



***Lactobacillus plantarum* S54'ÜN BAKTERİYOSİNİ OLAN
PLANTARİSİN GENİNİN EKSPRESYON PROFİLLERİNDE
ÇEVRE KOŞULLARINA VE GIDA PATOJENLERİNE
BAĞLI OLARAK MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Ceyda IŞIK

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

2018

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Lactobacillus plantarum S54'ÜN BAKTERİYOSİNİ OLAN
PLANTARİSİN GENİNİN EKSPRESYON PROFİLLERİNDE
ÇEVRE KOŞULLARINA VE GIDA PATOJENLERİNE BAĞLI
OLARAK MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI

Ceyda IŞIK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Genel Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***Lactobacillus plantarum* S54'ÜN BAKTERİYOSİNİ OLAN PLANTARİSİN
GENİNİN EKSPRESYON PROFİLLERİNDE ÇEVRE KOŞULLARINA VE
GIDA PATOJENLERİNE BAĞLI OLARAK MEYDANA GELEN
DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Ceyda IŞIK tarafından hazırlanan bu çalışma, 02/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Üye : Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ

Üye : Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Üye : Doç. Dr. Furkan ORHAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

İmza :

İmza :

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 22/03/2018 tarih ve 12/17 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: TAGEM-13/ARGE/6

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

Doktora Tezi

***Lactobacillus plantarum* S54'ÜN BAKTERİYOSİNİ OLAN PLANTARİSİN GENİNİN EKSPRESYON PROFİLLERİNDE ÇEVRE KOŞULLARINA VE GIDA PATOJENLERİNE BAĞLI OLARAK MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Ceyda IŞIK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada, sucuk kökenli laktik asit bakterisi olan *L. plantarum* S54 (Genbank No: KR011002) bakterisinden kısmi saflaştırma ile bakteriyosin elde edildi ve *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *M. luteus* ve *S. aureus* gibi gıda patojenleri üzerine antimikrobiyal aktivitesine bakıldı. Daha sonra bilinen plantarisinlerin üretimi için genleri taşıyıp taşımadığını belirlemek amacıyla farklı plantarisin genlerine özel primerler kullanılarak PCR analizi yapıldı. *L. plantarum* S54 bakterisi MRS Broth besiyeri kullanılarak farklı pH (3, 5, 6 ve 9), sıcaklık (20°C, 30°C, 40°C ve 60°C), NaCl tuz konsantrasyonu (%3, %6 ve %9) ve son olarak gıda patojenleri (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB) varlığında geliştirildi. Klasik PCR uygulaması sonucunda *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genleri tespit edildi. Real Time PCR uygulamasıyla bu şartlar altında geliştirilen bakterilerden elde edilen cDNA'ların klasik PCR uygulamasında pozitif sonuç veren primer çiftleri ile plantarisin geninin ekspresyon profillerinde meydana gelen değişimlerin araştırılması gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda farklı koşullar altında bakılan bakteriyosin üretiminin gerçekleşmesinde kullanılan gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerinde en fazla katkı sağlayan genlerin *plnB* ve *plnC* (Sinyal iletim yolu için), *plnE*, *plnJ* ve *plnK* (bakteriyosin kodlamak için) ve *plnN* (tek peptidli bakteriyosin sentezinde bilinmeyen rolleri olan gen) genleri olduğu görüldü. Bu durum, *L. plantarum* S54 bakterisinin farklı ekolojik koşullarda veya besin paylaşımı için diğer türlere karşı verilen mücadelede avantajlı konuma geçebilme durumlarında bu gen bölgelerinin de koşullara bağlı olarak aktive olabileceği izlenimini uyandırmaktadır.

2018, 111 sayfa

Anahtar Kelimeler: Gen ekspresyonu, Bakteriyosin, Real Time PCR, Laktik asit bakterisi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETERMINATION OF CHANGES IN EXPRESSION PROFILES OF PLANTARICIN BACTERIOCIN GENE IN *Lactobacillus plantarum* S54 IN RESPONSE TO ENVIRONMENTAL CONDITIONS AND IN PRENCE OF FOOD PATHOGENS

Ceyda IŞIK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of General Biology

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In this study, bacteriocin was obtained by partial purification from the *L. plantarum* S54 (Genebank Nu: KR011002) bacterium, a sausage -based lactic acid bacteria and antimicrobial activity was assessed on food pathogens such as *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB. Then, determining the genes whether or not to carry known genes for plantaricins production; PCR analysis was performed by using specific primers with the individual plantaricin genes in the literature. *L. plantarum* S54 bacterium was grown in the MRS broth by using in the presence of different pH (3, 5, 6 ve 9), temperature (20°C, 30°C, 40°C ve 60°C), NaCl salt concentration (%3, 6% and 9%) and finally with food pathogens (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB). In classical PCR, positive results were observed with the primers used for the *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* genes. Real Time PCR was used to investigate the changes in the expression profiles with primer pairs of plantaricin gene that gave positive results in the classical PCR of bacterial cDNAs developed under these conditions. According to the obtained results, the expression levels of gene regions used in the realization of bacteriocin production under different conditions, the most contributing genes are *plnB* and *plnC* (for signal transduction pathway) *plnE*, *plnJ* and *plnK* (to encode bacteriocin) and *plnN* (gene with unknown roles in the synthesis of single-peptide bacteriocin) genes. As a consequence of that the species *L. plantarum* S54 can be in different ecological conditions or in the case of being able to take advantageous position in the fight against other species for food sharing. It also gives the impression that these gene regions may also be active depending on the circumstances.

2018, 111 pages

Keywords: Gene expression, Bacteriocins, Real Time PCR, Lactic acid bacteria

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarında yürütölmüştür.

Araştırmanın planlanmasından yürütölmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Atatürk Üniversitesi Rektör Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye ve Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Abdulgani TATAR'a, Sayın Doç. Dr. Furkan ORHAN'a, Sayın Arř. Gör. Dr. Mehmet KARADAYI'ya, Sayın Arř. Gör. Dr. Gökçe KARADAYI'ya, Sayın Uzman Moleküler Biyolog Nurdan BALTACI'ya, çalışmalarımın farklı aşamalarında yardımlarını gördüğüm, Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a, Sayın Dr. Burak ALAYLAR'a, Sayın Uzman Biyolog Selin DOĐAN'a, Sayın Uzman Biyolog Selma SEZEN'e, Sayın Biyolog Semra YAĐCI'ya, Sayın Uzman Biyolog Taha Yasin KOÇ'a, Sayın Uzman Biyolog Abdussamed Yasin DEMİR'e, Sayın Kimyager Mine İSAOĞLU'na, Sayın Çevre Mühendisi Ekrem GÜLLÜCE'ye ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarı ekibine teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında destek ve teşviklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Murat İŐIK'a, annem Gülşen BOZOĞLU'na, babam Tuncer BOZOĞLU'na kız kardeşim Büşra GÜNDOĞDU'ya ve erkek kardeşim Emre BOZOĞLU'na kendilerinden görmüş olduğum destek ve güvenden dolayı teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Ceyda İŐIK

Őubat, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1. Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri.....	6
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılamasında Kullanılan Teknikler.....	9
2.2.1. Laktik asit bakterilerin fenotipik karakterizasyonu.....	11
2.2.2. Laktik asit bakterilerinin genotipik karakterizasyonu.....	12
2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sistematiği.....	27
2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik Ürünleri.....	28
2.5. Bakteriyosinler.....	30
2.5.1. Tarihçe.....	32
2.5.2. Bakteriyosinlerin mikrobiyal orijini.....	33
2.5.2.a. Arkelerden elde edilen bakteriyosinler.....	33
2.5.2.b. Gram negatif bakterilerden elde edilen bakteriyosinler.....	33
2.5.2.c. Gram pozitif bakterilerden elde edilen bakteriyosinler.....	34
2.5.3. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması.....	37
2.5.3.a Sınıf I bakteriyosinler.....	38
2.5.3.b. Sınıf II bakteriyosinler.....	39
2.5.3.c. Sınıf III bakteriyosinler.....	40
2.5.4. Bakteriyosinlerin biyolojik özellikleri.....	41
2.5.5. Bakteriyosinlerin teknolojik uygulamaları.....	43
2.5.5.a. Bakteriyosinler ve tedavi edici olarak kullanım potansiyelleri.....	43
2.5.5.b. Bakteriyosinler ve gıda uygulamaları.....	43
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	49
3.1. Materyal.....	49
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	49

3.1.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	50
3.1.3. Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması	51
3.1.4. Çalışmada kullanılan bakteri	53
3.2. Yöntem	53
3.2.1. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin gelişimi	53
3.2.2. Sıcaklık uygulamasının <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	53
3.2.3. pH uygulamasının <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	53
3.2.4. Tuz Konsantrasyonunun <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	54
3.2.5. Gıda patojeni varlığında geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	54
3.2.6. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin genomik DNA'sının izolasyonu	54
3.2.7. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinde var olduğu bilinen plantarisin genlerin PCR yardımı ile çoğaltılması	56
3.2.8. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinden bakteriyosinin kısmi olarak saflaştırılması ...	59
3.2.9. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinden saflaştırılan bakteriyosinin gıda patojenlerine karşı etkisinin araştırılması	60
3.2.10. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinden RNA izolasyonu	60
3.2.11. cDNA kütüphanesinin oluşturulması	61
3.2.12. cDNA için revers transkriptaz (RT-PCR) kullanılması	61
3.2.13. Real-Time PCR kullanılarak gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	62
3.2.14. Verilerin analiz edilmesi	63
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	64
4.1. <i>L. plantarum</i> S54 Bakterisinin Gelişimi	64
4.2. Sıcaklık uygulamasının <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	64
4.3. pH uygulamasının <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	64
4.4. Tuz Konsantrasyonunun <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	65
4.5. Gıda patojenlerinin varlığında geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon üzerine etkisi	65

4.6. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinde var olduğu bilinen plantarisin genlerinin PCR amplifikasyon sonuçları	65
4.7. <i>L. plantarum</i> S54 Bakterisinden Bakteriyosinin Kısmi olarak Saflaştırılması ...	67
4.8. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinden saflaştırılan bakteriyosinin gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisi.....	68
4.9. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin Real-Time PCR'daki gen ekspresyon sonuçları.....	70
4.9.1. Farklı sıcaklıklarda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin geninin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	70
4.9.2. Farklı pH'larda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin geninin ekspresyon seviyeleri	72
4.9.3. Farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin geninin ekspresyon seviyeleri	75
4.9.4. Gıda patojenlerinin varlığında geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin geninin ekspresyon seviyeleri	78
4.10. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin bakteriyosin genlerinin Real-Time PCR'daki gen ekspresyon sonuçlarının kıyaslanması	81
4.10.1. Farklı sıcaklıklarda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması	81
4.10.2. Farklı pH'larda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması	83
4.10.3. Farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması	84
4.10.4. Gıda patojenleri varlığında geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması	86
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	89
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	112

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

(H ₃ BO ₃)	Borik Asit
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
°C	Derece (Sıcaklık)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre (10 ⁻⁶)
µM	Mikromolar
bp (bç)	Base pair (Baz çifti)
CTAB	Hexadecyl trimetil-ammonium bromide
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
g	Gram
GRAS	Genellikle kullanımında herhangi bir sakınca bulunmayan
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterisi
M	Molar
ml	Mililitre (10 ⁻³)
mM	Milimolar
MRS Broth	De Man, Rogosa, Sharpe Broth
NaCl	Sodyum klorür
NB	Nutrient Broth
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodasil sülfat
TBE	Tris-EDTA borat tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
TSA	Tryptic Soy Agar
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kullanma mekanizması	8
Şekil 2.2. Biyolojik örneklerden yapılan Real-time PCR şeması	21
Şekil 2.3. SYBR Green yönteminin temel prensibi	22
Şekil 2.4. Taqman Prob yönteminin temel prensibi.....	23
Şekil 2.5. Moleküler boncuk yönteminin temel prensibi.....	24
Şekil 2.6. Hibridizasyon prob yönteminin temel prensibi	25
Şekil 4.1. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinde bakteriyosin üretimini sağlayan genlere ait primerlerin PCR jel görüntüleri.....	66
Şekil 4.2. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinde bakteriyosin üretimini sağlayan genlere ait primerlerin PCR jel görüntüleri.....	66
Şekil 4.3. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinde bakteriyosin üretimini sağlayan genlere ait primerlerin PCR jel görüntüleri.....	67
Şekil 4.4. <i>L. plantarum</i> S54 bakteri süpernatantının patojen mikroorganizma olan <i>Micrococcus luteus</i> NCIMB karşı gösterdiği antimikrobiyal etki	69
Şekil 4.5. <i>L. plantarum</i> S54 bakterisinden kısmi saflaştırılmış olan bakteriyosin örneğinin patojen mikroorganizmalara (<i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>L. monocytogenes</i> C3970, <i>B. cereus</i> 11778 ve <i>M. luteus</i> NCIMB) karşı gösterdiği antimikrobiyal etkisi.....	69
Şekil 4.6. Kontrol grubu ve farklı sıcaklıklarda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnB</i> ve <i>plnC</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	70
Şekil 4.7. Kontrol grubu ve farklı sıcaklıklarda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnD</i> ve <i>plnE</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	71
Şekil 4.8. Kontrol grubu ve farklı sıcaklıklarda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnJ</i> , <i>plnK</i> ve <i>plnN</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	72

Şekil 4.9. Kontrol grubu ve farklı pH'larda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnB</i> ve <i>plnC</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	73
Şekil 4.10. Kontrol grubu ve farklı pH'larda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnD</i> ve <i>plnC</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi.....	73
Şekil 4.11. Kontrol grubu ve farklı pH'larda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnJ</i> , <i>plnK</i> ve <i>plnN</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi.....	74
Şekil 4.12. Kontrol grubu ve farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnB</i> ve <i>plnC</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi.....	75
Şekil 4.13. Kontrol grubu ve farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnD</i> ve <i>plnE</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi.....	76
Şekil 4.14. Kontrol grubu ve farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnJ</i> , <i>plnK</i> ve <i>plnN</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	77
Şekil 4.15. Kontrol grubu ve <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>L. monocytogenes</i> C3970, <i>B. cereus</i> 11778 ve <i>M. luteus</i> NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnB</i> ve <i>plnC</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	78
Şekil 4.16. Kontrol grubu ve <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>L. monocytogenes</i> C3970, <i>B. cereus</i> 11778 ve <i>M. luteus</i> NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnD</i> ve <i>plnE</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi.....	79
Şekil 4.17. Kontrol grubu ve <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>L. monocytogenes</i> C3970, <i>B. cereus</i> 11778 ve <i>M. luteus</i> NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin <i>plnJ</i> ,	

	<i>plnK</i> ve <i>plnN</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	80
Şekil 4.18.	Kontrol grubu ve <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>L. monocytogenes</i> C3970, <i>B. cereus</i> 11778 ve <i>M. luteus</i> NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin bakteriyosin yapısal geni olan <i>NC8</i> ve <i>S</i> genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi.....	81
Şekil 4.19.	20°C ve 30°C’de geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan <i>plnN</i> , <i>plnJ</i> , <i>plnK</i> , <i>plnE</i> , <i>plnB</i> , <i>plnD</i> ve <i>plnC</i> genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması	82
Şekil 4.20.	40°C ve 60°C’de geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan <i>plnN</i> , <i>plnJ</i> , <i>plnK</i> , <i>plnE</i> , <i>plnB</i> , <i>plnD</i> ve <i>plnC</i> genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması	82
Şekil 4.21.	pH 3.0, pH 5.0 ve pH 6.0’da geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan <i>plnN</i> , <i>plnJ</i> , <i>plnK</i> , <i>plnE</i> , <i>plnB</i> , <i>plnD</i> ve <i>plnC</i> genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması	83
Şekil 4.22.	pH 7.0 ve pH 9.0’da geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan <i>plnN</i> , <i>plnJ</i> , <i>plnK</i> , <i>plnE</i> , <i>plnB</i> , <i>plnD</i> ve <i>plnC</i> genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması	84
Şekil 4.23.	%0 ve %3 NaCl tuz konsantrasyonunda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan <i>plnN</i> , <i>plnJ</i> , <i>plnK</i> , <i>plnE</i> , <i>plnB</i> , <i>plnD</i> ve <i>plnC</i> genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması.....	85
Şekil 4.24.	%6 ve %9 NaCl tuz konsantrasyonunda geliştirilen <i>L. plantarum</i> S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan <i>plnN</i> , <i>plnJ</i> , <i>plnK</i> , <i>plnE</i> , <i>plnB</i> , <i>plnD</i> ve <i>plnC</i> genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması.....	85

- Şekil 4.25.** *B. cereus* 11778 ve *E. coli* ATCC 25922 gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD*, *plnC*, *NC8* ve *S* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması 86
- Şekil 4.26.** *L. monocytogenes* C3970 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD*, *plnC*, *NC8* ve *S* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması 87
- Şekil 4.27.** *S. aureus* ATCC 29213 gıda patojeni ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD*, *plnC*, *NC8* ve *S* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması 87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Laktik asit bakterilerinin tanılanmasında kullanılan DNA tabanlı teknikler	12
Çizelge 2.2. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkili metabolik ürünleri	28
Çizelge 2.3. Laktik asit bakterilerinden elde edilen bazı önemli bakteriyosinler	35
Çizelge 2.4. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması	38
Çizelge 2.5. Bazı bakteriyosinler ve bunların insan sağlığında kullanılan farmasötik uygulamalarının örnekleri.....	43
Çizelge 2.6. Gıdada bakteriyosin verimi ve sınırlayıcı faktörler	45
Çizelge 2.7. Gıda endüstrisinde potansiyel bakteriyosin uygulamaları.....	46
Çizelge 3.1. Tez dahilinde kullanılan kimyasal maddeler ve kitler.....	49
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların listesi	50
Çizelge 3.3. Plantarisinin üretimini sağlayan genlerin belirlenmesi için kullanılan PCR primerleri ve koşulları	57

1. GİRİŞ

Günümüzde hızlı nüfus artışı, şehir hayatının getirdiği yoğun iş temposu, sık seyahat etme zorunluluğu nedeniyle insanlar çoğu kez sadece kolay hazırlanabilen ve ayaküstü yenilen hazır gıdaları veya fast-food tarzı yiyecekleri tüketmek zorunda kalmaktadırlar. Hazır gıdaların raf ömrünü uzatmak, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin daha iyi hale getirilmesi amacıyla gıdalara çok sayıda kimyasal koruyucu katılmaktadır. Ancak bu tür yiyeceklerin içerdiği katkı maddelerinin sağlık üzerine oluşturduğu olumsuz etkiler daha doğal ve daha sağlıklı yiyeceklere doğru büyük bir talep oluşturmuştur. Bu nedenle hem sağlıklı hem de doğru beslenmenin temelini oluşturan doğal fermente gıdaların tüketimi gün geçtikçe artmaktadır. Fermente gıdaların üretiminde vazgeçilmez unsur olan starter kültürlerin büyük bir çoğunluğunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. Laktik asit bakterileri sadece fermantasyonla gıdanın yapısını, tadını ve aromasını oluşturmakla kalmaz, aynı zamanda son yıllarda üzerinde çok fazla sayıda araştırma yapılan doğal antimikrobiyal maddeleri de sentezlerler. Laktik asit bakterileri; Gram pozitif, çubuk veya kok şeklinde özellik gösteren ve çok çeşitli türleri içeren prokaryotik mikroorganizmalardır. Heteretrof beslenme biçimine sahip olan bu mikroorganizmalar, fermantasyon sonunda laktik asit üretmeleri ile karakterize edilirler. Laktik asit bakterileri spor oluşturmazlar (*Sporolactobacillus inulinus* hariç) ve katalaz negatif özellik gösterirler (Axelsson 2004; Yerlikaya 2014). Diğer birçok anaerobik mikroorganizmanın aksine laktik asit bakterileri, oksijene karşı duyarlı değildirler. Bu durum, laktik asit bakterilerinin oksijen varlığında da gelişim gösterebilmelerini sağlamaktadır. Üretim endüstrisi açısından değer taşıyan bu özellikleri sayesinde başta süt ve et ürünleri olmak üzere birçok gıda ürünü yüzyıllardır özel bir ortam gerekmeksizin biyoteknolojik olarak işlenebilmektedir (Alan ve Dığrak 2012).

Peynir, yoğurt, tereyağ, kefir, kırmız gibi süt ürünlerinin, fermente sucuğun, boza, şalgam ve turşu gibi geleneksel gıdaların kendilerine has tat, koku ve aromalarının oluşumundan sorumlu en önemli faktörlerden birisi de bu ürünlerin olgunlaşma süreçlerine katılan spesifik laktik asit bakteri türleridir (Leroy and Vuyst 2004). Buna

ilaveten, bu ürünler üzerine yapılan çeşitli çalışmalar laktik asit bakterilerinin sindirim sistemi üzerine olumlu etki gösteren en önemli probiyotiklerden biri olduğunu ortaya koymuştur. En yaygın fermente gıdalardan olan yoğurttaki laktik asit bakterilerinin kolesterolü düşürmede etkili olduğu, kalın bağırsakta indol ve skatol gibi fenolik bileşikler üreterek canlı dokuya zarar veren ve ülserle neden olan bakterilerin üremesini inhibe ettiği, bağışıklık sistemini güçlendirdiği, kadınlarda hamilelik süresince ve sonrasında kan basıncını düzenleyici aktivite gösterdiği ve bunlar gibi birçok yararlı etkinin ortaya çıkmasında etkin rol oynadığı bilinmektedir.

Laktik asit bakterileri; ayrıca organik asit, diasetil, astoin, hidrojen peroksit, reuterin, antifungal peptidler ve bakteriyosinler gibi çok çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretebilme yeteneğine de sahiptirler. Taşıdıkları tüm bu özellikler laktik asit bakterilerinin gıda sektöründe; gıdaların mayalanması, tat, koku, yapı özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılmalarının dışında, ürettikleri metabolitlerin biyokontrol mekanizması, ortamda *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* gibi gıda patojenlerinin üremesine engel olmak amacıyla kullanılmalarına da imkan sağlar. Bu durum gıda kökenli bulaşıcı hastalıkların kontrolüyle halk sağlığı açısından ve mevcut gıdaların raf ömrünün uzatılmasına olanak sağlamasıyla ekonomik açıdan oldukça önemlidir (Kıran ve Osmanağaoğlu 2011).

Laktik asit bakterilerinin biyokoruma ajanları olarak kullanılmalarının ve teknolojik olarak geliştirilmelerinin birçok önemli gerekçesi vardır. Bu gerekçelerin başlıcaları, doğal yöntemlerin sağlık örgütleri tarafından daha güvenli kabul edilmesi, oluşacak ürünlerdeki besin değerleri kaybının azaltılması, raf ömrünü uzatırken işleme maliyetlerini düşürmesi ve patojen mikroorganizmaların biyokontrolünün sağlanması olarak sıralanabilir (Dinçer vd 2009).

Son yıllarda gerçekleştirilen birçok çalışma da özellikle artan antibiyotik dirençlerine çözüm olabilecek alternatif bir başlık olarak laktik asit bakterileri ve onların en önemli antimikrobiyal ürünleri sayılan bakteriyosinleri öne çıkarmıştır (Dinçer vd 2009). Laktik asit bakterilerinin ürettiği en önemli metabolitlerden biri olan bakteriyosinler;

GRAS (Generally Regarded as Safe – Genellikle kullanımında herhangi bir sakınca bulunmayan) statüsünde olan, ökaryotik hücrelere karşı aktif ve toksik olmayan, sindirim sırasında proteazlar tarafından inaktive edilen, genellikle düşük pH ve yüksek ısı değerlerine toleranslı, gıda kaynaklı patojen ve bozulmaya neden olan diğer bakteriler karşısında geniş inhibisyon etkisine sahip, genellikle sitoplazmik membran üzerinde aktif olan ve bakterisidal etki gösteren, genetik determinantları çoğunlukla plazmitlere kodlanmış olduğu için genetik manipulasyona uygun olan peptid yapılı bileşiklerdir (Galvez *et al.* 2007; Dinçer vd 2009).

Bir bakteriyosin preparatı olan Nisaplin (Nisin A) 1962-1965 yılları arasında geliştirilmiş olup, bakteriyosinlerin ilk ticari ekstraktıdır. Nisinin güvenilir olduğu ve insanlar tarafından tüketiminde hiçbir sakınca olmadığı 1962 yılında yapılan toksite testleri ile belirlenmiştir. Özellikle Sınıf II a bakteriyosinleri olan pediosin PA1 ve AcH, fermente etlerde bulunan *L. monocytogenes* kontaminasyonunu engellemek amaçlı kullanıldığı bilinmektedir (Dinçer vd. 2009). Günümüzde sıklıkla kullanıldığı bilinen nisin ve pediosine ek olarak *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen acidophilin ve lactocidin, *L. plantarum* tarafından üretilen lactocin gibi bakteriyosinlerin karakterizasyonu yapılmış ve antimikrobiyal özellikte oldukları kesinlik kazanmıştır (Thomas and Delves 2005). Bunlara ek olarak son zamanlarda laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinler olan lactocin 27, lactacin B, helveticin J (Joerger and Klaenhammer 1986), plantacin B ve plantaricin A ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır (Schillinger and Lücke 1989; Dinçer vd 2009).

Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterileri arasında patojenlere karşı en etkin bakteriyosin üretimini gerçekleştiren bakteri türlerinden birisinin *L. plantarum* olduğu belirlenmiştir. Özellikle fermente sucuklarda hakim floranın laktik asit bakterileri olduğu ve bunlar arasında da en fazla *L. plantarum*, *L. sakei* ve *L. curvatus* türlerinin bulunduğu bilinmektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin, et fermantasyonunun erken aşamalarında bir gıda patojeni olan *L. monocytogenes* sayısını azalttığı gözlenmiştir. Drosinos *et al.* (2007) yaptıkları çalışmada Güney Yunanistan'daki geleneksel fermente sucuklarda *L. plantarum* ve *L. sakei* türlerini

baskın olarak bulmuş ve bu türler arasından *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösteren 3 laktik asit bakteri suşu bildirmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda uygun şartlarda gıdalar üzerinde çoğalabilen ve toksin ürettikleri içinde ürünlerde kontaminasyon kaynağı olarak değerlendirilen, beyin zarı iltihabı ve menenjitte neden olan; *Staphylococcus aureus*'un bakteriyosinogenik strateji ile inhibe edilebileceği, özellikle *L. lactis* (Saelao *et al.* 2017), *L. acidophilus*, *L. fermentum* (Riaz *et al.* 2010) ve *L. plantarum* (Mukherjee and Ramesh 2015) türlerinin *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Deegan *et al.* 2006).

Yapılan çok sayıdaki mekanizma aydınlatma çalışması her bir türün kendine özgü bakteriyosinler ürettiğini ve bu bakteriyosinlerin ait oldukları temel sınıflardaki etki mekanizmalarından biriyle patojenlere karşı antagonistik etki yaptığını göstermiştir. Ayrıca son dönemlerde bakteriyosinogenik laktik asit bakterilerinin kendi gruplarına özgü olan birden fazla bakteriyosin genini genomlarında buldukları gözlenmiş ve bu özellikteki bakteriler multi-bakteriyosinogenik türler olarak tanımlanmıştır. Bu durum, multi-bakteriyosinogenik türlerin farklı ekolojik koşullarda veya besin paylaşımı için diğer türlere karşı verilen mücadelede avantajlı konuma geçebilme durumlarında bu gen bölgelerinin de koşullara bağlı olarak aktive olabileceği izlenimini uyandırmaktadır.

Azizi ve ekibinin 2017 yılında yapmış olduğu makalede elde edilen izolatlarla, bakteriyosin kodlayan genlere özgü primerler kullanılarak PCR analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda *L. plantarum* izolatlarında plantaricin A ve plantaricin EF genlerinin varlığı ve *Lactobacillus brevis* izolatlarında ise Brevicin 174A geninin varlığını ortaya koymuşlardır (Azizi *et al.* 2017) Yapılan bir diğer çalışmada ise farklı tuz konsantrasyonları altında yetiştirilen *Lactobacillus pentosus* B96 suşunda bakteriyosin genlerinin ekspresyonu incelenmiştir (Hurtado *et al.* 2011). Cho ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada ise potansiyel bakteriyosinogenik *L. plantarum* BFE 5092 bakterisinde bulunan 3 plantaricin geninin farklı sıcaklıklardaki ekspresyon seviyelerine bakılmıştır (Cho *et al.* 2010). Bu ve bunun gibi birkaç çalışma dışında literatürde büyük çeşitlilik gösteren bakteriyosinleri anlama hususunda moleküler yöntemlere dayalı yeterli sayıda araştırmanın bulunmadığı görülmektedir.

Literatürdeki bu eksikliğin giderilmesine katkı sağlamak amacıyla kurgulanan bu çalışmamızda sucuk kökenli *L. plantarum* S54 bakterisinin, seçilen farklı plantaricin geninin ekspresyon profillerinde çevre koşullarına (pH, sıcaklık, tuzluluk) ve gıda patojenlerine bağlı olarak meydana gelen değişimlerin araştırılması hedeflenmiştir. Bu bağlamda mevcut çalışmamızın elde edilecek bulguları ile multi-bakteriyosinjenik laktik asit bakterilerinin gıda işleme süreçlerinde kullanımının tek bir bakteriyosin üreten türlere kıyasla daha avantajlı olup olmadığının gösterilmesine; endüstriyel uygulamalarda *L. plantarum* S54 için çevresel limitlerin belirlenmesine ve bakteriyosin üretimi – çevre koşulları – patojen varlığı arasındaki etkileşimin aydınlatılmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

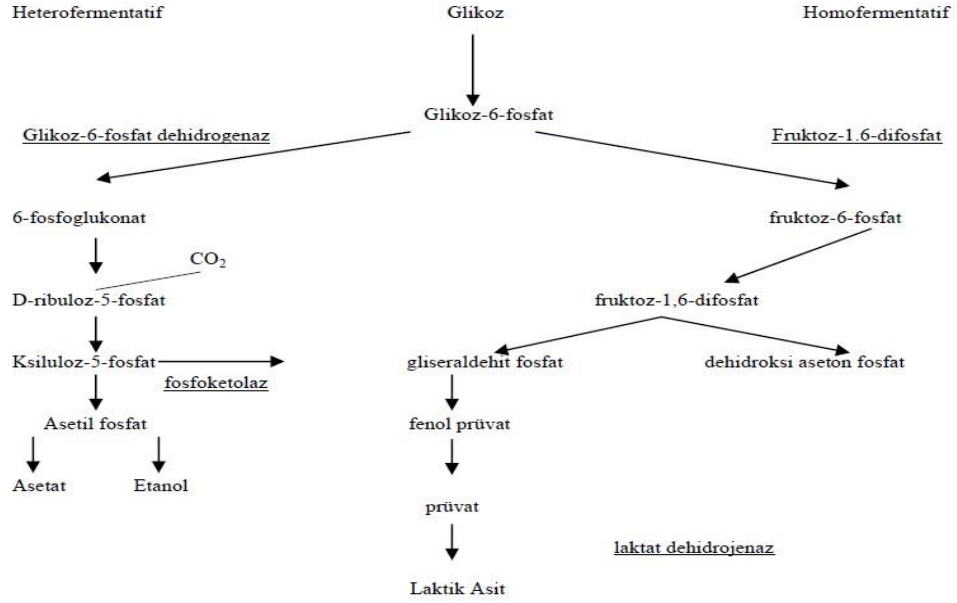
2.1. Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri

Binlerce yıldır fermente gıda ve alkollü içecek üretiminde kullanılan mikrobiyal kültürler, 20. yüzyılda çeşitli hastalıkları önleme ve tedavi etmedeki yetenekleri nedeniyle birçok bilimsel çalışmanın odak noktasını oluşturmuştur. Bu bilimsel çalışmalar sonrasında probiyotik terimi gün yüzüne çıkmıştır. Probiyotikler, yeterli miktarda kullanıldığında özellikle bağırsak florasında mikrobiyal dengeyi sağlayarak konakçıya fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar (WHO 2002). Çoğunlukla insan ve hayvan bağırsaklarından izole edilmiş olan ve probiyotik olarak seçilen bakteriler arasında *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* cinsleri bulunur. Fakat bağırsak sisteminde bulunmayan bazı laktik asit bakterileri (LAB) de probiyotik olarak kullanılabilirler. Bu bakteriler çoğunlukla süt ürünlerinde starterler olarak kullanılan *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleridir. Laktik asit bakterilerinin farklı tipleri, insan bağırsaklarındaki dengeyi farklı şekillerde etkileyebileceği için hangi mikroorganizmaların hangi mikrobik ekosistemde var olduğunu ve hangi türlerin potansiyel koruyucu etkiye sahip olduğunu belirlemek önemlidir. Ancak bu bakterilerin tür düzeyinde kesin olarak tanımlanması kolay bir iş değildir. Çünkü tanılama için *Lactobacillus* izolatlarının fenotipik yöntemlerin ve mevcut yaygın fermentasyon testlerinin ötesinde bakteri özelliklerinin belirlenmesi gerekir (Mohania *et al.* 2008).

Laktik asit bakterileri; özellikle yoğurt, kefir, turşu, salamura zeytin, sucuk, şarap gibi birçok fermente gıdanın üretiminde veya dayanıklılığının arttırılmasında yüzlerce yıldır kullanılan en önemli endüstriyel mikroorganizmalardır (Axelsson 2004). Bu mikroorganizmalar birçoğu insanların, hayvanların ve bitkilerin doğal ortamlarında hatta bünyelerinde doğal olarak bulunabilirler. Bu mikroorganizmaların insan ve hayvan sağlığı açısından tehdit oluşturmamalarının yanı sıra birçok patojen mikroorganizmanın gelişimini inhibe eden metabolitleri nedeniyle insan sağlığı açısından oldukça faydalıdırlar. LAB türleri Gram pozitif, fakültatif anaerob, sporsuz, çubuk, kok veya

kokobasil, oksidaz, jelatinaz, katalaz ve nitrat redüksiyonu negatiftir. Gelişim gösterebildikleri sıcaklıklar genellikle 2°C ile 50°C arasında iken optimum büyüme sıcaklıkları bir çok türünde 30-40°C'dir (Nousiainen 1998; Köseoğlu 2007).

Çoğu fakültatif anaerob mikroaerofilik olsa da, tüm laktik asit bakterileri anaerobik olarak da gelişebildiğinden, bu bakteriler çok geniş bir alanda varlıklarını sürdürmektedirler (Axelsson 2004; Köseoğlu 2007). LAB türleri glukoz fermentasyonlarının taşıdığı özelliklere göre; homofermentatif, fakültatif heterofermentatif, obligat heterofermentatif olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. Homofermentatif LAB türleri, heksoz şekerlerini Embden-Meyerhof glukolitik yoluna göre parçalar ve yalnızca ya da baskın olarak laktik asit oluştururlar. Pentozları ve glukonatu fermente etmezler. Homofermentatif özellik gösteren LAB türlerinin bazıları peynir, yoğurt ve probiyotik içeceklerde starter kültürü olarak kullanılan önemli bakterilerdir. Fakültatif heterofermentatif LAB türleri; heksozları Embden-Meyerhof yoluna göre, pentozları ve diğer bazı substratları ise fosfoketolaz enzim aktivitesine dayalı metabolik yola göre parçalarlar (Ouwehand 2002; Köseoğlu 2007). Bu metabolik faaliyetlerin sonucunda laktik asitin yanı sıra tipik olarak asetik asit ve etanol oluştururlar. Fakültatif heterofermentatif özellik gösteren LAB türlerinin bazıları geleneksel fermente ürünlerin ve silaj yemlerinin üretiminde kullanılır. Son grup olan zorunlu heterofermentatif LAB türleri ise şekerleri yalnızca fosfoketolaza dayalı metabolik yola göre parçalar ve fermentasyon sonucunda laktik asit ile birlikte önemli miktarda asetik asit ve/veya etanol ve CO₂ oluştururlar. Bu son grup genellikle besinlerin bozulmasına neden olan bakteriler olarak kabul edilirler. Gastrointestinal sistemde ve olgun peynirin de dahil olduğu değişik gıdalarda bu grup bakterilere rastlanabilir (Ouwehand 2002).



