge III, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *American Society For Microbiology*, 17(4), 840-862.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1-20.
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., Tomás-Pejó, E., 2018. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 12(2), 290–303.
- de la Fuente-Salcido, N.M., Castañeda-Ramírez, J.C., García-Almendárez, B.E., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R., Barboza-Corona, J.E., 2015. Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M- Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México. *Food Science & Nutrition*, 3(5), 434–442.
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki, A., 2016. 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiology*, 16, 105.
- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2010. Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria Warfare:

- Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Marine Drugs*, 8(4), 1153-1177.
- Dhakar, K. and Pandey, A., 2016. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2499-2510.
- Díaz, M.P., Boyd, K.G., Grigson, S.J., Burgess, J.G., 2002. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(2), 143-153.
- Díaz-Ruiz, G., Omar, N.B., Abriouel, H., Martínez Cañamero, M., Gálvez, A., 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* EC52 in a meat sausage model system. *African Journal of Microbiology*, 6(6), 1103-1108.
- Diep, D.B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., Nes, I.F., 2009. An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30(8), 1562–1574.
- Erkmen, O. (Ed.), 2010. Gıda Mikrobiyolojisi. Efil yayınevi, s 19, Ankara.
- Erkmen, O. (Ed.), 2010. Gıda Mikrobiyolojisi. Efil yayınevi, s 411, Ankara.
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S., 2011. Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9(1), 11-17.
- Felis, G.E., Torriani, S., Dellaglio, F., 2005. Reclassification of *Pediococcus urinaeequi* (ex Mees 1934) Garvie 1988 as *Aerococcus urinaeequi* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1325–1327.
- Franciosa, I., Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Cocolin, L., 2018. Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. *International Journal of Food Microbiology*, 279, 26-32.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based Strategies for Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 51-70.
- Gao, Y., Li, D., Liu, X., 2014. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages. *Food Control*, 35, 1-6.
- Gaspar, A.M. and Fraqueza, M.J., 2016. Bacteriocinogenic activity of lactic acid bacteria isolates against potential pathogenic microbiota and evaluation of EK13 enterocin on the survival of *Listeria innocua*. *Semantic Scholar*.
- Gautam, N. and Sharma, N., 2009. Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian J Microbiol*, 49(3), 204–211.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 31-36.
- Gonzalez, C.F. and Kunka, B.S., 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10), 2534-2538.
- Guder, A., Wiedemann, I., Sahl, H.G., 2000. Posttranslationally Modified Bacteriocins-The Lantibiotics. *Biopolymers*, 55, 62-73.
- Hoover, D.G., Walsh, P.M., Kolaetis, K.M., Daly, M.M., 1988. A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with a 5.5-Megadalton plasmid. *Journal of Food Protection*, 51(1), 29-31.
- Hugas, H., 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49, 139-150.

- Karani, M., Shashidhar, R., Kakatkar, A., Gautam, R.K., Sukhi, S., Pansare-Godambe, L., Bandekar, J., 2015. Radiation-resistant *Macroccoccus caseolyticus* (A) isolated from radiation-processed semidried prawns. *Canadian Journal of Microbiology*, 61, 89–92.
- Kaur, J., Lee, S., Sharma, A., Park, Y.S., 2017. DNA profiling of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from fermented foods and farm produce in Korea by repetitive element PCR. *Food Science Biotechnology*, 26(6), 1667–1673.
- Khodaei, M. and Soltani Nezhad, S.H., 2018. Isolation and molecular identification of bacteriocin-producing *Enterococci* with broad antibacterial activity from traditional dairy products in Kerman province of Iran. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(1), 172-179.
- Kimoto-Nira, H., 2018. New lactic acid bacteria for skin health via oral intake of heat-killed or live cells. *Animal Science Journal*, 89(6), 835-842.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120.
- Kumariya, R., Garsa, A.K., Rajput, Y.S., Sood, S.K., Akhtar, N., Patel, S., 2019. Bacteriocins: Classification, Synthesis, Mechanism of Action and Resistance Development in Food Spoilage Causing Bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177.
- Kurhan, Ş. ve Çakır, İ., 2017. Laktik asit bakterilerinin Aflatoksin B1 bağlayıcı ve antikanserojen özellikleri. *Gıda The Journal Of Food*, 42(6), 809-820.
- Kurt, Ş. ve Zorba, Ö., 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16(1), 77-83.
- Lewus, C.B., Kaiser, A., Montville, T.J., 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1683-1688.
- López-Cuellar, M.R., Rodríguez-Hernández, A.I., Chavarría-Hernández, N., 2016. LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30, 1039-1050.
- Lv, X., Miao, L., Ma, H., Bai, F., Lin, Y., Sun, M., Li, J., 2017. Purification, characterization and action mechanism of plantaricin JY22, a novel bacteriocin against *Bacillus cereus* produced by *Lactobacillus plantarum* JY22 from golden carp intestine. *Food Science Biotechnology*, 27(3), 695–703.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., 2009. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Onbirinci Baskıdan Çeviri, s 324-325.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2017. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*. Palme Yayıncılık, Ondördüncü Baskıdan Çeviri, s 355-356, Ankara.
- Maldonado-Barragán, A., Cárdenas, N., Martínez, B., Ruiz-Barba, J.L., Fernández-Garayzábal, J.F., Rodríguez, J.M., Gibello, A., 2013. Garvicin A, a Novel Class IId Bacteriocin from *Lactococcus garvieae* That Inhibits Septum Formation in *L.garvieae* Strains. *American Society For Microbiology*, 79(14), 4336-4346.
- Markowiak, P. and Śliżewska, K., 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.