Şekil 2.1. Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kullanma mekanizması (Köseoğlu 2007)

Fermentasyonda izledikleri metabolik yolun özellikleri dışında, LAB türleri morfolojik özelliklerine (koloni şekli, koloni rengi, vb.), hangi sıcaklık aralığında gelişim gösterdiklerine ve optimum gelişme sıcaklıklarına (5-50°C), tuz konsantrasyonu toleranslarına, kullanabildikleri şeker kaynaklarına, hangi pH aralığında gelişim gösterdiklerine ve optimum gelişme pH'larına (3-9), sahip oldukları yağ asidi kompozisyonuna ve rRNA dizilimi gibi moleküler markırlara göre sınıflandırılmaktadır (Sezer 2007; Köseoğlu 2007). LAB türlerinin tanımlanmaları için klasik yöntemler ve moleküler yöntemlerle birlikte kullanılmaktadır. Bakterilerin sahip olduğu morfolojik ve fizyolojik özellikleri baz alınarak yapılan tanılamada bir ön ayırım yapmakla birlikte, değerlendirme aşamasında düzenli, standartlaşmış bir tanılama şemasının olmaması ve var olan şemalarda yeni türlerin yer almaması yüzünden yaşanan zorluklar nedeniyle klasik yöntemlerle birlikte moleküler tekniklerin kullanımı bir zorunluluk haline gelmiştir (Nousiainen 1998).

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılamasında Kullanılan Teknikler

Gıda üretiminde kullanılan LAB türlerinin probiyotik kapasiteleri suşlara bağlı olduğundan suş seviyesinde LAB türlerini tanılamada kullanılan yöntemlerin güvenilir olması özellikle onaylanmış suşların kalite kontrolü, sağlık riskleri ve yanıtıcı iddialardan kaçınılabilmesi ve yeni suşların tanılama çalışmaları için büyük önem taşımaktadır (Lick 2003; Callon *et al.* 2004; Mohania *et al.* 2008; Kıran ve Osmanağaoğlu 2011).

LAB tanılama çalışmaları, fenotipik yöntemlere kıyasla daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere kaymaktadır. Moleküler yöntemler filogenetik çalışmalarda mikroorganizmaların birbirleriyle akrabalığının belirlenmesinde çoğunlukla kullanılan yaklaşımlardandır (Kıran ve Osmanağaoğlu 2011). Moleküler yöntemler, ayırım gücüne sahip olmaları, tekrarlanabilirliğinin ve uygulamasının kolay olmasının yanında, sonuçların kesin yorumlanabilmesi nedeniyle de son dönemlerde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Moschetti *et al.* 1998; Bush *et al.* 1999).

Mikroorganizmaların tanılamasında kullanılan moleküler teknikler için kritik bir aşama da PCR'da amplifikasyon için kullanılacak gen ya da genetik belirleyicilerin seçimidir (Justé *et al.* 2008). Bununla beraber; 16S rRNA geni, yakın ilişkili türlerin tanılanmasında güçlükler gösterdiği için LAB türlerinin ayırımında uzatma faktörü, *Tu* geni, *rpoB* geni, *rpoA* geni, DNA rekombinaz geni (*RecA*) ve *pheS* geni gibi diğer hedef genlerden faydalanılmaktadır (Justé *et al.* 2005; Naser *et al.* 2005; Randazzo *et al.* 2009). Çeşitli gıda ürünlerinde bulunan LAB türlerinin cins, tür, veya suş düzeyinde spesifik olarak saptanmasında kullanılan en hızlı PCR yaklaşımı, örnekten ekstrakte edilen toplam bakteriyel DNA'sında hedef organizmaların PCR temelli saptanması için özel primerlerin kullanılmasıdır (Yerlikaya 2014).

Geleneksel Mısır Domiati peynirinde bakteriyel ekosistemin biyoçeşitliliği kalıp DNA olarak peynirden direkt olarak ekstrakte edilen DNA kullanımı ile türe özgü PCR kullanımıyla araştırılmıştır. Peynirdeki bakteriyel türlerin onaylanmasında otuz bir türe

özgü primer kullanılmıştır. Araştırmada, türe özgü PCR tekniği kullanılarak pek çok *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Staphylococcus* cinsi temsilcisi saptanmıştır (Yerlikaya 2014).

Bu yönteme ek olarak son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan yada diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Real-time PCR reaksiyon esnasında her bir PCR döngüsünde yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonda aşama aşama oluşan ürünü sonuna kadar kontrol eden bir sistemdir (Yerlikaya 2014).

İtalyan geleneksel ve endüstriyel peynirlerde hedef gen olarak bir fenilalanil-tRNA sentaz (*PheS*) kültürden bağımsız qPCR kullanımı *E. gilvus*'un varlığını ve miktarını değerlendirmek için optimize edilmiştir. *Enterococcus gilvus*'un diğer LAB türlerinden kesin olarak ayırt edilmesi belgelenmiş, böylelikle Real time-PCR tahlilinin kesin özgünlüğü ispatlanmıştır (Ongol *et al.* 2009; Zago *et al.* 2009). Yoğurt ve meyveli yoğurtlardaki *Streptococcus thermophilus* miktarını da Real-time PCR yöntemiyle belirlemişlerdir (Yerlikaya 2014). DNA temelli Real-time PCR yaklaşımlarına ek olarak, kültürlenme olmadan peynirden RNA ekstraksiyonu için bir yöntem geliştirmiş ve *L. lactis* için real-time ters transkripsiyon PCR yöntemi optimize edilmiştir (Monnet *et al.* 2008).

Kültüre bağımsız moleküler yaklaşımlarda hala süt ve süt ürünlerinin mikroflorasının belirlenmesi konusunda eksik kalan noktalar bulunmaktadır. Bu sebeple, bu yöntemlerde karşılaşılan saptama sınırlandırılmalarının giderilmesi için çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bunun yanında, gelecek yıllarda gıda ve süt kaynaklı laktik asit bakterilerinin analizi için yeni tekniklerin geliştirilmesi amacıyla yeni çalışmalara devam edilecektir. Özellikle Mikro array teknolojisinin uygulanmaya başlamasıyla

toplam genom sekanslamanın hızla gelişmesi tanılama ve saptama için yeni olanaklar sağlayacaktır (Yerlikaya 2014).

2.2.1. Laktik asit bakterilerin fenotipik karakterizasyonu

Laktik asit bakterilerinin tanılamasında en önemli ve ilk aşama mikroskopik morfolojileridir. Kok, çubuk, zincir, tetrad, kokobasil şekilde yapılan gruplandırmalardan sonra tolerans testleri uygulanır. Tolerans testlerinde ise MRS Broth içinde farklı pH değerlerinde, farklı sıcaklık değerlerinde ve farklı tuz konsantrasyonların da üreme kontrol edilir (Nousiainen 1998; Sezer 2007). Bu kriterler göz önünde bulundurularak genel bir gruplandırma ile laktik asit bakterileri cins bazında ayrılmış olur. Fenotipik tanılamada öncelikli kullanılan bir diğer teknik Gram reaksiyonu ve katalaz testidir. Gram pozitif, katalaz negatif olan izolatlar üzerinde özellikle mikroskopik morfolojileri, glukozdan gaz üretimi ve farklı ısılarda üreyebilme yetenekleri ayırma önemli kriterleri oluşturmaktadır. Orla ve Jensen 1919 yılında, *Lactobacillus*'ları; glukoz fermantasyonu boyunca şekillenen laktik asitin miktarını temel alarak homofermantatif ve heterofermantatif olarak, biyokimyasal reaksiyonları ve üreme sıcaklığını esas alarak da üç grupta (*Thermobacteria*, *Betabacteria* ve *Streptobacteria*) sınıflandırmışlardır. Yaygın olarak kullanılmakta olan bu sınıflandırmada; üreme sıcaklığı, pentozu fermente edebilme, glukozdan ya da glukonattan CO₂ üretebilme, tiyamine ihtiyaç, fermantasyonun homofermantatif ya da heterofermantatif tipi, fruktozu mannitole indirgeme, arjinin hidrolizi gibi test sonuçları esas alınır. Ancak fenotipik yöntemlerin tekrarlanabilirliğinin zayıf olması, çoğunlukla bakteri büyümesinin esnekliğinden kaynaklanan bazı tekniklerin belirsizliği yeni sınıflandırma yaklaşımı ihtiyacını doğurmuştur. Ayrıca son yapılan çalışmalar da LAB türlerinin karşılaştırmalı 16S ribosomal RNA (rRNA) sekans analizi temelindeki taksonomisi, fenotipik özelliklere dayalı olarak üretilen bazı taksonların filogenetik ilişkileri ile uyuşmadığını ortaya koymuştur (Mohania *et al.* 2008; Moraes *et al.* 2013). Moleküler teknikler, özellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) temelli yöntemler; rep-PCR parmak izi, Kesilen Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Pulsed-Field jel elektroforezi (PFGE) LAB suşlarının spesifik karakterizasyonu ve tespiti için

önemlidir. Yine 16S rDNA geninin ve onun rRNA ampikonlarının denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DGGE) ve sıcaklık gradyan jel elektroforezi (TGGE) analizinin, bakteri topluluğunun belirlenmesinde ve izlenmesinde güçlü yaklaşımlar olduğu gösterilmiştir (Mohania *et al.* 2008).

2.2.2. Laktik asit bakterilerinin genotipik karakterizasyonu

Pekçok farklı genotiplendirme tekniği genellikle tür seviyesinde sınıflandırılma için kullanılmaktadır. DNA tabanlı araştırma yöntemlerinin en önemli avantajları, ayırım gücüne ve evrensel uygulanabilirliğe sahip olmalarıdır. Benzer fenotipik özelliklere sahip olan yakın ilişkili suşlar; Rasgele Amplifiye Polimorfik DNA (RAPD), RFLP, DGGE ve TGGE ve çoğaltılmış rDNA'nın restriksiyon analizi (ARDRA) gibi DNA tabanlı tekniklerle güvenilir şekilde ayırt edilebilirler (Mohania *et al.* 2008; Yerlikaya 2014).

Çizelge 2.1. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan DNA tabanlı teknikler

	Teknik	Tanımlanan Türler	Referans
1.	Restriksiyon enzim analizi	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. reuteri</i>	Roussel <i>et al.</i> 1993 Ahrne and Molin 1997 Stahl and Molin 1994
2.	Pulse-Field Jel elektroforezi	<i>Bifidobacteria</i> <i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. sakei</i>	Roy and Ward 2004 Ferrero <i>et al.</i> 1996 Roussel <i>et al.</i> 1993 Klein <i>et al.</i> 1998 Giraffa and Neviani 2000
3.	Ribotipleme	<i>L. reuteri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i>	Ning <i>et al.</i> 1997 Rodtong and Tannock 1993 Chun <i>et al.</i> 2001
4.	RAPD profillemesi	<i>Bifidobacteria</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. casei</i>	Roy and Ward 2004 Du Plessis and Dicks 1995 Gardiner <i>et al.</i> 2002 Schillinger <i>et al.</i> 2003

Çizelge 2.1. (devam)

5.	Amplifiye rDNA restriksiyon Analizi	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. sakei</i>	Giraffa and Neviani 2000 Holzapfel <i>et al.</i> 2001 Wilson and Blitchington 1996
6.	Amplifiye Fragman Uzunluğu Polimorfizmi	<i>L. pentosus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. pseudoplantarum</i>	Giraffa and Neviani 2000
7.	Real- Time PCR	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i>	Haarman and Knol 2006 Kao <i>et al.</i> 2007

Ribozomal DNA ve Diğer Korunmuş Bölgelerin Sekans Analizi

Ribozomal DNA makromolekülleri evrim tarihinin belgeleri olarak tanımlanmış, onlarca yıldır organizmaların filogenetik çeşitliliğini ve evrimsel ilişkisini keşfetmek için kullanılan korunmuş gen bölgeleridir. 16S rRNA geni bakteri çeşitliliği çalışmalarında en çok kullanılan genidir. Bu gen, evrimin erken safhalarında kurulmuş ve çevresel baskılardan nispeten etkilenmemiş, sabit ve oldukça kısıtlı fonksiyonlara sahip iyi korunmuş evrensel bir ayıraçtır. Bu bilgiler doğrultusunda genin yapısı iyi bir evrimsel saat olarak da kabul edilir (Kimura *et al.* 1997). 16S rRNA geni iyi korunmuş bir evrensel belirteç olmasına rağmen, kullanımıyla ilgili bazı eksiklikler mevcuttur. İlk olarak, 16S rRNA genleri o kadar iyi korunmuşlardır ki sınırlı bir çözünürlük gücüne sahiptir (Achenbach *et al.* 2001). İkinci olarak; 16S rRNA geni evrensel bir ayraç olmasına rağmen, farklı bakteri türleri farklı gen kopya sayısına sahiptir. Bu durum, 16S rRNA geni hedef olarak kullanıldığında bazı bakteri türlerinin aşırı veya çok az temsil edilmelerine yol açar. Ek olarak, bakteri çeşitliliği çalışmalarında 16S rRNA genleri dışındaki pek çok gen de araştırılmıştır. Bunların bazıları, her bakterinin sahip olduğu evrensel genlerdir ancak yapılarında eşsiz genetik sekans farklılıkları mevcuttur. Bu evrensel genlerin çoğu, tüm bakterilerde benzer işlevleri yaptığı için korunmuştur. Evrensel genlerin kullanılmasının avantajı, bakteriyel türler arasında daha tutarlı kopya

sayısına sahip olması dolayısıyla bakteri türlerinin daha niceliksel olarak temsil edilmelerini sağlamalarıdır. Bu genlerin bazıları taksona özgüdür ve yakından ilişkili türler arasında daha büyük bir genetik çeşitlilik ortaya koymaktadır. Yani bu genler evrensel genlere kıyasla daha keskin filogenetik çözünürlük sağlarlar (Chang *et al.* 2001). Bu tür genlerin LAB türlerindeki örnekleri *Tu* geni, *rpoB* geni, *rpoA* geni, *recA* geni ve *pheS* geni (Naser *et al.* 2005; Justé *et al.* 2008; Randazzo *et al.* 2009), sülfat indirgeyen bakteriler için *dsr* geni, metanotroflar için *pmoA* geni ve siyanobakteriler için ise *nifH* geni verilebilir (Rosado *et al.* 1998; Mohania *et al.* 2008).

Moleküler Ribotiplendirme

Ribotiplendirme kavramı sadece ribozomal genleri tanımlamak için nükleik asit problemlerinin kullanımını ifade eder. Pratikte, bakterinin kromozomal DNA'sı elde edildikten sonra restriksiyon enzimleri vasıtasıyla küçük parçalara ayrılır ve ribozomal 16S ve 23S rRNA genlerine özgü problemlerle hibridizasyona tabi tutulur. Kromozomal DNA'nın parçalanması ve daha sonra agaroz jel elektroforezi yardımı ile birbirlerinden ayrılması, ardından DNA'nın membrana transfer edilip 23S ve 16S rRNA problemleriyle hibridize edilmesi yani Southern blotlama yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Genellikle, parmakizi motifleri restriksiyon analizi yöntemleri ile elde edilen analizlerden daha tekrarlanabilir ve daha kolay yorumlanabilir olmaktadır (Charteris *et al.* 1997). Bu yöntemin bir diğer avantajı, benzer ribozomal genlere sahip olmaları, tüm türler için evrensel bir prob olarak kullanılmalrı ve yüksek tekrarlanabilirlikleridir (Mohania *et al.* 2008).

Literatüre bakıldığında ribotiplendirme etkinliğini değerlendiren birçok bilimsel çalışma mevcuttur. Zhong ve arkadaşları, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* ve *L. fermentum* gibi *Lactobacillus* türleri ve referans suşları ile ribotiplendirmenin etkinliğini inceleyerek ribotiplendirmenin, suş seviyesinden ziyade tür seviyesinde yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu rapor etmiştir. Daha sonra, Chun ve arkadaşları mikrobik bir karakterizasyon sistemi olan Riboprinter Qualicon, Wilmington, DE, USA'nın otomatik ribotiplendirme cihazı ile *L. casei* ve *L.*

acidophilus grubunun 91 türünü ve referans suşlarını karakterize etmişlerdir. İki gruba ait suşların çoğunda, tür düzeyinde ayırım yapılabilmüş ve Riboprinter sisteminin birçok suşun tanımlanmasında hızlı, doğru ve tekrarlanabilir genetik bilgiye ulaşmamızı sağlayan bir yöntem olduğu kabul edilmiştir.

Çoğaltılmış Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA)

ARDRA esas olarak ribotiplendirme işleminin tersidir. Bununla birlikte, ribotiplendirme genellikle parmak izi içindeki 16S rRNA genlerini çevreleyen bölgelerin de dahil olması nedeniyle ARDRA'dan daha fazla ayırım gücü sağlamaktadır. Yine de bu yaklaşımla, *L. acidophilus* kompleksi, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* ve *L. sakei* gibi çeşitli türler veya suşlar başarıyla ayırt edilmiştir (Giraffa and Neviani 2000; Holzapfel *et al.* 2001). Ayrıca ARDRA, *L. delbrueckii* ve üç alt türü de dahil olmak üzere tür düzeyinde çeşitli *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*) ve *Lactococcus* türlerini (*L. lactis*) ayırmada kullanılmıştır (Roy and Sirois 2001).

Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizimi (AFLP)

AFLP analizi, genomik DNA'nın restriksiyon fragmentlerinin selektif olarak amplifiye edilmesine, amplifiye edilen DNA parçalarının poliakrilamid jel elektroforezi yardımı ile ayrılmasına ve elde edilen görüntünün analiz edilmesine dayanır (Mohania *et al.* 2008). AFLP metodu, hedef organizmanın DNA'sında bulunan yüksek replikasyon potansiyeli olan işaretçi bölgelerin hızlı bir şekilde yüzlerce kopyalarını oluşturur ve bu durum da yüksek kararlılıkla genotiplendirme yapılmasına müsaade eder. AFLP yönteminin zaman, maliyet, tekrarlanabilirlik ve çözünürlük gibi parametreleri yüksek kalitededir. Başlangıçta bitki sistemi için geliştirilen AFLP yönteminin, yapılan araştırmalar sonunda bakterilerin tür ayırımı ve soy farklılaşmasını analiz etmek için de uygulanabilir ve çok yararlı bir teknik olduğu kanıtlanmıştır. Bugüne kadar AFLP tekniği çoğunlukla epidemiyolojik ve gıda kaynaklı patojenlerde virulans markırlarını ayırt etmeyi amaçlayan çalışmalarda kullanılmıştır (*Listeria* ve *Salmonella spp.* gibi).

Bununla birlikte, bu yöntem kullanılarak filogenetik olarak yakın akraba olan *L. pentosus*, *L. plantarum* ve *L. pseudoplantarum* türleri için tür düzeyinde ayırım yapabileme imkanı elde edilmiştir (Giraffa and Neviani 2000).

Pulse Field Jel Elektroforezi (PFGE)

PFGE, agaroz içerisinde bulunan bakteri hücresinden elde edilen büyük DNA fragmentleri uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek oluşan parmak izi profilleri kültür tanılaması için analiz edilebilir (Sullivan and Kullen 1999; Holzapfel *et al.* 2001). Bu nedenle, teknik diğer parmak izi alma stratejilerinden daha uzun sürebilir. Bununla birlikte, PFGE tarafından üretilen profil bütün genomu temsil eder ve bu teknik ribotiplendirmeye göre daha üstün bir ayırıcı güce sahiptir. Nitekim, titiz bir alttür ayırımı yapmak amacıyla PFGE tekniği laktobasiller ve bifidobakteriler de dahil olmak üzere çeşitli organizmalar için kullanılmıştır (Kimura *et al.* 1997; Sullivan and Kullen 1999). Bazı vakalarda PFGE, bir tür içinde bakteri soylarının gruplandırılmasını sağlamıştır ve bu tekniğin bakteri izolatlarını karakterize etme potansiyelini değerlendiren çeşitli örnekler de vardır (Kimura *et al.* 1997; Mohania *et al.* 2008).

PFGE tarafından *L. acidophilus* kompleksi *L. casei*, *L. delbrueckii* ve onun üç alttürü (*bulgaricus*, *delbrueckii* ve *lactis*), *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* ve *L. sakei* türleri başarılı bir şekilde ayrılmıştır (Klein *et al.* 1998; Giraffa and Neviani 2000). Başka bir raporda, PFGE'nin yakından ilişkili *L. casei* ve *L. rhamnosus* suşlarının ribotiplendirme veya RAPD analizine kıyasla daha fazla ayırıcı olduğu gösterilmiştir (Tynkkynen *et al.* 1999). İzolatların genel ribotiplerini belirlemek için çoklu ribo kalıplarının PFGE yöntemi ile kullanılması bu tekniğin ayırıcı gücünü birkez daha arttırdığı gösterilmiştir (Mohania *et al.* 2008).

RAPD PCR

RAPD tekniği, kısa rastlantısal primerlerin birden fazla rastgele hedef dizisine bağlanarak tanı için önemli motifler oluşturduğu PCR tabanlı güçlü ayırım yapan bir

metodtur. RAPD analizi, genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş bölgelerin ve yine rastgele bilgisayar tarafından oluşturularak dizayn edilmiş primerler tarafından (10 baz çift dizisi veya 10 bp dizisi) amplifiye edilmesine dayanmaktadır. Bu yöntem şu anda probiyotik suşları içeren LAB türlerini tanılamak için değerlendirilmektedir. RAPD kalıplarının tekrarlanabilirliği bazen zayıf olduğundan bu yöntem kontrollü koşullar altında gerçekleştirilmelidir. Çeşitli gruplar; çeşitli kaynaklardan, yani insan, gıda ve süt örneklerinden LAB suşlarını tanılamak ve karakterize etmek için RAPD kullanımının etkili olduğunu rapor etmişlerdir (Oh-Sik 2002; Spano *et al.* 2002). RAPD-PCR, bu bölgedeki probiyotik varlığını değerlendirmek için insan vajinasında bulunan *L. rhamnosus* GR-1, *L. fermentum* RC-14 ve *L. rhamnosus* GG'yi (ticari olarak temin edilebilir bağırsak probiyotiklerini) tespit etmek için de kullanılmıştır (Gardiner *et al.* 2002). Daha sonra Schillinger ve arkadaşları (2003), probiyotik yoğurtlarda en fazla olarak kullanılan *L. casei* ve *L. acidophilus* suşlarını belirlemek için spesifik PCR ve RAPD-PCR analizleri üzerinde çalışmışlardır. Laktobasillerin tür veya suş seviyesinde tanınması için 20 *Lactobacillus* suşunun RAPD profili, *L. acidophilus* ve *L. casei* grubunun 11 referans suşu ile karşılaştırılmıştır. Daha sonraki bir çalışmada ise; 149 *Lactobacillus* izolatu iki rasgele primer olan OPL-05 ve ArgDei-F ile RAPD PCR'a tabi tutulmuştur (Fontanaa *et al.* 2005). Bu çalışmada üretilen elektroforetik motiflerin, suş ayrımı için uygun olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar *L. plantarum* izolatlarında önemli derecede genomik çeşitlilik bildirmişlerdir.

Arjantin'de üretilen kuru sosislerin yapımında fermantasyondan sorumlu mikrobik topluluk olan *Lactobacilli* ve *Micrococcus* suşlarının tür içi farklılaşması ve tanınması için M13 ve RAPD2 primerleri ile RAPD tekniği kullanılmıştır (Fontanaa *et al.* 2005). Benzer şekilde, Weiss ve ekibi RAPD-PCR ile 14 rastgele primeri kullanmışlardır. Bu çalışma sonucunda potansiyel olarak probiyotik *L. reuteri* suşları tespit edilmiş ve bu suşlara özgü benzersiz RAPD modelleri bulunmuştur (Weiss *et al.* 2005). Farklı bir araştırmada ise; İspanyol keçi peynirinden izole edilen LAB türleri, RAPD-PCR ile analiz edilerek bulgular fenotipik özellikler ile karşılaştırılmıştır (Sanchez *et al.* 2005). İzolatların çoğu *L. paracasei* olarak tanımlanmakla birlikte, *L. paracasei*, *L. curvatus* ve *L. plantarum* için yüksek genetik çeşitlilik bulunmuştur. Daha sonra, Sanchez ve

arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada Artisanal Manchego peynirinin üretimi ve olgunlaşması sırasında 248 baskın laktobasilli suşu izole edilmiştir. RAPD-PCR tekniği ile 197 izolatın genetik çeşitliliği belirlenmiş ve 42 farklı RAPD motifi elde edilmiştir. Bu izolatların hepsi, %54'lük benzerlik düzeyinde altı ana kümeye ayrılmıştır (Sanchez *et al.* 2006). Catzeddu ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan araştırmada ekmek üretiminde kullanılan mayalardaki LAB topluluklarının yapısını ve çeşitliliğini incelemek için RAPD-PCR DNA parmakizi tekniği kullanılmıştır. Yine Mohania ve arkadaşları (2008) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada RAPD-PCR tekniği ile hafif fermente sosislerdeki laktobasillerin biyolojik çeşitliliği değerlendirilmiştir. Bu şekilde üretilen RAPD-PCR motifleri, düşük asitli İspanyol fermente sosislerden izole edilen 250 LAB türlerini karakterize etmek için kullanılmıştır. Bu çalışma, *L. sakei*, *L. curvatus* ve *Leuconostoc mesenteroides*'in de olduğu 144 farklı suş içinden LAB izolatlarını ayırmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular, türe özgü PCR ve izolatların plazmit profillemesi ile teyit edilmiştir. Literatürde bulunan tüm bu çalışmalar göstermiştir ki RAPD-PCR, laktobasil izolatlarının tür ve suş seviyesinde ayırımı için kullanımı oldukça faydalıdır.

RFLP veya Kromozomal DNA Restriksiyon Analizi

Kromozomal DNA restriksiyon analizi (RFLP), kromozomal DNA tabanlı yazım şemalarının ilkidir. DNA parçalarını kesip elektroforezle ayırdıktan sonra oluşan bantlama kalıpları DNA parmak izi olarak tanımlanır. Restriksiyon enzimlerinin yüksek özgüllüğü ve kromozomal DNA'nın kararlılığı nedeniyle kromozomal DNA'nın belirli bir enzim tarafından tam olarak kesilmesinden sonra tekrarlanabilir bir fragment modeli elde edilir. Suşlar arasındaki bantlama modellerindeki bu değişiklikler, incelenen organizmanın DNA baz bileşimindeki temel farklılıklara atıfta bulunmaktadır. Bununla birlikte, doğru enzimin kullanıldığı durumlarda RFLP tekniğinin diğer yöntemlere nispeten daha hızlı ve güvenilir bir teknik olduğuna inanan araştırmacılar mevcuttur. Yapılan bilimsel çalışmalara bakıldığında PCR-RFLP'nin özellikle şaraptan yaygın olarak izole edilen laktik asit bakteri türlerini tanılamada başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre, Claisse ve arkadaşları (2007) katı selektif ortamda koloni

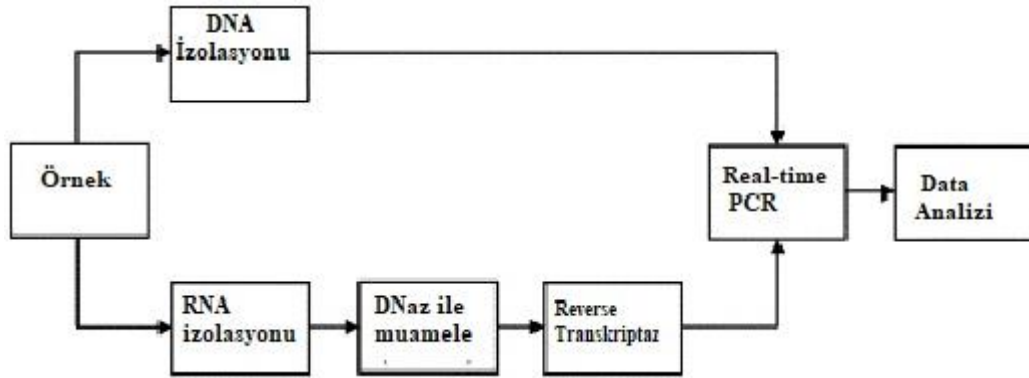
izolasyonu yaptıklarını, koklar ve çubuk hücrelerini ayırt etmek için mikroskop gözlemi öncesi PCR-RFLP yaklaşımı ile yedi cocci ve 12 lactobacilli türü saptadıklarını rapor etmişlerdir. Mainville ve arkadaşları (2005) ise kefirde izole ettikleri LAB türlerini fenotipik, biyokimyasal ve genotipik yöntemler kullanarak karakterize etmişlerdir. Sonuçların polifazik analizi, mikrofloranın soy seviyesinde tanımlanmasına izin vermiştir ki bu durum, bir RFLP tabanlı polifazik analiz yaklaşımının, suş gruplamalarını doğrulamaya yardımcı olarak suş tayininde güven arttırdığını ve dolayısıyla suşların filogenisinde bir etkisi olabileceğini göstermektedir. Rodas ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan başka bir çalışmada üzüm ve şaraptan izole edilen LAB türlerini tanımlamada 16S rDNA kolonisinden direkt amplifikasyona ve daha sonra restriksiyon enzimleri ile kesime dayanan basit ve doğru bir protokol olan RFLP tekniği kullanılmıştır. Teknik, test edilen LAB referans türünü ayırt edebilmiş ve şaraplardan 342 izolatın başarılı bir şekilde tanımlanmasına izin vermiştir. Deveau ve Moineau (2003) aynı zamanda ekzopolissakarit üreten *Lactococcus lactis* suşlarının farklılaşması ve hızlı karakterizasyonu için RFLP'yi kullanmıştır. Daha sonra Mohania ve arkadaşları (2008) DNA kısıtlama modellerini analiz ederek etkili bir RFLP tabanlı kataloglama sisteminin varlığının, laktokok suşlarının tanımlanmasına yönelik araştırmalara fayda sağlayabileceği sonucuna varmışlardır. Dolayısıyla, 16S rDNA-RFLP, *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* cinsi gibi cinslerden LAB koklarını ayırmak için etkin ve hızlı bir yöntem sunduğu rapor edilmiştir.

Real-Time PCR (Q PCR)

Real-time PCR, floresan boyaların kullanılması ile gerçek zamanlı olarak hedef DNA'nın amplifikasyonunu gözlemleyen DNA tabanlı bir tekniktir. Real-time PCR süt, atık, gıda ve su gibi çeşitli numunelerdeki bakteri örneklerini belirlemek için kullanılabilir. Real-time tekniği bir bakıma geleneksel PCR'da sıklıkla gözlenen yanlış pozitif olasılığını %99.9 oranında azaltır. Hedef DNA'nın bir kopyası bile yüksek enerji alanı sayesinde belirlenebilir. Konvensiyonel PCR *Lactobacillus* cinslerini ve farklı *Lactobacillus* türlerini belirlemede yeterince hassastır (Song *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001). Fakat geleneksel PCR, PCR ürününün miktarı hakkında bilgi veremediği için

sadece yarı niceliksel değerlendirmeler için kullanılabilir. Modern kantitatif geręek zamanlı PCR, amplifikasyonun tamamını görmemizi sağlar ve sonuç olarak PCR sürecinin son basamağı gibi ikinci bir tekniğe ihtiyaç duyulmaz. Son zamanlarda LAB suşlarının tanılanması için hedef olarak seçilen 16S rRNA geni kullanılarak, hızlı ve güvenilir bir Real-time tekniği geliştirilmiştir. *L. casei*, *L. paracasei* ve *L. rhamnosus* bakterilerinin 16S rRNA genindeki farklılıklar esas alınarak tasarlanan hibridizasyon problemleri ile bir PCR yaklaşımı geliştirilmiş ve bu bakteri türlerini ayırt etmek için kullanılmıştır (Kao *et al.* 2007). Bu yaklaşımla, *L. paracasei* ve *L. rhamnosus* türleri doğru olarak tanılanabilir fakat aynı 16S rRNA dizisine sahip olan *L. casei* ve *L. paracasei*'yi birbirinden ayırmak zordur. Bu sonuçlar ise bu çalışmadaki PCR yaklaşımı melting eğrisi analizinin yakından akraba olan laktobacilli suşlarının ayırt edilmesinde hızlı, basit ve doğru bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Real-time PCR (RT-PCR); tanılama çalışmaları dışında hücrelerdeki gen ekspresyonunu analiz etme imkanı sunan hızlı ve hassas bir yöntemdir. RT-PCR uygulamasında kullanılacak olan prokaryotik veya ökaryotik hücreden RNA izolasyonu gerçekleştirilir ve izole edilen RNA moleküllerinden retrovirslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi aracılığıyla komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilir. Oluşturulan cDNA, PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılır ve her bir yeni oluşan DNA kopyası farklı yöntemlerle tespit edilir. Böylece hücrede üretilen RNA miktarı çok az bile olsa eksprese olan genin ekspresyon miktarını tesbit edilebilir. Ayrıca, Oluşan RT-PCR rnleri kullanılarak cDNA kütüphaneleri oluşturulabilir ve bu cDNA'lar ihtiyaç duyulduğunda gen kütüphaneleri olarak kullanılabilir. Yapılan alışmalar sonucunda, RT-PCR, RNA hibridizasyonu, *in situ* hibridizasyon gibi diğer RNA analiz yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha hassas, hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Kubista *et al.* 2006). RNA'nın bulunduğu ve en çok çalışıldığı örnekler kan, serum, hücre kültürleri, dokular ve bakteri kültürleri olarak sıralanabilir.



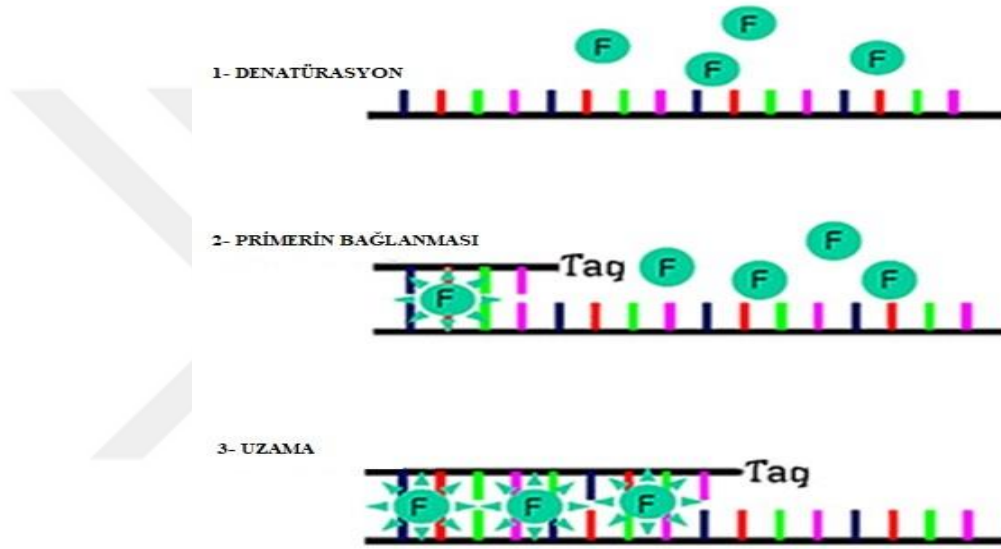
Şekil 2.2. Biyolojik örneklerden yapılan Real-time PCR şeması (Kubista *et al.* 2006)

RT-PCR ister bir gen bölgesinin tespiti ister bir genin ekspresyon analizi için kullanılıyor olsun amplifiye edilen DNA kopyalarının kantitatif ölçümü için kullanılan birbirine göre avantaj ve dezavantajlara sahip iki temel sistem vardır. Bu sistemler Özgül Olmayan Belirleme Sistemi (SYBR Green I) ve Özgül Belirleme Sistemi (TaqMan® Probe, Moleküler Boncuk Yöntemi ve Hibridizasyon Prob Yöntemi)'dir.

Özgül Olmayan Belirleme Sistemi (SYBR Green I)

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında "SYBR Green I" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa eş zamanlı bir şekilde "Real-time" PCR cihazında okunan floresanın miktarı da artar. 497 nm dalga boyunda yükseltgenip, 520 nm dalga boyunda indirgenen "SYBR Green I" en fazla kullanılan boya çeşitidir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin %6'sını kaybeder (Kubista *et al.* 2006). PCR reaksiyonu karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışıma yapar. Ancak primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girdiği için floresan ışıma ölçülebilir oranda artar. Bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir (Kubista *et al.* 2006). Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin

çoğaltılmasına olanak verir ve maliyeti düşüktür. Bunun yanı sıra SYBR Green I kullanımının en önemli dezavantajı; istenmeyen PCR ürünleri de süreçte çoğalabileceğinden yanlış pozitif sonuç almanın mümkün olmasıdır. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda “primer dimer”leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile de floresan ışığa oluşabilir (Velden *et al.* 2005).



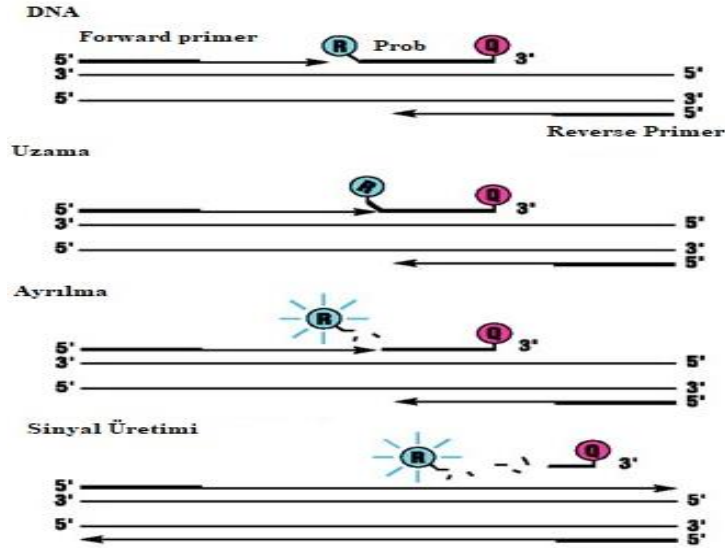
Şekil 2.3. SYBR Green yönteminin temel prensibi (<http://www.sinobiological.com/sybr-green-qpcr-method-cro-service.html>)

Özgül Belirleme Sistemi

DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin belirlenmesinde floresan işaretli proplar kullanılır. Bu yöntemde en çok kullanılan proplar “TaqMan” prob, “Molecular beacon”, “Light-up” prob, hibridizasyon prob ve “Scorpion” primer gibi floresan işaretli proplardır.

“TaqMan® Probe” Yöntemi

TagMan® probe yöntemi Double-Dye Oligonucleotide veya 5' nuclease probe olarak da adlandırılır. TagMan® probe yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6-karboksitetrametilrodamin= TAMRA) bulunur. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engeller. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında “Taq Man” problemler bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başladığında probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam ettikçe her bir PCR döngüsünde ürün çoğalımı arttıkça floresan ışımaya da artar (Cacherill *et al.* 2001).

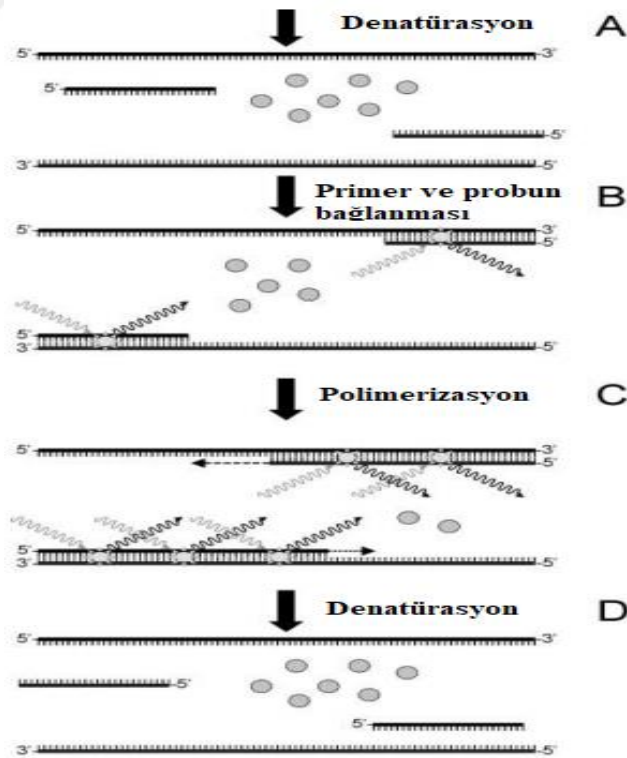


Şekil 2.4. Taqman Prob yönteminin temel prensibi (<http://www.filgen.jp/Product/Bioscience3/index1.htm>)

Bu yöntem standart bir protokol uygulama imkanı verdiği için ve kolay bir primer ve prob dizaynı olduğundan zaman kazandırıcı ve pratiktir (Gut *et al.* 1999).

Moleküler Boncuk Yöntemi

Moleküler boncuk yöntemi hem yapısı hem de çalışma prensibi ile TagMan® probe ve SYBR Green I yöntemlerinden çok farklıdır (Tyagi and Kramer 1996; Bustin 2000). Saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya bulunur. Bunlardan baskılayıcı florofor diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde serbest halde iken ışığa yapmaz. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında prob hedef DNA dizisine göre dizayn edildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha karardır. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değişir ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar (Tyagi and Kramer 1996).

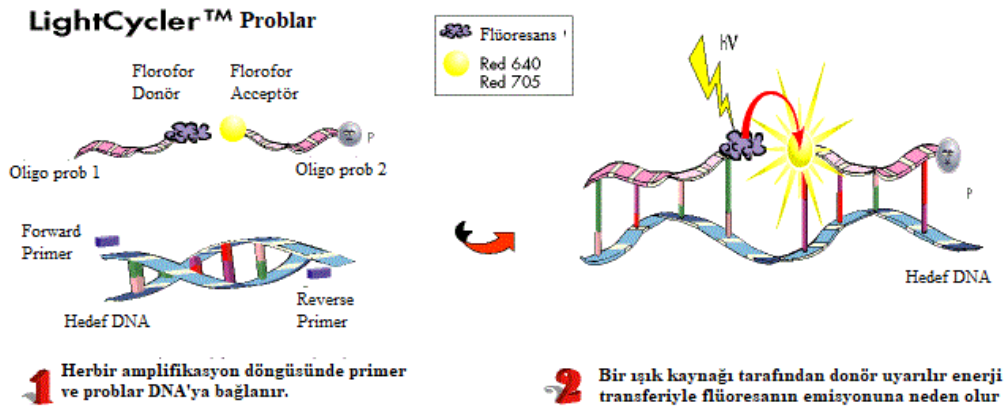


Şekil 2.5. Moleküler boncuk yönteminin temel prensibi (Bustin 2000)

Bu yöntemde prob dizaynı çok önemlidir ve optimum şartlar sağlanamadığında özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmeyeceğinden ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile floresan ışımaya elde edilemeyebilir (Tyagi and Kramer 1998; Bustin 2000).

Hibridizasyon Prob Yöntemi

Bu yöntem Roche Firması tarafından LightCycler® PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Wittwer *et al.* 1997; Chaplin *et al.* 1999). Bu yöntemde iki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (donör), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji “donör” boyadan “acceptor” boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru oranlı olarak artar ve analiz imkanı verir (Chaplin *et al.* 1999).



Şekil 2.6. Hibridizasyon prob yönteminin temel prensibi (http://www.biogene.com/ApplicationNotes/Analysis/Application/Hybridisation_Probes.htm)

RT-PCR, kullanım amaçları giderek artan bir tekniktir. Mikroarraylerin kullanım alanlarından olan gen ekspresyon çalışmalarında çıkış noktası mRNA'dır çünkü ekspresyon düzeyindeki tüm farklılıklar bu şekilde saptanabilir (Wittwer *et al.* 1997). Aynı anda kantitasyonda yapılabildiği için RT-PCR'a verilen önem giderek artmaktadır.

Ayrıca sistemin hassasiyeti ve güvenilirliği de kullanım oranını artmaktadır. Gelecekte de yoğun biçimde kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler arasında yerini koruyacağı muhakkaktır.

DNA Çipleri

Bir organik substrat üzerinde immobilize oligonükleotit sıralarından ibaret olan DNA çipleri, mikroorganizmalar arasında genetik çeşitliliği belirlemek için yeni fırsatlar sağlar. Bu diziler, minyatür bir inorganik substrat üzerinde belirli bir lokasyonda mevcut olan DNA fragmentleri veya izole edilmiş mikrobiyal DNA'nın büyük oligonükleotid dizileri ile hibridizasyonuna dayanmaktadır. DNA çipleri çeşitli gruplar tarafından bakteriyolojik testler için araştırılmaktadır. Bir çip üzerinde bulunan oligonükleotidlerin sayısı birkaç yüzden neredeyse bir milyona kadar değişebilir. Oligonükleotitler genomun her bölgesinden sağlanabilir ve nokta mutasyonlar (tek nükleotid polimorfizmi) bile yüksek doğruluk oranları ile araştırılabilmektedirler. Bu tip DNA çipleri, yakın gelecekte büyük çaplı testler için de muhakkak piyasada olacaktır. Bu metodun yüzleşebileceği tek zorluk, bir defa kullanılabilen bir çipin maliyetli olması bunun yanında hibridizasyon ve analizi için pahalı donanımın satın alınmasının gerekliliğidir. Bununla birlikte bu teknik, spesifiklik ve duyarlılık açısından yüksek güvenilirliğe sahip olması nedeniyle yakın gelecekte birçok mikrobiyal araştırmaların yapılmasında iyi bir yöntem olacaktır (Mohania *et al.* 2008).

Günümüzde probiyotik kavramı, hem gelişmiş hemde gelişmekte olan ülkelerdeki sağlık alanının önemli bir kısmını kapsamaktadır. Probiyotik LAB türlerinin belirlenmesi başlıca fenotipik ve biyokimyasal niteliklere dayanmaktadır. Pratikte, izolatların tanılanması için bu nitelikler bir türe özel bir suşu belirlemede tamamıyla yeterli olmayabilir. Bu nedenle tanılamak için yenilikçi, hızlı ve güvenilir analitik teknikleri geliştirmeye duyulan ihtiyaç, probiyotik fermente ürünler vasıtasıyla insan sağlığının iyileştirilmesine yönelik önemli bir basamak olmuştur. PCR tabanlı tekniklerin kullanılması gıdalarla ilişkili mikroorganizmaları tespit etmek için daha etkili yöntemlerin yenilenmesini kolaylaştırmış olsa da bu güçlü tekniklerin LAB

türlerine kıyasla daha da geliştirilmesi için halen çalışmalar sürmektedir. Neticede, bu alanda çok yararlı bilgi ve bilgilerin üretilmesine neden olacaktır (Mohania *et al.* 2008).

2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sistematığı

LAB; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium* ve *Propionibacterium* olmak üzere çok sayıdaki bakteri cinsinden oluşmaktadır (Holzapfel *et al.* 2001). LAB ilk olarak süttten izole edilmiş ve o zamandan beri et, süt ürünleri, sebze, içecek ve unlu mamüller gibi temel gıdalarda ve çeşitli fermantasyon ürünlerinde bulunmuştur. LAB, yüzlerce yıldır aroma verici ve gıda maddelerinde koruyucu olarak kullanılmaktadır (Mohania *et al.* 2008). *L. lactis* ve *S. thermophilus* gibi LAB türleri, yiyecek bozulmasını ve patojenik bakterilerin büyümesini engellerek işlenmemiş gıda maddesindeki besleyici özellikleri koruyarak raf ömrünü uzatır (Sullivan *et al.* 2002). Son zamanlarda, gıda ambalajlama materyalinde LAB metabolitlerinin biyolojik koruyucular olarak kullanımı tartışılmıştır. LAB türlerinin antimikrobiyal etkisi, temel olarak laktik asit ve organik asit üreterek büyüme ortamının pH'sını düşürmesine bağlıdır (Kuipers *et al.* 2000). Düşük pH, organik asitlerin çözünebilir lipidlere transformasyonu sayesinde hücre zarından sitoplazmaya doğru difuze olmasını sağlar. Aynı zamanda LAB türleri asetaldehit, hidrojen peroksit, diasetil, karbondioksit, polisakkaritler gibi antagonistik bileşenleri ve özellikle antimikrobiyaller gibi davranan bakteriyosinleri üretirler (Rodriguez *et al.* 2003). Bazı *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Bifidobacteria* cinsleri sağlığa faydalı bakteriler olarak kabul edilirler (Mohania *et al.* 2008). Bununla birlikte, bağırsak mikrobiyotasına ait probiyotik mekanizmalar hakkında fazla bilgi yoktur (Gibson 2000). Genellikle LAB türleri, çeşitli gıda ürünlerinde güvenilir olarak kullanılan uzun bir geçmişe sahiptirler. Bu nedenle *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerinin üyeleri, Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından GRAS (Generally Regarded as Safe) statüsüne kabul edilmiştir (Salminen *et al.* 1998).

2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik Ürünleri

Gıda ortamında bulunan LAB türleri göstermiş oldukları besin rekabeti, su aktivitesi, redoks potansiyeli, pH ve sıcaklık gibi etkenlere karşı geliştirdikleri adaptasyonla gıda korumasında önemli bir yerde bulunmaktadır. Bununla birlikte LAB türleri ürettikleri, organik asitler (laktik asit ve asetik asit), diasetil, hidrojen peroksit, reuterin ve bakteriyosinler gibi bileşiklerle de gıda güvenliğini bozan patojenler ve raf ömrünü kısaltan mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki gösterirler (Holzapfel *et al.* 1995; Köseoğlu 2007). Laktik asit bakterilerinin ürettiği metabolik ürünler ve etki gösterdikleri mikroorganizmaların listesi Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkili metabolik ürünleri (Holzapfel *et al.* 1995)

Ürün		Hedef Mikroorganizma
Organik asit	Laktik asit	Putrefaktif ve Gram negatif bakterilerle bazı küfler
	Asetik asit	Putrefaktif bakteriler, Clostridia, bazı mayalar ve küfler
H ₂ O ₂		Özellikle proteince zengin gıdalarda patojenler ve çürükçül bakteriler
Düşük molekül ağırlıklı metabolitler	Reuterin	Bakteri küf ve mayalara karşı geniş spektrumlu
	Diasetil	Gram negatif bakteriler
	Yağ asitleri	Farklı bakteriler
Bakteriyosinler	Nisin	Bazı laktik asit bakterileri, özellikle endospor oluşturan Gram pozitif bakteriler
	Diğer	Gram pozitif bakteriler, bakteriyosin tipi ve üretici suşlara bağlı olarak inhibitör spektrumu değişir

Organik Asitler

Laktik asit bakterilerinin ana fermentasyon ürünlerinden olan laktik asit ve asetik asit ortamın pH’sını düşürerek bozulmaya neden olan (Clostridia, Pseudomonas) ve patojen (*Salmonella* ve *Listeria* spp.) mikroorganizmaların gelişimini sınırlandırmakta veya

inaktive etmektedir. Bu iki asit direkt olarak antimikrobiyal aktivitede gösterebilir. Hidrofobik özellikleri sayesinde çözünmemiş formda bulunan zayıf asitlerden laktik asit ve asetik asit bakteri içerisine girerek hücre içinde çözünürler (Köseoğlu 2007). Bunun sonucunda sitoplazmada meydana gelen pH düşüşü, hücre ölümüne sebep olmaktadır (Ray 2001). Çözünürlük sabiti daha yüksek olan asetik asit (pKa 4,75) belli bir pH ve konsantrasyonda laktik asitten (pKa 3,1) daha fazla antimikrobiyal etkiye sahiptir (Holzapfel *et al.* 1995).

Hidrojen Peroksit

Laktik asit bakterileri O₂, laktat, pürivat ve NADH olduğu koşullarda hidrojen peroksit sentezlemektedirler. Hidrojen peroksit, antimikrobiyal özelliğini güçlü oksitleyici özelliği sayesinde kazanır (Holzapfel *et al.* 1995). Hidrojen peroksit nötr olması sayesinde hücre içerisine kolaylıkla girebilmektedir. Hücre içerisinde meydana gelen indirgenme reaksiyonlarının ürünü olan hidroksi radikalleri kalıtım materyalini etkileyip hücreyi ölüme terk etmektedir (Lindgren and Dobrogosz 1990). Hidrojen peroksit geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle bakteriler, mayalar, küfler, virüsler ve bakteri sporlarına karşı antagonistik aktivite gösterir (Köseoğlu 2007).

Diasetil

LAB türlerinin bazı türleri tarafından üretilen metabolit pirüvattan sentezlenir. Bunlar Streptokok, Leukonostok, Laktobasil ve Pediokok cinsi bakterilerdir. Diasetil tereyağına lezzet ve aroma vermektedir. Antibakteriyal özellikteki bu bileşik Gram negatif bakteri, mayalar ve son olarak laktik asit bakterileri dışındaki Gram pozitif bakteriler üzerine etki göstermektedir. Yüksek miktarda diasetil kullanımı antimikrobiyal etkiyi sağlamaktadır. Bu miktar ürünün tat, koku gibi duyuşal özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Bu da GRAS statüsünde bulunsa dahi gıda katkısı olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Diasetilin uçucu özelliği, çoğu malzeme ve yüzey temizliğinde kullanımına yön vermektedir (Köseoğlu 2007).

Reuterin

L. reuteri tarafından anaerobik şartlarda gliserolden üretilen reuterin, protein yapıda olmayıp, yüksek çözünürlüklü, düşük molekül ağırlıklı ve nötral pH'ya sahip bir bileşiktir. Reuterinin antimikrobiyal etki gösterdiği gruplar ise Gram pozitif özelliğe sahip *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. türleri ve Gram negatif bakteriler olan *Salmonella* spp., *Shigella* spp., maya olan *Candida* spp., *S. cerevisiae* ve protozoa olan *Trypanosoma*'dır (Daeschel 1989; Köseoğlu 2007).

2.5. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler genellikle bakteriler tarafından üretilen, ribozomal sentezlenmiş peptidler olarak tanımlanırlar. Bu moleküller evrimsel olarak yakın ya da yakın olmayan mikroorganizmalara karşı bakteriyostatik veya bakterisidal aktiviteye sahiptirler. İlk bakteriyosin izolasyon çalışması bir Gram negatif bakteri olan *Escherichia coli* kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve izole edilen molekül 1925 yılında colisin olarak adlandırılmıştır. Günümüze kadar yapılan bakteriyosin çalışmalarının büyük çoğunluğu *E. coli*'den elde edilen colisinler üzerinedir. Bu konuyla bağlantılı çalışmalar antibakteriyel peptidlerin farklı bir grubunu oluşturduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar ile bakteriyosinlerin DNaz veya RNaz'ın inhibisyonu, hedef hücre membranının geçirgenliğini artırma ve hücre duvar sentezinin inhibisyonu dahil çeşitli mekanizmalar ile yakın ilişkili bakteriler üzerine bakterisidal etkileri ortaya koyulmuştur (Nes *et al.* 1996; Cleveland *et al.* 2001; Riley *et al.* 2002; Riley *et al.* 2008; Balciunas *et al.* 2013). Bununla birlikte son yıllardaki çalışmaların çoğu, bakteriyosin üretiminin Gram negatif bakteriler tarafından sınırlandırılmaması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu bakımdan; bazı morfolojik, metabolik ve fizyolojik özellikleri karakterize edilmiş filogenetiksel olarak farklı mikroorganizmaların bir grubu olan Gram pozitif laktik asit bakterileri, GRAS (Generally Recognized as Safe; Genellikle Güvenli Olarak Kabul edilen) statüsü sayesinde endüstriyel veya tıbbi uygulamalar için büyük potansiyele sahiptir ve çeşitli bakteriyosinler için önemli bir kaynak oluşturur (Güllüce *et al.* 2013).

Gram pozitif bakterilerden elde edilen bakteriyosinler sadece bakteriyosin üretici olarak aynı tür içindeki bakterilere karşı değil aynı zamanda farklı tür ve cinsteki diğer bakterilere karşı da etkilidirler. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, duyarlı mikroorganizmaların geniş bir spektrum aralığına sahipmiş gibi görünürler ve bu moleküllerin teknolojik süreçlerde kullanılabilme alanı oldukça geniştir (Cintas *et al.* 2001; Nes *et al.* 2007).

Bakteriyosinler; literatürde sıklıkla antibiyotikler ve antimikrobiyal aktiviteye sahip farklı tiplerdeki peptidlerle karıştırılmaktadırlar. Bu karışıklık, bakteriyosinlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımını sınırlandıran en önemli yasal etkindir (Balciunas *et al.* 2013). Antibiyotikler ile bakteriyosinler karşılaştırıldığında antibiyotikler çoklu enzim kompleksleri tarafından üretilirken, bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenmektedir. Çoğu zaman bakteriyosinler, bakterilerde dar bir spekturum üzerinde bakterisidal veya bakteriyostatik etki gösterirken geleneksel antibiyotikler geniş bir spektruma sahiptirler. Ayrıca bakteriyosinlerin çoğu hedef bakteriye karşı daha düşük konsantrasyonlar da antibiyotiklerden daha etkilidirler. Bunların yanısıra bakteriyosinler ve antibiyotikler arasında konakçı hücrenin bağışıklığı, hedef hücrenin direnç ya da tolerans mekanizmaları, etkileşim gereksinimleri, etki mekanizması, toksisite ve yan etki mekanizmaları açısından çeşitli farklılıklar vardır (Cleveland *et al.* 2001; Riley *et al.* 2002; Nes *et al.* 2007; Balciunas *et al.* 2013). Prokaryotik veya ökaryotik hücrelerden orijinlenen bazı biyoaktif peptidler de antibiyotik aktiviteye sahiptir fakat bu moleküller ve bakteriyosinler farklı antimikrobiyal bileşikler olarak düşünülebilir. Biyoaktif peptidler polipeptid zincirinde şifrelenir ve proteoliziz yoluyla ortaya çıkar. Bu sürecin son ürünü genellikle 3–20 aminoasit içerir. Böyle biyoaktif peptidler salındıktan sonra ilgili reseptör ile etkileşir ve etki mekanizmalarında hormon benzeri aktiviteye sebep olurlar. Biyoaktif peptidlerin olgunlaşma yolu bakteriyosinlerin tümünden farklılık gösterir (Cintas *et al.* 2001; Nes *et al.* 2007; Mills *et al.* 2011).

Antibiyotik direnci ile ortaya çıkan mikrobiyal populasyonlar ve çeşitli biyoaktif peptitlerin istenmeyen toksik özellikleri hakkındaki mevcut endişeler, patojenlerle ve zararlı mikroorganizmalar ile mücadelede umut vadeden doğal antimikrobiyaller olarak

bakteriyosinlere dikkat çekmektedir. Bu amacı gerçekleştirmek için bu moleküllerin doğasının açık bir şekilde anlaşılması gereklidir. Bu amaç doğrultusunda, tanımı, kökeni, sınıflandırılması, etki mekanizması, teknolojik uygulamaları ve gelişimsel stratejilerdeki son perspektifler dahil bakteriyosinler hakkındaki temel konular bilim insanlarının ilgi odağı olmuştur (Güllüce *et al.* 2013).

2.5.1. Tarihçe

Bakteriyosinler ilk olarak 1925 yılında Gratia tarafından keşfedilmiştir. Gratia yapmış olduğu araştırmalar neticesinde *E. coli* V tarafından *E. coli* S'nin inhibisyonunu yaklaşık bir asır önce bulmuştur. Bu inhibisyonun kaynağı olan yeni moleküller başlangıçta colisin olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bu yeni moleküllerin Friedrich tarafından 1946 yılında protein yapısında oldukları ve etkilerinin duyarlı hücrelerin yüzeylerindeki özel reseptörlerin varlığına bağlı olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen bu bulgular bakteriyosinlerin niçin suşlar veya spesifik türler üzerinde sınırlı bir etki spektrumuna sahip olduğunu açıklamak için değerlidir. Colisinler ve Gram negatif bakteriler tarafından üretilen diğer bakteriyosin çeşitleri üzerine olan çalışmalar günümüze kadar süregelmiş olmakla birlikte *E. coli*'den elde edilen colisinler, bakteriyosin ailesinin en çok üzerinde durulan üyeleri olmuştur (Güllüce *et al.* 2013).

Bu süreçte Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler üzerine odaklanan çalışmalar, başlangıçta yapılan diğer çalışmaların gerisinde kalmıştır. Bununla birlikte, Gram pozitif bakterilerin ürettiği bakteriyosinlerin geniş antimikrobiyal aktivite spektrumları ve bu bakteriyosinlerin daha avantajlı özelliklerinin anlaşılması ilgili araştırmaları teşvik etmektedir. Sonuç olarak Gram pozitif bakterilerden elde edilen bakteriyosinler üzerine yapılan çalışmalar son otuz yıl içerisinde oldukça ivme kazanmıştır (Cintas *et al.* 2001; Nes *et al.* 2007; Balciunas *et al.* 2013).

2.5.2. Bakteriyosinlerin mikrobiyal orijini

Daha önceleri de bahsedildiği gibi, bakteriyosinler mikroorganizmalardan ribozomal olarak sentezlenmekte olan antimikrobiyal peptidler olarak ifade edilmektedir. Temelde farklı bakteriyosin üreticileri olarak arkeler, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Güllüce *et al.* 2013).

2.5.2.a. Arkelerden elde edilen bakteriyosinler

Arkeler, arkeosin olarak adlandırılan bakteriyosin benzeri antimikrobiyal peptidleri sentezler. Halobakteriden elde edilen 36 aminoasitlik kısa bir hidrofobik peptide sahip olan halosin S8, arkeosin ailesinin ilk keşfedilen üyesidir. Bu moleküller, hücreler durağan faza geçerken üretilir (Güllüce *et al.* 2013).

2.5.2.b. Gram negatif bakterilerden elde edilen bakteriyosinler

Bakteriyosin ailesinin ilk tanımlanan üyesi olan colisin Gram negatif bir bakteri olan *E. coli*'den elde edilerek 1925 yılında Gratia tarafından antimikrobiyal bir protein olarak tanımlanmıştır. Bakteriyosinler üzerine gerçekleştirilen çalışmaların büyük bir kısmı colisin üzerine olmakla birlikte yapılan araştırmalar *E. coli* ile sınırlı kalmamış ve Gram negatif bakterilerin çoğunun colisin benzeri proteinler üretme yeteneğine sahip olduğu ortaya konmuştur. *Klebsiella pneumonia*'dan elde edilen klebicinler, *Serratia marcescens*'den elde edilen marcescinler, *Hafnia alvei*'den elde edilen alveicinler, *Enterobacter cloacae*'den elde edilen cloacinler ve *Pseudomonas*'lardan elde edilen pyocinler *E. coli* dışındaki diğer Gram negatif bakterilerin bakteriyosinlerinin önemli temsilcileridir (Güllüce *et al.* 2013).

Gram negatif bakteriler grubunda bulunan bakteriyosinlerin çoğu, kısmen büyük ve bundan dolayı ısıya dayanıksız peptidlerdir. Yalnız istisna olarak *E. coli*'den elde edilen bakteriyosinlerden biri olan microsin V gibi microsinler karakteristik olarak sadece birkaç peptid içerir ve ısıya dayanıklıdır.

Dar antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahip olmaları Gram negatif bakterilerden elde edilen bakteriyosinler için dezavantajdır. Bu durum Gram negatif bakterilerin endüstriyel kullanımını sınırlandırdığından Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen daha uygun bakteriyosin tipleri üzerine yapılan çalışmalara ilgiyi arttırmıştır (Cleveland *et al.* 2001; Riley *et al.* 2002; Nes *et al.* 2007; Riley *et al.* 2008; Balciunas *et al.* 2013).

2.5.2.c. Gram pozitif bakterilerden elde edilen bakteriyosinler

Gram pozitif bakteriler de bakteriyosinlerin yaygın bir çeşidini üretir. Bu bakteriyosinlerin ökaryotik hücreler üzerinde toksik etki göstermemeleri, çok geniş inhibisyon spektrumuna sahip olmaları, çoğu endüstriyel ve tıbbi uygulamalar için Gram pozitif bakteriyosinlerini eşsiz bir araç yapar. Bazı morfolojik, metabolik ve fizyolojik özellikleri karakterize edilmiş filogenetiksel olarak farklı mikroorganizmaların bir grubu olan Gram pozitif laktik asit bakterilerinin, insanların tüketebilmesi için potansiyel GRAS statüsüne sahip olmaları bu bakterileri ve ürünlerini değerli kılan bir diğer özellikleridir (Güllüce *et al.* 2013).

Laktik asit bakteri (LAB) adının kazanımını, fermentasyon yolunda üretilen laktik asit ürününden almıştır. Fizyolojik ve morfolojik özellikleri nedeniyle büyük çeşitlilik gösteren bu bakteri grubu farklı koklar, basiller veya kokobasiller olarak gruplandırılabilirler. Laktik asit bakterileri güvenli doğalarından ve değerli metabolik ürünlerinden (organik asitler, diasetil, aseton, hidrojen peroksit, reuterin, reuterisiklin, antifungal peptidler ve bakteriyosinler) dolayı tıpta ve gıda uygulamalarında büyük bir öneme sahiptirler (Güllüce *et al.* 2013).

Çizelge 2.3. Laktik asit bakterilerinden elde edilen bazı önemli bakteriyosinler (Güllüce *et al.* 2013)

Bakteriyosin	Üretici Organizma	Referanslar
Nisin A	<i>Lactococcus lactis</i>	(De Vuyst <i>et al.</i> 1994)
Nisin Z	<i>Lactococcus lactis</i>	(De Vuyst <i>et al.</i> 1994)
Nisin U	<i>Streptococcus uberis</i>	(Nes <i>et al.</i> 2007)
Lactococcin DR	<i>Lactococcus lactis</i> ADRIA 85L030	(Dufour <i>et al.</i> 1991)
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ481	(Piard <i>et al.</i> 1992)
Lacticin 3147 (LtnA1 and LtnA2)	<i>Lactococcus lactis</i> DPC3147	(Dougherty <i>et al.</i> 1998)
Streptococcin A-FF22	<i>Streptococcus pyogenes</i> FF22	(Hynes <i>et al.</i> 1993)
Salivaricin A	<i>Streptococcus salivarius</i> 20P3	(Ross <i>et al.</i> 1993)
Cytolysin (CylL1 and CylL2)	<i>Enterococcus faecalis</i>	(Gilmore <i>et al.</i> 1994)
Carnocin U149	<i>Carnobacterium piscicola</i> U149	(Stoffels <i>et al.</i> 1992)
Lactocin S	<i>Lactobacillus sakei</i> L45	(Mortvedt <i>et al.</i> 1991)
Pediocin PA1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC-1.0	(Henderson <i>et al.</i> 1992)
Pediocin AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i> H	(Bhunia <i>et al.</i> 1988)
Leucocin A-UAL187	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL187	(Hastings <i>et al.</i> 1991)
Mesentericin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	(Hechard <i>et al.</i> 1992)
Mesentericin 52B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FR52	(Hechard <i>et al.</i> 1999)
Mesentericin B105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	(Revol-Junelles <i>et al.</i> 1996)
Acidocin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK9201	(Kanatani <i>et al.</i> 1995)
Bavaricin A	<i>Lactobacillus bavaricus</i> MI401	(Larsen <i>et al.</i> 1993)
Curvacin A	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174	(Tichaczek <i>et al.</i> 1992)
Sacacin A	<i>Lactobacillus sakei</i> LB706	(Holck <i>et al.</i> 1992)
Sacacin P	<i>Lactobacillus sakei</i> LTH673	(Tichaczek <i>et al.</i> 1992)
Sacacin 674	<i>Lactobacillus sakei</i> LB674	(Holck <i>et al.</i> 1994)
Carnobacteriocin BM1	<i>Carnobacterium piscicola</i> LB17B	(Quadri <i>et al.</i> 1994)
Carnobacteriocin B2	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B	(Quadri <i>et al.</i> 1994)
Divercin V41	<i>Carnobacterium divergens</i> V41	(Metivier <i>et al.</i> 1998)
Enterocin A	<i>Enterococcus faecium</i> CTC492	(Aymerich <i>et al.</i> 1996)
Lactococcin M (LcnM and LcnN)	<i>Lactococcus cremoris</i> 9B4	(Van Belkum <i>et al.</i> 1991)
Acidocin J1132 (α, β)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132	(Tahara <i>et al.</i> 1996)
Lactacin F (LafA and LafX)	<i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI11088	(Allison <i>et al.</i> 1994)

Çizelge 2.3. (devam)

Plantaricin S (Plsα and Plsβ)	<i>Lactobacillus plantarum</i> LCPO10	(Jimenez-Diaz <i>et al.</i> 1995)
Plantaricins EF (PlnE and PlnF)	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11	(Diep <i>et al.</i> 1996)
Plantaricins JK (PlnJ and PlnK)	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11	(Diep <i>et al.</i> 1996)
Leucocin H (α and β)	<i>Leuconostoc</i> sp. MF215B	(Blom <i>et al.</i> 1999)
Termophilin 13 (ThmA/ThmB)	<i>Streptococcus thermophilus</i> SPi13	(Marciset <i>et al.</i> 1997)
Acidocin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	(Leer <i>et al.</i> 1995)
Divergicin A	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	(Worobo <i>et al.</i> 1995)
Bacteriocin 31	<i>Enterococcus faecalis</i> YI17	(Tomita <i>et al.</i> 1996)
Enterocin P	<i>Enterococcus faecium</i> P13	(Casaus <i>et al.</i> 1997; Cintas <i>et al.</i> 1997)
Lactococcin 972	<i>Lactococcus lactis</i> IPLA972	(Martinez <i>et al.</i> , 1999)
Lactococcins A and B	<i>Lactococcus cremoris</i> 9B4 <i>Lactococcus cremoris</i> LMG2130 <i>Lactococcus lactis</i> WM4	(Van Belkum <i>et al.</i> 1991) (Holo <i>et al.</i> 1991) (Stoddard <i>et al.</i> 1992)
Diacetin B	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> UL720	(Ali <i>et al.</i> 1995)
Acidocin 8912	<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK8192	(Kanatani <i>et al.</i> 1995)
Peptide A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LF221	(Bogovic-Matijasic <i>et al.</i> 1998)
Peptide B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LF221	(Bogovic-Matijasic <i>et al.</i> 1998)
Lactobin A	<i>Lactobacillus amylovorus</i> LMG P-13139	(Contreras <i>et al.</i> 1997)
Lactocin 705	<i>Lactobacillus casei</i> CRL 705	(Palacios <i>et al.</i> 1999)
Gassericin B3	<i>Lactobacillus gasseri</i> HCM2124	(Tahara <i>et al.</i> 1997)
Plantaricin 1.25α	<i>Lactobacillus plantarum</i> TMW1.25	(Remiger <i>et al.</i> 1999; Ehrmann <i>et al.</i> 2000)
Plantaricin 1.25β	<i>Lactobacillus plantarum</i> TMW1.25	(Remiger <i>et al.</i> 1999; Ehrmann <i>et al.</i> 2000)
Divergicin 750	<i>Carnobacterium divergens</i> 750	(Holck <i>et al.</i> 1996)
Carnobacteriocin A (¥)	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A	(Worobo <i>et al.</i> 1994)
Piscicolin 61 (¥)	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV61	(Holck <i>et al.</i> 1994)
Leucocin B-TA33a	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA33a	(Papathanasopoulos <i>et al.</i> 1998)
Enterocin B	<i>Enterococcus faecium</i> T136	(Casaus <i>et al.</i> 1997)
Enterocins L50 (EntL50A and EntL50B)	<i>Enterococcus faecium</i> L50	(Cintas <i>et al.</i> 1998)
Enterocin Q	<i>Enterococcus faecium</i> L50	(Cintas <i>et al.</i> 2000)
Enterolysin A	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2333	(Nilsen <i>et al.</i> 2003)
Helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	(Joerger <i>et al.</i> 1986)
Caseicin 80	<i>Lactobacillus casei</i> B80	(Rammelsberg <i>et al.</i> 1990)

2.5.3. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

Bakteriyosinler; üretici organizmaları, moleküler boyutları, fiziksel özellikleri, kimyasal yapıları ve etki mekanizmaları gibi farklı kriterleri temel alınarak çeşitli şekillerde gruplandırılmalarına rağmen kesin bir sınıflandırmaları yoktur. İlk olarak bakteriyosinler Klaenhammer tarafından 1993 yılında dört sınıfa ayrılmıştır (Klaenhammer *et al.* 1993). Bu sınıflandırmada sınıf I bakteriyosinler; termostabil olmaları, çok düşük molekül ağırlığına sahip olmaları (<5 kDa), lantoninin ve türevlerinin bulunması ile karakterize edilmişlerdir. Bu sınıfın üyelerine örnek olarak Nisin verilebilir. Sınıf II bakteriyosinler; lantionin türevleri olmayan 10 kDa üzerinde molekül ağırlığında küçük termostabil peptidler içermektedirler. Bu grubun IIa (pediosin ve enterosin), IIb (laktosin G) ve IIc (laktosin B) olmak üzere üç alt sınıfı vardır. Sınıf III grubundakiler ise termolabil peptidler olup 30 kDa'dan büyük molekül ağırlığına sahip bakteriyosinlerdir. Sınıf IV bakteriyosinleri ise karbohidratlar veya lipidler ile kombine büyük peptidler içerirler (Balciunas *et al.* 2013; Güllüce *et al.* 2013). 2001 yılındaki bir tartışmada, sınıf IV bakteriyosinlerin kompleks yapıda olduğunu öneren Cleveland ve arkadaşları bu bakteriyosinlerin kısmi saflaştırılabilir bir yapı gösterdiğini rapor etmiştir. Cotter ve arkadaşları ise yeni bir sınıflandırılma yapılması gerektiğini önermiştir (Cotter *et al.* 2005). Bu görüşe göre bakteriyosinler sınıf I (lantibiyotik) ve sınıf II (lantionin dışındaki diğer peptidler) olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır. Yüksek molekül ağırlığına sahip olan termolabil peptidler, bakteriyosin sınıfından ayrı tutulmuş ve bakteriyolizinler olarak ayrı bir şekilde gruplandırılmıştır. Araştırmacılar yapılan ilk sınıflandırmadaki sınıf IV bakteriyosinleri olarak belirtilen grubun ayrılabiliceğini önermişlerdir (Cotter *et al.* 2005). Daha sonra, Drider ve arkadaşları son olarak bakteriyosinlerin genetik ve biyokimyasal özelliklerini kullanarak 3 ana sınıfa ayırmışlardır (Drider *et al.* 2006).