- Martinez, F.A., Balciunas, E.M., Converti, A., Cotter, P.D., de Souza Oliveira, R.P., 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances*, 31(4), 482-488.
- Mašlaňová, I., Wertheimer, Z., Sedláček, I., Švec, P., Indráková, A., Kovařovic, V., Schumann, P., Spröer, C., Králová, S., Šedo, O., Křištofová, L., Vrbovská, V., Füzik, T., Petráš, P., Zdráhal, Z., Ružičková, V., Doškař, J., Pantuček, R., 2018. Description and Comparative Genomics of *Macrococcus caseolyticus* subsp. *hominis* subsp. nov., *Macrococcus goetzii* sp. nov., *Macrococcus epidermidis* sp. nov., and *Macrococcus bohemicus* sp. nov., Novel Macrococci From Human Clinical Material With Virulence Potential and Suspected Uptake of Foreign DNA by Natural Transformation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1178.
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., Drosinos, E.H., 2003. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64, 265–271.
- Meera, N.S. and Devi, M.C., 2012. Partial characterization and optimization of parameters for bacteriocin production by probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(2), 357-365.
- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.M., Dousset, X., 2013. *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36(2), 296-304.
- Mokoena, M.P., 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Moračanin, S.V., Turubatović, L., Škrinjar, M., Obradović, D., 2013. Antilisterial Activity of Bacteriocin Isolated from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* IMAU:10231 in the Production of Sremska Sausages: Lactic Acid Bacteria Isolation, Bacteriocin Identification and Meat Application Experiments. *Food Technology and Biotechnology*, 51(2), 247–256.
- Müller, D.M., Carrasco, M.S., Tonarelli, G.G., Simonetta, C.A., 2009. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* Ip 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 2031-2040.
- O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5-6), 593-604.
- Papagianni, M. and Sergelidis, D., 2013. Effects of the presence of the curing agent sodium nitrite, used in the production of fermented sausages, on bacteriocin production by *Weissella paramesenteroides* DX grown in meat simulation medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(1), 1-5.
- Pehlivanoğlu, H., Nazlı, B., İmamoğlu, H., Çakır, B., 2015. Piyasada Fermente Sucuk Olarak Satılan Ürünlerin Kalite Özelliklerinin Saptanması ve Geleneksel Türk Fermente Sucuğu ile Karşılaştırılması. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 41(2), 191-198.
- Perczak, A., Goliński, P., Bryła, M., Waškiewicz, A., 2018. The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Arh Hig Rada Toksikol*, 69(1), 32-45.

- Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K., 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 3.
- Ramirez-Chavarin, M.L., Wachter, C., Eslava-Campos, C.A., Perez-Chabela, M.L., 2013. Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. *International Food Research Journal*, 20(2), 991-1000.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P., 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, 1(4), 218-228.
- Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology Third Edition*. CRC Press LLC, 2000, s 27, Florida.
- Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., Penna, A.L.B., 2012. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140.
- Rhee, S.J., Lee, J.E., Lee, C.H., 2011. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories*, 10(1), S5.
- Rimoux, T., Rivière, A., Illeghems, K., Weckx, S., De Vuyst, L., Leroy, F., 2012. Expression of the arginine deiminase pathway genes in *Lactobacillus sakei* is strain dependent and is affected by the environmental pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4874-4883.
- Roger, P., Delettre, J., Bouix, M., Béal, C., 2011. Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 631-41.
- Rzepakowska, A., Zielińska, D., Oldak, A., Kołożyn-Krajewska, D., 2017. Safety assessment and antimicrobial properties of the lactic acid bacteria strains isolated from polish raw fermented meat products. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2736–2747.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Sánchez-Hidalgo, M., Montalbán-López, M., Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., 2011. AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(17), 2845–2857.
- Sarı, B., 2016. Rize Ayder Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, Ksilanaz Enziminin *Geobacillus galactosidasius* BS61 Bakterisinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N., Traore, A.S., 2004. Antimicrobial activities of Lactic acid bacterial strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal Nutrition*, 3(3), 174-179.
- Sawa, N., Koga, S., Okamura, K., Ishibashi, N., Zendo, T., Sonomoto, K., 2013. Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 61-69.
- Schleifer, K.H. and Kloos, W.E., 1975. Isolation and Characterization of *Staphylococci* from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25(1), 50-61.