Çizelge 2.4. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması (Drider *et al.* 2006; Balciunas *et al.* 2013)

Sınıflandırma	Özellikleri	Alt kategorileri	Örnekler
Sınıf I (Lantibiotikler)	Lanthionine veya β -lanthionine peptidleri içeren	Tip A (lineer moleküller) Tip B (küresel moleküller)	Nisin, subtilin, epidermine Mersacidin
Sınıf II	Küçük termostabil peptidlerin heterojen sınıfı	Altsınıf IIa (antilisteriyal-pediyosin bakteriyosin tipi) Altsınıf IIb (iki peptidden oluşan) Altsınıf IIc (diğer bakteriyosinler)	Pediocin, enterocin, sakacin Plantaricin, lactacin F Lactococcin
Sınıf III	Büyük termolabil peptidler		Helveticin J, millericin B

2.5.3.a Sınıf I bakteriyosinler

Sınıf I bakteriyosin üyeleri lantibiyotik olarak da adlandırılmaktadır. Bu grup küçük (19-38 aminoasit) ve termostabil peptidlerden oluşmaktadır. Önceki çalışmalar, moleküllerin yapısındaki lantioninin veya β lantioninin termostabiliteden sorumlu olabileceğini vurgulamaktadır (Balciunas *et al.* 2013).

Nisin bu grup için en iyi bilinen örnektir. *L. lactis* subsp. *lactis* bu bakteriyosinin doğal üreticisidir ve moleküler yapıları içinde 34 aminoasit içerir. Nisinin, nisin A ve nisin Z olmak üzere iki çeşidi vardır. Bunların her ikisi de bir aminoasit hariç aynı motife sahip olmakla birlikte aynı antimikrobiyal aktiviteyi gösterirler. İlaveten, *Streptococcus uberis* bakterisinden elde edilen nisinin yeni bir çeşidi keşfedilmiş ve nisin A ya %78 benzerliğiyle nisin U olarak adlandırılmıştır (Güllüce *et al.* 2013).

Çoğu araştırma, nisinin *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* bakterileri gibi çeşitli patojenler üzerine geniş bir antimikrobiyal spektrumu ortaya koyduğunu göstermiştir. Nisinin etki mekanizması, çift yönlü etki mekanizması

ile hedef hücre duvarı ve membranı, por boyunca temel bileşiklerin taşınması, geçirgenlikteki değişimler ve sonuç olarak hedef hücrenin ölümünü kapsar.

Nisinin geniş oranda antimikrobiyal aktiviteye sahip olması, onu teknolojik uygulamalar için değerli bir araç yapar. Nisin FAO/WHO tarafından gıda uygulamaları için güvenli olduğu kabul edilen ilk bakterisiyosindir. Ayrıca biyokoruyucu olduğu da Avrupa Birliği ülkeleri tarafından E234 kodu ile onaylanmıştır (Balciunas *et al.* 2013).

2.5.3.b. Sınıf II bakteriyosinler

Yapısal olarak lantibiyotiklerden daha basit olan Sınıf II bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptidlerin farklı ve büyük bir grubunu oluşturur. Çünkü lantiyonin veya β -lantiyonin gibi peptid zincirindeki post translasyonel değişimlere sahip değıllerdir. Bu grup, amfifilik helikal bir form ile termostabil, 10 kDa'dan küçük molekül ağırlığına sahip peptidlerden oluşur. Sınıf II bakteriyosinlerin yapısal uygunluğu, hedef hücrenin sitoplazmik membranı içine rahatlıkla girmesini sağlar. Sonuç olarak bu süreç, membranın depolarizasyonuna ve hücrenin ölümüne sebep olur. Sınıf II bakteriyosinler; II-A, II-B ve II-C olarak 3 ayrı alt sınıfa bölünebilirler (Güllüce *et al.* 2013).

Alt sınıf II-A

Alt sınıf II A'nın üyeleri yüksek antilisterial aktivite göstermeleriyle karakterize edilir. Aynı zamanda bu bakteriyosinler, molekül yapıları içerisinde 37-48 aminoasit kalıntısı içerir. Bileşenin N-terminal parçası konformasyonunda katlanmış bir tabakaya sahiptir ve C terminal parçası bir ya da iki α sarmal yapıyı içerir. Bu alt sınıfa ait olan bakteriyosinlerin etki mekanizmasında, C ucu tarafından hedef hücrenin mebranından içeriye alınır. Bu durum, por oluşumuna ve sonuç olarak yüksek ATP harcanımına sebep olan proton motif gücün kaybına ve nihayetinde hücre ölümüne önyak olur. Pediosin, enterosin ve sakasin alt sınıf II-A grubunun en iyi bilinen bakteriyosinleridir (Balciunas *et al.* 2013).

Bu alt grup iki peptid içeren heterodimerik bakteriyosinleri içine alır. Bu alt gruba ait olan bakteriyosin üyelerinin önemli üç özelliği vardır. (i) Antimikrobiyal aktivitenin ortaya çıkışında her iki peptide de ihtiyaç duyulmaktadır. Peptidlerin birbirinden ayrı olduğu durumlarda aktivite çok az ya da hiç gözlenmez. (ii) Bağışıklık sağlayan proteinin biri bağışıklık kazanmak için yeterlidir ve (iii) Bakteriyosin sisteminin genetik organizasyonu, bireysel peptidlerin kodlandığı ardışık bakteriyosin yapı genlerinden ve tek bir bağışıklık geninden oluşur. Lactococcin G bu grubun ilk keşfedilen bakteriyosinidir ve antimikrobiyal aktivitesi α - ve β -peptidlerin varlığına bağlıdır. Plantarisin ve laktasin F de iki peptide sahip bakteriyosinleri temsil eden en önemli örneklerdir. Etki mekanizmaları membran potansiyelinin yok olmasına ve intrasellüler ATP konsantrasyonunda bir azalışın ortaya çıkmasına dayanır (Cintas *et al.* 2001; Riley *et al.* 2002; Nes *et al.* 2007; Balciunas *et al.* 2013).

Altsınıf II-C

Bu alt gruba ait olan bakteriyosinler eşsiz bir şekilde karbon ve azot uçları arasında kovalent bir bağ ile birlikte dairesel bir yapıya sahiptirler. Bu grubun en önemli örneği *E. faecalis* bakterisinden elde edilen AS-48 bakteriyosinidir. Bu bakteriyosinin etki mekanizması hedef hücrenin sitoplazmik membranı ile doğrudan ilişkilidir. Bu ilişkinin bir sonucu olarak proton motif gücün kaybına, bu da hücrenin ölümüne sebep olur (Güllüce *et al.* 2013).

2.5.3.c. Sınıf III bakteriyosinler

Bu sınıf, 30kDa'dan daha büyük molekül ağırlıklı, büyük termolabil bakteriyosinleri içine almaktadır. Bu grubun üyelerinin önemli kriteri, kompleks aktiviteye ve diğer bakteriyosinlerden tamamen farklı bir etki mekanizması sağlayan protein yapılarına sahip olmalarıdır. Bu durum diğer bakteriyosinlerin etki mekanizmalarındaki süreçlerden daha farklı süreçlerin ortaya çıkmasını sağlar. Burada hücre duvarında yer alan hedef molekül indüklenir ve liziz gerçekleştirir. Etki mekanizması sürecinde ise

molekülün N-terminal kısmı endopeptitaz gibi davranır ve C- terminal kısmı hedef hücreyi tanımak için rol alır (Güllüce *et al.* 2013).

2.5.4. Bakteriyosinlerin biyolojik özellikleri

Biyolojik bir mikrobiyal ürün olarak bakteriyosinler, sahip oldukları kendine has özellikler ile diğer bütün biyolojik moleküllerden ayrılırlar. Bu özellikler bakteriyosinlerin biyolojik özelliklerini oluşturmaktadır. Bu özellikler; sentez, etki mekanizması ve direnç mekanizmasını içermektedir (Güllüce *et al.* 2013).

Protein yapıları sayesinde tüm bakteriyosinler üretici mikroorganizmaların ribozomları tarafından sentezlenirler. Gerekli bilgi plazmitler üzerinde çoğunlukla yer alan genetik kodlardan veya kromozomlardaki transpozon gibi hareketli elementlerden sağlanır. Bakteriyosin gen kümelerinin genetik organizasyonu işlevsel operonları içerir. Bu operonlar yapısal genler, bağışıklık proteinini kodlayan genleri, bakteriyosinlerin taşınımından sorumlu genleri ve bazı durumlarda post transkripsiyonel modifikasyonlar için gerekli olan enzimleri kodlayan genler içerir. Buna ek olarak bakteriyosin operonları ön indüklenme faktörünü kodlayan gen, histidin protein kinaz geni ve düzenlemeden sorumlu genleri de kapsamaktadır (Cleveland *et al.* 2001). Bakteriyosin üretiminin başlangıcında yapısal gen aktive olur ve biyolojik olarak öncül maddeler veya prepropeptitler üretilir. Bu oluşan ürün preprobakteriyosinler olarak adlandırılır. Daha sonra bakteriyosin operonun diğer ilgili kısımları sırasıyla işlevsel olup bu sürecin sonunda antimikrobial aktiviteye sahip olan olgun bakteriyosinler ortaya çıkar (Güllüce *et al.* 2013).

Bakteriyosinlerin biyosentezinde görev alan düzenleyici belirgin mekanizmalar tamamen anlaşılammıştır. Bununla birlikte birçok çalışmada da vurgulanmış olduğu üzere bakteriyosin üretiminin düzenlenmesinde besinler veya sınırlı substratlar ile çevrede bulunan mikroflora üyeleri arasındaki rekabetin olması anahtar bir rol oynamaktadır. Son çalışmalara göre, 19-26 amino asit uzunluğundaki bakteriyosin benzeri peptid kalıntıları olan, düşük molekül ağırlıklı, katyonik doğaları düzenleme

mekanizmasına sahip olan indüksiyon faktörleri önemli bir role sahiptir. Nes ve arkadaşları 1996 yılında IF'nin (İndükleyici Faktör) rolüne ve bakteriyosinin indüklenmesiyle ilgili iki modeli öne sürmüşlerdir. Bu modellerden ilki Quorum sensing modelidir. Bu modelde temel olarak büyüme esnasında düşük konsantrasyonlarda üretilen ve biriktirilen IF'den bahsedilmiştir. Daha sonra otoindüksiyon seviyesine ulaşan IF konsantrasyonu bakteriyosin genlerinin indüksiyonunu meydana getirir. Böylelikle bu model kültürlerin kontrolü, hücre yoğunluğuna bağlı bir kontrol mekanizması üzerine kurgulanmıştır (Güllüce *et al.* 2013).

Quorum sensing modeline bir alternatif olan ikinci modele göre ise IF konsantrasyonu asla kendi eşik değerine ulaşamaz ve belirlenemeyen çevresel sinyaller ya da besin seviyesi veya fizyokimyasal büyüme koşulları içindeki değişimler gibi çevresel şartlar içinde değişen modifikasyonlara ihtiyaç duyar (Nes *et al.* 1996; Cintas *et al.* 2001). Son çalışmaların büyük bir kısmı, düzenleyici sistemlerin çoğu durumlarda 3 kısımdan oluştuğunu öne sürmektedir. Bu üç durum; indüklenmiş bir peptid (veya feromon aktive eden faktör), transmembran histidin kinaz (feromon reseptör) ve bir cevap regülatörü içerir. Bundan başka, nisin ve plantarisin gibi lantibiyotik ürünlerinin düzenleyicisi, bakteriyosinler tarafından doğrudan kontrol edilebilmeleriyle bilinir. Bu mekanizmada bakteriyosinlerin kendileri, yüksek seviyelerde ürünlerini indükleyen bir feromon olarak hareket ederler (Nes *et al.* 2007; Balciunas *et al.* 2013).

Bakteriyosin tiplerine özgü etki mekanizmaları, sınıflandırma kısmı içerisinde bahsedilen çeşitli mekanizmalar yoluyla hedef hücre yüzeyinde etkilerini gösterirler. Genellikle bu durum; hücre duvarı sentezindeki eksiklikler, membran geçirgenliğindeki değişimler ve hedef hücrenin ölümüne sebep olan porların oluşumu ile sonuçlanır. Lantibiyotikler, membran içinde porları oluşturarak transmembran potansiyelini veya pH gradientini azaltarak ve hücre içeriğinin pordan dışarı akmasını sağlayarak hücreyi inhibe ederler. Aşırı sentezlenmeleri durumunda ise bir feromon gibi hareket ederek kendi üretimlerini sınırlandırır.

2.5.5. Bakteriyosinlerin teknolojik uygulamaları

2.5.5.a. Bakteriyosinler ve tedavi edici olarak kullanım potansiyelleri

Modern tıp antibiyotiklere dirençli patojenlerin sayısında ciddi bir artışla karşı karşıya kalmıştır. Bunun yanı sıra yeni nesil antibiyotiklerin son derece toksik özelliklere sahip olmaları alternatif yöntem arayışını tetiklemiştir. Geleneksel antibiyotiklere kıyasla bakteriyosinler insan sağlığı uygulamalarında büyük bir potansiyele sahiptir. Düşük toksisite, yüksek hedef spesifik etki mekanizmaları, doğada çeşitli formlarda oluşları ve nanomolar konsantrasyonlarda bile etkin olmaları bakteriyosinlerin başlıca avantajlarıdır.

Çizelge 2.5. Bazı bakteriyosinler ve bunların insan sağlığında kullanılan farmasötik uygulamalarının örnekleri (Balciunas *et al.* 2013; Güllüce *et al.* 2013)

Bakteriyosin grupları	Farmasötik uygulamalar
Lantibiyotikler	Kan basıncı tedavisi, iltihaplanma ve elerjik tedavilerde, deri enfeksiyon tedavisi, göğüs iltihabı tedavisi, uçuk tedavisi, diş çürüğü tedavisinde, mide ülseri tedavisi.
Kolisiner	Hemolize olan üretilik sendromların tedavisi, Ürogenital hastalıkların tedavisi, Hemarojik kolitlerin tedavisi.
Mikrosinler	Antimikrobiyal ajanlar, Salmonellozis tedavisi.

2.5.5.b. Bakteriyosinler ve gıda uygulamaları

Gıda koruma teknolojileri üzerine günden güne yeni yöntemler geliştirilmektedir. Buna rağmen gıda bozulmaları ve bu durumun insan sağlığına istenmeyen etkileri sonucu

oluşan ekonomik kayıplar nedeniyle gıdaların korunması hala tartışılan bir konudur. Bu nedenle birçok kimyasal koruyucu madde tespit edilmiş ve çeşitli gıda işleme uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bununla birlikte kimyasal gıda katkı maddeleri ile ilgili tüketicilerin artan kaygıları ve artarak çoğalan sağlık sorunları doğal antimikrobikler daha çekici hale getirmektedir. Özellikle LAB tarafından üretilen bakteriyosinler bu talebi karşılamak için gıda endüstrisinde büyük bir potansiyele sahiptir. Gıda korunumunda LAB tarafından üretilen bakteriyosinler genellikle güvenli maddeler (GRAS özelliği) olarak tanınırlar. Ökaryotik hücrelerde pasif ve toksik değildirler, sindirim proteazları tarafından inaktif olurlar, bağırsak mikrobiyotası üzerine daha az olumsuz etkiye sahiptirler, genellikle pH ve ısıya dayanıklıdırlar, nispeten geniş bir antimikrobiyal spektruma sahiptirler, birçok gıda kaynaklı patojene ve bozulma bakterilerine karşıdırlar, bakterisidal etki mekanizmaları göstermektedirler, genetik belirleyicileri genellikle genetik manipülasyonu kolaylaştıran kodlanmış plazmitlerdir (Güllüce *et al.* 2013).

Bakteriyosinler ile ilgili gıda endüstrisindeki çalışmalar göstermiştir ki bakteriyosinler gıdaların raf ömrünü uzatabilir, kötü sıcaklık koşulları süresince ekstra koruma sağlayabilir, besin zinciri yoluyla gıda patojenlerinin bulaşma riskini azaltabilir, gıda bozulmaları nedeniyle ekonomik kayıpları önleyebilir, kimyasal koruyucuların uygulamalarını azaltabilir, gıda güvenliğini tehlikeye atmadan daha düşük derecede ısı işlem uygulamalarına izin verebilir; besinler ve vitaminlerin daha iyi korunması, gıdaların organoleptik özelliklerinin artırılmasının yanı sıra yeni tip gıdaların piyasaya sürülmesine de olanak sağlayabilirler (Galvez *et al.* 2007).

Bakteriyosinler *ex situ* üretilen preparatlar olarak ya da bakteriyosinogenik suşların inokülasyonlarıyla gıda işleme uygulamalarına eklenmiştir. Daha sonra bu antimikrobik ajanlar gıda matrisinde kendi spesifik aktivitelerini göstermek için hazır hale gelir. Ancak matris işlem adımları ve doğal mikrobiyota birçok durumda oldukça karmaşık ve değişken bir yapıya sahiptir. Bu yüzden bakteriyosinler patojenlerin faaliyetlerini durdurmak için tüm engelleyici faktörleri geçmek zorundadır. Galvez ve arkadaşları gıda uygulamaları için bakteriyosinlerin sınırlayıcı faktörlerini incelemiştir.

Çizelge 2.6. Gıdada bakteriyosin verimi ve sınırlayıcı faktörler (Galvez *et al.* 2007)

Gruplar	Sınırlayıcı Faktörler
Gıda ile ilgili faktörler	<ul style="list-style-type: none"> - Gıda işleme şartları - Gıda saklama sıcaklığı - Gıdanın pH'sı ve pH değişimlerinin bakteriyosinin stabilitesini bozması - Gıda enzimlerinin inaktivasyonu - Gıda içerikleri ile etkileşim - Gıda bileşenlerine bakteriyosin adsorpsiyonu -Gıda temelinde düzensiz dağılımı ve düşük çözünürlüğü - Gıda raf ömrü boyunca bakteriyosinin sınırlayıcı faktörleri
Gıda mikrobiyotası	<ul style="list-style-type: none"> - Mikrobiyal yük - Mikrobiyal çeşitlilik - Bakteriyosin duyarlılığı - Gıda sisteminde mikrobiyal etkileşimi
Hedef bakteri	<ul style="list-style-type: none"> - Mikrobiyalyük - Bakteriyosin duyarlılığı (Gram-tip, cins, tür, strainler) - Fizyolojik evre (büyüme, dinlenme, ölme veya canlı fakat kültürü yapılamayan hücreler, gerilimli veya öldürücü derecede zarar veren hücreler, endosporlar, vb. - Fizikokimyasal bariyerler tarafından koruma (mikrokoloniler, biyofilmler, mukoid madde) - Direnç/Adaptasyonun gelişimi

Bir başka çalışmada Galvez ve arkadaşları (2008) gıda endüstrisi uygulamalarında bakteriyosinlerin potansiyel kullanımlarını ayrıntılı olarak vermiştir. Bu araştırma özellikle bitkisel kaynaklı besin ve içecekler, balık ve deniz ürünleri, et ve kümes

hayvan ürünleri, günlük tüketilen yiyeceklerde bakteriyosinlerin uygulamalarını içermektedir.

Çizelge 2.7. Gıda endüstrisinde potansiyel bakteriyosin uygulamaları (Galvez *et al.* 2008).

Potansiyel Uygulamalar	Hedef Gruplar	Uygulama Detayları
Süt ve günlük ürünler	Ham materyal	<ul style="list-style-type: none"> - Saf süt içerisinde mikrobiyal büyümenin azalması - PEF ler ile ve HHP'nin kombinasyonu içinde süt içerisinde mezofilik bakterilerin inaktivasyonu
	Fermente ürünler	<ul style="list-style-type: none"> - Yarı katı ve katı peynirler üzerinde bulunan <i>C.tyrobtricum</i> ile gaz oluşmunun inhibiyonu - Peynir ve peynir yüzeyindeki patojenik ve toksigenik bakterilerin (<i>L. monocytogenes</i>, <i>B. cereus</i>, <i>S. aureus</i>) inhibisyonu - HHP kombinasyonu ile peynir içerisindeki mezofilik bakteri ve endospore formların inaktivasyonu - Yoğurt ve diğer fermente ürünler içerisindeki aşırı asitleşmenin kontrolü - Peynirde ve diğer fermente süt ürünlerindeki çürükçül bakteri ve patojenleri inhibe etmek için starterler ve ek kültürler olarak bakteriyosin üretici strainlerin kullanımı - Peynir içerisindeki LAB dağınık starter olmayan microflorayı inhibe etmek için bakteriyosin üreten starter kültürlerin kullanımı - Bakterinin saldığı intrasellüler enzimlerin azalışı vasıtasıyla peynir olgunlaşmasının hızlanması
	İşlenmiş ürünler	<ul style="list-style-type: none"> - Peynir üretiminde ve diğer günlük ürünlerin sürecinde endospor formların (başlıca <i>C. botulinum</i>) inhibisyonu - İşlem sonrası kontaminasyondan sonar günlük ürünlerde <i>L. monocytogenes</i>'in inhibisyonu
Et ve kümes hayvan ürünleri	Ham materyaller	<ul style="list-style-type: none"> - Çiğ etin temizlenmesi (spreyle yıkama işlemi gibi) - Etin bozulmasına neden olan bakterilerin inhibisyonu ve vakumlu paketlerde çiğ etin raf ömrünün uzaması - Çiğ et yüzeyinde ve kıyma içerisindeki <i>L. monocytogenes</i> bakterisinin inhibisyonu

Çizelge 2.7. (devam)

Pişmiş ürünleri	et	<ul style="list-style-type: none"> - Bozulmuş LAB türlerin inhibisyonu - Vakumla paketlenmiş kesilmiş et ürünlerinin uzun süre taze kalması - Kesilmiş et ürünleri içerisindeki gıda kaynaklı patojenlerin ve çürükçül bakterilerin inhibisyonu için uygulanan HHP iyileştirilmesinin yoğunluğunun azaltılması - Vakumla paketlenmiş et ürünleri içerisindeki <i>L. monocytogenes</i> ve çürükçül bakteriye karşı koruyucu kültür olarak bakteriyosin üreten LAB türlerinin kullanımı
Yumurta türevleri	ve	<ul style="list-style-type: none"> - Raf ömrünün uzatılması - Isı muamelesinin şiddetinin azaltılması - HHP ve PEF işlemlerinin birlikte uygulanmasında patojenik bakterinin inaktivasyonunun artırılması
Fermente ürünleri	et	<ul style="list-style-type: none"> - Çürükçül LAB türlerinin inhibisyonu - Gıda kaynaklı patojenlerin inhibisyonu (<i>Salmonella</i>, <i>L. monocytogenes</i>, <i>S. aureus</i>) - <i>L. monocytogenes</i> ve çürükçül bakterileri inhibe etmek için starterler olarak bakteriyosin üreten LAB türlerinin kullanımı (başlıca <i>L. sakei</i> strainleri) - Fermantasyon boyunca starterlerin etkilerinin iyileştirilmesi
Bitkisel kaynaklı gıdalar ve içecekler	Çiğ meyve ve sebzeler	<ul style="list-style-type: none"> - Çiğ sebzelerde bulunan <i>L. monocytogenes</i>'in etkisinin azaltılması (soya filizi ve diğerleri) - Tüketime hazır ürünlerin içerisinde <i>L. monocytogenes</i> ve <i>Salmonella</i>'nın etkinliklerinin azaltılması
Pişirilmiş ve pastörize edilmiş gıdalar	ve	<ul style="list-style-type: none"> - Pastörize gıdalarda endospor formların kontrolü - Pirinç kaynaklı gıdalarda <i>B. cereus</i>'un kontrolü
Konserveler		<ul style="list-style-type: none"> - Bitkisel kaynaklı konserveler içerisinde endospore form oluşturan asidürik ve asidürik olmaya çürükçül bakterilerin kontrolü - Meyve parçacıklı konservelerde <i>C. tyrobutyricum</i> tarafından çürümenin engellenmesi
Meyve suları ve içecekler		<ul style="list-style-type: none"> - Meyve suyu ve içeceklerde <i>Alicyclobacillus</i> tarafından bozunmanın önlenmesi - Meyve suyu içerisindeki <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>S. typhimurium</i>'in yok edilmesinin azalışı - Soya sütü içerisindeki <i>S. aureus</i> ve <i>L. monocytogenes</i>'in inhibisyonu
Fermente içecekler		<ul style="list-style-type: none"> - Birada bozulmaya sebep olan bakterilerin inhibisyonu - Şaraptaki bozulmaya neden olan bakterilerin inhibisyonu ve malolaktik fermantasyonun kontrolü. - Şarap endüstrisinde sülfürdioksit eklenerek azalması - Elma sırasındaki bozunmaya neden olan bakterinin inhibisyonu

Çizelge 2.7. (devam)

Fermente bitkisel ürünler	<ul style="list-style-type: none"> - İkili bir starter kültür kullanılarak fermente lahana turşusunun iyileştirilmesi. - Kısmen <i>Lactobacillus</i> sp. gelişimini önlemek için nisin eklenerek Kimchinin aşırı olgunlaşmasının kontrolü - Bir starter olarak bilinen nisin üreticisi <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> kullanılarak soya fasülyesi içerisindeki <i>B. subtilis</i>'in inhibisyonu - <i>P. acidilactici</i>'nin bir bakteriyosinogeneik strain tarafından kimchi içerisindeki <i>L. monocytogenes</i>'in kontrolü - Plantarisin S ve T üreten bir bakteriyosinogenik starter olan <i>L. plantarum</i> tarafından İspanya'ya özgü sofrta zeytinlerinin iyileştirilmesi
Diğer bitkisel fermente gıdalar	<ul style="list-style-type: none"> - Maya fermentasyonunun gelişimi - Ekmek içerisinde ipliksi formda basillerin inhibisyonu - Geleneksel tahıl fermente gıdalar içerisindeki gıda kaynaklı patojenlerin inhibisyonu

Bununla birlikte Sınıf I bakteriyosinlerin en önde gelen bakteriyosini olan nisin, uluslararası olarak bazı endüstriyel uygulamalar üzerine gıda biyokoruyucusu olarak kabul edilenlerden sadece birisi olup, pediyosin de son zamanlarda ticari bakteriyosin preparatı olarak gıda uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Mevcut çalışmalar bu preparatların sayısının büyük ölçüde yakın gelecekte artacağını öngörmektedir (Mills *et al.* 2011; Biscola *et al.* 2013).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez dahilinde kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

Kimyasal Materyaller	Markalar
MRS Broth	Sigma Aldrich
Nutrient Broth (NB)	Qxoid
Tryptic Soy Agar (TSA)	Merck
Agaroz	Lonza
Sodium phosphate dibasic	Sigma Aldrich
Sodium Clorur (NaCl)	Sigma Aldrich
Ammonium Sulfate (NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma Aldrich
Borik Asit (H ₃ BO ₃)	Sigma Aldrich
Fenol: Kloroform: İzoamil	Sigma Aldrich
İzopropanol Alkol	Sigma Aldrich
Kloroform: İzoamil Alkol	Sigma Aldrich
Etanol	Sigma Aldrich
Trizma	Sigma Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma Aldrich
EDTA	Sigma Aldrich
Gliserol	Sigma Aldrich
DMSO	Sigma Aldrich
CTAB	Sigma Aldrich
Proteinaz K	Sigma Aldrich
Ethidium Bromide	Sigma Aldrich
Plantaricin Primerleri	Methabion
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RT2 First Strand cDNA Kiti	Qiagen
RT2 Sybergreen Master Mix	Qiagen

3.1.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan alet ve cihazların listesi Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların listesi

Cihazlar Modelleri	
Buzdolabı	Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Cam Mezür	Isolab, 015.01.100
Derin Dondurucu Nuarie, -86 Ultralow Freezer	
Elektroforez Tankı (yatay)	OWL B2, U.S.A.
Elektroforez Sistemi	Owl, U.S.A., OSP300-2Q
İnkübatör	Binder, GERMANY, BD53
Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat, INFINITY-1000
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica / AREC
Hassas Terazı	Mettler Toledo, CHINA, AL204
Kar makinesi	Scotsman, U.S.A., AH 19828 5
Mikrodalga Fırın	Arçelik, TÜRKİYE, MD592
Mikrosantrifüj Tüpü	Eppendorf, 078.03.003
Magnetik Karıştırıcı	Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083
Nanodrop	Qiagen/Qiexpert 200061 24V F 2.5A
Otoklav	Hirayama, HVE 50, SN 030787253
Otomatik Pipetler	Eppendorf, GERMANY
PCR	Corbett Research CG1-96
pH Metre	Hanna, PORTUGAL, HI9321, SN 396202
RT-PCR	Qiagen/Rotor-Gene Q
Saf Su Cihazı	GFL, GERMANY, 2004
Santrifüj Cihazı	Hettich EBA 21, GERMANY
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Mikro 22R, M10
Su Banyosu	Jenotech, BS - 11
Steril Kabin	Esco, SINGAPORE, AC2-4E1
Vortex	IKA, U.S.A., MS2
PCR Cihazı SensoQquest, GERMANY, 1123240169	
Real-Time PCR Cihazı Rotor Gene Q	
Otomatik Pipet Setleri Eppendorf, GERMANY	
Ultra Santrifüj Beckman Coulter Allegra 64R Centrifuge	

3.1.3. Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltiler, hazırlanış biçimleri ve kullanıldıkları yerler aşağıda belirtilmiştir.

- 1. MRS Broth:** 52,2 g MRS broth içeriği (Merck) 1 L saf su içerisinde karıştırıldı. Besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildi.
- 2. Trypticase soy agar (TSA):** 40 g trypticase soy agar karışımı (Oxoid) 1 lt saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.
- 3. Stok Besiyeri:** 0,65 g nutrient broth karışımına, 36 mL gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 ml'lik eppendorf tüplerine 1,2 ml konularak hazırlandı.
- 4. TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 8) tamponu:** 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözüldü ve pH 8.0'e ayarlandı. Son hacim 250 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi.
- 5. 5 M NaCl çözeltisi:** 29,22 g NaCl'ün, 100 ml saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlanarak otoklavda steril edildi.
- 6. 1XTE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 8) çözeltisi:** 0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA saf su içerisinde çözüldü ve pH'sı 8.0'e ayarlandı. Son hacim 200 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi.
- 7. %10'luk SDS çözeltisi:** 10 g SDS'nin 100 ml saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlandı. Çözelti otoklavda steril edildi ve ağzı iyice kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- 8. Dimetil sülfoksit (DMSO):** %100'lük DMSO (Sigma) 2ml'lik eppendorf tüplere aktarılarak, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.
- 9. %10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi:** 80 mL saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözüldü. NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- 10. Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi:** Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır (Sigma 77617). +4°C’de muhafaza edilmiştir.
- 11. Kloroform:izoamilalkol (24:1) çözeltisi:** Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır (Sigma 77617). 24: 1 oranında hazır olarak kullanılmıştır. +4°C’de muhafaza edilmiştir.
- 12. %70’lik Etil alkol:** 70 ml saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml’ye tamamlandı. -20°C’de muhafaza edildi.
- 13. Proteinaz K:** 1 mL steril distile su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlandı. -20°C’de muhafaza edildi.
- 14. 5XTBE Tamponu (pH: 8):** 54 g Tris, 27,5 g borik asit ve 20 mL 0,5 M EDTA 500 mL steril distile su içerisinde çözüldükten sonra karışımın pH’sı 8.0’e ayarlandı ve toplam hacim steril distile su ile 1 L’ye tamamlandı.
- 15. 5XTAE Tamponu (pH: 8):** 24,2 g Tris, 5,71 ml glacial asetik asit, 10ml 0,5 M EDTA, 500 ml steril distile su içerisinde homojenize edildikten sonra karışımın pH’sı 8.0’e ayarlandı ve toplam hacim steril distile su ile 1 L’ye tamamlandı.
- 16. 0,5XTBE Tamponu:** 100 ml 5xTBE’nin hacmi steril distile su ile 1 L’ye tamamlanarak hazırlandı.
- 17. 0,5XTAE Tamponu:** 100 ml 5xTAE’nin hacmi steril distile su ile 1 L’ye tamamlanarak hazırlandı.
- 18. Ethidium bromür çözeltisi:** 100 mL distile su içerisinde, 1 g ethidium bromür (10 mg/ml) magnetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözüldü ve amber şişe içinde, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- 19. 6X yükleme tamponu:** 100 mL için, %100’lük gliserolden 40 mL alınıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırıldı ve hacmi 1x TBE ile 100 ml’ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C de muhafaza edildi.
- 20. Kullanılan Kitletler:** RNeasy Mini Kit (Qiagen), RT2 First Strand cDNA sentez kiti (Qiagen), RT2 Sybergreen Master Mix (Qiagen).

3.1.4. Çalışmada kullanılan bakteri

Çalışmamızda kullanılacak *L. plantarum* S54 (Genbank No: KR011002) bakterisi Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarından TAGEM/ 13 / AR-GE /6 proje no'lu projeden temin edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. *L. plantarum* S54 bakterisinin gelişimi

Çalışmada kullanılacak olan bakteri *L. plantarum* S54 bakterisi, 250 ml'lik steril MRS broth besiyerine inoküle edilip 30°'de 48 saat çalkalayıcılı inkübatöre gelişmesi için bırakıldı.

3.2.2. Sıcaklık uygulamasının *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan *L. plantarum* S54 bakterisi MRS broth besiyerinde büyütüldü. Daha sonra 50 ml'lik steril sıvı besiyerlerine inoküle edildi ve 20°C, 30°C, 40°C ve 60°C sıcaklıklarda çalkalayıcılı inkübatörde 48 saat büyütüldü (Bozoglu 2014). Son olarak bu örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.3. pH uygulamasının *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan *L. plantarum* S54 bakterisi MRS broth besiyerinde büyütüldü. Bakteri pH 3.0, pH 5.0, pH 7.0 ve pH 9.0 değerlerine sahip 50 ml'lik steril sıvı besiyerlerine inoküle edildi ve çalkalayıcılı inkübatöre 48 saat inkübe edildi. Son aşamada ise bu örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.4. Tuz Konsantrasyonunun *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılacak bakteri olan *L. plantarum* S54'ün plantarisin genleri üzerinde farklı tuz konsantrasyonlarının etkisine bakmak için MRS broth besiyeri kullanıldı. *L. plantarum* S54 bakterisi %0, %3, %6 ve %9 tuz konsantrasyonlarına sahip 50 ml'lik steril MRS broth besiyerine inoküle edildi ve çalkalayıcı inkübatörde 48 saat gelişmeye bırakıldı. Daha sonra bu örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.5. Gıda patojeni varlığında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi

Gıda patojenlerine karşı bakteriyosin üretiminden sorumlu plantarisin genlerinin ekspresyon seviyesine bakmak için 50 ml'lik steril MRS broth besiyerine gıda patojenleri ve *L. plantarum* S54 bakterisinden inoküle edildi ve çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de 24 saat gelişmeye bırakıldı. Daha sonra bu örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.6. *L. plantarum* S54 bakterisinin genomik DNA'sının izolasyonu

Araştırmada kullanılacak olan *L. plantarum* S54'den DNA ekstraksiyonu Adıgüzel 2006 tarafından modifiye edilen izolasyon metoduna göre yapıldı (Adıgüzel, 2006).

1. DNA'sı izole edilecek olan *L. plantarum* S54 NA besiyerine 3 faz halinde ekilerek petriler 55-56°'ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
2. Steril edilmiş, ağzı kapaklı 1,5 ml'lik ependorflara 1000 µl STE (hücre duvarını parçalayarak hücre içeriğinin serbest hale gelmesini sağlar) tamponu konularak içerisine 2-3 öze dolusu bakteri kültürü ilave edildi.
3. Tüp, 2500 rpm'de vortekslenerek homojenize olmaları sağlandı.

4. Vortekslenen tüp, 10 000 rpm'de 10 d süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alınarak atıldı ve peletin üzerine tekrar 1000 µl STE tamponu eklenerek, 10 d 10 000 rpm'de santrifüjlendi. Bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrar edildi.
5. Santrifüj sonrası, oluşan üst faz atılarak peletin üzerine 500 µl STE tamponu ilave edildikten sonra mikropipetle dikkatlice alıp vermek (pipetaj) suretiyle tamponun peletle iyice karışması sağlandı.
6. Tüp, 75°C'ye ayarlı su banyosunda 30 d süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun 15. dakikasında tüp alınarak 4-5 kez alt üst edilerek tekrar inkübasyona bırakıldı.
7. Su banyosundan çıkartılan tüpe 50 µl %10'luk SDS (proteinler arasındaki disülfid bağlarını parçalar) ve 7 µl proteinaz K (proteinleri parçalar) eklenmiş ve 40°C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat süreyle inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası tüpe ortamdaki tuz konsantrasyonu 0,75-0,8 M olacak şekilde 5M NaCl ve 0,1 hacim %10'luk CTAB/0,7 M NaCl (DNA'yı polisakkaritlerden ve ortamdaki diğer bileşiklerden arındırır) eklendi.
9. Tüp, 65°C'ye ayarlı su banyosunda 15 d inkübe edildi.
10. Su banyosundan alınan tüpe eşit hacimde 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol (genellikle, nükleik asitlerden proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanıldı. Kloroform proteinleri denatüre ederek, sıvı ve organik fazların ayrışmasını sağlar. İzoamilalkol ise ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek köpürmeyi engeller) ilave edilerek 15 d oda sıcaklığında çalkalayıcı karıştırıldı.
11. Tüp, 16 000 rpm'de 15 d santrifüjlendikten sonra oluşan üst faz yeni steril ependorf tüplere aktarıldı. Üzerine 0,1 hacim %10 CTAB / 0.7 M NaCl (ortamda bulunabilecek polisakkarit kalıntılarını elemine etmede kullanılır) eklendi.
12. 65°C'ye ayarlı su banyosunda, tüp 15 d bekletildi.
13. Tüpe eşit hacimde 24:1 kloroform: izoamilalkol eklendi ve tüpler 15 d oda sıcaklığında, çalkalayıcı çalkalandı.
14. Tüp tekrar 16 000 rpm'de 15 d santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası oluşan üst faz yine yeni steril bir ependorfa alındı.
15. Tüp üzerine 0,6 hacim izopropanol (DNA'yı bağlayarak, iplikcikler halinde çökmesini sağlar) eklendi.
16. Tüp -20°C'de 1 gece boyunca bekletildi.
17. Buzdolabından çıkartılan tüp 15 000 rpm de 15 d santrifüjlendi.

18. Üzerine -20°C’de bekletilen %70 lik etanolden (DNA’yı yıkamak amacıyla kullanılır) 500-600 µl eklendi ve 15 000 rpm de 15 d süreyle santrifüjlendikten sonra süpernatant yavaş ve dikkatlice döküldü.

19. Peletin üzerine yeniden %70 lik etanolden 500-600 µl eklenerek, 15 000 rpm de 15 d santrifüjendi. Süpernatant dikkatlice dökülerek tüpler ağzı açık bir şekilde etil alkolün uçması, DNA’nın kuruyarak şeffaf bir görünüm alması amacıyla 2-3 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi.

20. Tamamen kuruduktan sonra, DNA’lar 50-70 µl TE içinde oda sıcaklığında 30 d bekletilerek, iyice çözünmesi sağlanmış ve üzerlerine 2-3 µl RNase ilave edildi.

21. DNA’lar %0,6’lık agaroz jelde yürütüldü ve jelde tek parça bant veren örnekler 4°C’ye kaldırılarak sonraki çalışmalar için hazır hale getirildi.

DNA konsantrasyonunun ölçülmesi ve çalışma solüsyonunun hazırlanması

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm’deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin temizliği yani protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm’de okunan absorbans değeriyle tespit edildi. Kuvarts küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm’ye ayarlı spektrofotometrede absorbansı ölçülmüş ve elde edilen değer kör olarak kaydedildi. Ardından küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandıktan sonra 260 nm’de absorbansı yeniden ölçüldü. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA’nın absorbans değeri bulundu. Yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için de tekrarlanarak, A_{260} ve A_{280} değerlerine bakılarak $A_{260} / A_{280} = 1-1,7$ olan örnek çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı (Bozoglu 2014).

3.2.7. *L. plantarum* S54 bakterisinde varolduğu bilinen plantarisin genlerin PCR yardımı ile çoğaltılması

L. plantarum S54 bakterisinin genomik DNA’sı kullanılarak bakteriyosin veritabanındaki uygun plantarisin üreten primerler kullanılarak PCR uygulamaları yapıldı. Plantarisin üretimini gerçekleştiren diğer gen sekanslarının PCR amplifikasyonu Çizelge 3.3’de bulunan primerler ve koşullar altında uygulandı.

Çizelge 3.3. Plantarisinin üretimini sağlayan genlerin belirlenmesi için kullanılan PCR primerleri ve koşulları (Omar *et al.* 2008)

Hedef	PCR primerleri	Annealing Sıcaklığı	Amplikonların boyutu (bp)	Referanslar
<i>plnA</i>	F: GTACAGTAC TAATGGGAG R: CTTACGCCA	53	450	Diep <i>et al.</i> (1996); Remiger <i>et al.</i> (1999)
<i>plnB</i>	ATC TATACG F: TTCAGAGCA AGC CTA AATGAC	51.5	165	Diep <i>et al.</i> (1996)
<i>plnC</i>	R: GCCACTGTA ACA CCA TGAC F: AGCAGATGA	49.5	108	Diep <i>et al.</i> (1996)
<i>plnD</i>	AATTCGGCAG R: ATAATCAA CGG TGC AATCC F: TGA GGACAA	53	414	Diep <i>et al.</i> (1996)
<i>plnEF</i>	ACAGACTGGAC R: GCA TCG GAA AAA TTGCGG ATAC F: GGC ATAGTT	53.2	428	Anderssen <i>et al.</i> (1998); Diep <i>et al.</i> (1996)
<i>plnI</i>	AAA ATT CCC CCC R: CAGGTTGCC GCA AAA AAA G F: CTCGACGGTGAA ATT AGG TGT AAG R: CGT TTA TCC TAT CCT CTA AGC ATT GG F: TAAACGACGG ATT GCTCTG R: AATCAA GGA ATT ATC ACA TTA GTC F: CTGTAAAGCA	52.5	450	Diep <i>et al.</i> (1996)
<i>plnJ</i>	ATT GCTCTG R: AATCAA GGA ATT ATC ACA TTA GTC F: CTGTAAAGCA	51	475	Anderssen <i>et al.</i> (1998); Diep <i>et al.</i> (1996)
<i>plnK</i>	F: CTGTAAAGCA	52.9	246	Anderssen <i>et al.</i> (1998)
<i>plnG</i>	F: TGC GGT TATCAG TATGTC AAA G R: CCTCGA AAC AAT TTC CCC C	52.8	453	Diep <i>et al.</i> (1996)
<i>plnN</i>	F: ATTGCCGGG TTA GGT ATC G R: CCTAAAACCATGC CAT GCAC	51.9	146	Diep <i>et al.</i> (1996)
Plantaricin NC8 yapısal geni	F: GGTCTGCGTATA AGC ATCGC R: AAA TTG AAC ATA	60	207	Maldonado <i>et al.</i> (2004)
Plantaricin S yapısal geni	TGG GTG CTT TAA ATT CC F: GCC TTA CCA GCG TAA TGC CC R: CTG GTG ATG CAA TCG TTA GTT T	60	320	Stephens <i>et al.</i> (1998)
Plantaricin W yapısal geni	F: TCA CAC GAA ATA TTC CA R: GGC AAG CGT AAA TAA ATG AG	55	165	Holo <i>et al.</i> (2001)

Reaksiyonun (Master mix'in) hazırlanması

PCR'ı yapılacak örnek için 3 µl 10x PCR tamponu (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %0.01 jelatin pH: 8.3), 0.6 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10mM), 4 µl Forward, 4 µl Reverse, 1.2 µl DMSO, 1.8 µl MgCl₂ (50 µM), 0.3 µM / ml taq DNA polimeraz ve 12.1 µl sdH₂O ile 27 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma son olarak 3 µl template DNA (100 ng/µl) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlandı.

PCR programı

Hazırlanan örnekler, 95°C'de 2 dakika denatürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 d denatürasyon, 53-56°C'de 1 d bağlanma ve 72°C'de 1 d uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 5 d uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü cihazına yerleştirildi. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı (Bozoglu 2014).

Spesifik PCR ürünlerinin elektroforezi

1,2 gr agaroz üzerine 120 ml 1XTAE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edildi. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. 50°C'ye kadar soğutulan agarose jele 0,6 µl etidium bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 15-20 d beklenerek jelin donması sağlandı. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı ve içerisinde 1XTAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D7058) 8 µl yüklendi. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu, 8 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklendi.

Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 75 d yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülendi ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edildi (Bozoglu 2014).

3.2.8. *L. plantarum* S54 bakterisinden bakteriyosinin kısmi olarak saflaştırılması

MRS Broth ortamında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisi santrifüj yardımı ile çöktürüldü. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek kültür üst sıvısı steril bir erlen içerisinde toplandı ve elde edilen süpernatanta sırasıyla %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve %80-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Elde edilen süpernatant amonyom sülfat kullanılarak %0-40 doygunluğa getirildi (Nadaroglu, 2009).

Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyom sülfat miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$g [(NH_4)_2SO_4] = 1,77 \times V \times (S2 - S1) / 3,54 - S2$$

V = Süpernatant

S1 = 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S2 = 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında, ham ekstrakta katı $(NH_4)_2SO_4$ az miktarlarda ilave edilerek çöktürme yapıldı. Her ilave sırasında daha önce katılan $(NH_4)_2SO_4$ 'ların çözülmüş olmasına dikkat edildi ve soğuk ortamda yapılmasına dikkat edildi. Bu işlem yarım saatle-bir buçuk saat arasında sürdürüldü. Katı amonyum sülfat katılmasından sonra %40 doygunluğa getirilen süspansiyon bir gece $+4^\circ C$ 'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı (Nadaroglu 2009).

3.2.9. *L. plantarum* S54 bakterisinden saflaştırılan bakteriyosinin gıda patojenlerine karşı etkisinin araştırılması

Geliştirilmiş olan *L. plantarum* S54 bakterisinden elde edilen bakteriyosinin gıda patojenleri olan *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 29213, *L.monocytogenes* C3970, *B.cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB suşları üzerine antibakteriyal etkilerine bakıldı. Patojen mikroorganizmaların yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyeri üzerine 48 saatlik aktif kültürden kağıt disklerle emdirilen bakteriyosin örneği yerleştirilirdi ve 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

3.2.10. *L. plantarum* S54 bakterisinden RNA izolasyonu

15 farklı (sıcaklık, pH, tuz, patojen varlığı) koşul uygulanarak geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinden RNeasy Mini Kit (Qiagen) ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu için homojenat hazırlanışı aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. 1 lop bakteri 2ml’lik kapaklı tüpe alındı ve hücre sayısı $5 \times 10^8 - 7.5 \times 10^8$ aralığına ayarlandı.
2. Elde edilen pellet üzerine(daha önceden hazırlanan 1000 µl RLT buffer +10µl β-merkaptto ethanol) RLT bufferdan 350µl eklendi ve iyice homojenize oluncaya kadar vortekslendi.
3. Oluşan lizat üzerine 350 µl %70’lik etanol ilave edildi ve iyice karışması için pipetleme yapıldı.
4. Elde edilen toplam 700 µl örnek alınarak RNeasy mini spin kolonlarına yüklendi ve kapaklar kapatıldı.(2ml’lik toplama tüpleri kolon altına geçirildi.) 15 s 8000g (10.000 rpm)’de santrifüj yapıldı. Altta oluşan süzöntü atıldı.
5. 700 µl Buffer RW1 spin kolonun üzerine eklendi. 15 s 8000g (10.000 rpm)’de santrifüj yapıldı. Altta oluşan süzöntü atıldı.
6. 500 µl Buffer RPE spin kolonun üzerine eklendi. 15 s 8000g (10.000 rpm)’de santrifüj yapıldı. Altta oluşan süzöntü atıldı.

7. 500 µl Buffer RPE pembe spin kolonlarına yüklendi. 2 d 8000g (10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpleri atıldı.
8. Opsiyonel olarak RPE Buffer'ın iyice uzaklaştırılması için toplama tüpleri değiştirilip 1 d son hızda santrifüj yapıldı. Toplama tüpleri atıldı.
9. 1,5 ml'lik tüpler içine kolonlar yerleştirildi. Üzerine 30-50 µl RNase Free Water eklendi. 1 d 8000g de santrifüj yapılarak RNA elüsyonları elde edildi. Bu aşamadan sonra kolonlar bir kenara ayrıldı. RNA konsantrasyonlarının düşük çıktığı durumlarda bu basamak tekrarlandı.

RNA Miktar Tayini

İzole edilen RNA örneklerinden miktar tayini ve saflık derecesi belirlendi. Bu spektrofloreometre kullanılarak 260 nm ve 280 nm de ölçüm gerçekleştirildi. Ölçüm sonrasında $A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü} (60) \times 40 \mu\text{g/ml} = X \mu\text{g/ml}$ RNA formülü kullanılarak her bir örnekteki toplam RNA miktarı ve “A260/A280” oranından yararlanarak RNA saflık derecesi belirlendi.

3.2.11. cDNA kütüphanesinin oluşturulması

Farklı ortamlarda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakteri örneğinden total RNA izole edildi. PCR temelli cDNA oluşturma; PCR-seçimli cDNA oluşturma kiti kullanılarak yapıldı.

3.2.12. cDNA için revers transkriptaz (RT-PCR) kullanılması

RT-PCR analizi, farklı ifade edilen cDNA'ların sekanslarını doğrulamak için yapıldı. RNA'sı saflaştırılan örneklerin konsantrasyonları ayarlandı. Qiagen RT2 First Strand cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi üretici firmanın vermiş olduğu protokol talimatlarına uygun yapılmıştır.

1. 1µl RNA'da 100 nanogram konsantrasyon olacak şekilde ayarlama yapıldı. Toplam hacim 12µl'ye göre ayarlandı.
2. Sonrasında 2µl gDNA elimination buffer eklendi.
3. 42°C de 2 dakika thermal cyclers'da inkübe edildi. Sürenin bitiminde çıkarılan tüpler üzerine: Reaction Buffer 4 µL, RNase Inhibitor (20 U/µL) 1 µL, dNTP Mix 1 µL ve Reverse Transcriptase 1 µL eklenip, toplam hacim 20µl'ye tamamlandı.
4. 15 dakika 42°C'de ardından 3 d 95°C (Reverse Transcritase'ı inaktive etmek için) Thermal Cycler cihazında reaksiyon gerçekleştirildi.
5. Elde edilen ürünler çok yoğun olduğu için 91ul RNase DNase free H₂O ile seyreltilerek konsantrasyonları dengelendi.
6. Seçilen gen bölgelerinin primerleri kullanılarak cDNA'lar amplifiye edildi.

3.2.13. Real-Time PCR kullanılarak gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Çalışmamızın bu aşamasında 12 farklı şart uygulaması yapılarak geliştirilen *L. plantarum* S54 bakteri örneklerinde yer alan ilgili bakteriyosin genlerinin ekspresyon seviyelerini belirlemek için Real-Time PCR tekniği (Qiagen Rotorgene Q cihazı) kullanıldı. Çalışma SyberGreen tabanlı bir çalışma olup, toplam 7 hedef gen (*plnB*, *plnC*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN*) ve 1 referans gen (*rpo*) olmak üzere 8 gen üzerinden gerçekleştirildi. Tüm real-time PCR örnekleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PCR analizinde, cDNA'lar kalıp olarak kullanıldı ve belirlediğimiz gen bölgelerinin ifadesi *rpo* gen bölgesi ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Reaksiyonun hazırlanması

PCR'ı yapılacak örnek için 12,5 µl Master mix, 0,25 µl Forward (20 pmol), 0,25 µl Reverse (20 pmol) ve 9,5 µl sdH₂O ile 22,5 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma son olarak 2,5 µl cDNA eklenerek son hacim 25 µl'ye tamamlandı.

Real-Time PCR programı

Hazırlanan örnekler, 50°C’de 2 d, 95°C’de 10 d bunu takiben 45 döngü olacak şekilde 94°C’de 15 s denatürasyon, 54°C (plnK) -55°C (plnE ve plnJ) - 56°C (plnB, plnC ve plnN) – 58°C (plnD)’de 1 d bağlanma basamağından oluşacak şekilde programlanan Real-Time PCR cihazına yerleştirildi.

3.2.14. Verilerin analiz edilmesi

Sonuçların analizinde kontrol ve muamele grupları arasındaki karşılaştırmayı hesaplamak için kullanılan Δ CT metodunun formülü şu şekildedir:

$$\text{Ekspresyon Seviyesi} = 2^{\text{CT (Referans)} - \text{CT(Hedef)}}$$

2: Hedef geni çoğaltan primer etkinlik oranı (Bu oran %100’e yakın ise 2 alınır.)

CT Referans: Reaksiyon sırasında referans (housekeeping) genin miktarsal olarak anlamlı değişiminin gerçekleştiği değer

CT hedef: Reaksiyonu sırasında hedef genin miktarsal olarak anlamlı değişiminin gerçekleştiği değer

Çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 7.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplara Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) uygulandı. Bütün sonuçlarda mean±standard hata (SEM) değerleri analiz edildi. Yıldız olarak ifade edilen değerler istatistiksel analiz sonucu elde edilen p önem değerlerini ifade etmektedir. Önemlilik derecesine göre yıldız sayısı 1 ile 3 arasında doğru orantılı olarak değişmektedir. p>0,05=ns (not significant) önemsiz, p<0,05= *(significant) önemli, p<0,01= **(very significant) çok önemli, p<0,001= *** (highly significant) yüksek derecede önemli (Gönül 2013).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *L. plantarum* S54 Bakterisinin Gelişimi

Çalışmada kullanılacak olan *L. plantarum* S54 250 ml'lik steril MRS broth besiyerine inoküle edilip 30°C'de 48 saat çalkalayıcı inkübatöre gelişmesi için bırakılmış ve DNA izolasyonu yapılmıştır.

4.2. Sıcaklık uygulamasının *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine 20°C, 30°C, 40°C ve 60°C sıcaklıklardaki etkisini incelemek için bakteriden 50 ml'lik steril sıvı besiyerlerine inoküle edildi. Daha sonrasında RNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerden nanodropta RNA miktar ölçümleri yapıldı ve konsantrasyonları eşitlendi.

4.3. pH uygulamasının *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine pH'nın etkisine bakmak için bakteriden, pH 3.0, pH 5.0, pH 7.0 ve pH 9.0 değerlerine sahip 50 ml'lik steril sıvı besiyerlerine inoküle edildi. Daha sonrasında RNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerden nanodropta RNA miktar ölçümleri yapıldı ve konsantrasyonları eşitlendi.

4.4. Tuz Konsantrasyonunun *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi

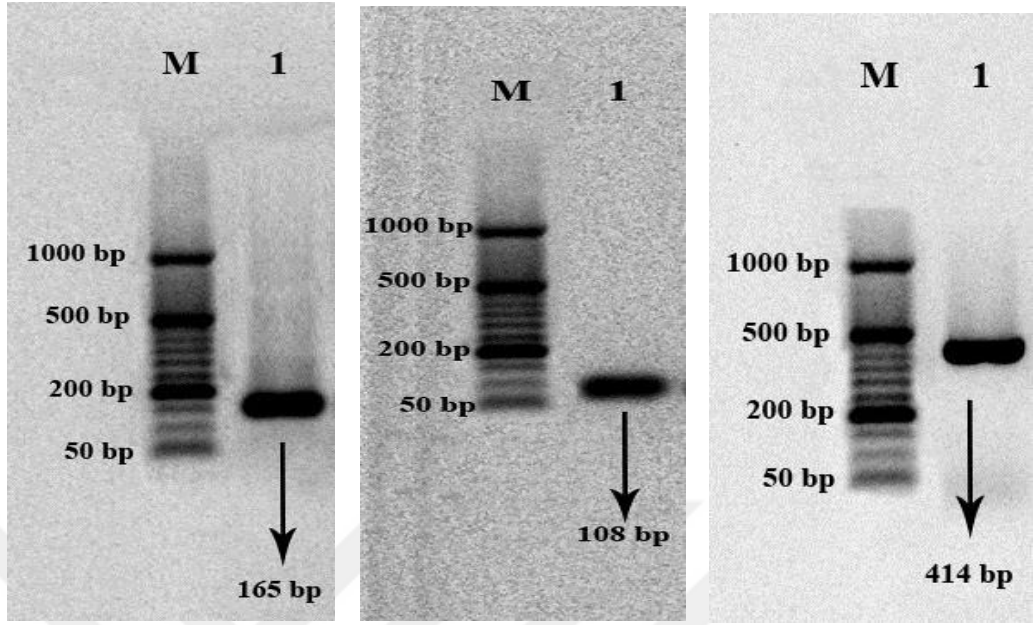
Çalışmada kullanılan *L. plantarum* S54 bakterisinin plantaricin genlerinin ekspresyonu üzerine farklı tuz konsantrasyonlarının etkisine bakmak için bakteriden; %3, %6 ve %9 tuz konsantrasyonlarına sahip 50 ml'lik steril sıvı besiyerlerine inoküle edildi. Daha sonrasında RNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerden nanodropta RNA miktar ölçümleri yapıldı ve konsantrasyonları eşitlendi.

4.5. Gıda patojenlerinin varlığında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon üzerine etkisi

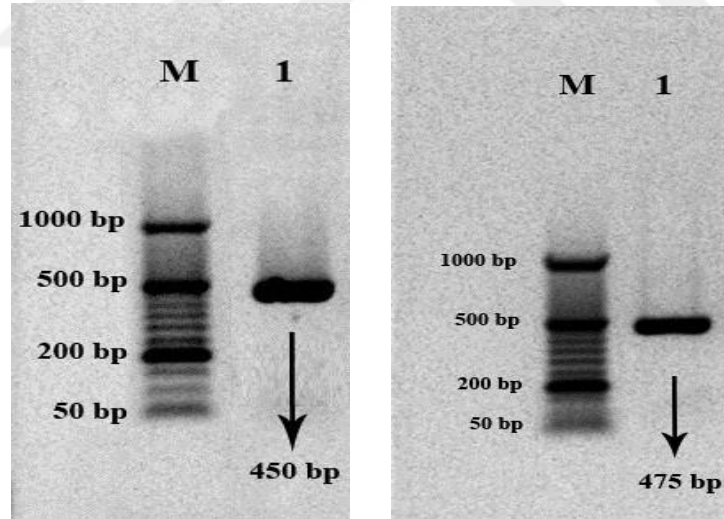
Gıda patojenlerine karşı bakteriyosin üretiminden sorumlu plantaricin genlerinin ekspresyon seviyesine bakmak için 50 ml'lik steril sıvı besiyerlerine gıda patojenleri ve *L. plantarum* S54 bakterisinden inoküle edildi. Daha sonrasında RNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerden nanodropta RNA miktar ölçümleri yapıldı ve konsantrasyonları eşitlendi.

4.6. *L. plantarum* S54 bakterisinde var olduğu bilinen plantarisin genlerinin PCR amplifikasyon sonuçları

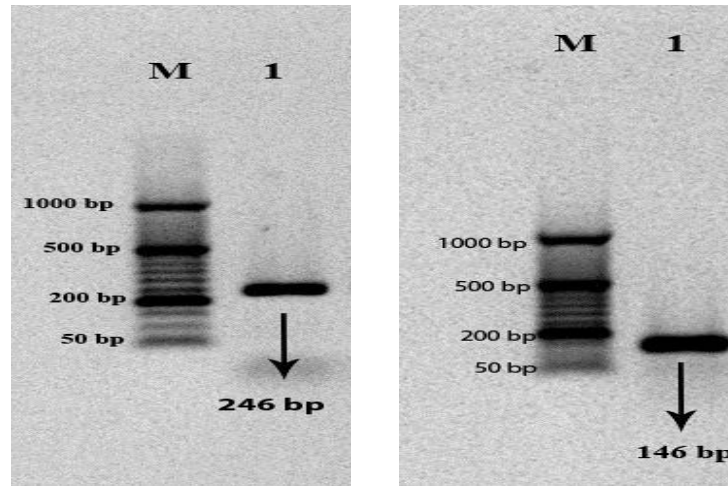
L. plantarum S54 bakterisinden izole edilen genomic DNA'dan, 2008 yılında Omar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmasından seçilen 13 primerinden 7 tanesinde amplifikasyon sonuçları gözlenmiştir. Yapılan analiz sonuçları Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *L. plantarum* S54 bakterisinde bakteriyosin üretimini sağlayan genlere ait primerlerin PCR jel görüntüleri (*plnB* [165bp]; *plnC*[108bp]; *plnD*[414bp])



Şekil 4.2. *L. plantarum* S54 bakterisinde bakteriyosin üretimini sağlayan genlere ait primerlerin PCR jel görüntüleri (*plnE* [450bp]; *plnJ* [475bp])



Şekil 4.3. *L. plantarum* S54 bakterisinde bakteriyosin üretimini sağlayan genlere ait primerlerin PCR jel görüntüleri (*plnK* [246bp]; *plnN* [146bp])

4.7. *L. plantarum* S54 Bakterisinden Bakteriyosinin Kısmi olarak Saflaştırılması

L. plantarum S54 bakterisinden 500 ml steril MRS broth ortamına %1 oranında ekim yapıldı ve 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kültürler 9000 devirde 30 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek kültür üst sıvısı steril bir erlen içerisinde toplandı ve elde edilen süpernatanta sırasıyla %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve %80-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Elde edilen süpernatant amonyum sülfat kullanılarak %0-40 doygunluğa getirildi (Nadaroglu 2009).

Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$g [(NH_4)_2SO_4] = 1,77 \times V \times (S2 - S1) / 3,54 - S2$$

V = Süpernatant

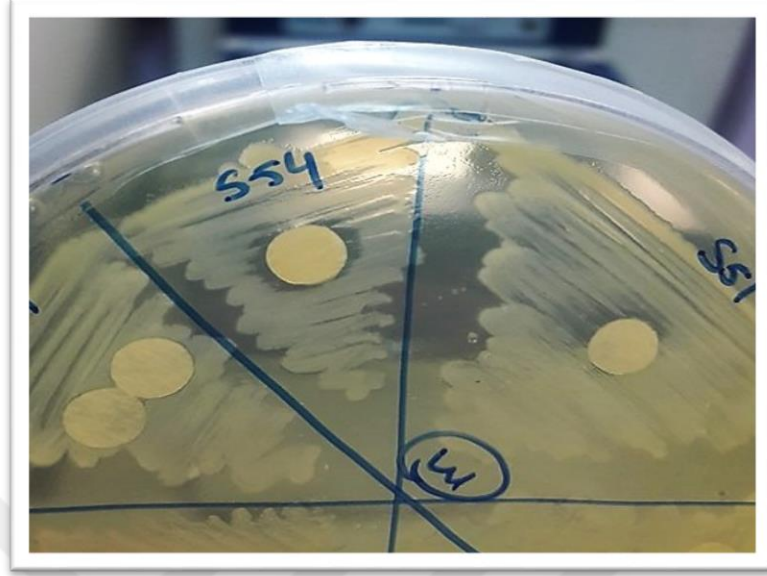
S1 = 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S2 = 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında, ham ekstrakta katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ az miktarlarda ilave edilerek çöktürme yapıldı. Her ilave sırasında daha önce katılan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ların çözünmüş olmasına dikkat edildi ve soğuk ortamda yapılmasına dikkat edildi. Bu işlem yarım saatle-bir buçuk saat arasında sürdürüldü. Katı amonyum sülfat katılmasından sonra %40 doygunluğa getirilen süspansiyon bir gece $+4^\circ\text{C}$ 'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Bir gece sonunda $+4^\circ\text{C}$ 'de 15000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bitiminde üst faz döküldü ve çökelti 1,5 ml 0.005 M sodyum fosfat (pH 6.0) tamponu içerisinde çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çözelti diyaliz torbasına yerleştirilip pH: 6.0 sodyum fosfat tamponuna karşı magnetik karıştırıcı üzerinde $+4^\circ\text{C}$ 'de 1 saat süreyle diyaliz edildi.