- Settanni, L. and Corsetti, A., 2008. Application of Bacteriocins in Vegetable Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123-138.
- Somarathna, T., Fernando, W.M.A.D.B., Ranaweera, K.K.D.S., Premakumara, G.A.S. Abeyasinghe, T., Weerakkody, N.S., 2018. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Alpinia malaccensis* (Ran-kiriya) against food-borne bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 125(5), 1276—1285.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K., Matošić, S., 2010. Antimicrobial Activity - The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307.
- Švec, P., Sedláček, I., Chrápavá, M., Vandamme, P., 2011. (GTG)₅-PCR fingerprinting of *Lactobacilli* isolated from cervix of healthy women. *Folia Microbiologica*, 56(1), 80–83.
- Şahin, İ. ve Başoğlu, F., 2011. Gıda Mikrobiyolojisi. Dora Yayınevi, s 53, Bursa.
- Şanlıbaba, P. ve Güçer, Y., 2015. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *Journal of International Scientific Publications*, 3, 1314-8591.
- Tayar, M. ve Hecer, C., 2010. Gıda Mikrobiyolojisi 2. Baskı. Dora Yayınevi, s 102, Bursa.
- TGK, 2000. Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği, Tebliğ No: 2000/4, Resmi Gazete, Sayı 23960, 42.
- Todorov, S.D., Stojanovski, S., Iliev, I., Moncheva, P., Nero, L.A., Ivanova, I.V., 2017. Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product 'lukanka'. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 48(3), 576-586.
- Turhan, Ö., 2010. Küflü Sucuklarda Mikrofloranın Belirlenmesi ve Küf Gelişmesi Üzerine Maya İzolatlarının Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Uylaşer, V., Parseker Yönel, S., Savaş, E., 2008. Doğal antimikrobiyal bir bileşik: bakteriyosin. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 10.
- Üstündağ, A.Ö. ve Özdoğan, M., 2011. Kanatlı hayvan beslemede bakteriyosinlerin kullanım olanakları. *Hayvansal Üretim*, 52(2), 69-73.
- Varsha, K.K. and Nampoothiri, K.M., 2016. *Lactococcus garvieae* subsp. *bovis* subsp. nov., lactic acid bacteria isolated from wild gaur (*Bos gaurus*) dung, and description of *Lactococcus garvieae* subsp. *garvieae* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 3805–3809.
- Vasilev, D., Aleksic, B., Tarbuk, A., Dimitrijevic, M., Karabasil, N., Cobanovic, N., Vasiljevic, N., 2015. Identification of lactic acid bacteria isolated from Serbian traditional fermented sausages Sremski and Lemeski Kulen. *Procedia Food Science*, 5, 300-303.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T.C., 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One*, 7(3), e33188.
- Venkadesan, D., Sumathi, V., 2015. Screening of lactic acid bacteria for their antibacterial activity against milk borne pathogens. *International Journal of Applied Research*, 1(11), 970-973.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5, 25–40.

- Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O., Moschetti, G., 2001. Detection and characterization of a bacteriocin, Garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *Journal of Applied Microbiology*, 90(3), 430-439.
- Weymarn, N., Hujanen, M., Leisola, M., 2002. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 37, 1207-1213.
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2016. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120, 118-132.
- Zacharof, M.P. and Lovitt, R.W., 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *Procedia APCBEE*, 2, 50-56.
- Zheng, S. and Sonomoto, K., 2018. Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(10), 4243–4253.
- Zielińska, D. and Kolożyn-Krajewska, D., 2018. Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties: review. *BioMed Research International*, 5063185, 15.
- Zommiti, M., Bouffartigues, E., Maillot, O., Barreau, M., Szunerits, S., Sebei, K., Feuilloley, M., Connil, N., Ferchichi, M., 2018. In vitro Assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16 isolated from artisanal Tunisian Meat “Dried Ossban”. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2607.

ÖZGEÇMİŞ

30.05.1992 yılında Erzurum’da doğdu. İlk öğrenimini Zonguldak’ta tamamladı. Orta ve lise öğrenimini ise Gaziantep’te tamamladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ne başlayıp, 2015 yılında mezun oldu. 2016 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