4.8. *L. plantarum* S54 bakterisinden saflaştırılan bakteriyosinin gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisi

Geliştirilmiş olan *L. plantarum* S54 bakterisinden elde edilen bakteriyosinin gıda patojenleri olan *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB suşları üzerine antibakteriyal etkileri patojen mikroorganizmaların yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyeri üzerine 48 saatlik aktif kültürden kağıt disklere 15 µl hacimde emdirilen bakteriyosin örneği yerleştirilirdi ve 37°C 'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda disklerin zon çapına bakılarak bakteriyosin örneğinin antimikrobiyal etkisi değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.4. *L. plantarum* S54 bakterisi süpernatantının patojen mikroorganizma olan *Micrococcus luteus* NCIMB karşı gösterdiği antimikrobiyal etki

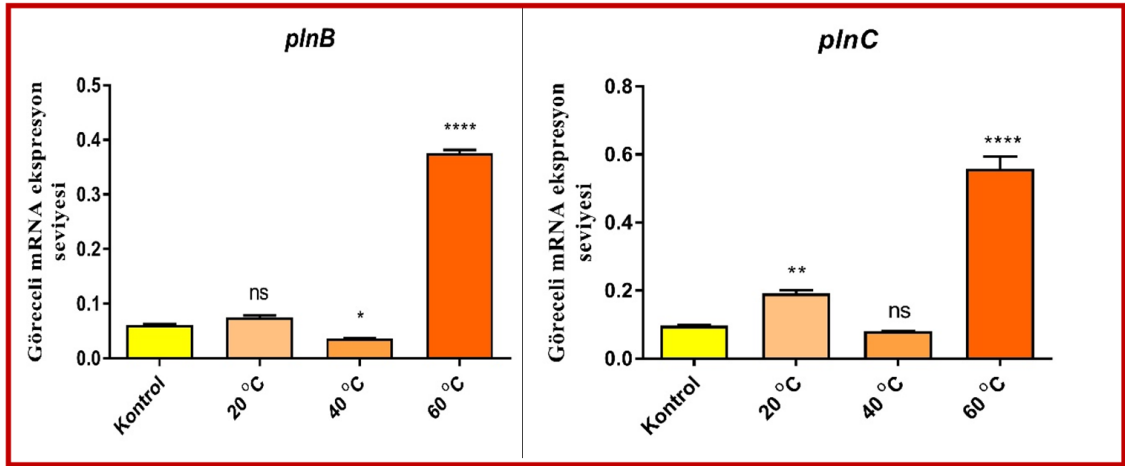


Şekil 4.5. *L. plantarum* S54 bakterisinden kısmi saflaştırılmış olan bakteriyosin örneğinin patojen mikroorganizmalara (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB) karşı gösterdiği antimikrobiyal etkisi

4.9. *L. plantarum* S54 bakterisinin Real-Time PCR'daki gen ekspresyon sonuçları

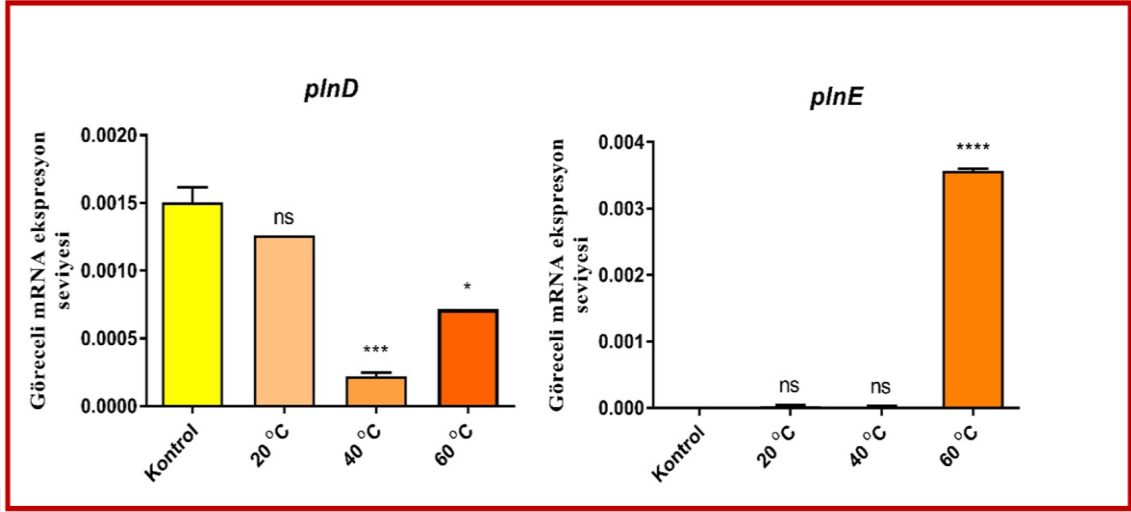
4.9.1. Farklı sıcaklıklarda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin geninin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

20°C, 30°C (Kontrol), 40°C ve 60°C sıcaklıklarda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinden bakteriyosin üretiminin gerçekleşmesi için gerekli olan plantarisin geninde bulunan *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* ve housekeeping gen olan *rpo* genlerine ait mRNA'larının ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.



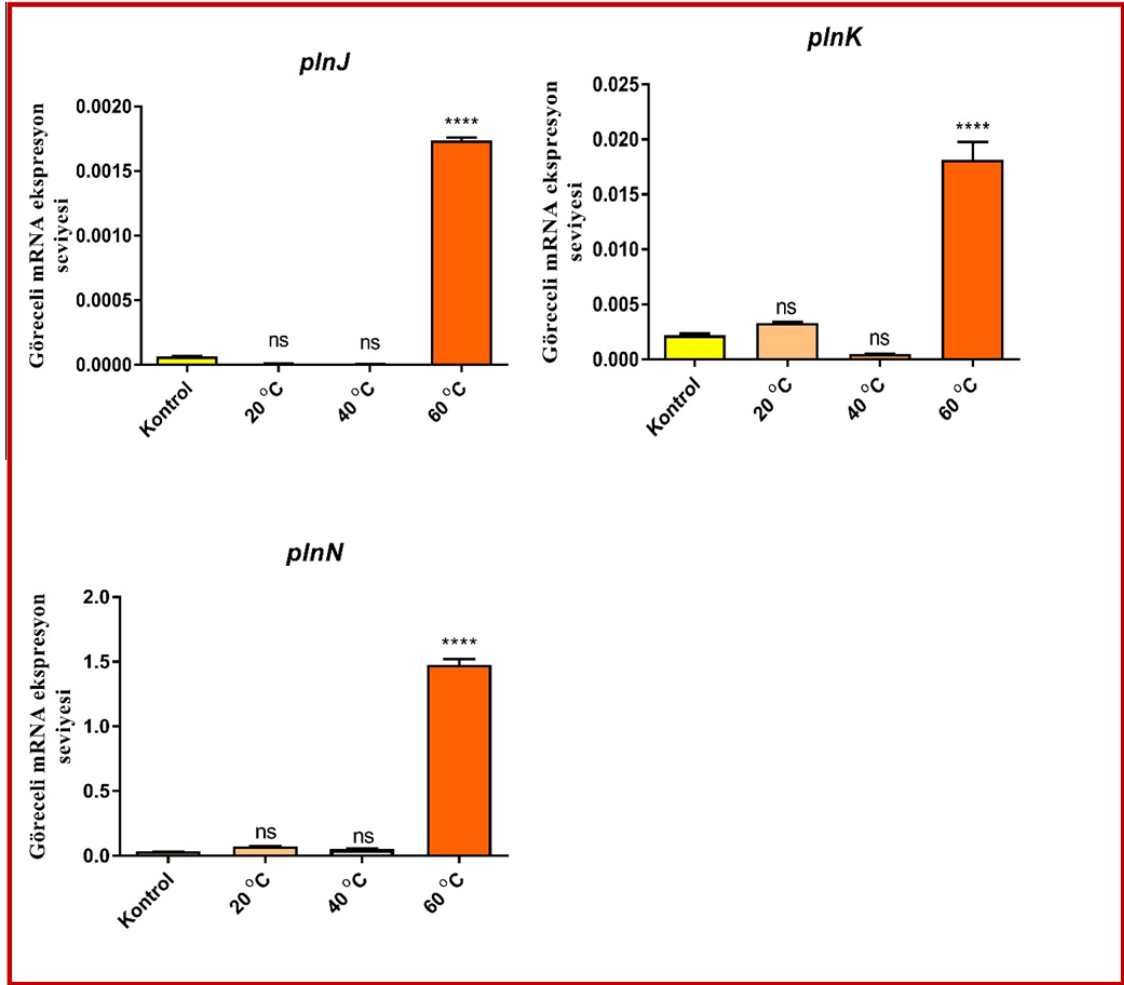
Şekil 4.6. Kontrol grubu ve farklı sıcaklıklarda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnB* ve *plnC* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.6'ya göre *plnB* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. Bu genler kontrole göre kıyaslandıklarında bu genlerde 20°C ve 60°C'de önemli derecede gen ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. 40°C'de ise *plnB* geninde azalış varken *plnC* geninde değişim tespit edilememiştir.



Şekil 4.7. Kontrol grubu ve farklı sıcaklıklarda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnD* ve *plnE* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.7'ye göre *plnD* ve *plnE* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. Kontrole göre kıyaslandıklarında *plnD* geninin 40 ve 60°C'de ekspresyonunda önemli derecede azalış gözlemlenirken, 20°C'de herhangi bir değişim tespit edilememiştir. *plnE* geninin ekspresyonunda sadece 60°C sıcaklıkta önemli derecede artış gözlemlenmiştir. Diğer sıcaklıklarda ekspresyonda değişim tespit gözlemlenememiştir.



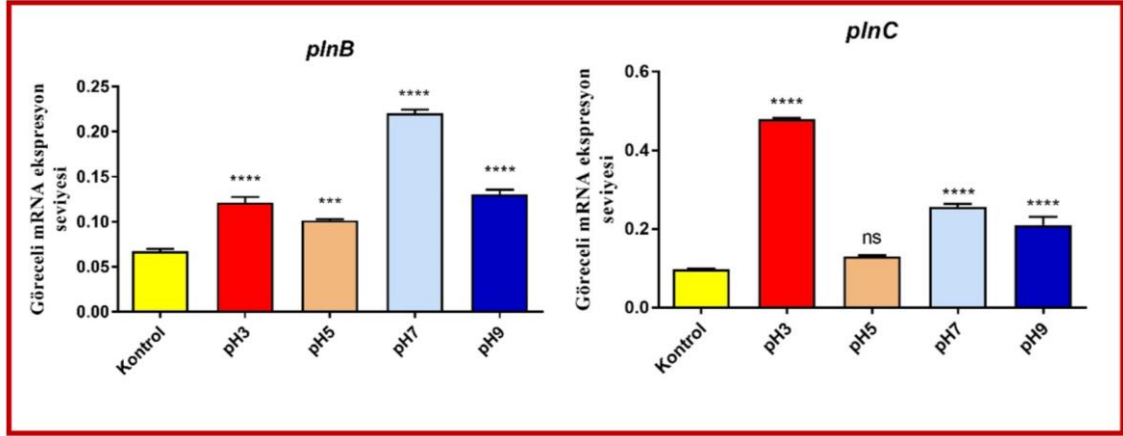
Şekil 4.8. Kontrol grubu ve farklı sıcaklıklarda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.8'e göre *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. Bu üç gen kontrol ile kıyaslandığında 60°C'de gen ekspresyonlarında önemli derecede arttığı görülürken, 20°C ve 40°C'de gen ekspresyonlarında değişim gözlemlenmemiştir

4.9.2. Farklı pH'larda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin geninin ekspresyon seviyeleri

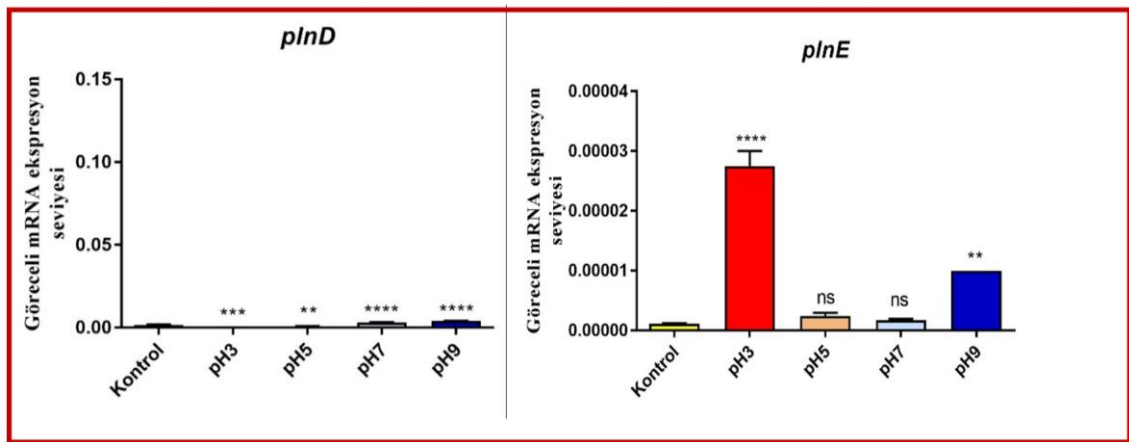
pH 3.0, pH 5.0, pH 6.0 (Kontrol), pH 7.0 ve pH 9.0'da geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinden bakteriyosin üretiminin gerçekleşmesi için gerekli olan plantarisin

geninde bulunan *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* ve *rpo* genlerine ait mRNA'larının ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.



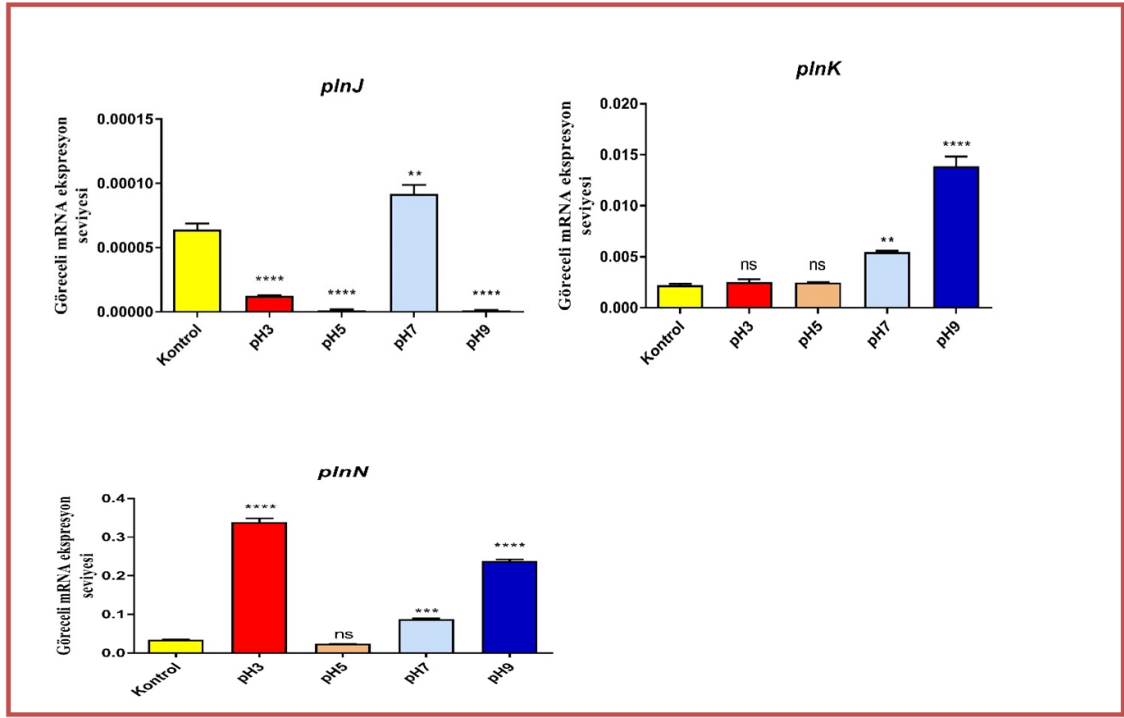
Şekil 4.9. Kontrol grubu ve farklı pH'larda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnB* ve *plnC* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.9'a göre *plnB* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *PlnB* geni en fazla pH 7.0'de ekspres olmuştur. Yine bu genin pH 3.0, pH 5.0 ve pH 7.0'de ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. *PlnC* geninde ise en fazla pH 3.0'de meydana gelmiştir. pH 5'de ekspresyon seviyesi değişmemiş iken, pH 7.0 ve pH 9.0'da ekspresyon seviyesi artmıştır.



Şekil 4.10. Kontrol grubu ve farklı pH'larda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnD* ve *plnE* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.10'a göre *plnD* ve *plnE* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *PlnD* geninde ekspresyon seviyeleri düşüktür. *plnE* geninde pH 5.0 ve pH 7.0'de değişim gözlemlenmemişken en fazla ekspresyon pH 3.0 ve pH 9.0'da meydana gelmiştir.

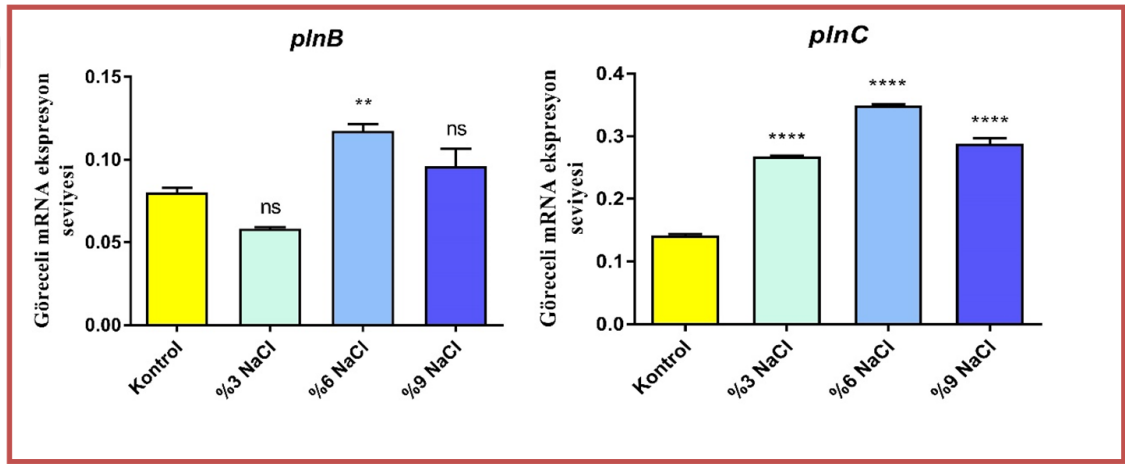


Şekil 4.11. Kontrol grubu ve farklı pH'larda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.11'e göre *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *plnJ* geninde pH 7.0'de en fazla ekspresyon gözlemlenirken pH 3.0, pH 5.0 ve pH 9.0'da azalış gözlemlenmiştir. *plnK* geninde pH 7.0 ve pH 9.0'da ekspresyonda artış gözlemlenirken pH 3 ve pH 5'de değişim gözlemlenmemiştir. *plnN* geninde ise pH 3.0, pH 7.0 ve pH 9.0'da ekspresyonda artış gözlemlenirken pH 5.0'de değişim gözlemlenmemiştir.

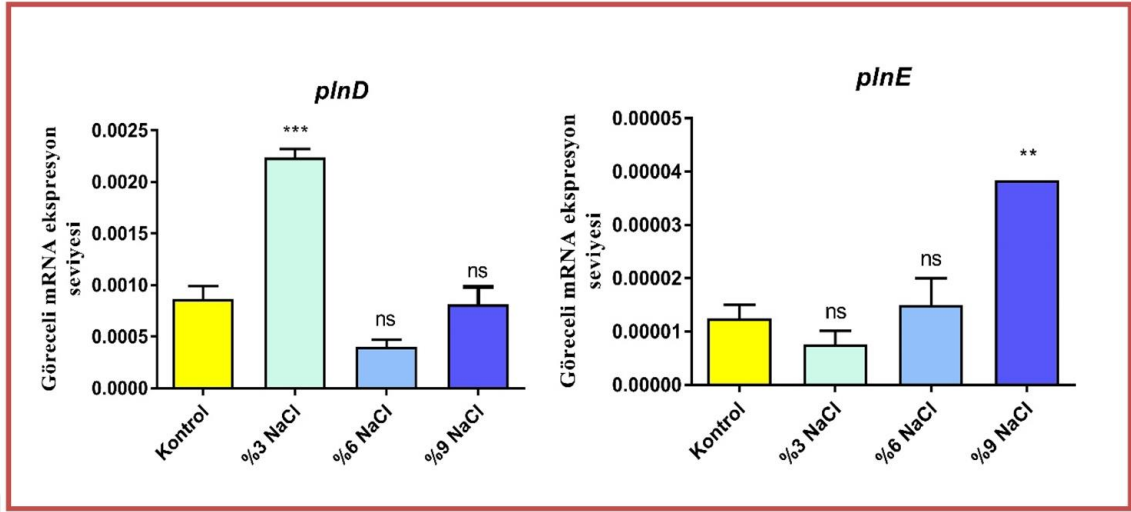
4.9.3. Farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin *pln* geninin ekspresyon seviyeleri

Kontrol, %3, %6 ve %9 tuz konsantrasyonlarında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinden bakteriyosin üretiminin gerçekleşmesi için gerekli olan *pln* geninde bulunan *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* ve housekeeping gen olan *rpo* genlerine ait mRNA'larının ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.



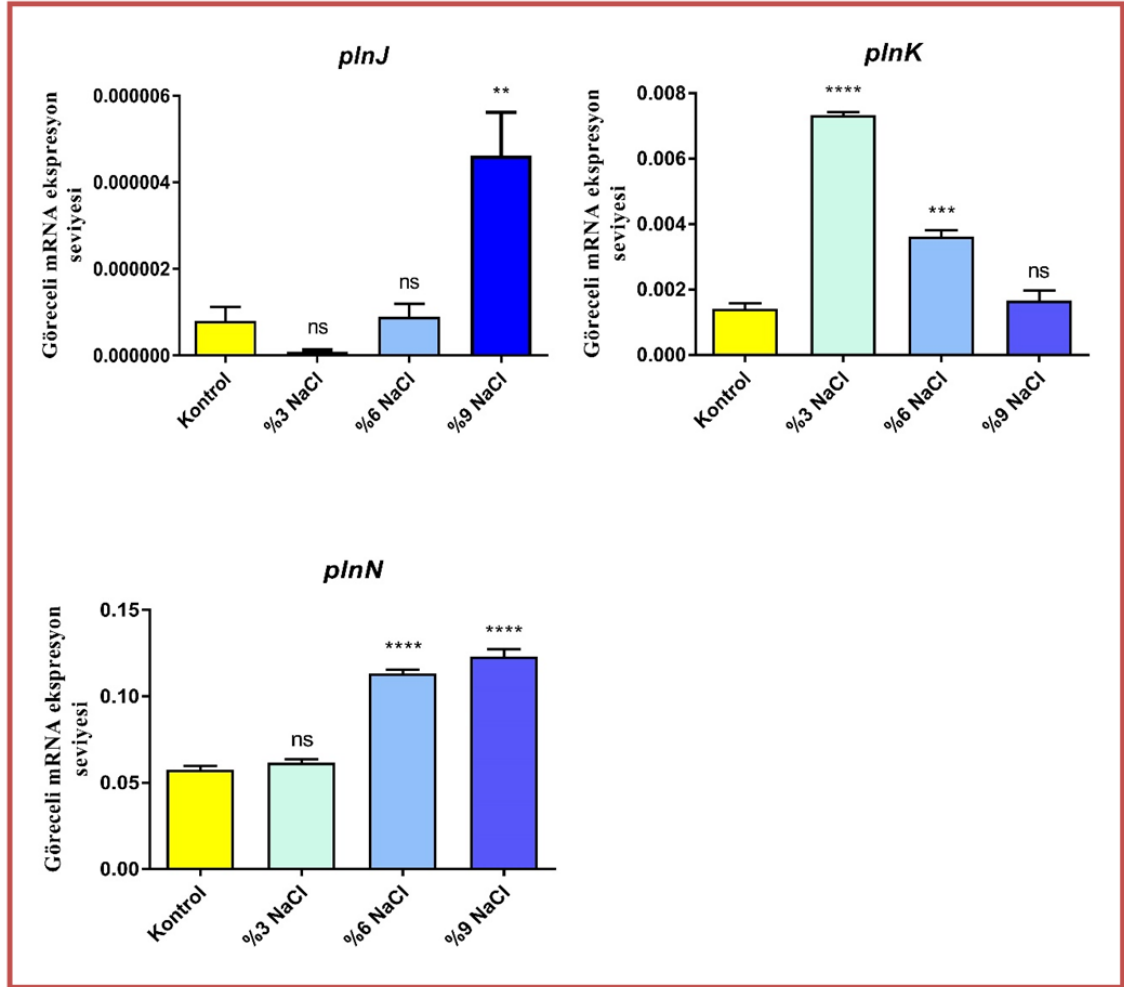
Şekil 4.12. Kontrol grubu ve farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnB* ve *plnC* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.12'ye göre *plnB* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *plnB* geninde sadece %6 NaCl tuz konsantrasyonunda ekspresyonda önemli derecede artış gözlemlenirken %3 ve %9 NaCl tuz konsantrasyonunda ekspresyonda bir değişim gözlemlenmemiştir. *plnC* geninde ise tüm tuz konsantrasyonlarında önemli derecede ekspresyonda artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.13. Kontrol grubu ve farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnD* ve *plnE* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.13'e göre *plnD* ve *plnE* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *plnD* geninde %3 NaCl konsantrasyonlarında ekspresyonda artış gözlemlenmiş olup %6 ve %9 NaCl tuz konsantrasyonunda ekspresyonda bir değişim gözlemlenmemiştir. *plnE* geninde ise %3 ve %6 NaCl tuz konsantrasyonlarında ekspresyonda değişim gözlemlenmemişken %9 NaCl tuz konsantrasyonlarında ekspresyonda artış gözlemlenmiştir.

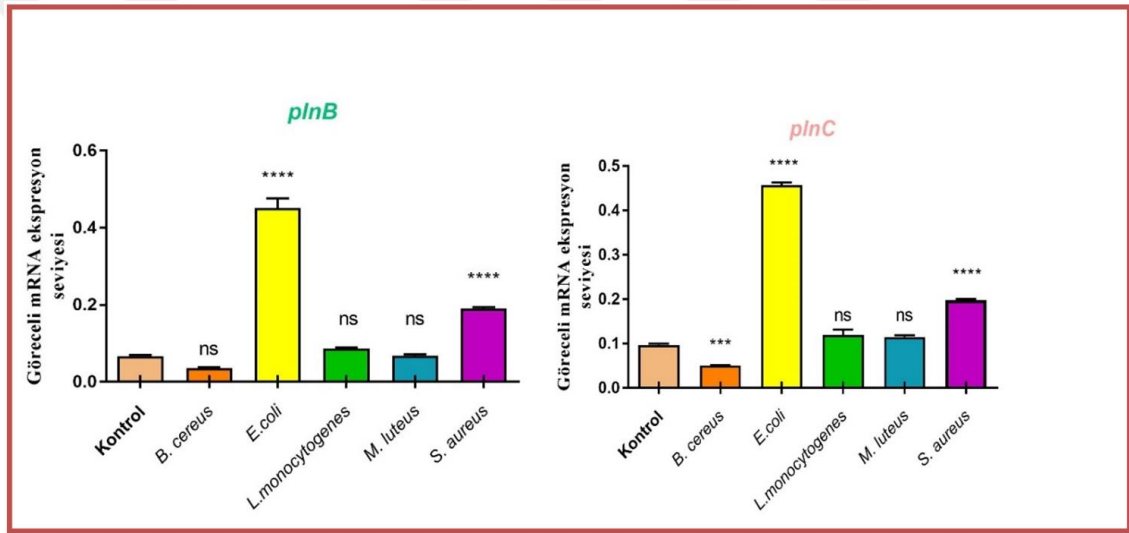


Şekil 4.14. Kontrol grubu ve farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.14'e göre *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *plnJ* genine göre sadece %9 NaCl konsantrasyonunda ekspresyonda artış gözlemlenmişken diğer tuz konsantrasyonlarında ekspresyonda değişim gözlemlenmemiştir. *plnK* geninde %3 ve %6 NaCl tuz konsantrasyonunda ekspresyonda artış gözlemlenmişken %9 NaCl tuz konsantrasyonunda değişim gözlemlenmemiştir. Son olarak *plnN* geninde ise %3 NaCl tuz konsantrasyonunda ekspresyonda değişim gözlemlenmemişken diğer tuz konsantrasyonlarında ekspresyonda artış gözlemlenmiştir.

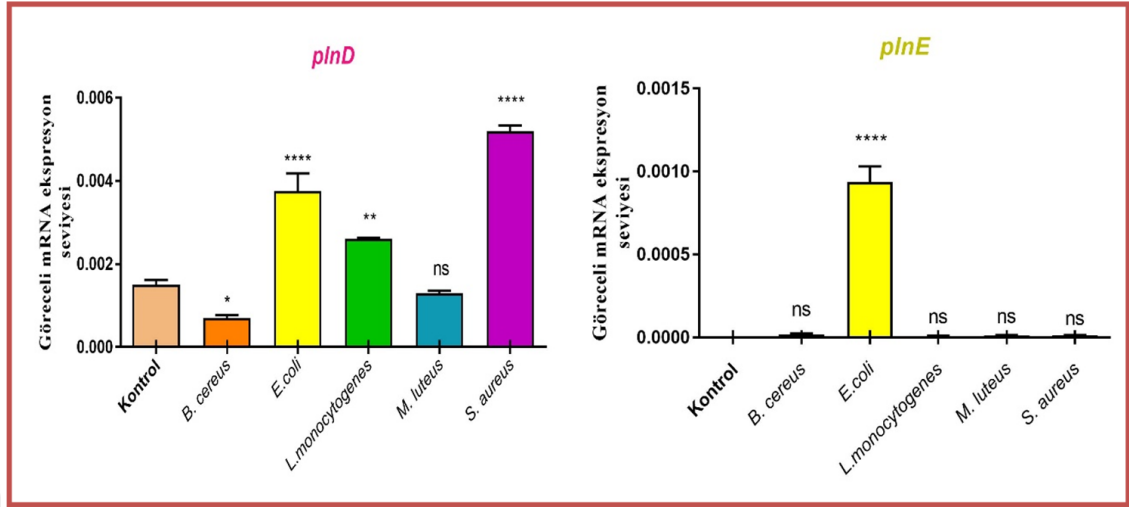
4.9.4. Gıda patojenlerinin varlığında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin geninin ekspresyon seviyeleri

E. coli ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB gibi gıda patojenleri ile birlikte geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminin gerçekleşmesi için gerekli olan plantarisin geninde bulunan *NC8*, *S*, *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* ve *rpo* genlerine ait mRNA'larının ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.



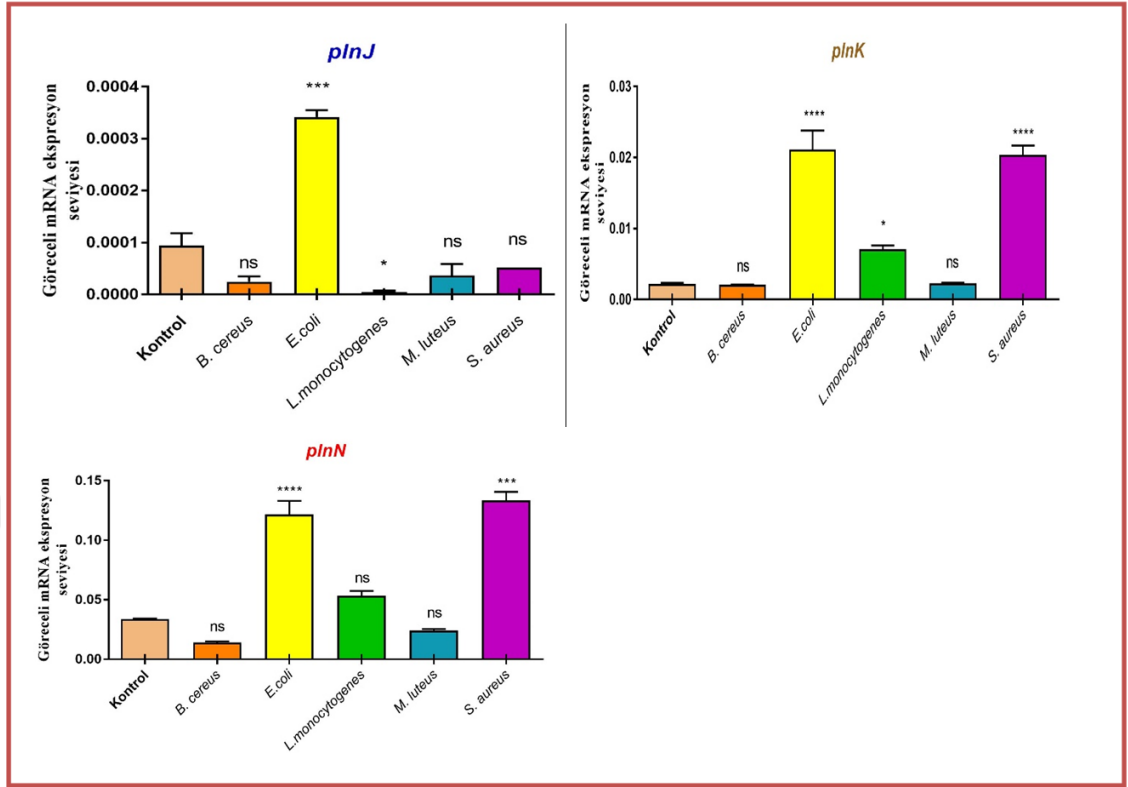
Şekil 4.15. Kontrol grubu ve *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnB* ve *plnC* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.15'e göre *plnB* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *plnB* geninde *E. coli* C1967 ve *S. aureus* ATCC 29213 gıda patojenlerine karşı ekspresyonda artış gözlemlenmişken *B. cereus* 11778, *M. luteus* NCIMB ve *L. monocytogenes* C3970 gıda patojenlerine karşı değişim gözlemlenmemiştir. *plnC* geninde ise yine *E. coli* C1967 ve *S. aureus* ATCC 29213 gıda patojenlerine karşı ekspresyonda artış gözlemlenmişken *B. cereus* 11778 gıda patojenine karşı ekspresyonda azalış, *L. monocytogenes* C3970 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenlerine karşı ekspresyonda değişim gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.16. Kontrol grubu ve *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnD* ve *plnE* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

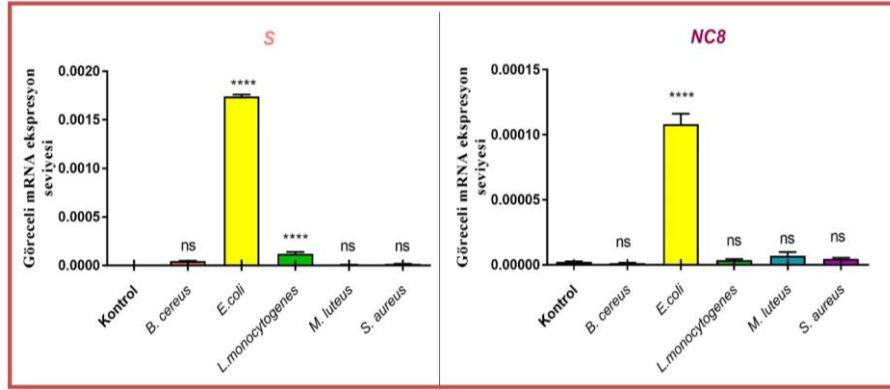
Şekil 4.16'ya göre *plnD* ve *plnE* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *plnD* geninde *E. coli* ATCC 255922, *L. monocytogenes* C3970 ve *S. aureus* ATCC 29213 gıda patojenlerine karşı ekspresyonda artış gözlemlenirken *B. cereus* 11778 gıda patojenine karşı ekspresyonda azalış, *M. luteus* NCIMB gıda patojenine karşı ekspresyonda değişim gözlemlenmemiştir. *plnE* geninde ise sadece *E. coli* ATCC 25922 gıda patojenine karşı ekspresyonda artış gözlemlenirken diğer patojenlere karşı değişim gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.17. Kontrol grubu ve *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.17'ye göre *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *plnJ* geninde *E. coli* ATCC 25922 gıda patojenine karşı ekspresyonda artış gözlemlenmişken diğerlerinin ekspresyonunda bir değişim gözlemlenmemiştir. *plnK* geninde *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* C3970 ve *S. aureus* ATCC 29213 gıda patojenlerine karşı ekspresyonda artış gözlemlenmişken *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenlerine karşı ekspresyonda değişim gözlemlenmemiştir.

plnN geninde ise *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 29213 gıda patojenlerine karşı ekspresyonda artış gözlemlenmişken, *B. cereus* 11778, *L. monocytogenes* C3970 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenlerine karşı ekspresyonda değişim gözlemlenmemiştir.



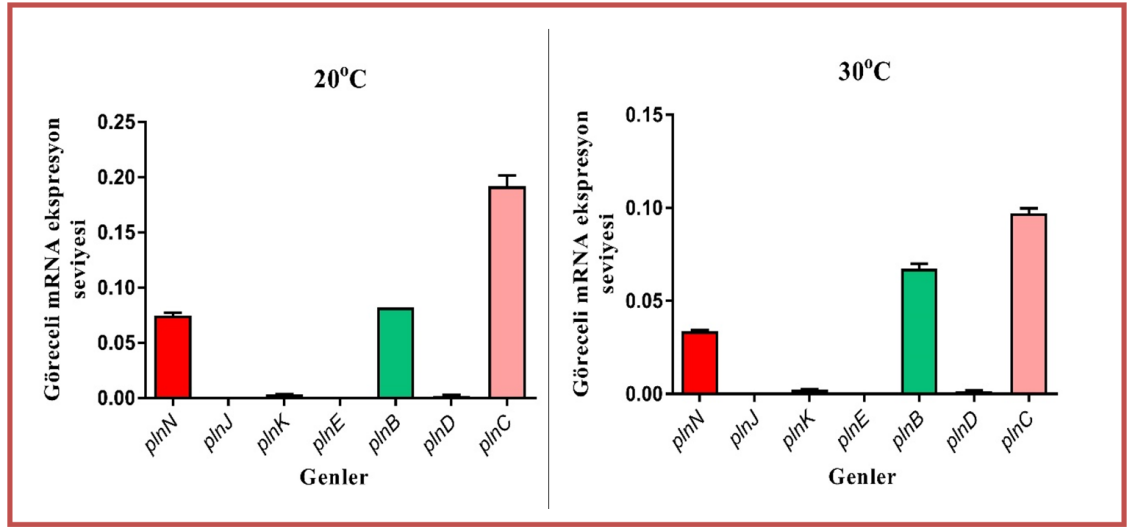
Şekil 4.18. Kontrol grubu ve *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin yapısal geni olan *NC8* ve *S* genlerindeki mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

Şekil 4.18'e göre *NC8* ve *S* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *S* yapısal geninde *E. coli* ATCC 25922 ve *L. monocytogenes* C3970 gıda patojenlerine karşı ekspresyonda artış gözlemlenmişken diğer gıda patojenlerinde ekspresyonda değişim gözlemlenmemiştir. *NC8* geninde ise *E. coli* ATCC 25922 gıda patojeninde ekspresyonda artış gözlemlenmişken diğer gıda patojenlerinin ekspresyonunda değişim gözlemlenmemiştir.

4.10. *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin genlerinin Real-Time PCR'daki gen ekspresyon sonuçlarının kıyaslanması

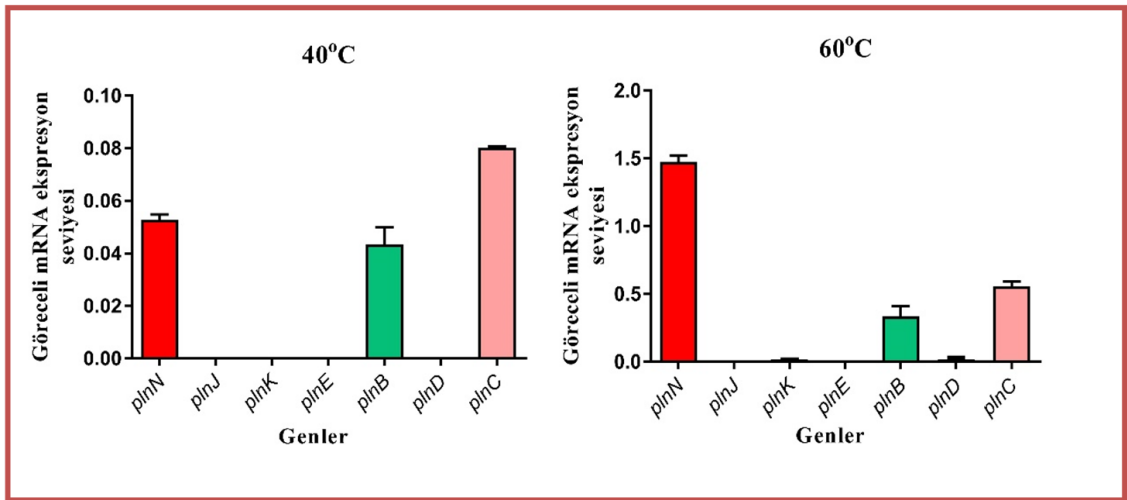
4.10.1. Farklı sıcaklıklarda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

20°C, 30°C, 40°C ve 60°C sıcaklıklarda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan plantarisin geninde bulunan *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* genlerine ait mRNA'larının ekspresyon seviyeleri birbirlerine göre kıyaslanmıştır.



Şekil 4.19. 20°C ve 30°C’de geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

Şekil 4.19’a *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. 20°C ve 30°C’de geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genlerinden en çok *plnB*, *plnC* ve *plnN* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenirken az seviyede *plnK* geninde ekspresyon gözlemlenmiştir.

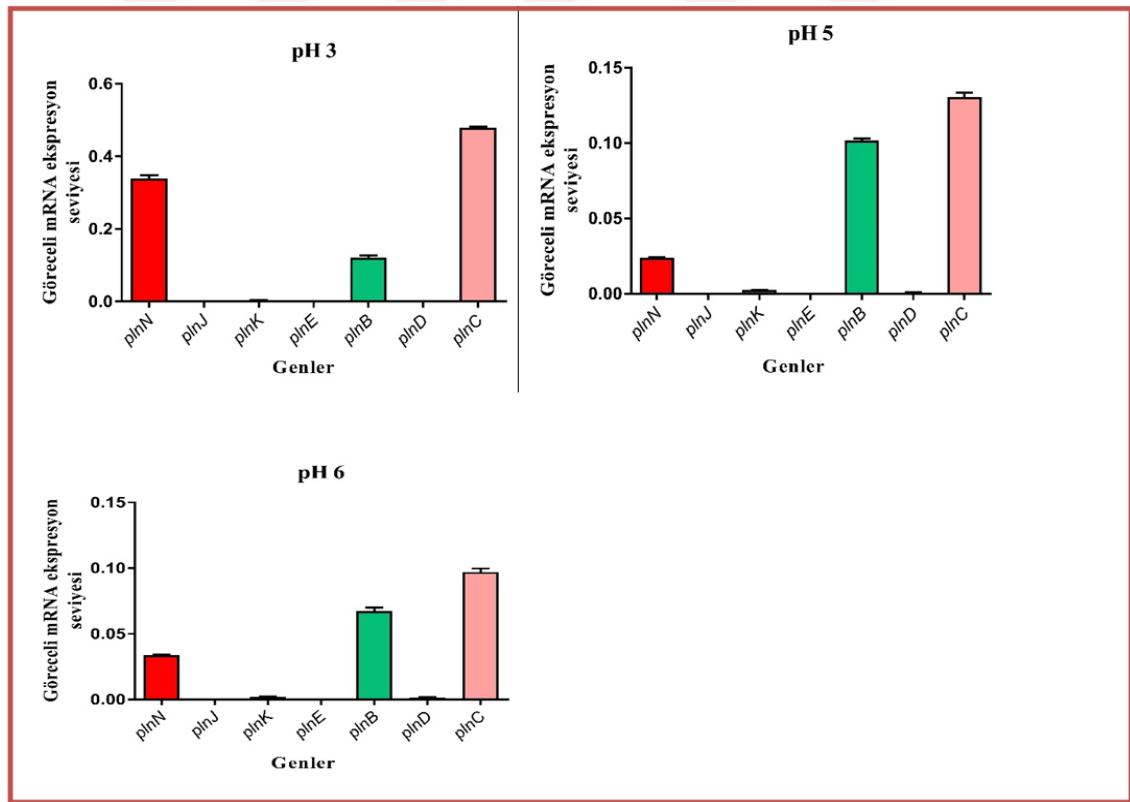


Şekil 4.20. 40°C ve 60°C’de geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

Şekil 4.20’de *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. 40°C ve 60°C’de geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genlerinden en çok *plnB*, *plnC* ve *plnN* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenirken, 60°C’de *plnK* geninde az seviyede ekspresyon gözlemlenmiştir.

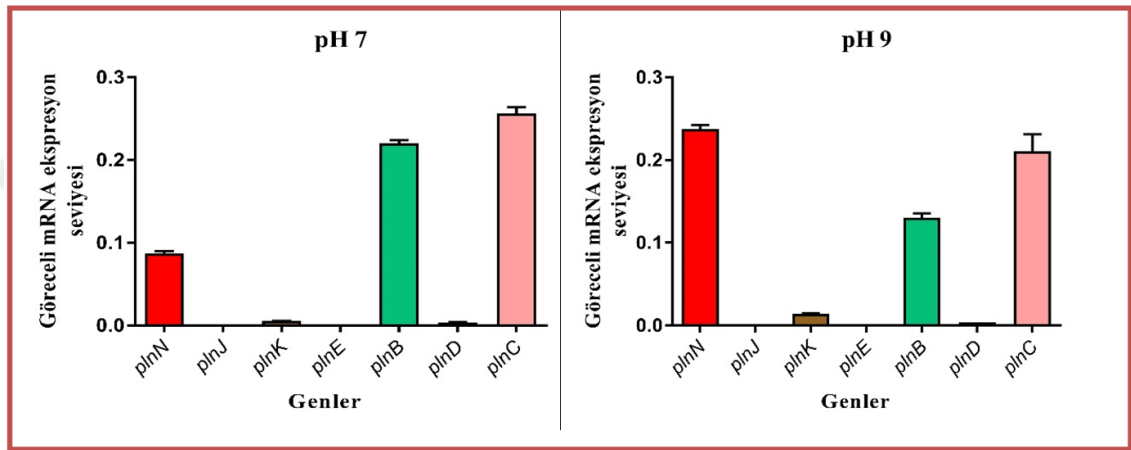
4.10.2. Farklı pH’larda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

pH 3.0, pH 5.0, pH 7.0 ve pH 9.0’da geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan plantarisin geninde bulunan *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* genlerine ait mRNA’larının ekspresyon seviyeleri birbirlerine göre kıyaslanmıştır.



Şekil 4.21. pH 3.0, pH 5.0 ve pH 6.0’da geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

Şekil 4.21’de *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. pH 3.0, pH 5.0 ve pH 6.0’da geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genlerinden en çok *plnB*, *plnC* ve *plnN* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenirken, pH 5.0 ve pH 6.0’da *plnK* geninde az seviyede ekspresyon gözlemlenmiştir.

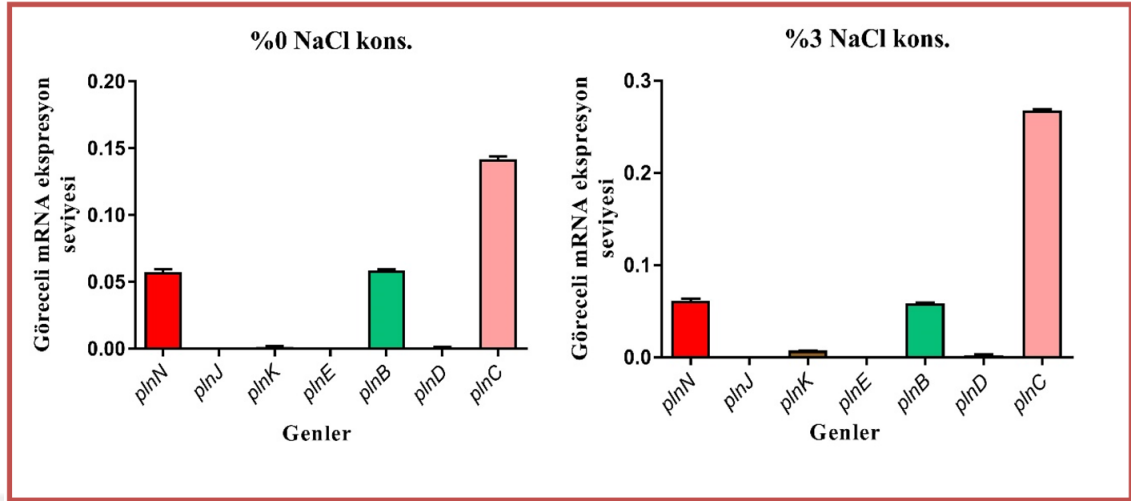


Şekil 4.22. pH 7.0 ve pH 9.0’da geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

Şekil 4.22’de *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. pH 7.0 ve pH 9.0’da geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genlerinden en çok *plnB*, *plnC* ve *plnN* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenirken, *plnK* geninde az seviyede ekspresyon gözlemlenmiştir.

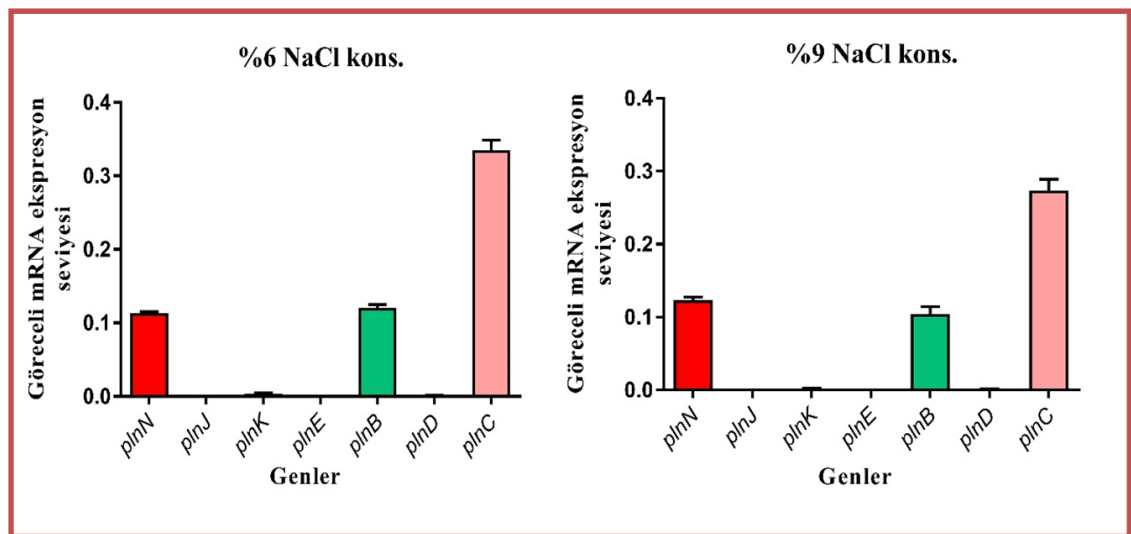
4.10.3. Farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

%0, %3, %6 ve %9’da geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan plantarisin geninde bulunan *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* genlerine ait mRNA’larının ekspresyon seviyeleri birbirlerine göre kıyaslanmıştır.



Şekil 4.23. %0 ve %3 NaCl tuz konsantrasyonunda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

Şekil 4.23’de *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. %0 ve %3 NaCl tuz konsantrasyonunda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genlerinden en çok *plnB*, *plnC* ve *plnN* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenirken, *plnK* geninde az seviyede ekspresyon gözlemlenmiştir.

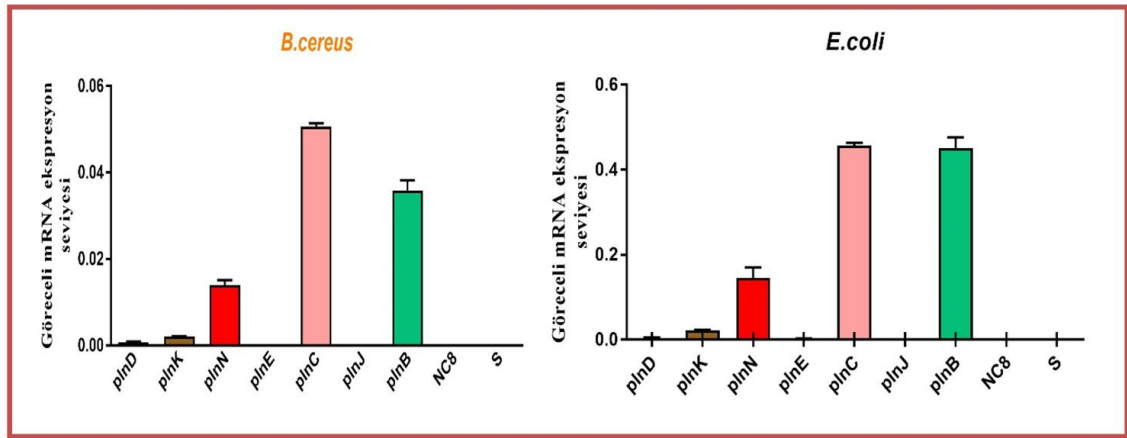


Şekil 4.24. %6 ve %9 NaCl tuz konsantrasyonunda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

Şekil 4.24’de *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD* ve *plnC* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. %6 ve %9 NaCl tuz konsantrasyonunda geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genlerinden en çok *plnB*, *plnC* ve *plnN* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir.

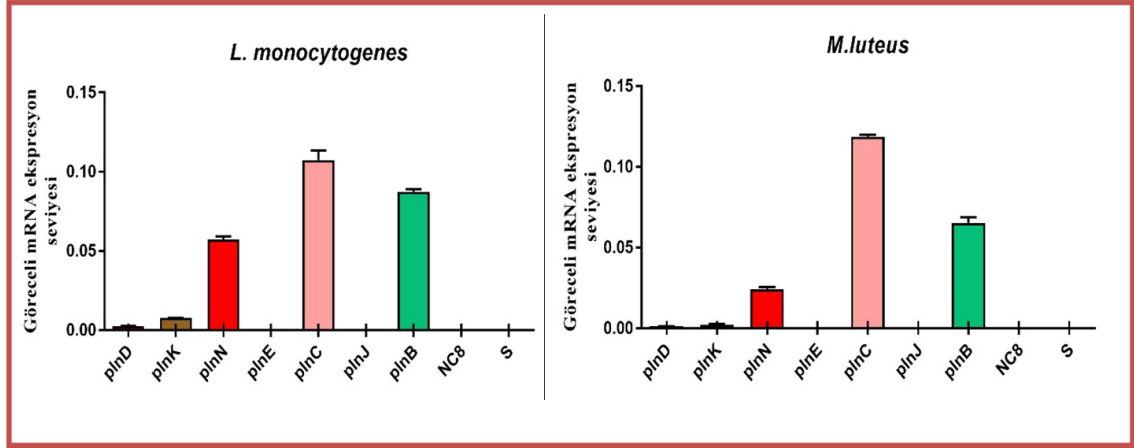
4.10.4. Gıda patojenleri varlığında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin genlerinin ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

E. coli ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan plantarisin geninde bulunan *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN*, *NC8* ve *S* genlerine ait mRNA’larının ekspresyon seviyeleri birbirlerine göre kıyaslanmıştır.



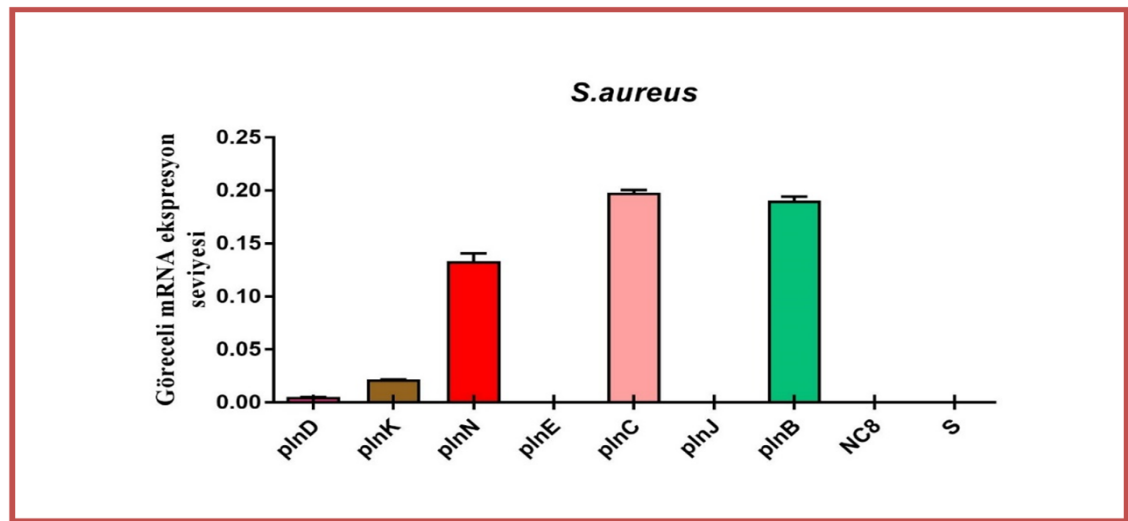
Şekil 4.25. *B. cereus* 11778 ve *E. coli* ATCC 25922 gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD*, *plnC*, *NC8* ve *S* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

Şekil 4.25’de *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD*, *plnC*, *NC8* ve *S* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *B. cereus* 11778 ve *E. coli* ATCC 25922 gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genlerinden en çok *plnB*, *plnC*, *plnN* ve *plnK* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.26. *L. monocytogenes* C3970 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD*, *plnC*, *NC8* ve *S* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

Şekil 4.26'da *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD*, *plnC*, *NC8* ve *S* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *L. monocytogenes* C3970 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genlerinden en çok *plnB*, *plnC*, *plnN* ve *plnK* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.27. *S. aureus* ATCC 29213 gıda patojeni ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterilerinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD*, *plnC*, *NC8* ve *S* genlerinin Real-Time PCR yöntemiyle mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

Şekil 4.27’de *plnN*, *plnJ*, *plnK*, *plnE*, *plnB*, *plnD*, *plnC*, *NC8* ve *S* genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *S. aureus* ATCC 29213 gıda patojenleri ile geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genlerinden en çok *plnB*, *plnC*, *plnN* ve *plnK* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya nüfusunun hızlı artması, teknolojinin kullanımının her geçen gün artması ve artan teknoloji sonucu çevre kirliliğinin ve beslenme ile ilgili sorunların baş edilemez noktaya doğru sürüklenmesi, güvenilir gıda bulunmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Tüm bu gelişmeler sonucunda oluşan sağlık sorunları insanların bilinçlenmesine, beslenme düzenlerinin değişmesine ve gün geçtikçe sağlıklı ürün kullanımı ile ilgili beklentilerinin artmasına yol açmıştır. Bu durum işletmeleri tüketicilerin isteklerini karşılamak üzere ürünlerin kalitesini iyileştirmeye zorlamaktadır. Bu da ancak işletmelerde, ürünün üretilmeye başlandığı ilk aşamadan son aşamasına kadar ki tüm süreçlerde olabileceği düşünülen tehlikelerin oluşmadan engellenmesi, hedeflenen güvenli gıda sistemlerinin uygulanabilir olması ve yetkili kurumlar tarafından aktif bir şekilde denetlenmesi ile sağlanabilir (Çopur vd).

Günümüzde gıda güvenliği üzerine yapılan çalışmalar özellikle ürünlerde sentetik katkı maddelerinin kullanılmaması ve doğal koruma yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır (Rosslund *et al.* 2005; Steffen 2005). Ayrıca son yıllarda tüketiciler doğal ve katkısız ürünlere yöneldikleri için bu kapsamda yapılmakta olan biyokoruyucu çalışmalarında, gıdanın doğal mikroflorasında mevcut olan ve gelişebilen mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Bu mikroorganizmaların antimikrobiyal karakterli bileşikleri ve diğer metabolit ürünleri doğal gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Doğal katkı maddeleri ile yapılmış olan birçok çalışma; doğal katkı maddelerinin *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *C. botulinum* gibi önemli gıda patojenlerinin gıdalarda bulunma halini veya toksin oluşturma kabiliyetlerini ortadan kaldırdığını göstermektedir. Bu amaç için en yaygın kullanılan mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterileri, sahip olduğu yüksek rekabet gücü ve bakteriyosin başta olmak üzere ürettikleri doğal antimikrobiyal bileşikler nedeniyle gıda güvenliğinin sağlanmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yörük ve Danyer 2016). Uzun yıllardır bakteriyosinlerin güvenle kullanılması ve GRAS olarak nitelendirilmeleri nedeniyle endüstriyel uygulamalarda öncelikli olarak tercih edilmişlerdir (Biler 2009).

Bakteriyosinler bağırsak sisteminde proteazlar tarafından rahatlıkla parçalandıkları ve vücuda absorbe edilmedikleri için doğal ve güvenilirlerdir. Ayrıca korunacak gıdaların yapısında hiçbir değişime neden olmazlar, gıdaların bozunmasına neden olan mikroorganizmaların yanısıra, hastalık yapıcı mikroorganizmaları da inhibe ederler (Cutter and Siragusa 1995; Papagianni 2003).

Sonuç olarak gıdalarda koruyucu olarak bakteriyosinlerin kullanılmaları gıdaların raf ömrünü uzatmakta, kimyasal koruyucuların kullanımını azaltmakta, gıda kökenli patojenlerin varlığını engellemekte ve gıdaların bozulmasına neden olan bakterilerin sebep olduğu ekonomik kayıpları azaltmakta, koruma amaçlı yapılan süreçlerin daha az olması nedeniyle ürünlerin besin değerinin daha iyi korunmasını sağlamaktadır (Thomas and Whimpenny 1996; Uludağ 2015).

Bakteriyosinler ribozom yoluyla sentezlenen posttranslasyonel peptidlerdir (Chen and Hoover 2003). Bakteriyosin üretimini ve immüniteyi kodlayan genler genellikle operon kümelerinde düzenlenir ve plazmidler veya kromozomlar üzerinde yer alırlar (Deegan *et al.* 2006). Bakteriyosin üretiminin gerçekleşebilmesi için dört farklı gen olması gerekmektedir. Bunlar; prepeptid kodlanmasını sağlayan gen, bağışıklık geni, ABC taşıyıcısını kodlayan gen ve bakteriyosinin hücre dışına taşınmasını sağlayan genidir (Deegan *et al.* 2006; Uludağ 2015). Bakteriyosinler öncelikle N-terminal liderini içeren inaktif prepeptidleri sentezlerler. Daha sonra bu peptidlerde hücre dışına salınmadan bakteriyosin gen kümesi tarafından kodlanan diğer aminoasit veya proteinler tarafından modifiye edilir. Bakteriyosin üreten suşlar sahip oldukları toksik etkiden kendilerini korumak için yapılarında spesifik bağışıklık proteini bulundururlar (Zacharof and Lovitt 2012). Bağışıklık proteinlerini kodlayan genler, diğer bakteriyosin yapılarına ve işlevsel genlerine genetiksel olarak yakındırlar. Genellikle yapısal bakteriyosin üretim geni ve bağışıklık geni aynı operonda bulunabilir (Cleveland *et al.* 2001). LAB bakteriyosinleri için iki tür immün sistem tanımlanmıştır. İlk sistem spesifik bağışıklık Lan I'e bağımlıdır, ancak ikinci sistem çok bileşenli bir ABC taşıyıcıya (LanEFG) bağımlıdır (Deegan *et al.* 2006). Lan I proteini sitoplazmik zarın dışına bağlanır. Bu sistem membran içine yerleşmiş bakteriyosin molekülleri tarafından por oluşumunu

önleyerek ve membrandaki bakteriyosin konsantrasyonunu kritik bir seviyede tutarak üretici hücrelere bağışıklık kazandırır (Garneau *et al.* 2002; Todorov and Discks 2004; Todorov and Dicks 2005; Zacharof and Lovitt 2012).

L. plantarum kuvvetli asitlere ve tuzlara en dayanıklı bakterilerden biri olduğu için tüm fermantasyon süresince baskın olan bir türdür. Çoğunlukla ortamdaki fermantasyon *L. plantarumun* etkinliği ile tamamlanmaktadır. *L. plantarum* hastalık yapıcı patojenler olan *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E.coli*, *M. luteus*, *C. botulinum* gibi mikroorganizmalara karşı aktif olarak görev almaktadır. *L. plantarum*'un en az 6 farklı bakteriyosin ürettiği düşünülmektedir. Bütün bu peptidler bir çift glisin parçasını içeren öncüler olarak üretilmektedir. *L. plantarum* tarafından üretilen bakteriyosinler içerisinde en yaygın bakteriyosin 'plantarisinler' olarak bilinir. *L. plantarum*, bakteriyosinleri *plnE* ve *plnF* genleri vasıtasıyla sentezler. Bu peptidler sonra *plnG* ve *plnH* proteinleri tarafından üretilir ve hücre dışına salınır. Bu sistem için peptid feromonu ayrı bir gen olan *plnA* tarafından kodlanır, *plnG* ve *plnH* tarafından salınır ve iki cevap regülatörü *plnC* ve *plnD*'nin fosforlanmasını sağlayan histidin protein kinaz *plnB* tarafından belirlenir. Plantarisinler *Pediococcus*, *Carnobacteria*, *Clostridia* ve *Propionobacteria* gibi diğer bakterileri ve *L. plantarum*'un doğal rakiplerinide kapsayan LAB türlerinin büyük bir çoğunluğunu inhibe eder (Zacharof and Lovitt 2012).

Laktik asit bakterilerinin üretmiş olduğu bakteriyosinlerin kapasitelerinin arttırılması çoğu araştırmaya konu olmuştur. Bu durum araştırmacıları farklı yöntemler kullanmaya yönlendirmiştir. Ancak çevre koşullarına bağlı olarak gen ekspresyon seviyesinin incelenmesine dayalı çalışmalar kullanılarak bakteriyosin üretim kapasitelerinin arttırılmasına yönelik yapılan çok fazla araştırma bulunmamaktadır (Erten 2013).

Bu bilgiler çerçevesinde hazırlanan mevcut çalışmamız bakteriyosin ürettiğini tespit ettiğimiz sucuk kökenli *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin üretiminde rol alan *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* genlerinin ekspresyon profillerine çevre koşullarının (pH, sıcaklık, tuzluluk) ve *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L.*

monocytogenes C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB gıda patojenlerinin etkisini araştırmayı hedeflemiştir.

Bu doğrultuda öncelikle Omar ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları çalışmadan seçmiş olduğumuz spesifik primerler kullanılarak PCR analizi yapılmış ve çalışmamızda kullanılan bakterinin bilinen plantarisinlerin üretimi için gen taşıyıp taşımadığı belirlenmiştir. Klasik PCR uygulaması sonrasında *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerinin *L. plantarum* S54 bakterisinde varlığı tespit edilmiştir. Omar ve ark. (2008) bakteriyosin üreten suşlarda genetik çeşitlilik ve plantarisin genlerinin varlığını belirlemek için yapmış oldukları çalışmada, *L. plantarum* C11 ve WCFS1 suşlarında tanımlanan plantarisin gen kümesinden bir veya daha fazla geni taşıdıklarını rapor etmişlerdir. Altı izolatta *plnA*, *plnB* ve *plnD* amplifiye olmuşken *plnC* amplifiye olmamıştır. Yine bu çalışmada kullanılan bir izolatta *L. plantarum* C11'in *plnABCD* operonundaki tüm genlerin amplifiye olduğu görülmüştür. Hurtado ve ark. (2011)'in gerçekleştirdiği çalışmada; *L. plantarum*, *L. paraplantarum* ve *L. pentasus* türlerinde yapılan PCR dayalı taramada *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE/F*, *plnI*, *plnJ*, *plnK*, *plnG* ve *plnN* kodlayan genlerin varlığı ortaya konmuştur. Bu sonuçlar da bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Daha sonra *L. plantarum* S54 bakterisine ürettirilen bakteriyosin kısmi saflaştırıldı ve kısmi saflaştırılan bakteriyosinin gıda kökenli patojen mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisine bakıldı. Antimikrobiyal testin sonucunda *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* C3970, *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB patojenlere karşı inhibisyon etkisi görülmüştür. Bizim bulgularımıza benzer şekilde Azizi ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada, tüm *L. plantarum* suşlarının, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 33090 ve *E. coli* ATCC 25922 patojen indikatörlerine karşı antibakteriyel etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Yine Sankar ve ark. (2012), çiğ inek sütü örneklerinden elde ettikleri *L. plantarum* izolatlarının bir dizi patojen mikroorganizmaya karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini gözlemlemiştir.

Literatür incelendiğinde *L. plantarum* türünün bakteriyosin genleri hakkında çeşitli çalışmalar yayınlandığı görülmektedir (Diep *et al.* 1996; Maldonado-Ruiz-Barba *et al.* 2003). Fakat literatürde çevresel koşulların değişimine bağlı olarak bakteriyosin üretimindeki değişimi esas alan çok fazla çalışma yoktur. Bu doğrultuda yapmış olduğumuz tez çalışmasında; *L. plantarum* S54'ün farklı NaCl konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve patojen varlığındaki bakteriyosin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. İlk olarak *L. plantarum* S54 türü, farklı NaCl konsantrasyonları [%0 (kontrol), %3, %6 ve %9] altında geliştirildikten sonra bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda; %3 NaCl tuz konsantrasyonunda kontrole kıyasla *plnC*, *plnD* ve *plnK* genlerinde ekspresyonunda artış gözlemlenirken; *plnE*, *plnJ* ve *plnN* genlerinin ekspresyonunda bir değişim gözlemlenmemiştir. %6 NaCl tuz konsantrasyonunda kontrole kıyasla *plnB*, *plnC*, *plnK* ve *plnN* genlerinin ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenirken *plnD*, *plnE* ve *plnJ* genlerinin ekspresyon seviyelerinde bir değişim gözlemlenmemiştir. Son olarak %9 NaCl tuz konsantrasyonunda kontrole kıyasla *plnC*, *plnE*, *plnJ* ve *plnN* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenirken *plnB*, *plnD* ve *plnK* genlerinin ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte özellikle *plnE*, *plnJ*, *plnK* ve *plnN* gibi bakteriyosin üretiminde asıl rol oynayan genlerin farklı NaCl tuz konsantrasyonlarda ekspresyonlarında değişimler de gözlemlenmiştir. Doulgeraki ve ark (2013) yapmış oldukları çalışmada da; %4 ve %6 NaCl tuz konsantrasyonlarında *plnE/F* ve *plnJ/K* genlerinde ekspresyonda artış gözlemlenmiştir. Hurtado ve ark. (2011) yapmış oldukları çalışmada *L. pentosus* B96 suşunun %4, %6 ve %9 NaCl tuz konsantrasyonların da bakteriyosin genleri *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnE/F*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* ve plantarisin S'in genetik ekspresyon seviyelerini incelenmişlerdir ve *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnG* ve *plnK* genleri genomda mevcut olmasına rağmen qPCR ile belirlenmemiştir. Sadece *plnE/F*, *plnN* ve *pls* genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenebilmiştir. Bu sonuçlar bizlere RT qPCR ile bakteriyosin etkinliği ve onu tercih eden koşullar hakkında yeni bilgiler vermiş ve en azından transkripsiyonel düzeyde her bakteriyosinin nispi önemini değerlendirmemizi sağlamıştır. Gen ekspresyon seviyelerinde gözlemlenen farklılıklar, çevresel koşullara bağlı olarak farklı zamanlarda eksprese olabilen farklı bakteriyosin aktiviteleri yüzünden olabilir (Hurtado *et al.* 2011).

Bakteriosinlerin üretim verimliliğini arttırmak için, üretimlerini etkileyen faktörlerin daha iyi anlaşılması gerekir. Son yıllarda bakteriyosin üretimini iyileştirmek için genetik manipulasyon yöntemlerine başvurulmakla birlikte pH ve sıcaklığın da bakteriyosin üretiminde büyük etkileri olduğu bilinmektedir (Aasen *et al.* 2000). Literatürde birçok çalışma, en yüksek bakteriyosin üretim seviyesinin optimum büyümeden daha farklı sıcaklık ve pH değerlerinde olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda Parente *ve ark.* 1994 lactococcin A; Parente and Ricciardi 1994 enterocin 1146; Mürtvéd-Abildgaard *et al.* 1995 lactocin S; De Vuyst *et al.* 1996 amylovorin 1471; Matsusaki *et al.* 1996 nisin Z; Krier *et al.* 1998 mesenterocin üretimi için benzer sonuçlar rapor etmişlerdir. Bu çerçevede, *L. plantarum* S54 türü, farklı sıcaklıklar (20°C, 30°C (Kontrol), 40°C ve 60°C) altında geliştirildikten sonra bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 20°C sıcaklıkta geliştirilen bakterinin bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol ile kıyaslandığında *plnB*, *plnC*, *plnK* genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlenirken, *plnJ* geninin ekspresyonunda azalış, *plnD*, *plnE* ve *plnN* genlerinin ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmemiştir. 40°C sıcaklıkta kontrol ile kıyaslandığında; *plnB*, *plnD*, *plnJ* genlerinin ekspresyon seviyesinde azalış görülürken, *plnC*, *plnE*, *plnK* ve *plnN* genlerinin ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmemiştir. Son olarak 60°C sıcaklıkta geliştirilen bakterinin gen ekspresyon seviyeleri kontrol ile kıyaslandığında sadece *plnD* geninin ekspresyonu azalırken diğer genlerin tamamında ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Bakteriyosinlerin 100°C'ye kadar ısıya dayanıklı olmaları, bu antimikrobiyallerin bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri antimikrobiyel peptidler olduğunu doğrulamaktadır (Tunalıgil 2009). Bu sonuçta çalışmamızı desteklemektedir. Literatürde farklı sıcaklıklar altında bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişime dair çalışma bulunmamaktadır. Mevcut olan çalışmalar ise bakteriyosin üretiminin optimizasyonuna dayalı çalışmalardır. Örneğin Krier *ve ark.* (1998) aynı organizma tarafından üretilen iki bakteriyosin için optimum bakteriyosin üretme pH ve sıcaklığın farklı olduğunu göstermiştir.

pH değişimine bağlı olarak bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin ekspresyon seviyelerini incelediğimizde; *L. plantarum* S54 türü, farklı pH'larda (pH 3.0, pH 5.0, pH 6.0 (Kontrol), pH 7.0, pH 9.0) geliştirildikten sonra bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. pH 3.0 ortamında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin geninin üretilmesinden sorumlu genler kontrol ile kıyaslandığında *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE* ve *plnN* genlerinin ekspresyonunda artış, *plnJ* geninin ekspresyonunda azalış gözlemlenirken *plnK* geninin ekspresyonunda herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. pH 5.0 ortamındaki genlerin ekspresyonu kontrol ile kıyaslandığında *plnB* ve *plnD* genlerinde ekspresyonda artış gözlemlenirken, *plnJ* geninde azalış, *plnC*, *plnE* ve *plnK* genlerinin ekspresyon seviyelerinde bir değişim gözlemlenmemiştir. pH 7.0 da kontrol ile kıyaslandığında *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnJ*, *plnK* ve *plnN* genlerinde ekspresyonda artış gözlemlenirken, *plnE* geninde ekspresyonda değişim gözlemlenmemiştir. Son olarak pH 9.0 da kontrol ile kıyaslandığında *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnK* ve *plnN* genlerinde ekspresyonda artış gözlemlenirken, *plnJ* geninin ekspresyonunda azalış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre; bakteriyosin sentezinde asıl rol alan genlerin pH 3.0 de *plnE* geni, pH 7.0 de *plnJ/K* geni, pH 9.0 da ise *plnE* ve *plnK* genleri olduğu görülmüştür. Todorov ve Dicks (2006) tarafından yapılan çalışmada bozadan elde edilen LAB türlerinin (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*) bakteriyosin üretimleri incelenmiş ve birbirleri ile kıyaslanmışlardır. Bakteriyosinlerin 2.0 ile 10.0 pH aralığının da 2 saat sonunda dahi aktivitelerini koruduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir.

LAB türlerinin bakteriyosin üretme kabiliyeti, *L. monocytogenes* gibi patojen bakterileri inhibe etmeleri, mikrobiyolojik güvenlik ve stabilite için önemlidir (Ross *et al.* 1993; Holzapfel *et al.* 1995). Bununla birlikte, önceki çalışmalarda, LAB bakteriyosinlerinin yakından ilişkili bakterilere karşı aktif olduğu da bildirilmiştir (Klaenhammer 1993; Doulgeraki *et al.* 2013). Bunun yanısıra yüksek miktarda *Lactobacilli* birçok patojen ve potansiyel patojenik mikroorganizmaların gelişmesini önleyerek son ürünün güvenliğini arttırmaktadır (Doulgeraki *et al.* 2013). Bu bağlamda yapmış olduğumuz çalışmanın son aşamasında; *L. plantarum* S54 türü, gıda patojenlerinin (*E.coli* ATCC 25922, *S.aureus*

ATCC 29213, *L.monocytogenes* C3970, *B.cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB) varlığında geliştirildikten sonra bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Çalışmamızda *B. cereus* 11778 gıda patojeni varlığında geliştirilen *L. plantarum* S54 bakterisinin plantarisin geninin üretilmesinden sorumlu genler kontrol ile kıyaslandığında; *plnB*, *plnE*, *plnJ*, *plnK*, *plnN* ve yapısal genler olan *NC8* ve *S* genlerinin ekspresyonunda değişim görülmezken, *plnC* ve *plnD* genlerinin ekspresyonunda azalış gözlemlenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 varlığındaki genlerin ekspresyon seviyeleri kontrole göre kıyaslandığında tüm genlerin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. *L. monocytogenes* C3970 varlığındaki gen ekspresyon seviyesi *plnB*, *plnC*, *plnE*, *plnN* ve *NC8* genlerinin ekspresyon seviyesinde bir değişim gözlemlenmemişken, *plnK* ve *S* genlerinin ekspresyon seviyesinde artış, *plnJ* geninin ekspresyonunda ise azalış gözlemlenmiştir. *M. luteus* NCIMB varlığındaki gen ekspresyon seviyesinde ise tüm genlerde bir değişim gözlemlenmemiştir. Son olarak *S. aureus* ATCC 29213 varlığındaki gen ekspresyonunda ise *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnK* ve *plnN* genlerinin ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenmişken *plnE*, *plnJ*, *NC8* ve *S* genlerinin ekspresyon seviyesinde bir değişim gözlemlenmemiştir. Elimizdeki bu verilerle bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *plnE*, *plnJ/K* genleri *E. coli* ATCC 25922 patojen mikroorganizmasının inhibe edilmesinden sorumlu genler iken *plnK* geni *L. monocytogenes* C3970 ve *S. aureus* ATCC 29213 patojen mikroorganizmasının inhibe edilmesinden sorumlu bakteriyosin genidir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar gen ekspresyon analizinin disk difüzyon testini desteklediğini göstermiştir. Karagül (2010), disk difüzyon yöntemiyle yapmış oldukları antimikrobiyal aktivitede, tulum peynirlerinden izole edilen bakteriyosin üreten LAB türlerinin *B. cereus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E.coli* ve *Salmonella* sp. gibi test bakterilerine inhibitör etkileri olduğunu göstermiştir. Bu da sonuçların literatür ile uyumlu olduğunu kanıtlamaktadır. Yine bu sonuçlar *B. cereus* 11778 ve *M. luteus* NCIMB patojen mikroorganizmalarını inhibe eden başka bakteriyosinlerin olabileceğini de düşündürmektedir. Bu ise kullanmış olduğumuz *L. plantarum* S54 bakterisinin multi-bakteriyosinjenik olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda uygulamış olduğumuz tüm farklı koşullardaki gen ekspresyon seviyeleri göz önünde bulundurularak en çok hangi genlerin eksprese olduğunu öğrenmek amaçlıda bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin ekspresyon seviyeleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; tüm koşullarda en çok *plnB*, *plnC* ve *plnN* genleri eksprese olmuştur. pH7, pH9, %3 NaCl tuz konsantrasyonunun da bu genlerin yanında *plnK* geni de en çok eksprese olan genidir.

Dolayısıyla mevcut çalışmamızda;

- 1- Sucuk kökenli *L. plantarum* S54 bakterisinin bakteriyosinlerin biyosentezinde etkin rol alan sıcaklık, NaCl tuz konsantrasyonu ve pH ve patojen mikroorganizmalara karşı, seçilen farklı plantaricin genlerinin ekspresyon profillerindeki değişim incelenmiştir. Bu sonuçlar bakterimizin ürettiği bakteriyosinin geniş pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarında bile bakteriyosin üretimini gerçekleştirdiğini göstermiştir.
- 2- *L. plantarum* türünün en çok bilinen bakteriyosini olan plantarisinin dışında literatürdeki bu türün ürettiği diğer bakteriyosinlerin de araştırılıp bakteriyosin üretimini düzenleyen mekanizmanın tam olarak aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.
- 3- *L. plantarum* S54 bakterisi ile yapılan bu tez çalışması ile elde edilen sonuçlar çoklu bakteriyosin üretimi sayesinde farklı çevre ortamlarında seçici bir avantaj sağlayabileceğini göstermektedir.
- 4- Bu bağlamda mevcut çalışmamız ile multi-bakteriyosinjenik laktik asit bakterilerinin gıda işleme süreçlerinde kullanımının tek bir bakteriyosin üreten türlere kıyasla daha avantajlı olup olmadığının gösterilmesine; endüstriyel uygulamalarda *L. plantarum* S54 için ilk kez çevresel limitlerin belirlenmesine ve bakteriyosin üretimi–çevre koşulları–patojen varlığı arasındaki etkileşimin aydınlatılmasına katkı sağlaması ve ilk kez yapıyor olması nedeniyle bilimsel olarak özgünlük ve değer arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Aasen, I. M., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L. and Storro, I., 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, 159-166.
- Achenbach, L. A., Carey, A. J. and Madigan, M. T., 2001. Photosynthesis and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2922–2926.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı termal tesislerden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Ahrne, S. and Molin, G., 1997. Restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA of *Lactobacillus*. *Microecol Ther.*, 26, 27–30.
- Alan, Y. ve Dığrak, M., 2012. Doğal Turşulardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması. *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 15 (2), 46-49.
- Ali, D., Lacroix, C., Thuault, D., Bourgeois, C. M. and Simard, R. E., 1995. Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *Diacetylactis* UL720. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 832–841.
- Allison, G., Fremaux, C., Ahn, C. and Klaenhammer, T. R., 1994. Expansion of the bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *Journal of Bacteriology*, 176, 2235–2241.
- Anderssen, E.L., Diep, B.D., Nes, I.F., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J., 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2269–2272.
- Axelsson, L., 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, Third edition.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I. F., 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1676–1682.
- Azizi, F., Najafi, M. B. H. and Dovom M. R. E., 2017. The biodiversity of *Lactobacillus* spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. *AMB Express*, 7,176.
- Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., de Souza Oliveira, R. P., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134-142.
- Bekpınar, E., 2012. Bazı Laktik Asit Bakteri Suşlarının *Staphylococcus Aureus* ve *Salmonella Typhimurium*'a Karşı Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bhunja, A. K., Johnson, M. C. and Ray, B., 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 261–268.

- Biler, B., 2009. *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi.
- Biscola, V., Todorov, S. D., Capuano, V. S. C., Abriouel, H., Gálvez, A. and Franco, B. D. G. M., 2013. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Food Control*, 32, 134-142.
- Blom, H., Katla, T., Holck, A., Sletten, K., Axelsson, L. and Holo, H., 1999. Characterization, production and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Current Microbiology*, 39, 43-48.
- Bogovič-Matijašić, B., Rogelj, I., Nes, I. F. and Holo, H., 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 606-612.
- Boris, S. and Barbes, C., 2000. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect*, 2, 543-546.
- Bozoglu, C., 2014. Ağrı Diyadin Kaplıcasından İzole Edilen Termofilik *Brevibacillus* sp. (Z1) Bakterisinden Lakkaz Enziminin Saflaştırılıp, Karakterize Edilmesi ve Endüstride Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Fakültesi, Atatürk Üniversitesi.
- Bush, U. and Nitschko, H., 1999. Methods for differentiation of microorganisms, *J. of Chromat. B*, 722, 263-278.
- Bustin, S. A., 2000. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-193.
- Cacherill, F. R. and Uhl, J. R., 2001. Applications and challenges of Real-Time PCR for the Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill FR, eds. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. 1st ed. Germany: Heidelberg, 11.
- Callon, C., Millet, L., Montel, M. C., 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.*, 71, 231-244.
- Casaus, M. P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernández, P. E. and Holo, H., 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143, 2287-2294.
- Catzeddu, P., Mura, E., Parente, E., Sanna, M. and Farris, G. A., 2006. Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results. *Syst Appl Microbiol*, 29, 138-144.
- Chang, Y. J., Peacock, A. D. and Long, P. E., 2001. Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl Environ Microbiol*, 67, 3149-3160.
- Chaplin, B. E., Rasmussen, R. P., Bernard, P. S. and Wittwer, C. T., 1999. LightCycler™ hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica*, 1, 5-8
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K., 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int J Food Microbiol*, 35, 1-27.

- Chen, H., Hoover, D. G., 2003. Bacteriosins and Their Food Applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 2, 82-100.
- Cho, G. S., Hanak, A., Huch, M., Holzapfel W. H. and Franz C. M. A. P., 2010. Investigation into the Potential of Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* BFE 5092 for Biopreservation of Raw Turkey Meat. *Probiotics & Antimicro. Prot.*, 2, 241-249.
- Chun, S. R., Czajka, W. J., Lakamoto, M. and Benno, Y., 2001. Characterization of the *Lactobacillus casei* group and the *Lactobacillus acidophilus* group by automated ribotyping. *Microbiol Immunol.*, 45, 271–275.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F. and Hernández, P. E., 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 7, 281-305.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, P. E. and Nes, I. F., 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4321–4330.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L. S., Holo, H., Hernández, P. E. and Nes, I. F., 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology*, 182, 6806–6814.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P. E., Nes, I. F. and Håvarstein, L. S., 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180, 1988–1994.
- Claisse, O., Renouf, V. and Lonvaud-Funel, A., 2007. Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *J Microbiol Meth*, 69, 387–390.
- Cleaveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L., 2001. Bacteriocins : safe, natural antimicrobial for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- 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, 1–20.
- Contreras, B. G. L., de Vuyst, L., Devreese, B., Busanyova, K., Raymaeckers, J., Bosman, F., Sablon, E. and Vandamme, E. J., 1997. Isolation, purification and characterization of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 13–20.
- Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
- Cutter, C. N., Siragusa, G. R. 1995. Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *Journal of Food Protection*, 58, 1028-1030.
- Çopur, Ö. U., Yonak, S. ve Şenkoyuncu, A., Gıda Güvenliği ve Denetim Sistemi, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği

- Daeschel, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 164-167.
- De Jong, A., Van Hijum, SAFT., Bijlsma, J. J. E., Kok, J. and Kuipers, O. P., 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acid Research*, 34, 273-279.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J., 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. eds., 1994. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. London: Blackie Academic & Professional, 151–221.
- De Vuyst, L., Callewaert, R. and Crabbe, K., 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142, 817-827.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J*, 16, 1058-1071.
- Deveau, H. and Moineau, S., 2003. Use of RFLP to characterize *Lactococcus lactis* strains producing exopolysaccharides. *J Dairy Sci*, 86, 1472–1475.
- Diep, D. B., Håvarstein, L. S. and Nes, I. F., 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*, 178, 4472–4483.
- Dinçer, E., Kıvanç, M. ve Karaca H., 2009. Biyokoruyucu olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler.
- Dougherty, B. A., Hill, C., Weidman, J. F., Richardson, D. R., Venter, J. C. and Ross, R.P., 1998. Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Molecular Microbiology*, 29, 1029–1038.
- Doulgeraki, A. I., Paraskevopoulos, N., Nychas, G. J. E. and Panagou, E. Z., 2013. An in vitro study of *Lactobacillus plantarum* strains for the presence of plantaricin genes and their potential control of the table olive microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, 821- 832.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M. and Prevost, H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 564-582.
- Drosinos, E. F., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I., Metaxopoulos, I., 2007. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiol*, 24, 260-270.
- Du Plessis, E. M. and Dicks, L. M. T., 1995. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus johnsonii*. *Curr Microbiol.*, 31, 114–118.
- Dufour, A., Thuault, D., Boulliou, A., Bourgeois, C. M. and Le Pennec, J. P., 1991. Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide. *Journal of General Microbiology*, 137, 2423–2429.

- Ehrmann, M. A., Remiger, A., Eijsink, V. G. and Vogel, R., 2000. A gene cluster encoding plantaricin 1.25b and other bacteriocin-like peptides in *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *Biochimia et Biophysica Acta*, 1490, 355–361.
- Erten, Ö., 2013. Protoplast Füzyonu Kullanılarak Bazı *Lactobacillus* suşlarının Bakteriyosin Üretim Kapasitelerinin Arttırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi.
- FAO/WHO, 2002. Food and agriculture organization of United Nation and world health organization working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: FAO.
- Ferrero, M., Cesena, C., Morelli, L., Scolari, G. and Vescovo, M., 1996. Molecular characterization of *Lactobacillus casei* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 140, 215–219.
- Fontanaa, C., Cocconcelli, P. S. and Vignoloa, G., 2005. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Int J Food Microbiol*, 103, 131–142.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N. B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51–70.
- Gálvez, A., Omar, N. B., Abriouel, H., 2008. Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 125-152.
- Gardiner, G. E., Heinemann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D. and Reid, G., 2002. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clin Diagn Lab Immunology*, 9, 92–96.
- Garneau, S., Martin, N. I., Vedras, J. G., 2002. Two-peptide bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Biochimie*, 84, 577-592.
- Gibson, G. R. and Fuller, R., 2000. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and probiotics for human use. *J Nutr*, 130, 391–95.
- Gilmore, M. S., Segarra, R. A., Booth, M. C., Bogie, C. P., Hall, L. R. and Clewell, D. B., 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *Journal of Bacteriology*, 176, 7335–7344.
- Giraffa, G. and Neviani, E., 2000. Molecular identification and characterization of food associated lactobacilli. *Italian J Food Sci*, 4, 403–423.
- Gönül, N., 2013. Karaciğer Spesifik Tip60 Nakavt Farelerde Karbonik Anhidraz Enzimlerinin (I,III ve VII) Ekspresyon Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi.
- Gut, M., Leutenegger, C. M., Huder, J. B., Pedersen, N. C. and Lutz, H., 1999. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods*, 77, 37-46.
- Güllüce, M., Karadayı, M. and Barış Ö., 2013. Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials. *İngilize Kitap Bölümü*, 1016-1027.
- Haarman, M. and Knol, J., 2006. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 2359–2365.

- Hammami, R., Zouhir, A., Lay, C. L., Hamida, J. B. and Fliss, I., 2010. BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*, 10, 22.
- Hastings, J. W. and Stiles, M. E., 1991. Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 127–134.
- Héchar, Y., Berjeaud, J. M. and Cenatiempo, Y., 1999. Characterization of the mesB gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Current Microbiology*, 39, 265–269.
- Héchar, Y., Derijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y., 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology*, 138, 2725–2731.
- Henderson, J. T., Chopko, A. L. and van Wassenaar, P. D., 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 295, 5–12.
- Holck, A. L., Axelsson, L. and Schillinger, U., 1994. Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Current Microbiology*, 29, 63–68.
- Holck, A., Axelsson, L. and Schillinger, U., 1996. Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750. *FEMS Microbiology Letters*, 136, 163–168.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S. E., Aukrust, T. and Blom, H., 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB706. *Journal of General Microbiology*, 138, 2715–2720.
- Holck, A., Axelsson, L., Hühne, S. K. and Kröckel, L., 1994. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiology Letters*, 115, 143–150.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., Nes, I.F., 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* 147, 643–651.
- Holo, H., Nissen, O. and Nes, I. F., 1991. Lactococcin A a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*, 173, 3879–3887.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Microbiol.*, 73, 365–373.
- Holzappel, W., Geisen, R. and Schillinger, R.G.U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343-362.
- http://www.biogene.com/ApplicationNotes/Analysis/Application/Hybridisation_Probes.htm
- <http://www.filgen.jp/Product/Bioscience3/index1.htm>
- <http://www.sinobiological.com/sybr-green-qpcr-method-cro-service.html>
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A. and Rozes, N., 2011. Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress. *Food Microbiology*, 28, 1339-1344.
- Hynes, W., Ferreti, J. J. and Tagg, J. R., 1993. Cloning of the gene encoding streptococcin A-FF22, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*

- and determination of its nucleotide sequence. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1969–1971.
- Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Holo, H., Nes, I. F., Sletten, K. H. and Warner, P. J., 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Joerger, C. and Klaenhammer, T. R., 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*, 167, 439–446.
- Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, April 30 and May 1, 2002. London, Ontario, Canada
- Justé, A., Thomma, B.P.H.J. and Lievens, B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, 25, 745–761.
- Kanatani, K., Oshimura, M. and Sano, K., 1995. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1061–1067.
- Kao, Y. T., Liu, Y. S. and Shyu, Y. T., 2007. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Res. Int.*, 40, 71–79.
- Karagül, B., 2010. Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Yetenekleri, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi.
- Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö., 2011. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 27(1), 62-74.
- Kimura, K., McCartney, A. L., McConnell, M. A. and Tannock, G. W., 1997. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli, and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl Environ Microbiol*, 63, 3394–3398.
- Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Review*, 12, 39-85.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 41, 103–125.
- Köseoğlu, V. K., 2007, Model sistemlerde laktik asit bakterilerinin bazı patojenler üzerine antibakteriyal etkilerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 59.
- Krier, F., Revol-Junelles, A. M. and Germain, P., 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50, 359-363.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J. and Lind, K., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27, 95-125.
- Kuipers, O. P., Buist, G. and Kok, J., 2000. Current strategies for improving food bacteria. *Res Microbiol*, 151, 815–822.

- Larsen, A. G., Vogensen, F. K. and Josephsen, J., 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolate from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 113–122.
- Leer, J. R., van der Vossen, J.B.M., van Gieze, M., van Noort, J.M. and Pouwels, P. H., 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*, 141, 1629–1635.
- Leroy, F. and De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67–78.
- Lick, S., 2003. Typing systems for lactobacilli. *Milchwissenschaft*, 58, 256–260.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 149–163.
- Mainville, I., Robert, N., Lee, B. and Farnworth, E. R., 2005. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Syst Appl Microbiol*, 29, 59–68.
- Maldonado, A., Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., 2004. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *Journal of Bacteriology*, 186, 1556–1564.
- Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L. and Jimenez-Diaz, R., 2003. Purification and Genetic Characterization of plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 383–389.
- Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B. and Poolman, B., 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 14277–14284.
- Martínez, B., Fernández, M., Suárez, J. E. and Rodríguez, A., 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology*, 145, 3155–3161.
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K. and Ishizaki, A., 1996. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45, 36–40.
- Métivier, A., Pilet, M-F., Douset, X., Rorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J-C., Marion, D., Cenatiempo, Y. and Fremaux, C., 1998. Divercin V41, a new bacteriocin with two-disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology*, 144, 2837–2844.
- Mills, S., Stanton, C., Hill, C. and Ross, R. P., 2011. New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 299–329.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. and Yadav, H., 2008. Molecular approaches for

- identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases*, 9, 190-198.
- Monnet, C., Ulvé, V., Sarthou, A.S. and Irlinger, F. 2008. Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5724–5730.
- Moraes, P. M., Perin, M. P., Junior, A. S. and Nero, L. A., 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 109-112.
- Mortvedt, C. I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K. and Nes, I. F., 1991. Purification and amino sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1829–1834.
- Moschetti, G., *et al.* 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism; Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *J. of Appl. Microbiol.*, 85, 25-36.
- Mukherjee, S. and Ramesh, A., 2015. Bacteriocin-producing strains of *Lactobacillus plantarum* inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* to extracellular matrix: quantitative insight and implications in antibacterial therapy. *Journal of Medical Microbiology*, 64, 1514-1526.
- Mørtvedt-Abildgaard, C. I., Nissen-Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M. and Nes, I. F., 1995. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl Environ Microbiol*, 61, 175-179.
- Nadaroğlu, H., 2009. Purification and properties of peroxidase from prangos ferulacea (Apiaceae) and investigation by some chemicals, *Asian J Chem.*, 21(7) 5768-5776.
- Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M. and Swings, J., 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of Enterococcus species based on rpoA and pheS genes. *Microbiology*, 151, 2141–2150.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S. and Brurberg, M. B., 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 113-128.
- Nes, I. F., Yoon, S. S. and Diep, D. B., 2007. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Science and Biotechnology*, 16, 675-690.
- Nilsen, T., Nes, I. F. and Holo, H., Enterolysin, A., 2003. A Cell Wall-Degrading Bacteriocin from Enterococcus faecalis LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2975-2984.
- Ning, W., Mackie, R. I. and Gaskins, H. R., 1997. Biotype and ribotype diversity among *Lactobacillus* isolates from mouse ileum. *Syst Appl Microbiol*, 20, 423–431.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K. and Nes, I. F., 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, 174, 5686–5692.
- Nousiainen, J. and Setälä, J., 1998. Lactic acid bacteria as animal probiotics. In: *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. Salminen S, Von Wright A (Eds.) 2nd Edition Marcel Dekker Inc, New York, 437–474.
- Oh-Sik, K., 2002. Characterization of isolated *Lactobacillus* spp. and classification by RAPD-PCR analysis. *J Microbiol*, 38, 137–44.

- Omar, B. N., Abriouel, H., Keleke, S., Valenzuela, M. C., Lopez, R. L., Ortega, E. and Galvez, A., 2008. Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from pototo, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 18-25.
- Ongol, M.P., Tanaka, M., Sone, T. And Asano, K., 2009. A real-time PCR method targeting a gene sequence encoding 16S rRNA processing protein, rimM, for detection and enumeration of *Streptococcus thermophilus* in dairy products. *Food Research International*, 42, 893–898.
- Orla-Jensen, S., 1919. The lactic acid bacteria. Host and Son, Koeniglicher Hof-Boghandel, Copenhagen.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. and Isolauri, E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.
- Palacios, J., Vignolo, G., Farias, M. E., de Ruiz Holgado, A. P., Oliver, G. and Sesma, F., 1999. Purification and amino acid sequence of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. *Microbiological Research*, 154, 199-204.
- Papagianni, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotec. Advances*. 21, 465-499.
- Papathanasopoulos, M. A., Dykes, G. A., Revol-Junelles, A. M., Delfour, A., von Holy, A. and Hastings, J. W., 1998. Sequence and structural relationships of leucocins A-, B- and C-TA33a from *Leuconostoc mesenteroides* TA33a. *Microbiology*, 144, 1343–1348.
- Parente, E., Ricciardi, A. and Addario, G., 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation of enterocin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 41, 388-394.
- Parente, E., Ricciardi, A., 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett Appl Microbiol*, 19, 12-15.
- Piard, J. C., Muriana, P. M., Desmazaud, M. J. and Klaenhammer, T. R., 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lantionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 279–284.
- Quadri, LEN., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E., 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 12204–12211.
- Rammelsberg, M., Muller, E. and Radler, F., 1990. Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archives in Microbiology*, 154, 249–252.
- Randazzo, C.L., Caggia, C. and Neviani, E., 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 1–9.
- Remiger, A., Eijsink, V-G-H., Ehrmann, M. A., Sletten, K., Nes, I. F. and Vogel, R. F., 1999. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25a and 1.25b, two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 1053–1058.

- Revol-Junelles, A. M., Mathis, R., Krier, F., Fleury, Y., Delfour, A. and Lefebvre, G., 1996. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* synthesizes two distinct bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*, 23, 120–124.
- Riaz, S., Nawaz, S. K. and Hasnain S., 2010. Bacteriocins produced by *L. fermentum* and *L. acidophilus* can inhibit cephalosporin resistant *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 643-648.
- Riley, M. A. and Chavan, M. A., 2008. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 150.
- Riley, M. A. and Wertz, J. E., 2002. BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56, 117-137.
- Rodas, A. M., Ferrer, S. and Pardo, I., 2005. 16S-ARDRA: A tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst Appl Microbiol*, 26, 412–422.
- Rodriguez, E., Arques, J. L., Rodriguez, R., Nunez, M. and Medina, M., 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig feces and evaluation of probiotic traits. *Lett Appl Microbiol*, 37, 259–263.
- Rodtong, S. and Tannock, G. W., 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl Environ Microbiol*, 59, 3480–3484.
- Rosado, A.S., Dauarte, G. F., Seldin, L. and VanElsas, J. D., 1998. Genetic diversity of nif H gene sequences in Paenibacillus azotofixans strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR – amplified gene fragments. *Appl Environ Microbiol*, 64, 2770–2779.
- Ross, K. F., Ronson, C. W. and Tagg, J. R., 1993. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene salA from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1652–1657.
- Rosland, E., Langsrud, T., Granum, P.E. and Sorhaug, T., 2005. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 98, 193-200.
- Roussel Y, Colmin C, Simonet JM, Decaris B., 1993. Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group. *J Appl Bacteriol*, 74, 549–56.
- Roy, D. and Sirois, S., 2001. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *idh* gene. *FEMS Microbiol Lett*, 191, 17–24.
- Roy, D. and Ward, P., 2004. Champagne G. Differentiation of *Bifidobacteria* by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol.*, 29, 11–29.
- Saelao, S., Maneerat, S., Kaewsuwan, S., Rabesona, H., Choiset, Y., Haertle, T. and Chobert J. M., 2017. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in vitro by bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* KTH0-1S isolated from Thai fermented shrimp (Kung-som) and safety evaluation, 199, 551-562.
- Salminen, S., Deighton, M. A., Benno, Y. and Gorbach, S. L., 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. In: Salminen S, von Wright A, eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker, 211–254.
- Sanchez, I., Sesena, S. and Palop, L., 2004. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with ‘Almagro’ eggplants spontaneous fermentation,

- based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns. *J Appl Microbiol*, 97, 446–447.
- Sanchez, I., Sesena, S., Poveda, J. M., Cabezas, L. and Palop, L., 2005. Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolates from Spanish goat cheese. *Int J Food Microbiol*, 102, 355–362.
- Sanchez, I., Sesena, S., Poveda, J. M., Cabezas, L. and Palop, L., 2006. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *Int J Food Microbiol*, 107, 265–273.
- Sankar, N.R., Priyanka, V. D., Reddy, P. S. Rajanikanth, P., Kumar, V. K. and Indira, M., 2012, Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from cow milk, *International Journal of Microbiological Research*, 3 (2), 133-137.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K., 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* isolated from Meat. *App. Environ Microbiol.*, 55 (8), 1901-1906.
- Schillinger, U., Yousif, N. M., Sesar, L. and Franz, C. M., 2003. Use of groupspecific and RAPD-PCR analyses for rapid differentiation of *Lactobacillus* strains from probiotic yogurts. *Curr Microbiol.*, 47, 453–456.
- Sezer, Ç., 2007. Gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin araştırılması. Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kafkas Üniversitesi.
- Song, Y., Kato, N., Liu, C., Matsumiya, Y., Kato, H. and Watanabe, K., 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S–23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett*, 187, 167–173.
- Spano, G., Beneduce, L., Tarantino, D., Zapparoli, G. and Massa, S., 2002. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR. *Lett Appl Microbiol*, 35, 370–374.
- Stahl, M. and Molin, G., 1994. Classification of *Lactobacillus reuteri* by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. *Int J Syst Bacteriol*, 44, 9–14.
- Steffen, T., 2005. Natural Dairy Safety in Dairy World. Food Protection Symposium Sao Polia, June 2005, Brazil.
- Stephens, S., Floriano, B., Cathcart, D.P., Bayley, S.A., Witt, V.F., Jiménez-Díaz, R., Warner, P.J., Ruiz-Barba, J.L., 1998. Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1871–1877.
- Stoddard, G., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J. and McKay, L. L., 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1952–1961.
- Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Guomundsdóttir, A., Sletten, K., Holo, H. and Nes, I. F., 1992. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1417–1422.
- Sullivan, D. J. and Kullen, M. J., 1999. Tracking of probiotic bifidobacteria in the intestine. *Int Dairy J*, 8, 513–525.

- Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593–604.
- Tahara, T., Oshimura, M., Umezawa, C. and Kanatani, K., 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1132, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1132. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 892–897.
- Tahara, T., Yoshioka, S., Utsumi, R. and Kanatani, K., 1997. Isolation and partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* JCM2124. *FEMS Microbiology Letters*, 148, 97-100.
- Thomas LV. and Delves B. 2005. Nisin. In: *Antimicrobials in Food*. Davidson P.M. Sofos JN, Branen AL. (chief eds), Taylor & Francis Group, New York, 237-275.
- Thomas, Lv., Wimpenny, Jw., 1996. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *App Environ Microbiol*, 62, 2006-2012.
- Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F. and Hammes, W. P., 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 460–468.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T., 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, 36, 318-326.
- Todorov, S. D., Dicks, L. M. T., 2006. Screening for bacteriocin -producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of bacteriocins. *Process Biochemistry Journal*, 41, 11-19.
- Todorov, S. D., Vaz-Velho, M., Gibbs, D., 2004. Comparison of two methods for purification of Plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 157-160.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. and Ike, Y., 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *Journal of Bacteriology*, 178, 3585–3593.
- Tunalıgil, S., 2009. İzmir Bölgesinde Satışa Sunulan Et ve Et Ürünlerinin Patojen Mikroorganizmalar Açısından Analizi ve PCR ile Bakteriyosin Üretiminin Saptanması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi.
- Tyagi, S., Kramer, F. R., 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 14, 303-308.
- Tynkkynen, S., Satokari, R., Saarela, M., Mattila-Sandholm, M. and Saxelin, M., 1999. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulse field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3908–3914.
- Uludağ, H., 2015. Klinik ve Gıda Kaynaklı Enterekoklar tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Bazı Patojen Bakteriler Üzerine Antimikrobiyel Etkilerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.

- Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Jeeninga, R. E., Kok, J. and Venema, G., 1991. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 492–498.
- Van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N. and Abee, T., 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmatic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *Journal of Bacteriology*, 173, 7934–7941.
- Van Schaik, W., Gahan, C. G. and Hill, C., 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lacticin 3147. *Journal of Food Protection*, 62, 536-540.
- Velden, V. H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J. and Van Dongen, J. J., 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17, 1013-1034
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K. and Hammes, W. P., 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2578–2585.
- Weiss, A., Lettner, H. P., Kramer, W., Mayer, H. K. and Kneifel, W., 2005. Molecular methods used for the identification of potentially probiotic *Lactobacillus reuteri* strains. *Food Technol Biotechnol*, 43, 295–300.
- Wilson, K. H. and Blichington, R. B., 1996. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Applied Environmental Microbiol.*, 62, 2273–2278.
- Wilson, K., 1997. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2.4.1-2.4.5.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. and Rasmussen, R. P., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22, 130-1, 134-8.
- Worobo, R. W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E., 1994. Characteristics and genetic determinants of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*, 140, 517–526.
- Worobo, R. W., van Belkum, M. J., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E., 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Journal of Bacteriology*, 177, 3143–3149.
- Yerlikaya, O., 2014. Laktik asit bakterilerinin tanılanmasında kullanılan başlıca fenatipik ve moleküler yöntemler. *Teknoloji dergisi*, 14, 8-22.
- Yörük, N. G. Ve Danyer, E., 2016. Gıda Katkı Maddeleri Genel Bilgiler ve Tanımlar. *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 2 (2).
- Zacharof, M. P. And Lovitt, R. W., 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.
- Zago, M., Bonvini, B., Carminati, D. and Giraffa, G., 2009. Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 514–521.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta, lise ve lisans öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2006 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kimya Bölümü’nden 2010 yılında mezun oldu. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2014 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı.