

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDALARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİN ÜRETME
YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Arş. Gör. Çiğdem SEZER
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Abamüslüm GÜVEN**

2007 - KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDALARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİN ÜRETME
YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Çiğdem SEZER
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Abamüslüm GÜVEN

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No:
2006-VF-04**

2007 – KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Arş. Gör. Çiğdem SEZER tarafından hazırlanmış olan “**Gıdalardan İzole Edilen Laktobasillerin Bakteriyosin Üretme Yeteneklerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21.09.2007

Adı Soyadı

İmza

Başkan: Prof. Dr. Abamüslüm GÜVEN

Üye : Doç. Dr. Mustafa ATASEVER

Üye : Doç. Dr. Salih OTLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat GÜLMEZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Leyla VATANSEVER

.....
.....
.....
.....
.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24.09.2007
Gün ve 20/116..... Sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Simgeler ve Kısaltmalar | I |
| Tablo Listesi | III |
| Şekil Listesi | V |
| Resim Listesi | V |
| Önsöz | VI |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ VE GIDALARDA KULLANIMI | 3 |
| 1.1.1 Starter Kültürlerin Fonksiyonları | 7 |
| 1.1.1.1 Laktik Asit Üretimi | 7 |
| 1.1.1.2 Etil Alkol Üretimi | 7 |
| 1.1.1.3 Proteoliz | 7 |
| 1.1.1.4 Lipoliz | 8 |
| 1.1.1.5 Tat ve Aroma Oluşumu | 8 |
| 1.1.1.6 Patojen ve Diğer Zararlı Bakterilerin İnhibisyonu | 9 |
| 1.1.1.7 Ekzopolisakkarit Üretimi | 10 |
| 1.1.1.8 Bakteriyofajlara Direnç | 10 |
| 1.1.1.9 Biyojen Amin Oluşturma | 11 |
| 1.1.2 Süt Ürünlerinde Kullanılan Starter Kültürler | 12 |
| 1.1.3 Et Ürünlerinde Kullanılan Starter Kültürler | 17 |
| 1.1.4 Probiyotik Starter Kültürler | 21 |
| 1.1.5 Genetiği Modifiye Edilmiş Laktik Asit Bakterileri | 25 |
| 1.2 LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN SINIFLANDIRILMASI VE İDENTİFİKASYONLARI | 26 |
| 1.2.1 Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri | 26 |
| 1.2.2 Sınıflandırma ve İdentifikasyon | 27 |
| 1.3 LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN METABOLİK ÜRÜNLERİ VE ANTİMİKROBİYEL ETKİLERİ | 37 |
| 1.3.1 Antagonistik Etki | 37 |
| 1.3.2 Organik Asitler | 39 |

| | | |
|----------|---|----|
| 1.3.3 | Hidrojen Peroksit | 40 |
| 1.3.4 | Karbondioksit | 40 |
| 1.3.5 | Diasetil | 41 |
| 1.3.6. | Düşük Molekül Ağırlıklı Antimikrobiyel Etkili Bileşikler | 41 |
| 1.3.6.1 | Reuterin | 41 |
| 1.3.7 | Bakteriyosinler | 42 |
| 1.3.8 | Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması | 44 |
| 1.3.8.1 | Sınıf I Bakteriyosinler (Lantibiyotikler) | 44 |
| 1.3.8.2 | Sınıf II Bakteriyosinler | 45 |
| 1.3.8.3 | Sınıf III Bakteriyosinler | 48 |
| 1.3.8.4 | Sınıf IV Bakteriyosinler | 49 |
| 1.3.9 | Sınıf I ve Sınıf IIa Bakteriyosinlerin Aktivite Spektrumu ve Özellikleri | 49 |
| 1.3.9.1 | Aktivite Spektrumları | 49 |
| 1.3.9.2 | Özellikleri | 52 |
| 1.3.10 | Bakteriyosinlerin Biyosentezleri ve Etki Mekanizmaları | 54 |
| 1.3.10.1 | Bakteriyosinlerin Biyosentezleri | 54 |
| 1.3.10.2 | Bakteriyosinlerin Etki Mekanizmaları | 55 |
| 1.3.11 | Bakteriyosinlerin Üretimini ve Aktivitelerini Etkileyen Faktörler | 56 |
| 1.3.12 | Bakteriyosinlere Dirençlilik Mekanizması | 56 |
| 1.4 | GIDA SANAYİNDE BAKTERİYOSİN UYGULAMALARI | 58 |
| 1.4.1 | Et Ürünlerinde Bakteriyosinler | 59 |
| 1.4.2 | Süt Ürünlerinde Bakteriyosinler | 61 |
| 1.4.3 | Deniz Ürünlerinde Bakteriyosinler | 62 |
| 1.4.4 | Ambalaj Materyalinde Bakteriyosinler | 63 |
| 1.4.5 | Bakteriyosin Uygulamalarındaki Engeller | 63 |
| 1.5 | LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ | 66 |
| 1.5.1 | Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Aktivitesinin Belirlenmesi | 67 |
| 1.5.2 | Etki Biriminin Ölçümü | 69 |
| 1.5.3 | Proteaz Uygulanması | 69 |
| 1.5.4 | Bakteriyosinlerin Saflaştırılması | 70 |
| 1.5.4.1 | Antimikrobiyel Etkili Proteinlerin Çöktürülmesi | 71 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.5.4.2 | Diyaliz | 71 |
| 1.5.4.3 | İnhibitör Proteinlerin Belirlenmesi | 71 |
| 1.5.4.4 | Kromotoğrafik Yöntemler ile Bakteriyosinlerin Saflaştırılması | 72 |
| 2. | MATERYAL VE METOT | 76 |
| 2.1 | MATERYAL | 76 |
| 2.1.1 | Örnekler | 76 |
| 2.1.2 | Test Suşları | 76 |
| 2.1.3 | Alet ve Ekipman | 77 |
| 2.2. | YÖNTEM | 77 |
| 2.2.1 | Örneklerin Toplanması | 77 |
| 2.2.2 | Kefir Örneklerinin Hazırlanması | 77 |
| 2.2.3 | Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Gruplandırılmaları | 78 |
| 2.2.3.1 | Gram Reaksiyonu ve Mikroskopik Morfolojileri | 79 |
| 2.2.3.2 | Katalaz Testi | 79 |
| 2.2.3.3 | Oksidaz Testi | 79 |
| 2.2.3.4 | Glukozdan Gaz Oluşturma | 79 |
| 2.2.4 | Test Suşlarının Aktif Hale Getirilmesi | 80 |
| 2.2.5 | İzolatların Antimikrobiyel Etkilerinin Belirlenmesi | 80 |
| 2.2.6 | Bakteriyosinlerin Varlığının Belirlenmesi | 82 |
| 2.2.6.1 | Organik Asitlerin Antimikrobiyel Etkisinin Elimine Edilmesi | 82 |
| 2.2.6.2 | Hidrojen Peroksitin Antimikrobiyel Etkisinin Elimine Edilmesi | 82 |
| 2.2.7 | Duyarlılık Testleri ve Proteolitik Enzim Uygulamaları | 82 |
| 2.2.7.1 | Enzim Uygulaması | 83 |
| 2.2.7.2 | Isı Uygulaması | 83 |
| 2.2.7.3 | pH Uygulaması | 83 |
| 2.2.8 | Bakteriyosinogenik İzolatların İdentifikasyonu | 84 |
| 2.2.8.1 | Tolerans Testleri | 84 |
| 2.2.8.2 | Argininden Amonyak Oluşturma | 84 |
| 2.2.8.3 | Dekstran Oluşturma | 84 |
| 2.2.8.4 | Voges Prouskauer Testi | 85 |
| 2.2.8.5 | Asetat Agar'da Üreme | 85 |
| 2.2.8.6 | %0,1 Metilen Mavisinde Üreme | 85 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 2.2.8.7 | Karbonhidrat Fermantasyon Testleri | 85 |
| 2.2.9 | Bakteriyosinlerin Kısmi Saflaştırılması | 86 |
| 2.2.9.1 | Amonyum Sülfat ile Proteinlerin Çöktürülmesi | 86 |
| 2.2.9.2 | Diyaliz | 86 |
| 2.2.9.3 | İyon Değişim Kromotoğrafisi | 87 |
| 2.2.10 | Örneklerin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi | 88 |
| 2.2.11 | Bakteriyosinlerin Saflığının Belirlenmesi ve Tanımlanması | 88 |
| 3. | BULGULAR | 91 |
| 3.1 | Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu | 91 |
| 3.2 | İzolatların Antimikrobiyel Etkisinin Belirlenmesi | 91 |
| 3.3 | Bakteriyosinlerin Varlığının Belirlenmesi | 94 |
| 3.4 | Duyarlılık Testleri ve Proteolitik Enzim Uygulamaları | 96 |
| 3.5 | Bakteriyosinjenik İzolatların Gruplandırılması ve İdentifikasyonu | 98 |
| 3.6 | Bakteriyosinlerin Kısmi Saflaştırılması | 106 |
| 3.6.1 | Amonyum Sülfat ile Çöktürme | 106 |
| 3.6.2 | Diyaliz İşlemi | 107 |
| 3.6.3 | İyon Değişim Kromotoğrafisi | 108 |
| 3.7 | Örneklerin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi | 108 |
| 3.8 | Bakteriyosinlerin Saflığının Belirlenmesi ve Tanımlanması | 109 |
| 4. | TARTIŞMA ve SONUÇ | 112 |
| 5. | ÖZET | 125 |
| 6. | SUMMARY | 126 |
| 7. | KAYNAKLAR | 127 |
| 8. | ÖZGEÇMİŞ | 144 |
| | EKLER | 145 |
| | Ayıraç ve Çözeltiler | 145 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| Simge-Kısaltma | Açıklama |
|-----------------------------------|--|
| AFM1 | Aflatoksin M1 |
| API | Analitiksel Profil İndeks (Analytical Profile Index) |
| ARDRA | Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis |
| ATP | Adenozin Trifosfat (Adenosine Triphosphate) |
| BCA | Bisinsinonik Asit (Bicinchoninic Acid) |
| BHI | Brain Heart Infusion Agar/Broth |
| CO₂ | Karbondioksit |
| D(-)/ D(+) | Dekstrorotari (Dextrorotatory) |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit (Deoxyribonucleic Acid) |
| E234 | European 234 (Katkı Maddesi Kodu) |
| EDTA | Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) |
| EMP | Emden-Mayerhof-Parnas (Fruktoz Difosfat Yolu-EMP Yolu) |
| EMS | En Muhtemel Sayı |
| FAO | Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization) |
| FPLC | Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (Fast Performance Liquid Chromatography) |
| GRAS | Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen (Generally Recognized As Safe) |
| H₂O₂ | Hidrojen Peroksit |
| HACCP | Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (Hazard Analysis and Critical Control Point) |
| HPLC | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) |
| IU/ml | Uluslararası Birim (International Units) |
| kob/g | Koloni Oluşturan Birim/Gram |
| L(-)/L(+) | Levorotatori (Levorotatory) |
| L | Listeria |
| Lan | Lanthionine |

| Simge-Kısaltma | Açıklama |
|-----------------------|---|
| Lc | Lactococcus |
| Leuc | Leuconostoc |
| MAP | Modifiye Atmosfer Ambalajlama |
| MeLan | α -Methyllanthionine |
| MIC | Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (Minimum İnhibitor Concentration) |
| MRS | De Man Rogosa Sharpe Agar/Broth |
| MR-VP Broth | Methyl-Red Voges Prouskauer Broth |
| NADH+H | Nikotinamid Adenin Dinükleotit (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) |
| NO₂ | Nitrat |
| NO₃ | Nitrit |
| P | Pediococcus |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) |
| PFGE | Pulsed Field Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis) |
| pKa | Bir asitin gücünün ölçümünde kullanılan Ka (asitlik sabiti)'nin negatif logaritması |
| ppm | Milyonda Bir Kısım (Parts Per Milion) |
| RFLP | Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism) |
| RNA | Ribonükleik Asit (Ribonucleic Acid) |
| RP-HPLC | Ters Faz Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) |
| RSKK | Refik Saydam Kültür Koleksiyonu |
| SDS | Sodyum Dodosil Sülfat (Sodium Dodecyl Sulfate) |
| SDS-PAGE | Sodyum Dodosil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis) |
| Strep | Streptococcus |
| ssp | Alt Tür (Subspecies) |
| UHT | Ultra Yüksek Isı (Ultra High Temperature) |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) |

TABLO LİSTESİ

| Tablo No | Adı | Sayfa |
|-----------------|---|--------------|
| Tablo 1 | Gıda Sanayinde Kullanılan Fonksiyonel Starterlerin Avantajları | 6 |
| Tablo 2 | Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Aroma Bileşikleri | 8 |
| Tablo 3 | Süt Ürünlerinin Üretiminde En Çok Kullanılan Bazı Laktik Asit Bakterileri | 13 |
| Tablo 4 | Bazı Fermente Süt Ürünlerinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri | 14 |
| Tablo 5 | Fermente Et Ürünlerinde Starter Kültür Olarak Kullanılan Önemli Mikroorganizmalar | 19 |
| Tablo 6 | Probiyotik Kültürlerin Taşınması Gereken Özellikler | 22 |
| Tablo 7 | Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar ve Sağlık Üzerindeki Etkileri | 23 |
| Tablo 8 | Laktik Asit Bakterilerinin Ayrımında Kullanılan Bazı Testler | 28 |
| Tablo 9 | Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda Kullanılan Teknikler | 35 |
| Tablo 10 | Lactobacillus'ların İdentifikasyonunda Kullanılan Tekniklerin Karşılaştırılması | 36 |
| Tablo 11 | Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Etkili Metabolik Ürünleri | 38 |
| Tablo 12 | Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması | 44 |
| Tablo 13 | Bakteriyosinler ve Üretici Türler | 46 |
| Tablo 14 | Gıda Güvenlik Zincirinde Engeller (Hurdling) Teknolojisi | 65 |
| Tablo 15 | Bakteriyosinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler | 73 |
| Tablo 16 | Test Mikroorganizmaları ve Temin Edildiği Kaynaklar | 76 |
| Tablo 17 | Süpernatantlara Uygulanan Proteolitik Enzimler, Isı ve pH Değerleri. | 83 |
| Tablo 18 | Örneklerden Elde Edilen İzolat Sayısı | 91 |
| Tablo 19 | Antimikrobiyel Etki Gösteren İzolat Sayısı | 93 |
| Tablo 20 | Çeşitli Patojenlere Karşı İzolatların Antimikrobiyel Etkisi | 95 |

| Tablo No | Adı | Sayfa |
|-----------------|---|--------------|
| Tablo 21 | Bakteriyosin Ürettiği Belirlenen İzolatların Elde Edildiği Örnekler | 96 |
| Tablo 22 | Süpernatantlara Uygulanan Duyarlılık Testlerinin Sonuçları | 97 |
| Tablo 23 | Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda Yapılan Temel Testlerin Sonuçları | 99 |
| Tablo 24 | Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda Yapılan Metabolizma Testlerinin Sonuçları | 100 |
| Tablo 25 | Karbonhidrat Fermantasyon Test Sonuçları | 101 |
| Tablo 26 | Karbonhidrat Fermantasyon Test Sonuçları (API Test Kiti ile) | 102 |
| Tablo 27 | İzolatların Gruplandırılması | 104 |
| Tablo 28 | İdentifiye Edilen İzolatların İsimleri ve Kaynakları | 105 |
| Tablo 29 | Farklı Amonyum Sülfat Konsantrasyonlarında Test Edilen Antimikrobiyel Etki | 106 |
| Tablo 30 | Örneklerin Protein Konsantrasyonları | 109 |

ŞEKİL LİSTESİ

| Şekil / Grafik No | Adı | Sayfa |
|--------------------------|--|--------------|
| Şekil 1 | Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyon Şeması | 30 |
| Şekil 2 | Kefir Üretim Şeması | 78 |
| Grafik 1 | Antimikrobiyel Etki Gösteren İzolatların Sayısı | 94 |
| Grafik 2 | Standart Eğrinin Hesaplanması | 108 |

RESİM LİSTESİ

| Resim No | Adı | Sayfa |
|-----------------|---|--------------|
| Resim 1 | Antimikrobiyel Etki Belirleme Testleri Kağıt Disk Yöntemi Test mikroorganizması: <i>L. monocytogenes</i> | 92 |
| Resim 2 | Antimikrobiyel Etki Belirleme Testleri Kağıt Disk Yöntemi Test mikroorganizması: <i>S. aureus</i> | 92 |
| Resim 3 | Antimikrobiyel Etki Belirleme Testleri Kuyucuk Yöntemi Test mikroorganizması: <i>L. monocytogenes</i> | 93 |
| Resim 4 | Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda Kullanılan API Test Kiti | 104 |
| Resim 5 | Tricine –SDS-PAGE’de Jelin Coomassie Blue ile Boyanması | 110 |
| Resim 6 | Tricine –SDS-PAGE’de Jelin Gümüş Boyama ile Boyanması | 110 |

ÖNSÖZ

Modern gıda üretim tekniklerinde güvenilir, sağlıklı ve raf ömrü uzun gıdalar üretmek esas hedeftir. Son zamanlarda gıdalarda kullanılan kimyasal koruyucuların bilinen ve/veya olası yan etkilerinden dolayı tüketiciler ciddi bir endişe içerisinde. Bu nedenle insanlar artık daha doğal ürünlere yönelmişlerdir. Doğal ürünlere olan talep arttıkça, gıdanın üretim aşamalarını kolaylaştıracak, gıdanın raf ömrünü uzatacak doğal ve etkili koruyucu maddelerin gıda üretiminde kullanılabilirliğine yönelik çalışmaların da sayısı hızla artmaktadır. Bu doğal koruyucuların başında gelen ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler son zamanların en çok araştırılan ve ilgi duyulan biyokoruyuculardır.

Özellikle biyokoruyucu olarak adlandırılan bakteriyosinlerin bu ihtiyacı tam olarak karşılayıp karşılayamayacağı üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Fakat çalışmaların neredeyse tamamında bakteriyosinler ve bakteriyosin üreten suşlar hakkında daha detaylı ve güvenilir bilgiye ihtiyaç duyulduğundan bahsedilmektedir.

Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin tanımlanması ve bakteriyosinojenik laktik asit bakterilerinin identifikasyonu konusunda ülkemizde az sayıda çalışma mevcuttur. Fermente gıdalardaki laktik asit bakteri florasının gıdanın çeşidine, üretim metoduna ve çevresel faktörlere bağlı olarak büyük bir değişim gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle özellikle yöremizdeki çeşitli gıdalarda bakteriyosinojenik laktik asit bakterileri hakkında da araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, özellikle mikroflorasını laktik asit bakterilerinin oluşturduğu geleneksel yöntemlerle üretilmiş bazı fermente gıdalar (kaşar peyniri, tulum peyniri, beyaz peynir, krema, tereyağı, yoğurt ve sucuk) ile çiğ süt ve laboratuvar ortamında farklı kefir taneleri ve kefir kültürü kullanılarak üretilen kefirde bakteriyosinojenik laktik asit bakterilerini tanımlama ve seçilen gıda patojenlerine karşı en etkili olan bakteriyosini kısmi olarak saflaştırmak hedeflendi. Elde edilecek olan güçlü bakteriyosinojenik suşlar ve bu suşların bakteriyosin üretme potansiyeli tanımlanarak, gıda muhafazasında kullanılabilme olanakları yorumlanarak bu konuda yapılacak diğer çalışmalara bilgi sağlanması amaçlandı.

Mesleki ve sosyal etik anlayışının yanı sıra bilimsel çalışma disiplini öğrenmemde ve akademik gelişimimde büyük emeği geçen, Yüksek Lisans ve Doktora Öğrenimi Danışman Hocam, Sayın Prof. Dr. Abamüslüm GÜVEN'e;

Araştırmamın her aşamasında, zaman ayırıp sabırla çalışmamı takip eden ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Yrd. Doç. Dr. Murat GÜLMEZ ve Yrd. Doç. Dr. Leyla VATANSEVER'e; Çalışmalarına yaptıkları katkı ve emekleri için Arş. Gör. Dr. Nebahat BİLGE ORAL ve Arş. Gör. Berna DUMAN'a;

Çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, Doç. Dr. Salih OTLU, Doç. Dr. Mithat ŞAHİN, Doç. Dr. Sedat YILDIZ, Doç. Dr. Metehan UZUN, Doç. Dr. Sabri ULUKANLI, Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÜNVER, Yrd. Doç. Dr. Aysel GÜVEN, Yrd. Doç. Dr. Mahmut SÖZMEN'e;

Bakteriyosinlerin saflaştırılması aşamasında, çalışmamı tamamlayabilmem için gereken tüm imkanları sağlayan ve her aşamayı bizzat takip eden, ODTÜ Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayhan Sıtkı DEMİR'e; Arş. Gör. Peruze AYHAN ve Arş. Gör. Betül SOPACI'ya;

Maddi desteğinden dolayı KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Fonu Yönetim Kurulu'na;

Her zaman yanımda olan maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen aileme

Teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Günümüzde hızlı nüfus artışı, sınırsız seyahat edebilme olanağı, ayaküstü yemek yeme (fast-food) gibi birçok etkenden dolayı insanların kolay hazırlanabilen, farklı damak tadında değişik yiyecekleri talep etmelerine karşın son yıllarda artık bu tür yiyeceklerin içerdiği katkı maddelerinden dolayı daha doğal ve daha sağlıklı yiyeceklere doğru büyük bir talep oluşmuştur. Hazır gıdaların raf ömrünü uzatmak, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin daha iyi hale getirilmesi amacıyla gıdalara çok sayıda kimyasal koruyucu katılabilmektedir. Buna karşın hem sağlıklı hem de doğru beslenmenin temelini oluşturan doğal fermente gıdaların tüketimi gün geçtikçe daha da artmaktadır. Fermente gıdalara olan ilgi sonucunda gıda üretiminde yeni ürünlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar artmıştır. Bilinen fermente gıdaların yanında özellikle kefir gibi probiyotik gıda olarak nitelendirilen ürünler tüketiciler için çok sağlıklı ve gün geçtikçe tüketimi daha da artan gıdalar haline gelmiştir (25, 64, 126).

Fermente gıdaların üretiminde vazgeçilmez unsur olan starter kültürlerin büyük bir çoğunluğunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. Laktik asit bakterileri sadece fermantasyonla gıdanın tekstürünü, tadını ve aromasını oluşturmakla kalmaz, aynı zamanda son yıllarda üzerinde çok fazla sayıda araştırma yapılan doğal antimikrobiyel maddeleri de sentezlerler (75).

Günümüzde gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlar hem insan sağlığına hem de ekonomiye olan olumsuz etkileri ile büyük bir sorun oluşturmaktadır. Gıda teknolojisinin ilerlemesine karşın gıda kaynaklı hastalıkların da sayısı hızla artmaktadır. Elbette bunda pek çok faktör etkilidir. Özellikle gıda kaynaklı patojenler olan *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7 üzerine sayısız araştırma mevcuttur. Patojenlerin ve çürükçüllerin gıda teknolojisinde ve halk sağlığında oluşturdukları tehlikenin boyutu arttıkça gıda sanayinde farklı modern teknikler ve koruyucu maddeler önem kazanmıştır (29, 76).

Gıda sanayinde kullanılan antimikrobiyel amaçlı katkı maddelerinin seçiminde en önemli kriter patojenlere karşı olan antimikrobiyel etki spektrumu olmuştur. Fakat göz ardı edilemeyecek kadar önemli olan bir diğer kriter ise bu

katkıların insan sağlığına olabilecek olumsuz etkileridir. Gıdanın raf 6mrünü uzatıp g6venilirliği arttırılırken, diğer taraftan kullanılan kimyasal koruyucuların 7eşidinin ve miktarının g6n ge7tik7e artması ve yapılan araştırmalarda bu kimyasalların insan sağlığına kısa veya uzun vadeli olumsuz etkileri hem gıda teknolojisi uzmanlarında hem de t6keticiler 6zerinde b6y6k endişe yaratmaktadır. G6n ge7tik7e artan endişelerin sonucu olarak gıdaların raf 6mr6n6 uzatacak, gıda 6retim işlemine kolaylaştıracak, doğal ve etkili gıda katkı maddeleri b6y6k bir ihtiya7 olarak ortaya 7ıkmıştır. Bu nedenle son yıllarda doğal bir katkı maddesi olarak nitelendirilen, laktik asit bakterilerinin 6rettikleri antimikrobiyel maddeler b6y6k ilgi uyandırmaktadır. 6zellikle biyokoruyucu olarak adlandırılan bakteriyosinlerin bu ihtiya7ı tam olarak karşılayıp karşılayamayacağı 6zerine araştırmalar yapılmaktadır (25, 43).

Bakteriyosinler laktik asit bakterileri tarafından 6retilen antimikrobiyel maddelerdir. Bakteriyosinlerin de i7inde yer aldığı doğal antimikrobiyellerin gıdalarda kullanımına ilişkin 7ok sayıda 7alışmaya ulaşmak m6mk6nd6r. Laktik asit bakterileri ve gıdalarda kullanılan diğer bakteriler tarafından 6retilen bakteriyosinler, yasal olarak GRAS (Genel Olarak G6venilir Kabul Edilen) kapsamında değerlendirilmektedir. FAO-WHO'ya bağlı Gıda Katkıları Uzmanlar Komitesi tarafından 1969 yılında nisin gıdalarda bir antimikrobiyel olarak kullanılabilirliği onaylanmıştır. Nisin E234 no'lu gıda katkı maddesi koduyla 50'den fazla 6lkede kullanılmaktadır (41). Her ne kadar nisin dışındaki saflaştırılmış bakteriyosinlerin gıdalara eklenmesine lisanslı olarak izin verilmemiş olsa da g6n6m6zde gıda katkılarında bakteriyosin rez6dilerinin bulunduğu bir ger7ektir. Microgard ve Alta 2341 isimleri ile gıdaya katılmaları lisanslı hale getirilen ticari bileşikler, gıdalara antibakteriyel 6zellik katmak 6zere eklenen fermentlerdir. Nisin dışında bakteriyosinler 6zerine yapılan 7alışmalar sınırlı sayıdadır. Gıdalara katılmaları nisin hari7 lisanslandırılmadığı i7in bu durumu anlamak zor değildir (149).

Nisin ticari olarak kullanılan tek bakteriyosin olmasına rağmen diğer bakteriyosinlerin de gıdalarda potansiyel koruyucu olarak kullanılabilirliklerinin değerlendirilmesi, yeni bakteriyosinlerin tanımlanmasının yanında bu bakteriyosinlerin gıda sanayinde kullanılabilirliklerinin denenmesi ve bu konudaki ekonomik ve biyolojik endişelerin giderilmesi gerekmektedir (25, 29).

1.1. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ VE GIDALARDA KULLANIMI

Beslenmede fermente gıdaların sağlık üzerindeki faydalarının bilincine varılmasıyla gıda sanayinde ve tüketicilerin isteklerinde fermente gıdalara yönelik büyük bir talep olmuştur. Fermente gıdalar, sadece farklı lezzette besin maddesi elde etmek için değil; aynı zamanda insan sağlığını düzenleyici etkileri nedeniyle de özellikle prebiyotik gıdalar oldukça dikkat çekmektedir. Yeni ürünlerin elde edilmesi amacıyla fermantasyondan yararlanılmaktadır. Fermantasyon, gıdaların lezzetini ve aromasını arttırmak ve muhafaza süresini uzatmak için kullanılan en eski metotlardan biridir (23).

Fermantasyonda çiğ materyal, mikroorganizmalar tarafından kaliteli gıdalara dönüştürülür. Doğal fermantasyonda şartlar belirlidir. İstenen mikroorganizmalar üreyerek, ürün ve ürüne kalite özelliklerini veren metabolik yan ürünler oluştururlar. Fakat doğal bir fermantasyonda ürün kalitesi standart değildir, istenen mikroorganizmalar ile birlikte istenmeyen, ya da patojenik mikroorganizmalar da üreyebilir. Bu yüzden kontrollü fermantasyon kullanılmalıdır. Kontrollü fermantasyonda seçilmiş, saf kültür halindeki fermantatif mikroorganizmalar ana kültür (starter kültür) olarak kullanılır. Starter kültürler çiğ materyale çok sayıda katılır ve optimum şartlarda inkübe edilir. Yoğurt gibi kontrollü fermantasyon ürünlerinde laktik asit, starter kültür bakterileri tarafından üretilir (83).

Starter kültürler çeşitli ürünlerin yapımında lezzet, aroma, yapı, tekstür ve görünüm bakımından ürüne yeni özellikler kazandırmak, var olan özelliklerini geliştirmek, dayanıklılığını arttırmak, olgunlaştırma süresini kısaltmak ve kontrol altına almak amacıyla kullanılan, spesifik özellikleri nedeniyle seçilmiş saf, tek veya karışık kültürler halindeki mikroorganizmalar olarak tanımlanabilir (100). Gıdadaki doğal mikroflora aktivitesini kaybetmiş olabileceği gibi, bu mikroflora istenmeyen mikroorganizmaları da içerebilmektedir. Starter kültürler standart bir fermantasyon sağlayarak, ürünün aynı kalitede ve yüksek özellikte olmasını sağlar. Süte uygulanan ısı işlemi; süt içerisinde bulunan, kaliteyi olumsuz yönde etkileyen, sütü bozan ve patojen mikroorganizmaların yanı sıra, yararlı olanları da etkisiz hale getirir. Ancak bakteriler olmaksızın fermente süt ürünlerinin yapılması; tereyağı, peynir gibi ürünlerde ise lezzet, görünüm ve yapının oluşması mümkün değildir. Bu nedenle ısı

işlemden sonra bazı mikroorganizmalar “starter kültür” olarak gıda mamullerinin arzu edilen özelliklere sahip olabilmesi için kullanılır. Starter kültürler belli mikroorganizma türlerinin veya bir kaçının seçilip, kontrollü şartlar altında çoğaltılmasıyla elde edilir. Bu konuda pek çok araştırma yapılmış ve bugün artık mikroorganizmaların gıda mamulleri üretiminde kullanılmaları tamamen kontrol altına alınmıştır (100, 111).

Bilimsel teknolojideki gelişmeler diyet ve hastalıklar arasındaki ilişkiyi anlamamıza olanak vermiş olup, fonksiyonel besinler ile bunların sağlığımızın korunması ve geliştirilmesindeki rolleri daha çok ilgi çeker hale gelmiştir. Besinler artık sadece içerdikleri makro- ve mikrobeyiciler ile değerlendirilmez olmuştur. Son zamanlarda biyolojik düzenleyici rolleri üzerinde daha çok durulmaktadır. Temel besleyici özelliklerinin ötesinde sağlığımıza olumlu katkıları olan besinlere “**Fonksiyonel besinler**” adı verilmektedir. Fonksiyonel besinler hiçbir işlem görmemiş doğal bir besin maddesi olabileceği gibi fonksiyonel bir besin ögesi ile zenginleştirilmiş veya genetik mühendislik yöntemleri ile değişikliğe uğratılmış bir besin de olabilir ve günlük diyetle tüketilir. Son yıllarda prebiyotik ve probiyotik terimleri sıkça kullanılmaya başlanmış olup, bilim adamlarının da ilgisini daha çok çekmeye başlamıştır. Prebiyotik ve probiyotikler fizyolojik işlevleri geliştirdikleri, sağlığı olumlu yönde etkiledikleri ve hastalıkları önledikleri için fonksiyonel besinler grubunda incelenmektedir (34).

Güven ve Gülmez (64) fonksiyonel gıdalar hakkında yaptıkları derlemede fonksiyonel gıdalar hakkında detaylı bilgi sunmuşlardır. Bitkisel kaynaklı fonksiyonel gıdalar her ne kadar fazla ise de; hayvansal kaynaklı ürünlerde de optimal sağlık için potansiyel role sahip çok sayıda bileşik mevcuttur. Sağlığa faydalı bakterileri içeren probiyotik gıdalar, fonksiyonel gıdaların en önemli ve en iyi bilinen grubunu oluşturur. Bitkisel kaynaklı fonksiyonel gıdalara örnek olarak; yulaflar, soya, keten tohumu, domates ve domates ürünleri, sarımsak, brokoli ve benzer sebzeler, turunçgiller, yabanmersini, çay, şarap ve üzüm sayılabilir. Hayvansal kaynaklı fonksiyonel gıdalar için ise balık ile süt ürünleri örnek verilebilir.

Laktik asit bakterileri fermente gıdalarda gıda güvenliğini, raf ömrünü ve teknolojik özelliklerini arttırmaları gibi avantajlarına karşın biyojenik amin oluşturma riskleri nedeniyle son zamanlarda biyojenik amin oluşturmayan ve

antibiyotiklere dirençli yeni starter kültür kombinasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hızlı asit oluşumu ve doğal antimikrobiyel maddeler salgılayarak tüketici sağlığını patojenlere karşı koruyan starter kültürler “**Fonksiyonel starterler**” olarak adlandırılmaktadır. Probiyotik kültür olarak da adlandırılabilen bu starterlerin seçiminde birçok faktör göz önünde bulundurulmalıdır. Hızlı bir şekilde laktik asit üretebilme yeteneği ve bu ortama adaptasyonu, farklı ısı, tuz konsantrasyonları ve pH değerlerinde üreyebilme yetenekleri, karbonhidratlardan gaz oluşturmaları, hidrojen peroksiti parçalayabilme ve katalaz aktiviteleri, nitrat ve nitriti indirgeme, proteolitik ve lipolitik enzim aktiviteleri, üretimde kullanılacak diğer starterlerle sinerjistik etki yapabilmeleri ve onları tolere edebilme yetenekleri gibi birçok önemli faktör dikkate alınmalıdır (7).

Fonksiyonel kültürler ile starter kültürler çoğu zaman terim olarak karıştırılabilmektedir. Aynı kültür amaca ve üretim yöntemine uygun olarak starter kültür veya fonksiyonel kültür olarak kullanılabilmesi gibi tanım olarak bu terimler birbirinden farklılık göstermektedir. Starter kültürler üretim teknolojisi gereği metabolik faaliyetleri için kullanılırlar ve üründe istenen özellikleri sağlayarak biyokatalizör görevi üstlenirler. Bunların antimikrobiyel etkileri ikinci görevleridir. Fakat fonksiyonel kültürlerden beklenen ve amaçlanan ilk görev insan sağlığını düzenlemeleri ve antimikrobiyel etki göstermeleridir (76).

Tablo 1’de gıda sanayinde kullanılan fonksiyonel starter kültürlerin avantajları verilmiştir (103).

Tablo 1. Gıda Sanayinde Kullanılan Fonksiyonel Starterlerin Avantajları (103).

| Avantajları | Fonksiyonları | Laktik Asit Bakterileri | Kaynak |
|----------------------|--|---|--|
| Gıda Koruması | Bakteriyosin üretimi | | |
| | Süt ürünleri | <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> | Maisnier-Patin ve ark (1992) |
| | | <i>Enterococcus ssp.</i> | Giraffa (1995) |
| | Fermente et ürünleri | <i>Lactobacillus curvatus</i> | Vogel ve ark. (1993) |
| | | <i>Lactobacillus sakei</i> | Hugas ve ark. (1995) |
| | | <i>Pediococcus acidilactici</i> | Foegeding ve ark. (1992) |
| | | <i>Enterococcus faecium</i> | Callewaert ve ark. (2000) |
| | Fermente zeytin | <i>Lactobacillus plantarum</i> | Ruiz-Barba ve ark.(1994) |
| Fermente sebzeler | <i>Lc. lactis</i> | Harris ve ark. (1992) | |
| Organoleptik | Ekzopolisakkarit üretimi | Çeşitli <i>Lactobacillus</i> 'lar ve <i>Streptococcus</i> 'lar | DeVuyst ve Marshall (2001) |
| | Amilaz üretimi | Çeşitli <i>Lactobacillus</i> 'lar | Mogensen (1993) |
| | Aroma oluşturma | Çeşitli suşlar | Marshall (1987) Demeyer ve ark. (2000) |
| | Tatlılığı arttırma | | |
| | -Homoalanin-fermente edilebilen starterler -Galaktoz (+)/glukoz (-) starterler | <i>Lc. lactis</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> | Hols ve ark. (1999) |
| | Malolaktik fermantasyon | <i>Oenococcus oeni</i> | Lonvaud-Funel (1999) |
| Teknolojik | Bakteriyofaj dirençliliği | Çeşitli suşlar | Fordeve Fitzgerald(1999) |
| | Yoğurtta hızlı asidifikasyonu gerçekleştirme | Laktoz negatif <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> | Mollet (1996) |
| | Starterlerin autolizisi | | |
| | - Faj kaynaklı - Bakteriyosin kaynaklı | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> <i>Lc. lactis</i> | Crow ve ark. (1996) Morgan ve ark. (1997) |
| | | | |
| Besinsel | Besin öğeleri oluşturma | | |
| | - Düşük kalorili şekerler (sorbitol, mannitol) -Oligosakkarit üretimi - B grubu vitaminlerin üretimi (folik asit) -Biyoaktif peptitlerin oluşumu | <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> <i>Lc. lactis</i> <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Strep. thermophilus</i> Çeşitli suşlar | Wisselink ve ark. (2002) Ruas-Madiedo ve ark.(2002) Hugenholtz ve Kleerebezem (1999) Wouters ve ark. (2002) |
| | Toksik ve antibesinsel bileşiklerin yıkımlanması | | |
| | -L(+)-laktik asit izomerleri üretmek -Galaktoz ve laktozun yıkımı -Soyada rafinozun parçalanması - Fitik asitin, amilaz inhibitörlerinin ve polifenolik bileşiklerin yıkımlanması | L(+)-laktik asit üreten suşlar <i>Strep. thermophilus</i> Çeşitli suşlar <i>Lb. plantarum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Wouters ve ark. (2002) Holzapfel (2002) Wouters ve ark. (2002) Scalabrini ve ark. (1998) Sharma ve Kapoor (1996) |
| | -Biyojenik amin üretimini azaltmak | <i>Enterococcus faecalis</i> | Joosten ve ark. (1995) |
| | | | |

1.1.1. Starter Kültürlerin Fonksiyonları

1.1.1.1. Laktik Asit Üretimi: Laktik asit bakterilerinin en önemli özelliği ürettikleri laktaz (beta-galaktosidaz) enzimi ile laktozu parçalayıp laktik asit oluşturmalarıdır. Bu kültürler laktozu farklı mekanizmalarla fermente ederler ve buna göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki gruba ayrılırlar. Karbonhidrat metabolizmalarında glikolizis'de EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) yolunu kullanan kültürler, homolaktik fermantasyon sonucu son ürün olarak 1 mol heksozdan 2 mol laktik asit üretirler. Heterofermantatif kültürler ise 6-fosfoglukonat yolunu kullanarak heterolaktik fermantasyon sonucu, 1 mol laktik asit, 1 mol CO₂, 1 mol etanol, (ya da asetik asit) yanında formik asit, diasetil ve asetaldehit oluşturur (77, 91). Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat metabolizması sonucu oluşan laktik asitin etkisiyle pH değeri düşer ve bu düşüş Gram negatif ve Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde geniş spektrumlu bir antimikrobiyel etki gösterir (93). Organik asitlerin antimikrobiyel etkisi ortamın pH'sına ve pKa değerine bağlıdır. Laktik asit (pKa= 3,86) asetik asite (pKa= 4,75) göre çok daha güçlü bir antimikrobiyel etkiye sahip olmasına karşın, iyi tamponlanmış gıdalarda asetik asit disosiyasyon formu ile çok daha etkili olabilmektedir (2).

1.1.1.2. Etil Alkol Üretimi: Kıymız, kefir ve diğer alkollü fermente ürünlerde etil alkol, saf kültürlerde bulunan *Saccharomyces kefir*, *Kluyveromyces lactis* gibi mayalar ve heterofermantatif laktik asit bakterileri tarafından laktozdan üretilir (99).

1.1.1.3. Proteoliz: Starter kültürlerin teknolojik yönden bir diğer işlevi de proteolizdir. Starterler metabolik faaliyetleri sırasında gereksinim duydukları serbest amino asit ve peptitleri özümleyebilmeleri için salgıladıkları proteaz enzimi ile proteinleri parçalarlar. Proteoliz, starterlerin hem asit oluşturma işlevi, hem de ürünün duyuşsal özellikleri açısından önemlidir. Proteoliz peynirlerin olgunlaşmasında oluşan en önemli değişikliktir. Bu olay, peynirlerin karakteristik yapı, tat, koku ve aromasını oluşturur (164, 175). Laktik asit bakterileri zayıf proteolitik özellikte olmalarına rağmen sahip oldukları proteinaz ve peptidaz enzimleri, peynir yapımında peptitleri parçalayarak küçük peptitlerin ve amino

asitlerin şekillenmesini sağlar. Laktik asit bakterilerinin sahip olduğu proteolitik sistem kazeini tamamen hidroliz ederek serbest amino asitlere parçalar. Bu proteolitik sistem sayesinde laktik asit bakterilerinin üremesi ve gelişmesi için ihtiyaç duydukları serbest amino asitlerin ve küçük peptitlerin oluşması sağlanır (51).

1.1.1.4. Lipoliz: Starterlerin hücre yüzeyine lokalize olan lipaz enziminin etkinliği ile süt yağı hidrolize olarak yağ asiti ve gliserine ayrışır. Yağ asitleri de keton, ester ve aldehitlere parçalanır. Oluşan bu parçalanma ürünleri de peynir aromasına katkı sağlar. Laktik asit bakterilerinin lipolitik aktiviteleri tür ve cinslere göre farklılık gösterir. Starter bakteriler süt yağını oldukça yavaş hidroliz ederler (164).

1.1.1.5. Tat ve Aroma Oluşumu: Starter kültürler metabolik faaliyetleri sonucu, yoğurt, peynir, tereyağı gibi fermente gıdaların kalitesinde çok etkili olan asetaldehit, diasetil gibi aroma maddeleri oluşturur. Bu reaksiyonlarda bakterilerin sentezledikleri enzimler anahtar rol oynar. Peynirde proteoliz sonucu oluşan peptitler, amino asitler ve bunların parçalanma ürünleri, tat ve kokunun oluşmasında en büyük etkenlerdir. Tat ve aroma üzerinde etkili olan diğer bileşikler ise lipit kaynaklı ketonlar, laktonlar, aldehitler ve serbest yağ asitleri; laktoz ve sitrat kaynaklı laktik asit, asetik asit, diasetil, asetaldehit, etanol ve propiyonik asittir (164). Laktik asit bakterileri ürüne özgü seçilerek istenen tat ve aroma bileşiklerinin üretilmesi sağlanabilir. Fermente süt ürünlerinde tipik aroma maddeleri karışık kültürlerin kullanılması durumunda oluşan karbonil bileşiklerce sağlanır. Tablo 2’de laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan aroma bileşikleri verilmiştir (155).

Tablo 2. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Aroma Bileşikleri (155).

| Mikroorganizma | Asetaldehit (ppm) | Aseton (ppm) | Asetoin (ppm) | Diasetil (ppm) |
|--|------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Strep. Thermophilus</i> | 1,0–8,3 | 0,3–5,2 | 1,5–7,0 | 0,1–13,0 |
| <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> | 1,4–12,2 | 0,3–3,2 | 2,0 | 0,5–13,0 |
| Karışık kültürler | 2,0–41,0 | 1,3–4,0 | 2,2–5,7 | 0,4–0,9 |

1.1.1.6. Patojen ve Diğer Zararlı Bakterilerin İnhibisyonu: Fermente gıdaların üretiminde kullanılan starter kültürler, ürün yapımı esnasında veya sonrasında kontamine olan patojen ve istenmeyen zararlı mikroorganizmaların inhibisyonunda önemli görevler üstlenmiştir. İnhibisyonda en önemli etki laktik asit bakterilerince laktozun parçalanması sonucu üretilen laktik asit ve diğer organik asitler ile düşük pH değerlerinden, hidrojen peroksitten, diasetilden ve bakteriyosin olarak isimlendirilen protein yapısındaki antimikrobiyel etkili maddelerden kaynaklanır (117). Son zamanlarda oldukça güncel bir konu olan aflatoksinlerin detoksifikasyonu hakkında oldukça fazla sayıda çalışma olmasına rağmen biyolojik detoksifikasyon hakkında sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. Laktik asit bakterilerinin *Aspergillus*'ların üremesi ve aflatoksin üretimindeki etkileri hakkında da farklı görüşler mevcuttur. Bunlar arasında laktik asit bakterileri ile küfler arasındaki rekabet, bakteriyel metabolitler, pH değerleri ya da hepsinin kombine etkisiyle meydana gelmektedir (110). Öztürk ve Güven (127), farklı dozlarda aflatoksin M1 (AFM1) ile kontamine edilen sütlerden yapılan yoğurt ve kefirde muhafaza süresince AFM1 yıkımını araştırmışlardır. Hem yoğurt hem de kefir içerisinde AFM1 detoksifikasyonunun inkübasyon periyodu boyunca gerçekleştiğini, muhafaza sürecinde ise devam etmediğini ve bir miktar geri salınım olduğu belirtilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin bilinen inhibisyon etkileri gıda güvenilirliği açısından kesin bir sonuç vermemektedir. Yıllardır mikrobiyolojik yönden güvenilir olarak kabul edilen fermente gıdalar üzerine yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir. Fermente süt ürünlerinin barsak florası, giderek barsak sağlığı ve dolayısıyla genel sağlık üzerindeki olumlu etkileri bilinmektedir. Ancak bu ürünlerin de patojen mikroorganizmalar ile kontamine olabilecekleri, soğuk muhafaza sürecinde bu patojenlerin canlı kalabileceği ve sonuçta tüketici sağlığını bozabilecekleri artık kesinlik kazanmıştır. Gülmez ve Güven (61), yoğurt, ayran, kefir ve yoğurt-kefir kombine mayalı süt ürünlerinde önemli gıda patojenlerinin davranışlarını inceledikleri çalışmalarında, probiyotik bir ürün olarak kabul edilen kefirde patojenlerin fermantasyon sürecinde, yoğurda nazaran daha çok ürediklerini ve soğuk muhafaza boyunca canlı kaldıklarını, buna karşın yoğurt ve kefir kombine kültürüyle fermente edilen süt örneklerinde tam olmamakla birlikte ürün

güvenilirliğinin çok daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada pastörizasyon işleminin laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkili bileşiklerinin etkilerini yok etmediğini de vurgulamışlardır. Özellikle sindirim sistemi enfeksiyonlarından korunmada güvenilir ve yüksek biyolojik değere sahip gıda tüketimi ve bu gıdaların probiyotik ve anti patojenik niteliklerinin geliştirilmesi halk sağlığı açısından son derece önemlidir.

1.1.1.7. Ekzopolisakkarit Üretimi: Çoğu laktik asit bakterisi ekzopolisakkarit üretme yeteneğine sahiptir. Bu madde ip gibi sünen yapışkan bir özelliكتedir. Son 10 yıl boyunca süt endüstrisinde laktik asit bakterilerinin bu yapışkan formu çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Özellikle viskozitesi yüksek fermente süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin bu özelliklerinden faydalanılır. Finlandiya geleneksel içeceği olan Villi'de olması tercih edilen bir özelliktir. Bu üründe mezofilik ekzopolisakkarit üreten *Lactococcus*'lar, aroma üreten diğer *Lactococcus*'lar ve *Leuconostoc*'lardan faydalanılır. 1980'lerin sonlarında yoğurtların reolojik kalitesini arttırmak ve daha viskoz bir ürün elde etmek amacıyla ekzopolisakkarit üreten termofilik starterler yoğurt üretiminde çok sık kullanılmaya başlanmıştır (110).

Hücre dışı polisakkarit olarak adlandırılan ekzopolisakkaritler değişik derecelerde olmak üzere birçok laktik asit bakterisi tarafından üretilir. Bunlardan birincisi *Leuconostoc mesenteroides* ve *Strep. mutants* tarafından oluşturulan ve glukozun homopolimeri olan dekarboksilandır. İkinci grup *Strep. salivarius* tarafından üretilen ve fruktozun homopolimeri olan levanlardır. Üçüncü grupta ise termofil ve mezofil laktik asit bakterilerinin oluşturduğu (oldukça önemli olan) heterojen polisakkaritten meydana gelen ve birçok yapıtaşını da bünyesinde bulunduran heteropolisakkaritler yer alır (93).

1.1.1.8. Bakteriyofajlara Direnç: Bakteriyofajlar bakterileri infekte eden virüsler olarak adlandırılabilir. Bakteri hücrelerini infekte ettikten sonra üremek için hücre enzimlerini kullanırlar. Böylece bakteri hücresi lizise uğrar ve bakterinin üremesi durur. Süt endüstrisinde en büyük problemlerin başında bakteriyofaj kontaminasyonu yer almaktadır. Üretimde başarısız bir fermantasyona neden olan bu

olay büyük ekonomik kayıplar yaratır. Bu durumda düşük miktarda laktik asit üretimi, proteolizin yavaşlaması nedeniyle aroma bileşiklerinin oluşumunda problemler görülür. Böylece, ya yavaş fermantasyon gerçekleşir ya da fermantasyon tamamen durur (89).

Laktik asit bakterilerinde fajın kontaminasyon aşamalarına bağlı olarak direnç mekanizması gelişir. Bu direnç mekanizması plazmidlerle kodlanmıştır. Bir hücreden diğerine bu kodlar transfer edilebilir. Tanımlanmış 4 farklı direnç mekanizması bulunmaktadır. Bunlardan ilki faj adsorpsiyonunun inhibisyonudur. Bakteri hücre duvarını reseptör olarak kullanan fajın, hücre duvarına adsorpsiyonunu engellemek için bakteri hücre duvarı mutasyona uğrar ve faj başarısız olur. İkinci mekanizma ise sınırlama ve modifikasyondur. Bu sistem, spesifik endonükleotik aktiviteye sahip restriksiyon enzimleri ile genellikle spesifik DNA metilasyon aktivitesi gösteren modifikasyon enzimlerini kombine eder. Modifiye olmamış faj kromozomu sitoplazmaya girer girmez restriksiyon enzimleri tarafından yıkılır. Üçüncü mekanizma ise abortif infeksiyondur. Bu durumda infeksiyonun tüm fazları gerçekleşir. Fakat patlamanın boyutu son derece düşüktür. Böylece saldırıya uğramış her bir hücre ortama son derece az sayıda faj salıverir. Peynir yapımı boyunca asidifikasyon ve starterin üreme oranında çok az değişiklik gözlenebileceği gibi, hiçbir değişiklik de olmayabilir. Lizojenik immunité ise dördüncü mekanizmayı oluşturur. Bu mekanizmada laktik asit bakterilerinde lizojenik immunité, lizojenik faj DNA'sının bakteri DNA'sına yerleşmesi durumunda gerçekleşir. Profajlar muhtemelen ilgili diğer fajların gelişimini önleyen molekülleri kodlayarak suşu dirençli hale getirir (110).

1.1.1.9. Biyojen Amin Oluşturma: Süt ürünleri ve fermente et ürünlerinin olgunlaşması esnasında tiramin, histamin, triptamin, kadaverin, putresin ve spermidin gibi biyojenik aminler proteoliz sonucu oluşan amino asitlerin mikrobiyel dekarboksilasyonu sonucu şekillenmektedir. Amino dekarboksilaz enzimine sahip olan mikroorganizmalara laktik asit bakterileri, Enterococcus'lar, Pseudomonas'lar örnek verilebilir. Özellikle fermente gıdalarda starter kültürlerin amino dekarboksilaz aktivitesinin yanında, pH değeri de biyojenik amin oluşumunda anahtar faktörlerin başında gelmektedir. Laktik asit bakterilerinin varlığına bağlı olarak tiramin ve

putresin sucuk üretiminde en çok oluşan biyojenik aminlerdir. Biyojenik aminler toksik etkilerinden dolayı istenmeyen maddelerdir. Sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve kan basıncı problemlerine neden olurlar. Bu nedenle fermantasyonda kullanılacak starterlerin aminoasit dekarboksilaz enzimine sahip olmaması istenir (98, 146).

1.1.2. Süt Ürünlerinde Kullanılan Starter Kültürler

Süt ürünlerinin yapımında genel prensip, sütün bileşiminde bulunan temel besin maddelerinin, başta laktoz olmak üzere protein ve yağın belirli düzeylerde parçalanmasına dayanır. Bunun için en önemli görev onların yapımlarında kullanılan laktik asit bakterilerine düşer. Gerçekte bu bakterilerden istenen de ürünler bazında belirli oranda laktik asit ile tat ve aroma maddeleri oluşturmak, belli düzeyde proteoliz meydana getirmek, antibakteriyel etkinlik göstererek istenmeyen bakterilerin faaliyetini sınırlamaktır (93).

Üretilecek gıdanın fiziksel karakteristikleri ve istenen aromasına göre farklı starterler seçilebilmektedir. Bu starterler farklı kombinasyonlar ile kullanılabilir. Tek bir tür ya da tek bir türün farklı suşları, aynı cins veya farklı cinsin kombine edilmiş türleri kullanılabilir. Süt ürünlerinde kullanılacak laktik asit bakterilerinin seçiminde üründe istenen özellikler çok önemlidir. Örneğin yoğurt üretiminde hızlı asit üreten termofilik kültür tercih edilir. Tereyağında ise yavaş asit üretimi esastır. Kefirde ise düşük ısılarda CO₂ üretebilen heterofermantatif kültürler seçilebilir (108). Süt ürünlerinde laktik asit bakterileri, maya ve küflere ilaveten laktik asit bakterisi olmayan *Propionibacterium*'lar ya da *Brevibacterium* türleri de kullanılabilir (147).

Tablo 3'de süt ürünlerinin üretiminde en çok kullanılan bazı laktik asit bakterileri verilmiştir (147).

Tablo 3. Süt Ürünlerinin Üretiminde En Çok Kullanılan Bazı Laktik Asit Bakterileri (147).

| Homofermantatif Koklar | Heterofermantatif Koklar |
|--|--|
| <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> <i>Lc. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis</i> <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> <i>Strep. thermophilus</i> | <i>Leuc. lactis</i> <i>Leuc. mesenteroides ssp. cremoris</i> |
| Homofermantatif Çubuklar | Heterofermantatif Çubuk |
| <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> <i>Lb. helveticus</i> | <i>Lb. casei ssp. casei</i> (Fakültatif) <i>Lb. kefir</i> (Obligat anaerob) |

Özellikle *Lc. cremoris*, *Lc. lactis*, *Strep. thermophilus* ve *Lb. acidophilus* asit üretimi için, *Lc. diacetylactis* ve *Lb. bulgaricus* asit ve aroma üretimi için, *Leuc. cremoris* ve *Leuc. dextranicum* aroma üretimi için kullanılır. Bu kültürlerin suşları veya farklı türlerinin kombinasyonu çok farklı derecelerde asit ve aroma eldesi sağlar. Fermente süt ürünlerinde kullanılan kültürler genellikle iki tip bakteri içerir. Bunlardan bir tip *Lc. lactis* veya *Lc. cremoris*, laktozu 21–36°C arasında hızla parçalayarak laktik asit oluştururlar. Saf kültürlerde organizmalar çoğaltıldıklarında oluşan aroma, tereyağı kültürlerinin aromasına benzemez. Daha çok ekşi süt aromasını verir. Kültürlerdeki bakterilerden diğer bir tip ise *Leuc. citrovorum* veya *Leuc. dextranicum*'dur. Her ikisi de sitrik asit veya sitratları uygun pH'da parçalayarak biasetil, asetil metil karbonil, uçucu asitler ve CO₂ oluştururlar. Bu kültürlerle bu özelliklerinden dolayı "Aroma Bakterileri" denir. Bunlar saf kültürler halinde sütte çoğaltıldıklarında az miktarda asit oluşturup aroma oluşturamazlar. Aroma oluşumu, laktik asit üreten kültürlerle birlikte aroma oluşturanlar kombine edildiğinde gerçekleşir (100). Tablo 4'de bazı fermente süt ürünlerinde kullanılan laktik asit bakterileri verilmiştir (103).

Tablo 4. Bazı Fermente Süt Ürünlerinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri (103).

| Ürün Adı | Kültür |
|---------------------------------|---|
| Gözenekli sert peynirler | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> , <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> |
| Küçük gözenekli peynirler | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> , <i>Lc. lactis ssp. lactis var. diacetylactis</i> , <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides ssp. cremoris</i> |
| İsveç ve İtalyan tipi peynirler | <i>Lc. delbrueckii ssp. lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lc. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>Strep. thermophilus</i> |
| Tereyağı | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> , <i>Lc. lactis ssp. lactis var. diacetylactis</i> , <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides ssp. cremoris</i> |
| Yoğurt | <i>Lc. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>Strep. thermophilus</i> |
| Fermente süt içecekleri | <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> |
| Kefir | <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i> |

Birçok ülkede değişik özelliklerde yüzlerce çeşit peynir üretilmesi, üretiminde değişik sütlerin kullanılmasından, üretim teknolojilerinin ve olgunlaştırma şartlarının çeşitli olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, peynire çeşitli yollardan buluşan veya bilinçli olarak katılan mikroorganizmaların da oldukça önemi vardır (18, 164).

Süt ve süt ürünlerinde tanımlanan 6 büyük şeker fermantasyonu mevcuttur (99);

1. Laktik Asit Fermantasyonu: Tüm fermente süt ürünlerinde laktik asit oluşumu çok önemlidir. Özellikle homofermantatif laktik asit bakterileri laktozdan büyük oranda laktik asit üretir.

2. Propiyonik Asit Fermantasyonu: Emmental, Swiss, Gravyer ve sert peynirlerde propiyonik asit fermantasyonu tipik peynir aroması ve düzgün şekilli el ayası büyüklüğünde gözenek oluşumunda önemli rol oynar. Bu fermantasyonda starter kültür olarak *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* kullanılır. Bu kültür öncelikle laktozdan laktik asit, daha sonra propiyonik asit, asetik asit ve CO₂ oluşturur.

3. Sitrik Asit Fermantasyonu: Bu fermantasyon, bazı peynirlerde hafif aromatik bileşiklerin oluşmasından sorumludur.

4. *Alkol Fermantasyonu*: Kefir ve kımız gibi alkollü süt ürünlerinin üretiminde gerekli olan fermantasyondur. Laktik asit bakterileri ile mayalar arasında gerçekleşir. Reaksiyon sonucu etil alkol ve CO₂ oluşur.

5. *Bütirik Asit Fermantasyonu*: Laktozun parçalanmasıyla oluşan laktik asit, Clostridium cinsi bakteriler tarafından bütirik asit, CO₂ ve H₂'e parçalanır. Anaerobların neden olduğu bu şişme, 2–3 hafta içerisinde oluşur. Geç şişme denilen bu durumda, şişme ile birlikte keskin bir lezzet ve kokuşma gözlenir.

6. *Koliform Fermantasyonu*: Koliform grubu bakterilerin neden olduğu bu reaksiyonda, özellikle peynirlerde kısa süre içerisinde oluşan CO₂ ve H₂'den dolayı şişme gözlenir ve erken şişme olarak adlandırılır. Peynir süngerimsi bir görünüm alır.

Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc ve Lactobacillus türlerinden oluşan laktik asit bakterileri, peynir mikroflorasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Olgunlaşma süreci geçiren bütün peynirlerde laktik asit bakterilerinin bir veya birkaç türü mutlaka bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların metabolizmaları sonucu oluşan laktik asit, rennetin pıhtılaştırma süresini kısaltır, pıhtıdan peynir altı suyunun ayrılmasına yardımcı olur, arzu edilmeyen mikroorganizmaların gelişimini önler. Laktik asit bakterileri dışında bazı mikroorganizmalar da peynir çeşitlerine özgü niteliklerin oluşmasında etkili olmaktadır. Limburger, Romadur ve Herve peynirlerinin yüzeyinde kahverengi bir gelişme gösteren *Brevibacterium linens* olgunlaşmaya hizmet eder. Propiyonik asit bakterileri, özellikle *Propionibacterium shermanii*, İsviçre peynirlerinde arzu edilen fındık lezzetinin oluşmasına katkıda bulunur ve bir metabolizma ürünü olan CO₂ ile delik ve gözenekler şekillendirir (18).

Laktik asit bakterileri tarafından ortamdaki laktozun hücre içine alınması ve hidrolizi bakteri gruplarına göre farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Lactococcus türlerinde laktoz, fosfotransferaz sistemiyle laktoz-fosfat şeklinde hücre içine alınmakta ve daha sonra fosfo-β-galaktozidaz enzimiyle hidrolize edilmektedir. Termofilik Lactobacillus'lar, *Strep. thermophilus* ve Leuconostoc türlerinde laktoz, laktozpermeaz ile doğrudan hücre içine alınmakta ve laktozun hidrolizi daha sonra β-galaktozidaz enzimiyle gerçekleşmektedir. Mezofilik Lactobacillus'larda ise her iki enzim sisteminin de bulunduğu ve genel olarak *Lb. casei*'de fosfo-β-galaktozidaz, *Lb. plantarum*'da ise β-galaktozidaz enziminin hakim olduğu bildirilmektedir (50).

Homofermantatif Streptococcus'lar ve Lactobacillus'lar laktozu; glukoz ve galaktoza parçalar. Glukoz sonra pruvata, daha sonra az miktarda asetik asit ve CO₂ ile birlikte laktik asite dönüşür. Sitrik asit fermantasyonu starterleri, *Strep. diacetylactis*, *Leuc. cremoris* ve *Leuc. dextranicum* sitrik asiti pruvata, daha sonra asetoine, diasetile ve CO₂'e dönüştürür. Diasetil, aktif aldehit ve asetil CO-A'nın reaksiyonlarıyla oluşur. Aynı şartlar altında asetoin ve diasetil, tatsız ve kokusuz 2,3-butanediol'e indirgenebilir. Diasetilin ekşi krema ve tereyağında karakteristik tereyağı aroması ve lezzeti verdiği bildirilmiştir (82).

Genellikle termofilik suşlar, üretimde yüksek ısı gerektiren İsveç ve İtalyan tipi peynirlerde kullanılır. Bazı üretim tekniklerinde tekstür ve aromayı etkilemek için ikincil mikroflora ilave edilir. Örneğin diasetil üretimi ya da İsveç peynirinde CO₂ üretimi için Propionibacterium ilavesi gibi. Laktik asit bakterilerinin dışında maya, küf ve diğer bakteriler de örneğin *Penicillium roqueforti*, mavi peynir yapımında ikincil flora olarak kullanılmaktadır (23).

Streptococcus cinsi bakteriler süt mamullerinde tekstürün oluşmasında ve doğrudan veya dolaylı olarak aroma maddeleri meydana getirerek çeşitli süt mamullerinin karakteristik özelliklerinin oluşmasında rol oynar. Bu özellikleri ile fermente süt mamullerinin üretiminde zorunlu bakteriler olarak kabul edilirler (111).

Leuconostoc türlerinin proteolitik aktiviteleri çok zayıftır ve laktozu fermente edemezler. Bu nedenle *Lc. lactis* veya *Lc. cremoris* gibi asit üreten laktik Streptococcus'larla birlikte gelişebilirler. Süt teknolojisi için önem taşıyan Leuconostoc cinsi bakterilerin 5 türü yaygındır. *Leuc. cremoris* (*Leuc. citrovorum*), *Leuc. lactis*, *Leuc. dextranicum*, *Leuc. mesenteroides* ve *Leuc. paramesenteroides*. Aroma maddesi üreten bu organizmaların belli başlı iki görevleri vardır. Birincisi, olgunlaştırılmayan peynirlerde ekşi krema, tereyağı ve fermente süt ürünlerinde diasetil ve asetoin gibi aroma bileşikleri meydana getirmektir. İkincisi ise; Edam, Gouda, Tilsit gibi gözenekli peynirlerde CO₂ oluşturarak gözenek oluşumunu sağlamaktır. Her iki fonksiyon da, sitratın metabolizması sonucu meydana gelir. Ancak Leuconostoc'ların bazı türleri aynı zamanda laktozdan da CO₂ üretir. Fakat sitrat ve laktozdan kaynaklanan CO₂, çoğu kez peynirlerde yapısal bozukluklara neden olur ve zararlara yol açar. Bu nedenle Leuconostoc türleri ve *Lc. diacetylactis*

starter kültür olarak kullanıldıklarında süt içerisine değil, pıhtı içerisine ilave edilerek bu zararlı etki önlenir (100).

Fermente gıdaların beslenmede önemli rolleri vardır. Özellikle besin kompozisyonu olarak tüm fermente süt ürünleri iyi bir beslenme için yüksek kaliteli protein, kalsiyum, fosfor, potasyum ve riboflavin içerir. Gıdaların besin değeri sadece içerdiği besin öğelerine bağlı değildir. Aynı zamanda sindirilebilirliğine, hazmedilebilirliğine ve besin olarak faydalanılabilirliğine de bağlıdır. Süt karbonhidratı olan laktoz, kimi insanlarda laktaz enzimi yetersizliği nedeniyle sindirilemeyebilir. Bebekler, çocuklar ve yaşlılar, kemik gelişimi ve oluşumu için kalsiyuma ihtiyaç duyarlar fakat laktoz intoleransı olan insanlarda süt tüketimi sınırlandırıldığı için bu ciddi beslenme sorunları doğurabilir. Laktik asit bakterilerinin fermente süt ürünlerindeki faaliyeti laktozun indirgenmesini ve bu sorunun tam veya kısmi olarak giderilmesini sağlar. Ayrıca laktik asit bakterileri gelişip çoğalabilmeleri için mutlaka B grubu vitaminlere ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle laktik asit bakterileri fermantasyon boyunca ortamda bu vitaminleri sentezleyerek gıdayı vitamince zenginleştirmektedirler (82).

1.1.3. Et Ürünlerinde Kullanılan Starter Kültürler

Fermente et ürünlerinin hazırlanmasında mikroorganizmaların kullanılması hususunda 1919 yılından beri öneriler ve patent çalışmaları olmasına karşın, ilk defa starter kültürler, 1960'lı yılların başlangıcında piyasaya sürülmüştür. Bugün teknolojiye gelişmiş ülkelerin çoğunda fermente, kuru, yarı-kuru sosis ve salamların üretiminde starter kültürlerden yararlanılmaktadır (58).

Fermente et ürünlerinde basit tanımıyla fermantasyon, laktik asit bakterilerinin metabolizması ve aktif üremeleri ile pH'nın hızla düşmesi durumudur. Bu aşamada gıdada bazı diğer değişiklikler olsa da en önemlisi pH'nın düşmesidir. Yarı kuru sucuklarda laktik asit bakterilerinin üremesi kurutma ve tütsüleme boyunca sürer. Kuru sucuklarda ise fermantasyon boyunca mikroorganizmalar canlılıklarını sürdüremese de, aktif halde kalan mikrobiyel enzimler fermantasyonun devamını sağlar. Peynir, fermente süt, lahana turşusu gibi diğer fermente gıdaların üretiminde olduğu gibi laktik asit bakterileri sucuk üretiminde de anahtar rol oynar.

Pediococcus'lar, homofermantatif laktik asit bakterileri ve en az onlar kadar da Lactococcus'lar önemlileridir. Heterofermantatif laktik asit bakterileri, istenmeyen aroma ve gaz üretimi nedeniyle arzulanmazlar. Çoğu Leuconostoc türü sünmeye neden olur. Pratikte heterofermantatif laktik asit bakterilerinin çoğu türü fermente sucukta bulunsa da genellikle sayıca çok düşük orandadır (168).

Modern et endüstrisi, yüksek ve standart kalite ile arzulan organoleptik özellikleri en iyi şekilde sağlamak zorundadır. Fakat bu özelliklerin doğal fermantasyon ile gerçekleştirilmesi mümkün değildir. Bu nedenle kullanılacak nitrat ve nitrit seviyesini mümkün olan en düşük düzeye indirmek, fermantasyon süresini kısaltmak ve ürünün organoleptik özelliklerini düzenlemek amacıyla starter kültür kullanımı yaygınlaşmıştır. Bakterilerin öneminin anlaşılmasıyla birlikte ticari starter kültür üretimi artmıştır. Bu kültürlerin başında laktik asit bakterileri gelmekle birlikte Staphylococcus'lar ve Micrococcus'lar et starterleri olarak kullanılmaktadır (79).

Et ürünlerinin başarılı bir şekilde korunması için esas faktörler: pH 4,5'e düşmesi önemli miktarlarda disosiye organik asit üretimi, substratın tamponlama kapasitesi, H₂O₂, besinler için diğer mikroorganizmalarla rekabet, antibiyotik ve bakteriyosin üretimi ile redoks potansiyelinin azalmasıdır (83).

Fermantasyon için seçilen starter kültürlerin fizyolojik özellikleri büyük önem taşır. İyi bir fermantasyon için üretim yöntemi gereği sucuk hamuruna karbonhidrat ilavesi yapılır. Bu karbonhidratları laktik asit bakterileri şeker kaynağı olarak kullanarak üremeleri için gerekli olan maddeleri sentezlerler. Bu reaksiyon içerisinde fermantasyonu başlatacak ve üretim tekniğinde büyük önem taşıyan düşük pH değeri elde edilir. pH değerindeki düşüşü takiben, et proteinleri koagüle olur, bu şekilde sucukta istenen tekstürel değişimler ve asit tat meydana gelir. Sucukta hijyenik stabilite artar. Küring ajanı olarak kullanılan nitritin indirgenmesi hızlanır. Oluşan nitrojenmonoksit, myoglobin ile reaksiyona girerek nitrozomyogloin oluşturur ve bu şekilde arzulan renk oluşumu hızlanır. Daha aromatik ve daha yüksek kalitede duyuşal özelliklere sahip fermente sucuk üretimi için kullanılacak starterlerin temelini laktik asit bakterileri oluşturur. Micrococcus ve mayalarında ilavesiyle bu özellikler daha da verimli hale getirilebilmektedir. Laktik asit bakterilerinin enzimatik özellikleri fermantasyon boyunca etkili olsa da laktik asit

bakterisi olmayan starterlerin nitrat ve nitrit redüktaz aktiviteleri, katalaz ve lipaz aktiviteleri fermantasyon için vazgeçilmezdir ve göz ardı edilemez (66).

Fermente sucuklarda patojenlerin gelişimini engellemek ve renk oluşumu amacıyla kullanılan nitrat ve nitritin zararları bilinmektedir. Bu nedenle yapılan birçok araştırma, bu kimyasalların miktarlarını mümkün olduğunca azaltabilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesine yöneliktir. Kaya ve Gökalp (92), fermente sucuklarda *L. monocytogenes*'in kontrolü açısından mutlaka starter kültür kullanımı gerektiğini, kullanılmadığı durumlarda ise 200 ppm nitrit seviyesinin bile patojenlerin gelişmesini engelleyemediğini belirtmişlerdir. Aksu ve Kaya (4), pastırma üretiminde starter kültürün son ürün üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kültürlerin pastırmanın kimyasal bileşimi ve bazı kalitatif kriterleri üzerinde genelde önemli etkileri olmadığını; fakat karışık kültür içeren pastırmalarda pH değerinin daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bu kültürler arasında pastırma için en uygun kültürün *Staphylococcus xylosus* ve *Lb. sake* kültürleri olduğunu ve bu kültür karışımının pastırmada en düşük nitrat ve nitrit kalıntısını sağladığını vurgulamışlardır.

Fermente, kuru, yarı kuru sosis ve sucuk üretiminde starter olarak hamura ilave edilen laktik asit bakterilerinin tümü homofermantatiftir. Starter kültür olarak kullanılan suşların farklı optimum üreme sıcaklığına sahip olmaları teknolojik açıdan önemlidir. *Pediococcus acidilactici* 40°C'nin üzerindeki ısı derecelerinde en hızlı şekilde fermantasyonu gerçekleştirirken, *Lb. plantarum*'un optimum sıcaklık derecesi 30-35°C'dir. *Lb. sake* ve *Lb. curvatus* daha düşük derecelere kolayca adapte olabilmektedir. Tablo 5'de sucuk ve benzeri ürünlerde starter kültür olarak kullanılan önemli mikroorganizmalar verilmiştir (58).

Tablo 5. Fermente Et Ürünlerinde Starter Kültür Olarak Kullanılan Önemli Mikroorganizmalar (58).

| Lactobacillus | Pediococcus | Staphylococcus | Micrococcus | Maya-Küf |
|---|------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------------|
| <i>Lb. plantarum</i> | <i>P. acidilactici</i> | <i>S. xylosus</i> | <i>Micrococcus</i> | <i>Debaryomyces</i> |
| <i>Lb. sake</i> | <i>P. pentosaceus</i> | <i>S. carnosus</i> | <i>varians</i> | <i>hansenii</i> |
| <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. pentosus</i> | | | | <i>Penicillium nalgiovense</i> |

Sucuk üretiminde laktik asit bakterileri olgunlaşma aşaması için vazgeçilmezdir. Doğal fermantasyonlarda *Lb. curvatus* ve *Lb. sake* dominant laktik asit bakteri florasını oluştururlar. Olgunlaşma süresi boyunca tüm süreç içerisinde kullanılan starterlerin baskın flora olması gerekmektedir. Teknolojik faktörlere ve çiğ materyalin kalitesine bağlı olarak fermantasyon süresince laktik asit bakterilerinin rekabet etme yeteneği geçici olarak baskılanabilir. Laktik asit bakterilerinin fizyolojik özelliklerinin, geleneksel yöntemlerle üretilen fermente sucukların duyu kalitesini sağlayabilecek kapasitede olduğundan emin olunamaz. Fakat starter kültür ile üretilen sucuklarda laktik asit bakterilerinin kullanımında bu kültürlerin nitrat – nitrit redüktaz aktiviteleri, katalaz, lipaz ve proteaz aktiviteleri sucuğa duyu kalite karakterleri kazandırmak için yeterlidir (66).

Starter kültürler ile fermantasyonda starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri ortama çok daha erken hakim olup fermantasyonu başlatsa da, esasında bu fermantasyon başarılı bir doğal fermantasyon ile aynı seyrederek. *Lactobacillus*'ların çoğu doğal fermantasyonda önemlidir. Fakat bunlar etin baskın florası tarafından baskılandığından yetersiz fermantasyona neden olurlar. Sucuk fermantasyonu için kullanılan starter teknolojisi üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Üründe istenen niteliklerin sağlanması amacıyla yeni teknolojilerin geliştirilmesi ya da genetik modifikasyonun kullanılması ilgi uyandırmıştır. Starter kültür olarak kullanılan *Micrococcus* ve *Staphylococcus* türleri öncelikle nitratı nitrite indirgeyerek renk oluşumunda etkili olurlar, fakat az oranda asit üretimi vardır. Fermantatif *Micrococcus*'lar dahil, birçok *Micrococcus* izolatu starter olarak kullanılır. *Micrococcus varians* şimdilerde en yaygın olanıdır. *S. xylosus* bir starter kültür olarak da kullanılmasına karşın, son yıllarda *Staphylococcus carnosus*, nitrat redüksiyonunun önemsiz olduğu nitrit ile yapılan sucuklarda renk ve aroma üzerine olumlu etkide bulunur (168).

Son on yılda gıdalarda saprofit ve patojen mikroorganizmaların öldürülmesi için laktik asit bakterilerinin kullanılmasına yönelik geniş araştırmalar yapılmaktadır. Optimum laktik asit fermantasyonu için fermente edilebilir uygun karbonhidrat ilavesi ve istenen laktik asit üretimi için starterlerin hızla çoğalması gerekmektedir. Bunlara ilaveten et üretiminde laktik asit bakterilerinin koruyucu etkilerinin farklı faktörlere bağlı olduğu bilinir (83).

1.1.4. Probiyotik Starter Kùltürler

Probiyotik: Probiyotikler, genellikle konak tarafından sindirildiklerinde sağlık üzerine yararlı etkiler gösteren canlı mikroorganizmalar (bakteriler ve mayalar) olarak tanımlanırlar. Özellikle fermente süt ürünleri başta olmak üzere çoğu gıdada kullanılırlar. Ancak bunun yanı sıra tablet şeklinde de kullanımları söz konusudur. Yeni izole edilen veya modifiye edilen mikroorganizmaların güvenilirlikleri ve risk/yarar oranları iyi belirlenmelidir. Gıdalarda laktik asit bakterilerinin kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir. Lactococcus ve Lactobacillus cinslerinin üyeleri çoğunlukla ve genel olarak güvenli kabul edilir (GRAS) statüde değerlendirilir. Buna karşın Streptococcus, Enterococcus ve laktik asit bakterilerinin diğer cinsleri fırsatçı patojenler içerir. Laktik asit bakterileri çoğu antibiyotiklere karşı dirençlidir. Bununla birlikte dirençlilik çoğu olgularda aktarılabılır nitelikte değildir ve fırsatçı infeksiyonlarla ilgili, laktik asit bakterileri de dahil olmak üzere türlerin büyük bir kısmı klinik olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğunluğuna duyarlıdır (140).

Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal sistemdeki olumlu etkilerini muhtemelen iki farklı mekanizmaya bağlamak mümkündür. Birincisi, laktik asit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyel etkili bileşikler oluşturmalarıdır. İkinci etken ise bağırsak mukozasında patojenlerin tutunamayacağı bariyerler oluşturmalarıdır (45).

Tablo 6'da probiyotik kùltürlerin taşıması gereken özellikler verilmiştir (121).

Tablo 6. Probiyotik Kùltürlerin Taşıması Gereken Özellikler (121).

| Kriter | Etkisi |
|---|--|
| Asite tolerans | Duodenum ve mideden geçerken canlı kalabilme |
| Safra tolerans | İnce bağırsaklardan geçerken canlı kalabilme |
| Asit üretimi | Bağırsaklarda asit bariyerleri oluşturabilme |
| Antimikrobiyel etkili bileşikler üretebilme | Patojenlerle rekabet |
| Bağırsak epitelyum hücrelerine tutunabilme | Etkili bir kolonizasyon ve diğer bakterilerin epitelyuma tutunmasını engelleme |
| Isıya tolerans | Gıdaya uygulanan teknolojik işlemlerden en az hasar görme |
| Gıda antimikrobiyelerine tolerans | Gıda üretiminde kullanılan antimikrobiyelerden etkilenmeme |

İntestinal mikroflorada değişikliğe ihtiyaç duymayan, kolonize olan ya da gastrointestinal kanala geçici olarak kolonize olan mikroorganizmalar olarak tanımlanan probiyotikler gastrointestinal sistemde geçiş boyunca ya da lokal bir alanda oluşturdukları etki için kullanılabilir. Bu tanıma göre probiyotikler canlı olarak vücuda alınmalıdır. Herhangi bir pastörizasyon ya da diğer işlemlerle inaktif hale gelmemiş olmalıdır. Özel olarak belirli bir sayı belirtilmemesine rağmen genel olarak vücuda günlük alınan bakteri sayısı en az 10^9 kob olmalıdır. Probiyotiklerin insan sağlığına yararları birçok çalışma ile belirlenmiştir. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar birçok farklı cinsten elde edilebilir. En yaygın kullanılan probiyotik suşların hemen hepsi laktik asit bakterilerinin üyesi olan *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Bifidobacterium*'lardır. Özellikle *Lactobacillus*'ların probiyotik olarak kullanımı çok yaygındır. Tablo 7'de probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar ve sağlık üzerindeki etkileri verilmiştir (126).

Tablo 7. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar ve Sağlık Üzerindeki Etkileri (126).

| Cins | Tür | Sağlığa Yararı | Referans |
|------------------------|--------------------|--|---|
| <i>Lactobacillus</i> | <i>acidophilus</i> | Antibiyotik kullanımına bağlı ishallerde azalma | Black ve ark.1991 |
| | <i>casei</i> | Rotavirüs ishallerinde azalma, Mesane kanserinde yüze yayılmayı azaltma, immun sistemi güçlendirme. | Sugita ve Togawa 1994, Aso ve ark. 1995, Nagao ve ark.2000 |
| | <i>crispatus</i> | | |
| | <i>fermentum</i> | | |
| | <i>johsonii</i> | Ağız aşılarının etkisini artırma, <i>H. pylori</i> 'nin kolonizasyonunu azaltma. | Link-Amsteret ve ark. 1994, Felley ve ark. 2001 |
| | <i>paracasei</i> | | |
| | <i>plantarum</i> | Bağırsak enfeksiyonlarının semptomlarını ve LDL-kolesterol seviyesini azaltma. | Niedzielin ve ark. 2001, Bukowska ve ark.1998 |
| | <i>reuteri</i> | Rotavirüs ishallerinde azalma | Shornikova ve ark.1997 |
| | <i>rhamnosus</i> | Rotavirüs ishallerinde azalma, immun sistemini güçlendirme, bağırsak enfeksiyonlarının semptomlarını azaltma, alerjiyi önlemek ve tedavi etme. | Guandalini ve ark. 2000, Gupta ve ark. 2000, Kalliomakiet ve ark. 2001 Majama ve Isolauri 1997 |
| | <i>salivarius</i> | Bağırsak enfeksiyonlarının semptomlarını azaltma. | Mattila-Sandholm ve ark. 1999 |
| <i>Bifidobacterium</i> | <i>brevis</i> | Bağırsak enfeksiyonlarının semptomlarını azaltma. | Brigidi ve ark. 2001 |
| | <i>longum</i> | | |
| | <i>lactis</i> | Alerji tedavisi, Rotavirüs ishallerinde azalma, seyahat ishallerinin görülme sıklığını azaltma, ağız aşılarının etkisini artırma. | Isolauri ve ark. 2001, Saavedra ve ark. 1994, Black ve ark.1989 Link-Amster ve ark. 1994 |
| <i>Enterococcus</i> | <i>faecium</i> | | |
| <i>Saccharomyces</i> | <i>cerevisiae</i> | Bağırsak iltihaplarının yenilemesini azaltma. | Guslandi ve ark. 2000 |

Prebiyotikler: Prebiyotik terimi “kolon bakterilerinden birinin veya bir kısmının çoğalmasını ve/veya aktivitesini etkileyerek yararlı bir etki oluşturan, sindirilemeyen gıda katkı maddesi” olarak tanımlanmıştır. Fruktooligosakkaritler, inulin, galaktooligosakkaritler, laktuloz, laktitol örnek olarak verilebilir (55).

İnsan bağırsak sistemine yerleşik halde bulunan Bifidobacterium'lar ve Lactobacillus'ların sayılarını arttıracak nitelikte prebiyotikler ve uygun substratların tanımlanması, her ne kadar konuya ilişkin yapılmış yeni çalışmalar bulunsa da oldukça zor bir konudur. Daha önce yapılmış çalışmalar ve deneyimleri temel alarak bu konuda aşağıdaki noktalar göz önüne alınmalıdır (139).

1. Prebiyotik bileşiklerin yavaş emilebilir ya da emilemez nitelikte doğal ya da doğaldan derive edilmiş olmaları istenir.
2. Bifidobacterium'lar ve laktik asit bakterileri çoğunlukla üremelerini teşvik eden fruktooligosakkaritler, laktuloz ve laktitolu yıkımlayabilir.
3. Fekal pH'daki azalma, her substrat için genellikle istenilen bir özelliktir ve bağırsak sağlığını teşvik eder. Aynı zamanda sağlıklı bir mikro-ekoloji dengesi sağlar.
4. Lactobacillus'lar ve Bifidobacterium'ların teşvik edilmesi açısından substratların kombine kullanımı daha çok tercih edilir.
5. Prebiyotik substratların patojenlerin aktiviteleri ve virülansları üzerine etkileri değerlendirilmelidir.
6. Diyetteki prebiyotik komponentler, intestinal mikroflora ve bunun metabolik fonksiyonlarını etkileyen ve “*Kolonik Besinler*” olarak da adlandırılan insan kolon mikroflorasını selektif bir şekilde modifiye etmek üzere kullanılabilir.

Sinbiyotikler: Sinbiyotik; probiyotik ve prebiyotik kombinasyonuna verilen addır. Bifidobacterium'lar + Fruktooligosakkaritler, Lactobacillus'lar + laktitol, Bifidobacterium'lar + galaktooligosakkaritler şeklindeki gruplandırmalar örnek olarak verilebilir (96).

1.1.5 Genetiği Modifiye Edilmiş Laktik Asit Bakterileri

Gen teknolojisindeki gelişme ve ilerlemeler, yeni gen aktarma ya da metabolik fonksiyonları değiştirme gibi yollarla, laktik asit bakterilerinde modifikasyonlara olanak sağlamaktadır. Bu modifikasyonlar, gıda teknolojisinde ilerlemenin yolunu açabilir. Bakteriler, teknolojik uygulamalara daha iyi uyum sağlar ve bu sayede organoleptik özelliklerin daha üstün olmasına veya teropatik moleküller üreten bakterileri kapsayan yeni uygulamaların kullanımına olanak sağlayabilir.

Laktik asit bakterilerinin genetik özelliklerine olan ilginin dikkat çekici bir şekilde artışı, bu bakterilerin metabolizmalarını analiz ve modifiye etmeye yönelik oldukça farklı genetik yöntemlerin geliştirilmesinin yolunu açmıştır. Bu alanda özellikle laktik asit bakterileri için bir paradigma halini alan *Lc. lactis* türleri ile ilgilenilmiştir. Ancak bugün endüstriyel anlamda diğer laktik asit bakterileri de saha kapsamına alınmıştır. Kullanılan sistemler; klonlama, kromozom modifikasyonu ve ekspresyon sistemleri olarak sınıflandırılabilir. Gen dizilimi değiştirilmiş *Lactobacillus*'ların doğal suşlarına göre daha düşük pH değerlerinde gelişmeye ve daha hızlı laktik asit üretmeye adaptasyonu sağlanabilmektedir. Bu gelişmeyle fermantasyonda kullanılacak mikroorganizmaların birçok özelliği değiştirilerek hem ekonomik hem de hızlı fermente gıda üretimi mümkün olabilecektir. Bu konuda çalışan araştırmacılar, gen diziliminin değiştirilmesi prosedürünün endüstriyel mikroorganizmaların tolerans ya da diğer kompleks fenotiplerinin geliştirilmesinde hem hızlı hem de kullanışlı olacağını belirtmişlerdir (133).

Genetik modifikasyon uygulamalarında avantajlar ile birlikte dezavantajlar ve risklerde göz önünde bulundurulmalıdır. Bu konuda temel olarak en azından şu üç konu üzerinde titizlikle durulmalıdır; yeni genlere ait ürün güvenli midir, yeni genler yeni konakta istenmeyen fonksiyonların yolunu açabilir mi, yeni genin transfer edilmesi halinde bir tehlike oluşabilir mi? (133).

1. 2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN SINIFLANDIRILMASI VE İDENTİFİKASYONLARI

Sütte bakteri varlığı ilk olarak 1659 yılında Kircher tarafından belirlenmiştir. Bunun ardından, 1780 yılında Scheele, sütün ekşimesinde temel rol üstlenen laktik asiti tanımlamıştır. Bu keşfi izleyen yıllarda, laktik asit bakterilerinin gıda ile olan etkileşimleri bilim adamlarının ilgisini çeken bir konu olarak güncelliğini korumuş, bu bağlamda 1857 yılında Pasteur tarafından sütün ekşimesinin mikroorganizma üremesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bunu takiben 1867 yılında Martin, peynirin olgunlaşmasının alkolik, bütirik ve laktik fermentasyona benzer olduğunu ileri sürmüştür. Bu gelişmelerin akabinde 1873 yılında Lister tarafından saf bakteri kültürü şeklinde *Bacterium lactis* (*Lactococcus lactis*) izole edilmiştir. 1900'lerin başlarında bilimsel ve teknolojik gelişmelerin öncülüğünde, laktik asit bakterileri kavramı, bir grup mikroorganizma için tanımlanmıştır. Bu doğrultuda 1907 yılında E. Metchnikoff ve arkadaşları tarafından, yoğurt bakterilerinden biri olan *Lactobacillus bulgaricus* izole edilerek isimlendirilmiştir. Araştırma sonuçlarının katkılarıyla gıdalarda beğenilen lezzetin laktik asit bakterilerinin etkileşimi sonucu olduğu ortaya çıkmıştır (88, 150).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de Boone ve Castenholz (17)'un belirttiği sınıflandırmaya göre laktik asit bakterileri; **Firmicutes** şubesinin **Bacilli** sınıfına üyelerdir. Bu sınıfın ikinci takımı **Lactobacillales**'dir. Takımda 6 familya yer almaktadır. *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*. Familya içerisinde en önemli laktik asit bakteri cinsleri *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* ve *Bifidobacterium*'dur (97).

1.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri Gram pozitif, fakültatif anaerobik, sporsuz, çubuk, kok veya kokobasil formda, oksidaz ve katalaz negatif, nitrat redüksiyonu negatif, jelatinaz negatiftir. Üreme ısıları 2-53°C olup genellikle 30–40°C'de optimum

üzerler. *Lactobacillus*'lar en iyi hafif asidik ortamlarda pH 4,5–6,4'de ürerler. %5 CO₂ konsantrasyonu üremelerini stimüle eder. Suşlar genelde zayıf lipolitik ve proteolitikdir. Kompleks besin maddelerinin varlığında üreyebilirler. Enerji kaynağı olarak fermente edilebilir şekerleri kullanırlar. Heksozu esas olarak laktata (homofermantatifler) ya da laktata ilaveten asetat, etanol, CO₂ ve formata (heterofermantatifler) parçalarlar. Nükleotid, amino asit ve vitaminleri sentezleyemedikleri için gelişmek için riboflavin, folik asit, pridoksal fosfat, pürin ve primidin bazıları ile amino asitlere ihtiyaç duyarlar. Tüm laktik asit bakterileri heksozdan laktik asit üretir (91).

1.2.2. Sınıflandırma ve İdentifikasyon

Laktik asit bakterilerinin identifikasyonları için klasik yöntemler ile modern yöntemler kullanılabilir. Son yıllarda laktik asit bakterilerinin identifikasyonu için artık klasik yöntemlerden ziyade modern yöntemler olarak adlandırılan genetiğe dayalı metotlar tercih edilmektedir. Çünkü laktik asit bakterilerinin fizyolojik özellikleri baz alınarak yapılan klasik identifikasyon hem testlerin çokluğu hem de değerlendirme aşamasında düzenli, standartlaşmış bir identifikasyon şeması olmadığından ve var olan şemalarda yeni türlerin olmamasından dolayı büyük zorluklara neden olmaktadır. Klasik identifikasyon tekniklerinde öncelikle laktik asit bakterilerinin ayırımında temel olan Gram reaksiyonu ve katalaz testi yapılmaktadır. Gram pozitif, katalaz negatif olan izolatlar üzerinde özellikle mikroskopik morfolojileri, glukozdan gaz üretimi ve farklı ısılarda üreyebilme yetenekleri ayırımında önemli kriterleri oluşturmaktadır. Tablo 8'de laktik asit bakterilerinin ayırımında kullanılan temel testler verilmiştir (24).

Tablo 8. Laktik Asit Bakterilerinin Ayırımında Kullanılan Bazı Testler (24).

| Cins | Gram Morfolojisi | Laktik asit Formu | Glukozdan Gaz | Riboz Ferm. | Glukonat Ferm. | Arjinin Hidrolizi |
|--------------------------|------------------|-------------------|---------------|-------------|----------------|-------------------|
| Homofermantatif | | | | | | |
| Streptococcus | Kok/zincir | L(+) | - | (-/+) | (D) | (D) |
| Pediococcus | Kok/tetrad | DL, L(+) | - | (D) | - | (D) |
| Lactococcus | Kok/zincir | L (+) | - | - | - | (D) |
| Lactobacillus | Basil/zincir | D(-), L(+), DL | - | (+/-) | (+/-) | - |
| Heterofermantatif | | | | | | |
| Betabacterium | İkili/zincir | DL | + | + | + | - |
| Leuconostoc | İkili/zincir | D(-) | + | (D) | (-/+) | - |

(D), Değişken; (+/-), Çoğu suş pozitif, fakat negatif olan suşlar da olabilir; (-/+), Çoğu suş negatif, fakat pozitif olan suşlar da olabilir.

Orla ve Jensen 1919 yılında, Lactobacillus'ları, glukoz fermantasyonu boyunca şekillenen laktik asitin miktarını temel olarak homofermantatif ve heterofermantatif olarak, biyokimyasal reaksiyonları ve üreme ısılarını esas olarak da (Thermobacteria, Betabacteria ve Streptobacteria) üç grupta sınıflandırmışlardır. Yaygın olarak kullanılmakta olan bu sınıflandırmada üreme ısı, 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 (24, 91). Şekil 1'de laktik asit bakterilerinin identifikasyon şeması verilmiştir (143).

Lactobacillus

Orla ve Jensen 1919 yılında, Lactobacillus'ların sınıflandırılmasında üreme ısılarını ve fermantasyon tiplerini temel olarak bir gruplandırma yapmıştır. Bu sınıflandırmada Lactobacillus'lar 3 gruba ayrılmıştır (91).

Grup I: Obligat Homofermantatif Lactobacillus'lar: EMP yolu ile heksozu fermente eden fakat pentoz veya glukozu fermente etmeyen gruptur. Thermobacterim'lar bu grup üyeleridir.

Grup II: Fakültatif Heterofermantatif Lactobacillus'lar: Heksozu EMP yoluyla fermente ederler ya da bazı türler glukozdan laktik, asetik ve formik asit ile etanol oluştururlar. Streptobacterium'lar bu grup üyeleridir.

Grup III: Obligat Heterofermantatif Lactobacillus'lar: Heksozu fermente ederek laktik ve asetik asit, etanol ve CO₂ oluştururlar. Pentozu fermente ederek laktik ve asetik asit oluştururlar. Betabacterium'lar bu grup üyeleridir.

Carnobacterium

Et laktikleri olarak da isimlendirilen Carnobacterium'lar laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmalarında yeni üyelerdir. Balık, tavuk eti ve vakum ambalajlanmış etlerden izole edilen fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri birbirine çok benzeyen atipik laktik asit bakterileri yeni bir gruplandırma ile Carnobacterium adı altında toplanmıştır. Bu grubun en ayırt edici özelliği ise tipik Lactobacillus'ların üreyemediği Asetat Agar (pH 8,5–9,0 ve pH 5,4)'da üreyebilmeleridir (31, 67).

Streptococcus

Streptococcus cinsi 6 grupta incelenmektedir (Lancefield's şeması).

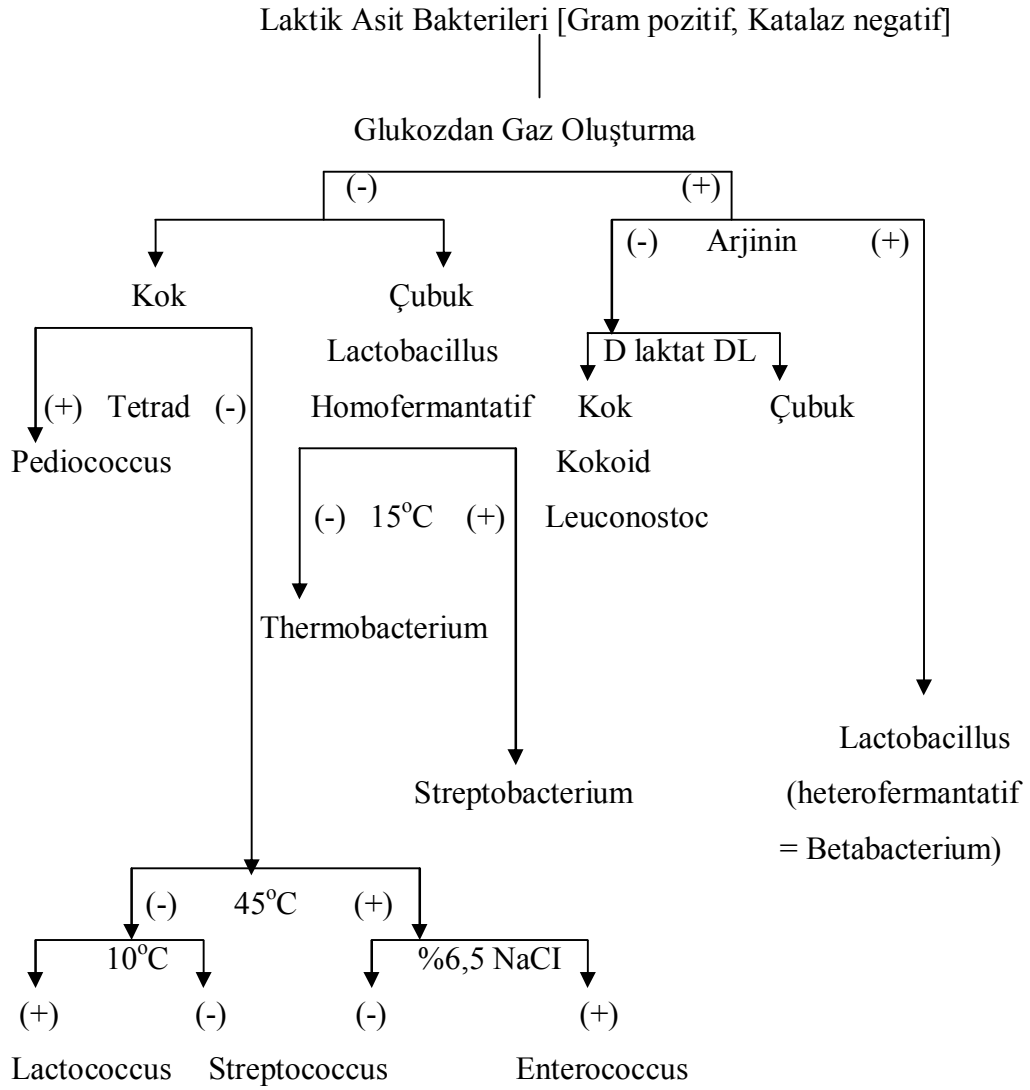
Piyojenik Streptococcus: Hücre duvarlarında polisakkarit antijeni içeren, Kanlı Agar'da β -hemoliz yapan Streptococcus'lar bu gruptadır. Hemolitik Streptococcus'lar insanlar ve hayvanlar için patojeniktir (138).

Oral (Viridans Grup) Streptococcus: İnsanların ve hayvanların üst solunum yollarında ve ağız boşluğunda sıklıkla bulunan gruptur (68).

Enterococcus: İnsan ve sıcakkanlı hayvanların intestinal sisteminde bulunan türlerdir. Grup D antijenlerini içerdiklerinden sınıflandırmada Grup D olarak geçerler. Enterococcus'lar %6,5 NaCl ve pH 9,6'da üreyebilmeleri ile diğer Streptococcus'lardan ayrılırlar (113).

Lactococcus: Laktik Streptococcus'lar bu grupta yer alır. % 6,5 NaCl ve pH 9,6'da üreyemezler. Hareketsiz ve mezofiliktirler. N grup Streptococcus'lar olarak adlandırılırlar. 10°C'de ürerler, fakat 45°C'de üreyemezler. Homofermantatif bakterilerdir (114).

Diğer Streptococcus: Yapılan sınıflandırmanın dışında kalan Streptococcus'lar bu grubu oluşturur (69).



Şekil 1. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyon Şeması (143).

Vagococcus

Grup N Streptococcus'ların (Lactococcus) hareketli olan üyeleri yeni bir gruplandırma ile Vagococcus olarak isimlendirilmiştir (30).

Pediococcus

Homofermantatif laktik asit bakterileridir. Pediococcus'lar diğer laktik asit bakterileri ile mikroskopik morfolojilerinden faydalanılarak ayrılırlar. Pediococcus'lar mikroskopta dörtlü küme halinde kok şeklinde görülürler. Bu görünümüleri ile Micrococcus'lar ile karıştırılabilse de Micrococcus'ların tuza olan toleransları, düşük miktarda laktik asit üretmeleri ve şeker yokluğunda üreyebilme özellikleri dikkate alınarak ayırım yapılabilir (53).

Tetragenococcus

Pediococcus halophilus diğer Pediococcus'lardan, özellikle %18 NaCl konsantrasyonlarında gösterdiği üreme ile farklı özellikler göstermektedir. 16S rRNA dizilimi ile diğer tüm Pediococcus'lardan ayrılmaktadır. Ayrıca biyokimyasal olarak tuza da oldukça dayanıklıdır. Bu nedenle bu tür, tekrar yapılan bir sınıflandırma ile yeni bir cins olan Tetragenococcus cinsi içerisinde yer almıştır (33).

Leuconostoc

Gaz oluşturan laktik asit bakterileri olarak da tanımlanabilir. Kok şeklindeki heterofermantatif laktik asit bakterileridir. Diğer heterofermantatif laktik asit bakterilerinden (Betabacterium), arjinini hidroliz edememeleri ve mikroskopik görünümünde kok şekilleri ile ayrılırlar (52).

Weissella

Collins ve ark. (32), *Leuc. mesenteroides* ve benzer türleri yeni bir sınıflandırma ile Weissella adı altında toplamış ve fermente sucuklardan *Weissella hellenica* adında yeni bir tür tanımlamışlardır.

Oenococcus

Dicks ve ark. (44), fizyolojik özellikleri bakımından, pH 4,8 de üreyebilme, %10 etanol içeren besiyerinde üreyebilme gibi farklı özellikleri ve genetik açıdan farklı özellikleri ile diğer *Leuconostoc*'lardan ayrılan *Leuconostoc oenos*'u *Oenococcus* adını verdikleri yeni bir cins içerisinde sınıflandırmışlardır.

Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda 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 ısı değerlerinde ve farklı tuz konsantrasyonlarında üreme kontrol edilir. Bu kriterler göz önünde bulundurularak genel bir gruplandırma ile laktik asit bakterileri cins bazında ayrılmış olur.

Laktik asit bakterilerinin klasik yöntemlerle identifikasyonunda karbonhidrat fermantasyon testleri büyük önem taşımaktadır. Özellikle tür bazında yapılacak identifikasyonda karbonhidrat fermantasyon testleri olmaksızın klasik identifikasyonun yapılması mümkün değildir. Bu yöntemde çok fazla sayıda karbonhidrat değerlendirilmeye alınmaktadır. Bu amaçla geliştirilen bir sistem olan API 50 CHL test kitleri bu ihtiyacı karşılamaktadır. Uygulanışının kolaylığı ve sonuçların bilgisayar programı ile değerlendiriliyor olması teste avantaj kazandırmaktadır. Fakat değerlendirmede yeni identifiye edilen türlerin fermantasyon profilleri de dikkate alınmalıdır.

Karbonhidrat fermantasyon testinin prensibi ve yapılışı bellidir. Test edilecek karbonhidratları ve indikatör boyayı içeren sıvı besiyerine izolatlar inoküle edilip yüzeyi mineral yağ ile kapatılarak 3–5 gün inkübe edilir. İnkübasyon sonrası besiyerinde sarı renk pozitif sonuç olarak değerlendirilmektedir (91).

Karbonhidrat fermantasyon testleri için üretilen ticari kitlerin benzer şekli enzimler için de geliştirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin enzim profillerinin çıkarılmasında API-zym enzim kitleri kullanılabilir. Bu kitlerle çok sayıda enzim test edilebilmektedir.

Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda kullanılan bir diğer önemli test ise üretilen laktik asitin stereoizomer formunun belirlenmesidir. Manome ve ark. (107), yaptıkları çalışmalarında enantiomerik resolusyon kolonu kullanarak HPLC

tekniki ile stereoizomerlerin tiplerinin kolaylıkla ve hızlı bir şekilde ayırt edilebileceğini belirtmişlerdir. Bu ayırmada L- form / D- form şeklinde laktik asitin izomerleri belirlenerek identifikasyonda büyük bir kolaylık sağlanacağını vurgulamışlardır.

Laktik asit bakterileri izolasyonunda All Purpose Tween Agar (APT Agar), Rogosa Agar, De Man Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar), modifiye Chalmers Agar (167) kullanılabilmektedir (91). Sezer ve Güven (145), kefirin laktik asit bakteri florasını belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında laktik asit bakterilerinin izolasyon ve identifikasyonu için MRS Agar ve M17 Agar'ın selektifliğinin az olduğunu ve bu besiyerlerinin izolasyon için uygun olmadığını belirtmişlerdir. Vanos ve Cox (167), laktik asit bakterilerinin sayısının belirlenmesi ve izolasyonu için MRS ve M17 Agar'a göre çok daha selektif ve başarılı bir agar olarak geliştirdikleri modifiye Chalmers Agar'ı önermişlerdir.

İster klasik identifikasyon ister modern yöntemlerle identifikasyon yapılsın her iki şekilde de identifiye edilmiş suşun teknolojik özelliklerinin belirlenmesi de çok önemlidir. Özellikle gıda sanayinde starter kültür olarak kullanılacak ise mutlaka teknolojik özelliklerinin de belirlenmesi gerekir. Bu özellikler arasında proteolitik aktivite, amolitik aktivite, lipolitik aktivite, çeşitli enzim profilleri, ekzopolisakkarit oluşturma, antagonistik aktivite ve biyojenik amin şekillendirme (amino dekarboksilaz aktivitesi) gibi özellikler belirlenmelidir. Böylece suşun probiyotik karaktere sahip olup olmadığı da bilinmiş olur.

Laktik asit bakterilerinin fenotipik ve genetik identifikasyonu için kullanılan yöntemler, kültürel ve kültürel olmayan yöntemler olarak da sınıflandırılabilir. Kültürel yöntemler incelendiğinde fenotipik metotlar, genotipik metotlara göre daha ucuzdur. Bu yöntemler için minimize edilmiş ticari kitler (API, BİOLOG) mevcuttur. Fenotipik yöntemlerin identifikasyon için daha pratik olduğu bilirse de, benzer fenotipik özellikteki suşların ayrımı kolay olmasına karşın genotipi benzer suşların ayırımında, fenotipik özellikleri baz alan yöntemler hatalı sonuçlar vermektedir. Bu nedenle laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve identifikasyonunda, genotipik özelliklerin temel alındığı yöntemler tercih edilmektedir. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu için laboratuvarlarda kullanılan rutin analizlerde fenotipik analiz yöntemlerinin uygulanabilirliği daha kolaydır. Bu metotlar

morfolojik ve fizyolojik özellikler, karbonhidrat fermantasyonu ve protein profilinin belirlenmesi yöntemlerini kapsar. Çoğu zaman fizyolojik analizler karbonhidrat fermantasyonunun belirlenmesi için kullanılan ticari olarak üretilmiş kitlerle birlikte kullanılırlar. Diğer fenotipik teknikler (organik asitlerin ince tabaka kromatografisi ile belirlenmesi, yağ asitlerinin metil esterlerinin analizi) identifikasyon için kullanılsa da başarı sınırlıdır. Bu nedenle başarılı bir identifikasyon için fenotipik tekniklerin kombine kullanımını uygulanmalıdır (157).

Laktik asit bakterilerinin fenotipik özelliklerinin temel alındığı identifikasyon yöntemlerinde problemlerle karşılaşmaktadır. Bunlar arasında en çok karşılaşılan sorun türlere ait fenotipik özelliklerin bazı suşlarda değişiklik göstermesidir. Diğer önemli bir sorun ise fenotipik olarak çok benzer olan suşların genotiplerinin oldukça farklı olmasıdır. Büyük sayılarda izolatların identifikasyonunda, bu ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Diğer bakteri gruplarının identifikasyon şeması ile karşılaştırıldığında, laktik asit bakterilerinin belirlenmiş çok sayıda türü mevcut olduğundan ve bu türlere ait geçerli bir identifikasyon şeması olmadığından gerçek sorunlarla karşılaşmaktadır. Bilinmeyen bir mikroorganizmanın, identifikasyon şemasındaki fenotipik özellikler kullanılarak karşılaştırma ile identifikasyonu çoğu zaman başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bu tür identifikasyon şemalarında özellikler belirlidir. Bir mikroorganizma ya Gram negatiftir ya Gram pozitifdir veya bir tür için belirli bir şeker fermantasyonu ya negatiftir ya pozitifdir. Fakat laktik asit bakterilerinin identifikasyon şemaları incelendiğinde zayıf negatif, zayıf pozitif veya değişken şekilde ibarelerle karşılaştığı gibi tür bazında pozitif olan bir özellik alt türlerde negatif olabildiğinden bu bakteri grubu için fenotipik özelliklerle identifikasyon oldukça zorlu bir iştir (38).

Çoğu genotipik yöntem ise Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) analizi temeline dayanır. Şüphesiz ki; bu yöntemlerin en önemli avantajlarından biri, mikroorganizmaların üreme koşullarındaki değişikliklerden bağımsız olmalarıdır. Genotipik teknikler, tür düzeyinden suş düzeyine değişen oranlarda ayırım gücüne sahiptir. Laktik asit bakterilerinin ileri teknikler ile identifikasyonunda ilk sırayı PCR almaktadır. PCR ile laktik asit bakterilerinin identifikasyonunu klasik yöntemlere göre çok daha güvenilir ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. Kullanılan diğer yöntemler arasında Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP),

Çoğaltılmış rDNA'nın Restriksiyon Analizi (ARDRA), Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE), amino asit dizilimi sayılabilir. Özellikle DNA'yı temel alan yöntemler çok güvenilir kabul edilmektedir. Tablo 9'da laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda kullanılan teknikler verilmiştir (157).

Tablo 9. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda Kullanılan Teknikler (157).

| Teknik | Prencip | İş Yükü | Ayrım Başarısı | Tekrar Edilirlik | Kaynak |
|------------------------------|---|----------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Fenotipik Yöntemler | | | | | |
| Morfolojik analizler | Mikroskopik analiz | Düşük | Cins seviyesinde | Orta | Gonzalez ve ark. 2000 |
| Fizyolojik analizler | Üreme özellikleri, basit testler | Orta | Cins seviyesi ve daha düşük | Düşük | Corsetti ve ark. 2001 |
| Biyokimyasal karakterizasyon | Fermantasyon ve asimilasyon (API, BIOLOG) | Düşük | Cins veya tür seviyesinde | Orta | Muyanja ve ark. 2003 |
| Protein profili | Hüresel proteinlerin elektroforezi (SDS-PAGE) | Yüksek | Tür seviyesinde | Yüksek | Leisner ve ark. 2001 |
| Genotipik Metotlar | | | | | |
| Spesifik primerler | Grup-spesifik primerlerle PCR | Düşük | Primere bağlı | Yüksek | Numura ve ark. 2002 |
| Sequens | Gen sequensinin belirlenmesi (16S rDNA) | Yüksek | Cinsten türe kadar | Yüksek | Booyesen ve ark. |
| PRFL | DNA'nın restriksiyon enzim analizi ya da PCR amplifikasyonu | Orta | Türden suşa kadar | Yüksek | Giraffa ve ark. 2002 |
| AFLP | REA ile PCR amplifikasyonu kombinasyonu | Yüksek | Türden suşa kadar | Yüksek | Giraffa ve Neviani 2000 |
| RAPD – PCR | Random Primer PCR | Düşük | Türden suşa kadar | Düşük | Booyesen ve ark. 2002 |
| Rep-PCR | Tekrarlayan sekansları hedefleyen PCR | Düşük | Türden suşa kadar | Yüksek | Gevers ve ark. 2001 |
| PFGE | REA ve Pulsed-Field Jel elektroforezi | Yüksek | Suş seviyesinde | Yüksek | Ventura ve Zink 2002 |
| Ribotyping | REA ve oligonükleotitlerin problemlerle ile belirlenmesi | Yüksek | Türden suşa kadar | Yüksek | Lyhs ve ark. 2002 |
| Hibridizasyon problemleri | İşaretili problemler ile DNA-DNA hibridizasyonu | Yüksek | Cinsten türe kadar | Yüksek | Manero ve Blanch 2002 |

Kültürel yöntemlerde bakterilerin her zaman kültüre edilmesi zor ve zaman alıcı olabilmektedir. Bu durumlarda hızlı ve daha güvenilir bir identifikasyon için kültürel olmayan yöntemler tercih edilir. Gıda ortamındaki laktik asit bakterilerinin cins, tür ya da suş düzeyinde saptanmaları için en hızlı kültürel olmayan yaklaşım, örnekten direk olarak ekstrakte edilen bakteriyel DNA halindeki hedef organizmanın PCR temelli yöntemle saptanmasında genellikle spesifik primerlerin kullanılmasıdır (157).

Tablo 10'da Lactobacillus'ların identifikasyonunda kullanılan tekniklerin karşılaştırılması verilmiştir (134).

Tablo 10. Lactobacillus'ların İdentifikasyonunda Kullanılan Tekniklerin Karşılaştırılması (134)

| Metot | İş Yüğü | | | İdentifikasyon Seviyesi | | |
|---|---------|----------|-------|-------------------------|-----|-----|
| | Fiyat | Materyal | Zaman | Cins | Tür | Suş |
| FENOTİPİK | | | | | | |
| Morfolojik | | | | | | |
| Fizyolojik | ± | ± | ± | ++ | + | ± |
| Biyokimyasal | | | | | | |
| SDS-PAGE: Çözünebilir Hücre Proteinleri | + | + | + | ++ | ++ | + |
| GENOTİPİK | | | | | | |
| RAPD-PCR | + | + | + | * | + | ++ |
| Plasmid Demonstrasyonu | * | * | * | * | ± | + |
| Restriksiyon Enzim Analizleri | ± | ± | ± | + | + | + |
| Pulsed Field Jel Elektroforezi | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ |
| DNA–DNA Hibridizasyonu (Dot Blot-teknigi) | + | + | ±/+ | ++ | ++ | * |

++, Çok yüksek; +, Yüksek; ±, Orta; *, Düşük.

1.3. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN METABOLİK ÜRÜNLERİ VE ANTİMİKROBİYEL ETKİLERİ

Bilim adamları ve gıdacılar 1990'lı yıllarda gıda güvenliğini sorgulayarak gıdalardaki güvenliğin ne derece yeterli olduğu ve bu konuda neler yapılabileceğini araştırmışlardır. Modern teknolojilerin başlamasına ve güvenlik kavramlarının (HACCP) geliştirilmesine karşın intoksikasyonların ve gıda kaynaklı hastalıkların sayılarındaki artış durdurulamamıştır. Diğer yandan tüketicilerin en az işlem görmüş, kimyasal koruyucu kullanılmadan hazırlanmış, düşük miktarda asit, şeker ve yağ içeren gıdalara olan ilgileri gün geçtikçe artmaktadır. Bunların çoğu tüketime hazır gıdalar ve yeni tipte gıdalardır. Bu doğrultuda artık gıda sanayi ve teknolojisi insan sağlığını riske etmeyecek, gıda raf ömrünü doğal katkılarla uzatabilecek yeni gıda teknolojisine yönelmiştir. Bunların başında ise biyolojik koruyucu olarak da adlandırılan koruyucu kültürler ile bunların metabolitleri (bakteriyosinler ve enzimler) gelmektedir (76).

İlk olarak XX. yy'ın başında Eli Metchnikoff, insan sağlığına yararlı bir beslenme bileşeni olarak, sindirim sisteminde canlı kalabilme gücünde olan laktik asit bakterileri tarafından fermente edilen gıdaların kullanımını önermiştir. Laktik asit bakterilerinin biyolojik bir etki gücüne sahip olmaları için sindirim sistemini geçerken canlılıklarını yitirmemeleri ve belli bir aktiviteye sahip olmaları gerekir. Bakteriler ve metabolik ürünleri özellikle enzimleri, mideden asit bariyerlerini, herhangi bir şekilde değişikliğe uğramadan, zarar görmeden geçmelidir. Aynı şekilde safra tuzlarının bilinen zararlı etkilerinden de hasar görmemelidir (93).

1.3.1. Antagonistik Etki

Antagonizm farklı biyolojik faktörlerin kombine etkisi ve mikroorganizmaların kendi aralarındaki rekabetleri ile metabolik aktivitelerinden kaynaklanır. Mayalar ve küfler dahil olmak üzere özellikle laktik asit bakterileri genellikle "GRAS" olarak kabul edilir. Fermantasyonlarda dominant olan bu floranın insan sağlık riskiyle ilişkisi yoktur. Yani sağlığı riske etmezler. Bu yararlı

organizmalar patojenlere ve çürükçüllere karşı oldukça etkilidir. Laktik fermente gıdaların sağlığa yararlı ve güvenli kabul edildiği bilinmektedir (75).

Laktik asit bakterilerinin homofermantatif karbonhidrat metabolizmalarının son ürünlerinin gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivitesi son on yıldır çok detaylı olarak araştırılmıştır. Heterofermantatif laktik asit bakterileri tarafından heksozun katabolizması sonucu oluşan eşit molarlarda laktik asit, asetik asit (veya etanol) ve CO₂ benzer bir koruyucu ve antagonistik etkiye neden olur. Bu koruyucu etki, karbonhidrat metabolizması sonucunda oluşan düşük pH değerlerinden kaynaklanır. Laktik asit bakterileri, metabolizmaları sonucu çok düşük miktarlarda da olsa hidrojen peroksit ve diasetil üretirler. Bu maddeler az da olsa antimikrobiyel etkiye katkıda bulunarak gıda korunmasında rol oynarlar (147).

Son bilgilere göre laktik asit, asetik asit, H₂O₂, bakteriyosin gibi fermantasyon boyunca üretilen birçok metabolik ürün antimikrobiyel özellik göstererek laktik fermente gıdaları güvenilir kılmıştır (75). Tablo 11’de laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkiye sahip metabolik ürünleri verilmiştir (76).

Tablo 11. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Etkili Metabolik Ürünleri (76)

| 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 |

1.3.2. Organik Asitler

Laktik asit bakterileri ürettikleri laktaz enzimi ile laktozu parçalayıp, başta laktik asit olmak üzere organik asitler oluşturur. Oluşan organik asitlerin türü ve miktarı, suşun üreme şartlarına ve organizmanın türüne bağlıdır. Karbonhidrat metabolizmalarında glikolizis'de EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) yolunu kullanan kültürler, homolaktik fermantasyon sonucu son ürün olarak 1 mol heksozdan 2 mol laktik asit üretirler. Heterofermantatif kültürler ise 6-fosfoglukonat yolunu kullanarak heterolaktik fermantasyon sonucu, 1 mol laktik asit, 1 mol CO₂, 1 mol etanol, (ya da asetik asit) yanında formik asit, diasetil ve asetaldehit oluşturur (77, 91).

Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat metabolizması sonucu oluşan laktik asitin etkisiyle pH değeri düşer ve bu düşüş Gram negatif ve Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde geniş spektrumlu bir antimikrobiyel etki gösterir (117). Organik asitlerin antimikrobiyel etkisi ortamın pH'sına ve pKa değerine bağlıdır. Laktik asit (pKa= 3,86), asetik asite (pKa= 4,75) göre çok daha güçlü bir antimikrobiyel etkiye sahip olmasına karşın, iyi tamponlanmış gıdalarda asetik asit disosiyasyon formu ile çok daha etkili olabilmektedir (2).

Taniguchi ve ark. (156), *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas ssp.* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı organik asitlerin (laktik, asetik ve propiyonik asit) antimikrobiyel etkisini test ederek her üç organik asitin de tek başına ayrı ayrı antimikrobiyel etki gösterdiğini fakat eşit konsantrasyonlardaki organik asitlerin disosiyasyon formları karşılaştırıldığında, asetik asitin ve propiyonik asitin antimikrobiyel etkisinin laktik asitin etkisinden çok daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Bjornsdottir ve ark. (14), yaptıkları çalışmalarında pH'nın ve çeşitli organik asitlerin (asetik, sitrik, malik asit ile L ve D-laktik asitin) 5–10 mM konsantrasyonlarda *E. coli* O157:H7 üzerine antimikrobiyel etkisini araştırmışlardır. Asitlerin 1–20 mM arası konsantrasyonları karşılaştırıldığında en büyük antimikrobiyel etkiyi D-laktik asitin gösterdiği belirlenmiştir. Sitrik asitin ise bu konsantrasyonlarda herhangi bir antimikrobiyel etki göstermediği belirtilmiştir. İnhibitör etkisi olmayan düşük pH tamponu olarak glukonik asitin kullanıldığı çalışmada, pH 3,2'de seçilen organik asitlerin varlığında ve yokluğunda *E. coli*

O157:H7 suşunun canlı kalabilme yeteneğinin araştırıldığı çalışmada, patojenin pH 3,2 değerine kolaylıkla adapte olduğu fakat organik asitlerin ortama ilavesiyle şaşırtıcı bir şekilde hücre sayısının 3 log'dan 2 log'a düştüğü belirlenmiştir.

1.3.3. Hidrojen Peroksit

Laktik asit bakterileri, oksijen varlığında, flavoprotein oksidaz enziminin aktivitesi sonucu hidrojen peroksit üretir. Laktik asit bakterileri katalaz enzimine sahip olmadığından dolayı ortamda biriken H₂O₂, *S. aureus* ve *Pseudomonas ssp.* gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etki gösterir (3). Bakteriyosidal oksijen, metabolitleri, nükleik asitleri ve hücre proteinlerini etkileyerek bakteri hücrelerinde güçlü bir oksidatif etki yapar (117).

Bakteri membranlarını bozmada etkin rol oynayan bu bileşiğe en duyarlı olanlar Gram negatif bakterilerdir. H₂O₂ özellikle *E. coli*'de DNA'nın üzerinde bozulmalara sebep olabilir. Gerçekte kromozomik replikasyonu engelleyen nükleotidik bazları açığa çıkararak DNA zincirinde kırılmalara meydan verir (93).

Thomas ve ark. (158), oral Streptococcus'lara karşı bakteriyel laktoperoksidazın, H₂O₂'in ve tiyosiyanatın antimikrobiyel etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, tiyosiyanatın ve laktoperoksidazın yokluğunda H₂O₂'in çok büyük bir antimikrobiyel etki gösterdiğini, üçünün kombine kullanımında ise etkinin çok daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

1.3.4. Karbondioksit

Heterofermantatif laktik asit bakterilerinin heksozu fermente etmeleri sonucu karbondioksit oluşur. CO₂ diğer metabolik yollarla da oluşsa bile esas olarak heterofermantatif laktik asit bakterilerinin heksozu fermente etmeleri süresince şekillenir. CO₂ amino asitlerin (histidin, tirozin) dekarboksilasyonu sonucu da şekillenmektedir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkilerine katkıda bulunan CO₂, çift antimikrobiyel etkiye sahiptir. Birincisi, gıda ortamında küfler gibi zorunlu aerobik mikroorganizmaların üremelerini engellemesidir. İkincisi ise CO₂'in kendi antimikrobiyel etkisidir (3).

1.3.5. Diasetil

Heksozun fermantasyonu sırasında diasetil (2,3-butanediol) oluşumu baskılanır, fakat ortam şartları uygun hale döndüğünde yani ortamda sitrat benzeri organik asitlerin varlığında önemli miktarda diasetil üretilir. Sitrat, pruvat yoluyla diasetile kadar parçalanır (105).

Diasetil Gram pozitiflere kıyasla, Gram negatif bakterilere, mayalara ve küflere karşı çok daha etkilidir (117). Diasetilin 300–1000 ppm konsantrasyonlarında antimikrobiyel aktivite spektrumu geniştir. Fakat 2–4 ppm değerlerinde keskin bir tereyağı aroması verdiği için dolayı diasetilin koruyucu özelliği sınırlıdır. Laktik asit bakterinin doğal fermantasyonlarında çok düşük (0,2–1,5 ppm) seviyelerde diasetil üretilir (71).

Diasetilin antimikrobiyel aktivite etki parametreleri tam olarak bilinmemektedir. Jay (87), Gram negatif bakteriler ile mantarların, Gram pozitiflere oranla diasetile karşı çok duyarlı olduğunu belirtmiştir. Yaptıkları denemelerde diasetilin antimikrobiyel etkisine pH değerlerinin de etki ettiğini ve $\text{pH} \leq 7$ 'de antimikrobiyel etkinin arttığını, $\text{pH} > 7$ 'de ise etkinin gittikçe azaldığını belirtmişlerdir. Anaerobik şartlarda *Clostridia* için diasetilin etkisiz olduğu fakat 200 $\mu\text{g/ml}$ diasetilin antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu, 350 $\mu\text{g/ml}$ diasetilin ise *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* ve *Citrobacter*'e karşı antimikrobiyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

1.3.6. Düşük Molekül Ağırlıklı Antimikrobiyel Etkili Bileşikler

Laktik asit bakterilerinin ürettiği düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyel etkili bilinen en önemli bileşik reuterindir (125).

1.3.6.1 Reuterin: Reuterin; glukoz ve gliserol ya da gliseraldehit karışımında *Lb. reuteri*'nin anaerobik şartlarda üremesinde, durgun fazda glukozdan $\text{NADH} + \text{H}^+$ şekillenmesi için bir alıcı olarak hareket eden gliserolden, bir katabolit olarak oluşur (15). Reuterin ya da 3-hidroksipropiyonaldehit, B_{12} koenzimine bağlı olarak

gliserolden üretilir. Reuterin, heterofermantatif bir laktik asit bakterisi olan *Lb. reuterii* tarafından salgılanan düşük molekül ağırlığına sahip, nötral pH'lı, yüksek çözünürlüğe sahip, protein tabiatında olmayan, özellikle halk sağlığı açısından önemli Salmonella, Shigella, Clostridium, Staphylococcus, Listeria ve Candida'ya karşı inhibitör etkiye sahip, geniş spektrumlu antimikrobiyel bir maddedir. Reuterinin antimikrobiyel etkisi muhtemelen ribonükleotit redüktazı bağlayan substratı inhibe ederek, DNA sentezini engellemesinden kaynaklanır (37, 105).

1.3.7. Bakteriyosinler

İlk kez 1925 yılında Gratia, *E. coli*'nin bir suşunun *E. coli*'nin diğer kültürlerine karşı bir madde ürettiğini belirtmiştir. 1946 yılında Gratia ve Fredericq bu maddeyi "Colicine" olarak isimlendirmişlerdir. Jacob ve ark. (85), 1953 yılında yüksek spesifik antibakteriyel proteinler için genel bir terim olarak "Bacteriocin" terimini kullanmışlardır. Kolisin terimi, şimdi *Enterobacteriaceae* ile yakın ilişkili türleri ile *E. coli*'nin suşları tarafından üretilen bakteriyosidal proteinler için kullanılmaktadır.

Bakteriyosinler bakteriler tarafından sentezlenerek ortama salgılanan ve genelde ilk olarak yakın türlerin inhibisyonunda etkili, kısa veya uzun zincirli protein tabiatında sekonder metabolit ürünleri olan antimikrobiyel etkili proteinler ya da peptitler olup, genellikle gastrointestinal sistemde proteazların etkisiyle inaktif hale gelen çoğu küçük katyonik moleküllerdir. Genellikle 30–60 amino asit rezidüsü içerirler (76, 94, 152).

Louis Pasteur ve Robert Koch zamanından bu yana, çevredeki zararlı mikroorganizmaların kontrol altına alınması ihtiyacı, bilimsel bir gerçek olarak süregelmiştir. 1929'da Alexander Fleeming'in penisilini keşfiyle, tıp ve veteriner alanında, spesifik hastalıklara sebep olan mikroorganizmalarla mücadelede teropatik antibiyotiklerin kullanımı başlamıştır. Teropatik antibiyotiklerin gıdalarda kullanımı yasaklanmasına karşın, antimikrobiyel veya koruyucu özelliği olan antagonistik katkıların kullanımı gıda güvenliği ve korunmasında başvurulan bir yol olmaya başlamıştır. Ticari gıda koruyucularından biri de bakteriyosinlerdir. Bakteriyosinler bakteriler tarafından üretilir ve antibiyotik özelliğe sahiptir. Fakat bakteriyosinler,

insanda alerjiye sebep olduğundan dolayı yasaklanan teropatik antibiyotiklerle karıştırılmaması için antibiyotik olarak isimlendirilmezler (25, 29).

Bakteriyosinler, biyokimyasal özellikleri, genetik orijinleri, molekül ağırlıkları, etki tarzları ve inhibisyon spektrumları farklı olan antibakteriyel protein gruplarıdır (1). Birçok bakteriyosinjenik suş sadece bir bakteriyosin sentezlerken, bazı suşların birden fazla (2 veya 3) bakteriyosin sentezlediği belirtilmiştir (21, 117, 128).

Laktik asit bakterileri antimikrobiyel aktiviteli protein ve peptit üretme yeteneğine sahiptirler. Büyük proteinler (>20 kDa), çoğunlukla enzimatik aktiviteyle hedef bakterinin hücre zarına yönelir. Bakteriyosinlerin hedefi hücre zarı olsa da enzimatik olmayan aktivitelerini kullanarak da hedef hücre membranının bütünlüğünü bozarak veya hücre duvarının sentezini bozarak da etkili olabilmektedir (162).

Bakteriyosinlerin antimikrobiyel etki tarzı kesin olmamakla birlikte, Gram negatif bakterileri sınırlamak, Gram pozitif bakterileri ise inhibe etmek şeklindedir. Daha net bilgi için bileşiklerin Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarının kompozisyonunun karşılaştırılması ve detaylı bir şekilde incelenerek bakteriyosinlerin etki tarzları araştırılmaktadır (1). Bakteriyosinlerin antimikrobiyel aktiviteleri için ilk hedef bakteri hücresinin sitoplazmik membranıdır (1, 76).

Gıdalarda kontrolü zor olan ve çevrede yaygın olarak bulunan patojenik bakteriler, *L. monocytogenes* dahil gıda kaynaklı hastalıklarda önemli rol oynayan Gram pozitif patojenlere karşı etkili olan çoğu bakteriyosin “GRAS” olarak nitelendirilen bakterilerden elde edilir. Bu nedenle son 25 yıldır bakteriyosinler üzerine çok sayıda araştırma yapılmış ve bunların önemi göz ardı edilemez bir hal almıştır. Laktik asit bakterilerince üretilen bakteriyosinlerin, gıdaları patojenlere karşı korumada gıda katkı maddesi olarak kullanımı büyük ilgi uyandırmaktadır. Bakteriyosinler heterogenus bir gruptur ve istenmeyen mikroorganizmalara karşı spesifik antagonist olarak kullanımı ve değerlendirilmesi için bakteriyosidal özellikleri belirlenmelidir. Bakteriyosinlerin gıdada etkileri çeşitli sebeplerden dolayı sınırlıdır, ayrıca gıda katkı maddesi olarak bakteriyosinlerin kullanımında ekonomik değerleri, kullanımı engelleyen bir problemdir. Bu nedenle, yapılan çalışmalar sadece yeni ve daha etkili bakteriyosinlerle sınırlı olmayıp aynı zamanda

bakteriyosinlerin optimum ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesiyle hem biyolojik hem de ekonomik kolaylıkların belirlenmesi yönünde ilerlemektedir (25).

1.3.8. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Bakteriyosinlerin üretimindeki hakim konumlarından dolayı *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinsleri tarafından üretilen bakteriyosinlerin özellikleri sınıflandırmada temel olarak alınmıştır. Klaenhammer (95), tarafından oluşturulan sınıflandırmaya göre bakteriyosinler molekül ağırlıkları, ısı stabiliteyi, enzim hassasiyetleri, etki mekanizmaları ve modifiye amino asit içerikleri esas alınarak 4 gruba ayrılmıştır. Tablo 12’de laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin sınıflandırılması verilmiştir (95).

Tablo 12. Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması (95).

| Sınıf | Alt Sınıf | Tanım |
|-------|-----------|---|
| I | | Lantibiyotikler; küçük, ısıya dayanıklı, nadir aminoasitleri içerir |
| II | | Lantibiyotik olmayan, küçük (30–100 amino asit), ısıya dayanıklı |
| | IIA | Antilisteriyal aktiviteleri ile pediosin benzeri bakteriyosinler |
| | IIB | İki peptid bakteriyosinler |
| | IIC | Özellikleri tam bilinmeyen bakteriyosinler |
| III | | Büyük (>30kDa), ısıya karşı değişken proteinler |
| IV | | Glyco- ya da lipid kompleks bakteriyosinler |

1.3.8.1. Sınıf I Bakteriyosinler (Lantibiyotikler): Bu sınıf bakteriyosinler yapı ve bileşimleri modifiye olmuş amino asitleri içerir, bunlar “Lantibiyotik” olarak isimlendirilir. Lantibiyotikler yapılarında lanthionine bulundurdukları için bu ismi almışlardır. Lantibiyotikler, bilinen amino asitlerden farklı olarak lanthionine (Lan), α -methyllanthionine (MeLan), dehydroalanine ve dehydrobutyrine içeren küçük (<5kDa) ısıya dayanıklı polisiklik peptitlerdir (25, 27, 162).

Sınıf I içinde yer alan en yaygın bakteriyosin *Lc. lactis ssp. lactis* tarafından üretilen nisindir. Nisin gıda maddelerinde kullanılan GRAS katkı maddeleri

statüsünde yer alır (37). FAO-WHO'ya bağlı Gıda Katkıları Uzmanlar Komitesi tarafından 1969 yılında gıdalarda bir antimikrobiyel olarak kullanılabilirliği onaylanmıştır. Nisin o tarihten bu zamana dek E234 no'lu gıda katkı maddesi koduyla 50'den fazla ülkede kullanılmaktadır. Nisin Gram pozitif mikroorganizmalara karşı oldukça etkilidir. Nisinin *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* üzerinde oldukça etkili olduğu, *Clostridium ssp.*'nin toksin üretimini ve sporlanmasını engellediği buna karşın Gram negatif bakteriler, maya ve küflere karşı etkisiz kaldığı belirtilmiştir (41). Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakterilere göre hücre duvarlarındaki zayıf geçirgenlik özelliklerinden dolayı nisine karşı dirençlidirler. Fakat Gram negatif bakterilerin hücre duvarı geçirgenlikleri ozmatik basınç, ısı uygulaması, çelat kullanımı gibi farklı bir uygulamayla arttırılırsa, nisin etkili hale geçer (41).

Sınıf I, kimyasal strüktür ve antimikrobiyel aktivitelere göre, Tip A ve Tip B lantibiyotikler şeklinde 2 alt gruba ayrılır (95).

Tip A lantibiyotikler, duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranında elektrolitik dengeyi bozarak porlar oluşturmak suretiyle etkiyen, vida şekilli katyonik kısa peptit zincirlerdir. Bu alt gruba giren bakteriyosinlerin içerdiği modifiye amino asit sayısı 3–5 arasında değişmektedir. Tip B lantibiyotikler daha küçük globuler peptitlerdir. Bunlar anyonik veya nötral peptitlerden oluşan küresel şekilli protein molekülleridir. Antimikrobiyel aktiviteleri hedef hücre metabolizmasının esansiyel enzimlerinin inhibisyonuyla ilgilidir. Tamamı kısa peptit zincirlerinden oluşan tip B lantibiyotiklerin molekül ağırlıkları 1,9–4,6 kDa arasındadır. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyel etki gösterirler. Bu gruba giren en önemli bakteriyosinler, nisin, lacticin 481, mutacin A ve duramycin bakteriyosinleridir (25, 162).

1.3.8.2. Sınıf II Bakteriyosinler: Küçük (<10kDa), 30-100 amino asit içeren, ısıya dayanıklı, lanthionine içermeyen peptitlerden oluşan grup Sınıf II'dir. Sınıflandırmada en büyük gruptur. Yeni identifiye edilen çoğu bakteriyosin bu sınıf içerisinde yer alır. Bu sınıf 4 alt gruba ayrılır. Bu sınıfın en önemli alt gurubu olan **IIa alt grubu** bakteriyosinler *Listeria ssp.* üzerindeki inhibitör etkilerinden dolayı

“Pediocin benzeri güçlü antilisteriyal etkili bakteriyosinler” olarak adlandırılmışlardır (27). Tablo 13’de bakteriyosinler ve üretici türler verilmiştir (27).

Tablo 13. Bakteriyosinler ve Üretici Türler (27).

| Bakteriyosin | Üretici Mikroorganizma | Kaynaklar |
|---|--|-------------------------------|
| Sınıf I (Lantibiyotikler) | | |
| Nisin A | <i>Lc. lactis</i> | de Vuyst ve Vandamme (1994b) |
| Nisin Z | <i>Lc. lactis</i> | de Vuyst ve Vandamme (1994b) |
| Lactococcin DR | <i>Lc. lactis</i> ADRIA 85L030 | Dufour ve ark. (1991) |
| Lacticin 481 | <i>Lc. lactis</i> CNRZ481 | Piard ve ark. (1992) |
| Lacticin 3147(LtnA1 ve LtnA2) | <i>Lc. lactis</i> DPC3147 | Dougherty ve ark. (1998) |
| Streptococcin A-FF22 | <i>Strep. pyogenes</i> FF22 | Hynes ve ark. (1993) |
| Salivaricin A | <i>Strep. salivarius</i> 20P3 | Ross ve ark. (1993) |
| Cytolysin (CylL1 ve CylL2) | <i>Enterococcus faecalis</i> | Gilmore ve ark. (1994) |
| Carnocin U149 | <i>Carnobacterium piscicola</i> U149 | Stoffels ve ark. (1992b) |
| Sınıf II | | |
| Sınıf IIa (Pediocin Benzeri Bakteriyosinler) | | |
| Pediocin PA1 | <i>P. acidilactici</i> PAC-1.0 | Henderson ve ark. (1992) |
| Pediocin AcH | <i>P. acidilactici</i> H | Bhunja ve ark. (1988) |
| Leucocin A-UAL187 | <i>Leuc. gelidum</i> UAL187 | Hastings ve ark. (1991) |
| Mesentericin Y105 | <i>Leuc. mesenteroides</i> Y105 | Hécharde ve ark. (1992) |
| Mesentericin 52B | <i>Leuc. mesenteroides</i> FR52 | Hécharde ve ark. (1999) |
| Mesentericin B105 | <i>Leuc. mesenteroides</i> Y105 | Revol-Junelles ve ark. (1996) |
| Acidocin A | <i>Lb. acidophilus</i> TK9201 | Kanatani ve ark. (1995) |
| Bavaricin A | <i>Lb. bavaricus</i> MI401 | Larsen ve ark. (1993) |
| Curvacin A | <i>Lb. curvatus</i> LTH1174 | Tichaczek ve ark. (1992) |
| Sakacin A | <i>Lb. sakei</i> LB706 | Holck ve ark. (1992) |
| Sakacin P | <i>Lb. sakei</i> LTH673 | Tichaczek ve ark. (1992) |
| Sakacin 674 | <i>Lb. sakei</i> LB674 | Holck ve ark. (1994a) |
| Carnobacteriocin BM1 | <i>Carnobacterium piscicola</i> LB17B | Quadri ve ark. (1994) |
| Carnobacteriocin B2 | <i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B | Quadri ve ark. (1994) |
| Divercin V41 | <i>Carnobacterium divergens</i> V41 | Métivier ve ark. (1998) |
| Enterocin A | <i>Enterococcus faecium</i> CTC492 | Aymerich ve ark. (1996) |

a, bu bakteriyosinler Sınıf IIa’ya da dahil edilebilir; **b**, bu bakteriyosinler iki peptid (sınıf IIb) bakteriyosinlere benzemektedir.

Tablo 13. Bakteriyosinler ve Üretici Türler (27). (Devamı)

| Bakteriyosin | Üretici Mikroorganizma | Kaynaklar |
|--|---------------------------------------|---|
| Sınıf IIb (İki-Peptit Bakteriyosinler) | | |
| Lactococcin M (LcnM ve LcnN) | <i>Lc. cremoris</i> 9B4 | Van Belkum ve ark. (1991a) |
| Lactococcin G (LcnGa ve LcnGb) | <i>Lc. lactis</i> LMG2081 | Nissen-Meyer ve ark. (1992) |
| Acidocin J1132 (a,b) | <i>Lb. acidophilus</i> JCM1132 | Tahara ve ark. (1996) |
| Plantaricin S (Plsa ve Plsb) | <i>Lb. plantarum</i> LCPO10 | Jimenez-Diaz ve ark. (1995) |
| Plantaricins EF (PlnE ve PlnF) | <i>Lb. plantarum</i> C11 | Diep ve ark. (1996) |
| Plantaricins JK (PlnJ ve PlnK) | <i>Lb. plantarum</i> C11 | Diep ve ark. (1996) |
| Leucocin H (a ve b) | <i>Leuconostoc ssp.</i> MF215B | Blom ve ark. (1999) |
| Termophilin 13 (ThmA/ThmB) | <i>Strep. thermophilus</i> SPi13 | Marciset ve ark. (1997) |
| Sınıf IIc (Sec-Dependent Bakteriyosinler) | | |
| Acidocin B | <i>Lb. acidophilus</i> M46 | Leer ve ark. (1995) |
| Divergicin A | <i>Carnobacterium divergens</i> LV13 | Worobo ve ark. (1995) |
| Bacteriocin 31 ^a | <i>Enterococcus faecalis</i> Y117 | Tomita ve ark. (1996) |
| Enterocin P ^a | <i>Enterococcus faecium</i> P13 | Cintas ark. (1997), Casaus (1998) |
| Lactococcin 972 | <i>Lc. lactis</i> IPLA972 | Martinez ve ark. (1999) |
| Sınıf IId (Diğer Bakteriyosinler) | | |
| Lactococcins A ve B | <i>Lc. cremoris</i> 9B4 | Van Belkum ve ark. (1991a,b) |
| | <i>Lc. lactis</i> WM4 | Stoddard ve ark. (1992) |
| | <i>Lc. cremoris</i> LMG2130 | Holo ve ark. (1991) |
| Diacetin B | <i>Lc. lactis ssp. diacetylactis</i> | Ali ve ark. (1995) |
| Acidocin 8912 | <i>Lb. acidophilus</i> TK8192 | Kanatani ve ark. (1995) |
| Peptide A | <i>Lb. acidophilus</i> LF221 | Bogovic-Matijasic ark.(1998) |
| Peptide B | <i>Lb. acidophilus</i> LF221 | Bogovic-Matijasic ark. (1998) |
| Lactobin A | <i>Lb. amylovorous</i> LMG P-13139 | Contreras ve ark. (1997) |
| Lactocin 705 | <i>Lb. casei</i> CRL 705 | Palacios ve ark. (1999) |
| Gassericin B3 | <i>Lb. gasseri</i> HCM2124 | Tahara ve ark. (1997) |
| Plantaricin 1.25a | <i>Lb. plantarum</i> TMW1.25 | Ehrmann ve ark. (2000), Remiger ve ark. (1999) |
| Divergicin 750 | <i>Carnobacterium divergens</i> 750 | Holck ve ark. (1996) |
| Carnobacteriocin A | <i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A | Worobo ve ark. (1994) |
| Piscicolin 61 | <i>Carnobacterium piscicola</i> LV61 | Holck ve ark. (1994b) |
| Leucocin B-TA33a | <i>Leuc. mesenteroides</i> TA33a | Papthanasopoulos ark. (1998) |
| Enterocin B | <i>Enterococcus faecium</i> T136 | Casaus ve ark. (1997) |
| Enterocins L50 ^b | <i>Enterococcus faecium</i> L50 | Cintas ve ark. (1998b) |
| Enterocin Q | <i>Enterococcus faecium</i> L50 | Cintas ve ark. (2000) |
| Sınıf III | | |
| Helveticin J | <i>Lb. helveticus</i> 481 | Joerger ve Klaenhammer (1986) |
| Caseicin 80 | <i>Lb. casei</i> B80 | Rammelsberg ve ark. (1990) |

Bu alt grubu oluşturan bütün bakteriyosinlerin peptit zincirlerinin N ucunda Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys (YGNGV) dizisi ortak özellikleridir (95). IIa alt gruba dahil başlıca bakteriyosinler olan mesentericin Y 105, sakacin A gibi bakteriyosinler hücre membranında elektrolitik dengeyi bozarak organik fosfatın dışarı akmasını sağlamak suretiyle inhibisyon etkilerini gösterirler (25).

IIa alt grubunu antilisteriyal aktiviteli pediocin benzeri bakteriyosinler oluşturur. Pediocin benzeri peptitler *L. monocytogenes* dahil Gram pozitif bakterilere karşı büyük bir antimikrobiyel etkiye sahiptir. Pediocinler sporlara karşı çok etkili olmamasına rağmen et gibi bazı gıda sistemlerinde nisinden çok daha fazla etkilidir. Pediocinler fermente etlerin üretiminde kullanılan esas starterlerdir. Ayrıca sebzelerin fermantasyonlarında da önemli görevler alırlar (1).

IIb alt grubu bakteriyosinler, etkiledikleri hücrelerin membranında por kompleksleri oluşturarak inhibitör etkilerini gösterirler. Çoğu bakteriyosin ortama tek bir peptit salgılayarak tam bir antimikrobiyel etkiyi sağlayabilirler. Fakat IIb alt grubunda bulunan bakteriyosinlerin en önemli özellikleri aktiviteleri için iki peptit dizisinin aynı anda bulunması ve aktiflik göstermesidir. Bu iki peptit dizisi bireysel olarak oldukça zayıf bir inhibisyon etkisi gösterdikleri halde aynı ortamda olduklarında sinerjistik bir etkileşim ile çok daha aktif moleküller haline gelmektedirler. Sinerjistik aktivite gösteren peptit dizileri ikililer halinde adlandırılırlar. Bu alt gruptaki bazı önemli bakteriyosinlere örnek olarak enterocin L50A ve L50B, lactococcin G/G ve M/N, plantaricin EF ve JK verilebilir. Sınıf II bakteriyosinleri içerisinde yukarıdaki alt gruplara dahil edilmeyen bazı bakteriyosinler iki ayrı gruba ayrılarak **IIc alt grubunu** oluştururlar. Bu alt gruba dahil bakteriyosinlerin temel yapıları birbirine benzemekle birlikte hücre dışına salgılanmalarında rol oynayan mekanizma farkından dolayı iki gruba ayrılmışlardır. Yapılarında sistein içermeyenler IIc_I alt grubunu, peptit dizisinde bir veya iki sistein amino asiti bulunduranlar ise IIc_{II} alt grubunu oluştururlar (27, 29).

1.3.8.3. Sınıf III Bakteriyosinler: Sınıf III bakteriyosinler çok iyi tanımlanmamış bakteriyosinlerden ibarettir. Bu grupta büyük (>30kDa) ve ısıya-değişken proteinler yer alır. *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen ve diğer gruplara dahil edilen bazı bakteriyosinlerin bulunmasına karşın bu gruba giren

bakteriyosinlerin büyük kısmı *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından sentezlenir, bundan dolayı bu gruba “**Lactobacillus bakteriyosinleri**” de denilmektedir. Isıya dayanıklı olanların varlığına (helveticin J) karşın pek çoğu ısıya duyarlı olan bu grup bakteriyosinler özellikle gıda teknolojisinde ilgi uyandırmaktadır. Acidophilucin A, Helveticin V-1829 gibi özellikleri ayrıntılı olarak belirlenmiş bakteriyosinlerle birlikte reuterin ve reuterin 6 gibi son yıllarda gündeme gelen ve özellikleri yeni keşfedilen bakteriyosinler de bu grup içerisinde yer almaktadır (95).

1.3.8.4. Sınıf IV Bakteriyosinler: Yapıları diğerlerine göre en kompleks bakteriyosinler olan bu gruptaki bakteriyosinlerin en önemli özellikleri, aktiviteleri için polipeptit yapısına ilave olarak lipoprotein veya glikoprotein gibi ilave bazı moleküler grupların gerekli olmasıdır. Molekül ağırlıkları sınıf III bakteriyosinlere yakın olan bu gruba dahil önemli bazı bakteriyosinler, plantaricin S, lactocin 27 ve leuconocin S bakteriyosinleridir. Bu sınıf hakkında çok fazla bilgi mevcut değildir (95).

1.3.9. Sınıf I ve Sınıf IIa Bakteriyosinlerin Aktivite Spektrumu ve Özellikleri

1.3.9.1. Aktivite Spektrumları: Sınıf I bakteriyosinlerin inhibisyon spektrumu oldukça geniştir. Bu sınıf sadece *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* gibi yakın cinslere değil aynı zamanda *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* ve *Clostridium botulinum* gibi diğer Gram pozitiflere karşı da inhibitör etkiye sahiptir. Nisin ve thermophilun 13 gibi bu sınıftaki çeşitli bakteriyosinler, *Bacillus cereus* ve *Clostridium botulinum* sporlarının gelişimini de önler. Acidocin J1132 çok dar inhibitör spektruma sahiptir ve duyarlı suşlar *Lactobacillus* cinsi üyeleriyle sınırlıdır. Sınıf I bakteriyosinlerle karşılaştırıldığında çoğu sınıf II bakteriyosinler daha dar aktivite spektrumuna sahiptir ve sadece yakın ilişkili Gram pozitif bakterileri inhibe eder. Genellikle *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* cinsi üyeleri sınıf IIa bakteriyosinlere duyarlıyken, *Lactococcus* cinsi üyeleri bu bakteriyosinlere dayanıklıdır (25).

Davies ve ark. (40), nisinin raf ömrü üzerindeki etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada, peynir örneklerine 10^2 – 10^3 kob/g *L.monocytogenes* inoküle ederek, 70 gün olgunlaştırılan peynir örneklerinde 2,5 mg/l nisin, peynir türüne bağlı olarak 8 hafta ve üzerinde *L. monocytogenes* üremesini inhibe ettiğini fakat kontrol grubu örneklerinde 1–2 hafta içinde *L. monocytogenes* sayısının peynirde tüketilemeyecek düzeye çıktığını belirtmişlerdir.

Einarsson ve Lauzon (46), karideslerin muhafazasında biyokoruyucu olarak nisin Z, carnocin UI49 ve bavaricin A ile benzoat-sorbit solüsyonunu karşılaştırmışlardır. Karidesler için 10 günlük raf ömrü esas kabul edilmiştir. Carnocin UI49 raf ömründe artış sağlayamamasına karşın, bavaricin A 16 gün, nisin Z ise 31 gün raf ömrü sağlamıştır. Benzoat-sorbit solüsyonu ise 59 günlük bir raf ömrü sağlamaktadır.

Gonzalez ve ark. (56), starter kültür kullanılmadan üretilmiş çeşitli fermente gıdalardan 75 adet *Lactobacillus* türü izole etmişlerdir. İzolatlardan 10 adedi antimikrobiyel etki göstermiştir. İdentifiye ettikleri *Lb. plantarum* tarafından üretilen plantaricin C'nin geniş spektrumlu antimikrobiyel etkili olduğunu ve gıda koruyucu olarak güçlü bir potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Gonzalez ve ark. (57), peynirlerden identifiye ettikleri 395 laktik asit bakterisinin *L. monocytogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* suşlarına karşı antimikrobiyel etkisini test etmişlerdir. Etkili olan izolatların kültürlerinin nötürlenmesi sonrasında katalaz enzimi uygulandığında 395 izolattan sadece 24 adedi (*Lc. lactis ssp. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Leuc. mesenteroides* ve *Leuc. pseudomesenteroides*) antimikrobiyel etkisini korumuştur.

Lewus ve Montville (104), et örneklerinden izole ettikleri bakteriyosinjenik suşların *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı güçlü bir antimikrobiyel etki gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Schillinger ve Lücke (142), et ve et ürünlerinden izole ettikleri 221 adet laktik asit bakterisinin 90 adedinin çeşitli gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyel etki gösterdiğini ve bakteriyosin üreten *Lb. sake*'nin et ürünlerinde *L. monocytogenes*'in inhibisyonu için kullanılabileceğini önermişlerdir.

Todorov ve Dicks (159), bozadan izole ettikleri 40 izolatin antimikrobiyel etkilerini araştırmışlardır. İzolatların, *Lb. casei*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, Klebsiella ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel etkili olduklarının fakat Gram negatif bakterilere karşı sadece *Strep. thermophilus*'un ürettiği thermophilin 81, *Lc. lactis* KCA2386'in ürettiği bakteriyosinin, *Lb. plantarum*'un ürettiği plantaricin 35d ve *Lc. lactis* NK24'ün ürettiği lacticin NK24 bakteriyosininin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Vignolo ve ark.(171), fermente sucuklardan izole ettikleri 100 adet *Lc. lactis* ve *Lb. plantarum* izolatlarının bakteriyosin ürettiği ve bunların özellikle birçok Gram negatif (*E. coli*, Proteus, Serratia, Shigella, Klebsiella, Salmonella, Pseudomonas) bakteriler ile Gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*) bakteriler üzerinde antimikrobiyel etki gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Vaughan ve ark. (169), arpa maltlarından bakteriyosin ürettiğini belirledikleri 8 adet laktik asit bakterisini identifiye etmişlerdir. İzolatların ürettikleri bakteriyosinleri saflaştırıp tanımlamışlardır. İzolatlardan *Lb. sake* ve *Leuc. mesenteroides*'in bir veya birden fazla bakteriyosin ürettiklerini ve sınıf IIa grubuna ait olduğunu belirledikleri bakteriyosinlerin yüksek antilisteriyal etkili olduklarını rapor etmişlerdir.

Aktypis ve ark. (5), *Strep. thermophilus* tarafından üretilen thermophilin T bakteriyosinini saflaştırarak karakterize etmişlerdir. Bakteriyosinin özellikle *Clostridium sporogenes* C22W/20 ve *Clostridium tyrobutyricum* NCDO-1754'e karşı yüksek antimikrobiyel etki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Bromberg ve ark. (20), 285 adet et ve et ürünlerinden 813 adet laktik asit bakterisi izole etmişler. İzolatların 128'inin çeşitli indikatör mikroorganizmalara karşı inhibitör etki gösterdiğini, indikatör suşlar arasında en duyarlı olanın *S. aureus*, en dayanıklısının ise *Enterococcus faecalis* ile *Lb. plantarum* olduğunu belirtmişlerdir.

Budde ve ark. (21), antibakteriyel etkili laktik asit bakterilerini izole edebilmek amacıyla vakum paketlenmiş 48 adet farklı et örneğinden yaklaşık 72.000 adet laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. Bu izolatlar arasında et ürünlerinde istenmeyen aroma bileşikleri oluşturmaksızın en güçlü antilisteriyal etkisi olan suşun *Leuc. carnosus* 1040 olduğu ve bu suşun birbirine büyük benzerlik gösteren iki farklı

bakteriyosin ürettiği ve bu bakteriyosinlerin özelliklerinin leucocin A ve leucocin B bakteriyosinleri ile çok büyük benzerlikler gösterdiği rapor edilmiştir.

Tahiri ve ark. (154), dondurulmuş midyelerden izole ettikleri *Carnobacterium divergens* M35 izolatının ürettiği divergicin M35 bakteriyosini saflaştırarak tanımlamışlardır. Bu yeni bakteriyosinin sınıf IIa bakteriyosin grubuna dahil olduğunu ve molekül ağırlığının 4518,75 Da olduğunu, güçlü bir antilisteriyal etki gösterdiğini ve özellikle *L. monocytogenes*'e karşı yüksek antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu fakat *Escherichia*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus*'lara karşı etkili olmadığını belirtmişlerdir.

Gıda fermantasyonlarında bakteriyosinlerin kullanımı gıdadaki patojen mikroorganizmalar ile çürükçüllerin inhibisyonunda, starterlerin diğerleri ile rekabetinde bir avantaj sağlar. Bakteriyosinlerin hedefi sitoplazmik membrandır. Gram negatif bakterilerin dış membrandaki lipopolisakkaritin koruyucu bariyerinden dolayı bakteriyosinler genellikle sadece Gram pozitif hücrelere karşı etkilidirler. Fermantasyon ortamında asıl hedef *Clostridium* gibi bakterilerin sporları, heterofermantatif *Lactobacillus*'lar ile *L. monocytogenes*, *Staphylococcus ssp.*, *Clostridium*, *Enterococcus* ve *Bacillus ssp.* dahil diğer gıda patojenleridir. Gram negatif bakterilerin hücre geçirgenliği, elektrostatik basınç, yüksek hidrostatik basınç gibi koruma metotları kullanılarak artırılabilir. Buna ilaveten, lipopolisakkarit tabakasında Mg iyonu tutan sitrat, EDTA gibi çelatların kullanılması yoluyla da Gram negatiflerin membranının bütünlüğü bozularak bu bakterilere karşı bakteriyosinlerin etkisi artırılabilir (23, 142).

1.3.9.2 Özellikleri: Bakteriyosinlerin özellikleri birçok çalışmada araştırılmıştır. Farklı sıcaklık, pH, enzim, deterjan gibi değişkenlerin etkilerine karşı ne derece duyarlı oldukları belirlenmiştir. Bu bilgiler gıda ortamında bir katkı maddesi olarak bakteriyosinlerin kullanılabilirliğini etkileyen önemli özelliklerdir.

Todorov ve ark. (160), *Lb. plantarum* tarafından üretildiği belirlenen Bacteriocin AMA-K'nın proteolitik enzim uygulamasıyla antimikrobiyel etkisinin tamamını ya da çok büyük miktarını kaybettiğini, fakat amilaz enzimi uygulamasından etkilenmediğini, Tween-80 ve 20 ile Triton X-14 ile 100'e ve SDS'ye karşı duyarlı olmadığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte bakteriyosin

üretimini, bileşiminden Tween-80 çıkarılmış besiyerinde yapıldığında, antimikrobiyel etkinin %50'sinin kaybolduğunu vurgulamışlardır.

Powell ve ark. (131), *Lb. plantarum* ST8KF'nin ürettiği Bacteriocin ST8KF'nin proteolitik enzimlere duyarlı olduğunu fakat amilaz enzimi uygulaması sonrası aktivitesini kaybetmediğini, pH 2-10 arası değerlerde ve 121 °C'de 20 d ısı uygulamasında aktivitesini koruduğunu, deterjan uygulamalarında ise, SDS, üre, Tween 20-80'e dayanıklı olduğu fakat Triton X100 ve Triton X114 uygulaması sonucu etkisini kaybettiğini belirtmişlerdir.

Ohmomo ve ark. (123), fermente sebzelerden izole ettikleri *Enterococcus faecium* NIAI 157'nin ürettiği enterocin ON-157'nin proteolitik enzim uygulamalarında özellikle α -chymotrypsin ve pepsin etkisiyle tamamen diğer proteolitik enzimlerde ise kısmen aktivitesini yitirdiğini belirtmişlerdir. Aynı bakteriyosin α -amilaz enziminde aktivitesini kaybederken, α -glukozidaz enziminde aktivite göstermiştir. pH 4 değerinde en yüksek aktiviteyi veren bakteriyosin, aynı şartlarda pH 8'de aktivitesini kaybetmiştir.

Albano ve ark. (6), sucuklardan izole ettikleri *P. acidilactici*'nin ürettiği iki farklı bakteriyosinin (Bacteriocin HA-6111-2 ve Bacteriocin HA-5692-3) proteolitik enzimlere, yüzey aktif maddelere, farklı ısı ve pH uygulamalarına karşı hassasiyetlerini inceledikleri araştırmalarında, proteolitik enzim uygulamalarında aktivitelerin tamamen veya kısmen yıkımlandığı fakat amilaz, katalaz enzimlerinden etkilenmediklerini, pH 10'da aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybettiklerini hatta pH 12'de tamamen inaktif olduklarını, 100°C'de 60 d'da aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybettiklerini, 121°C'de 20 d'da ise tamamen inaktif olduklarını bildirmişlerdir.

Todorov ve Dicks (159), fermente bir içecek olan bozadan izole ettikleri *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. paracasei*'nin ürettikleri bakteriyosinlerin proteolitik enzimlerde aktivitelerini tamamen yitirdiklerini fakat amilaz enziminden etkilenmediklerini, pH 2-10 gibi geniş bir pH aralığında aktivitelerinin stabil olduğunu, 30-100°C'de 1 saat ve 121°C'de 20 d ısı uygulamasında aktif kaldıklarını, fakat Triton X-100, Triton X-114 ve tween 80'de aktivitelerini kaybettiklerini buna karşın SDS, Tween 20 ve üreye karşı aktivitelerini koruduklarını belirtmişlerdir.

Campos ve ark. (22), kalkan balığından izole ettikleri *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus faecium* ve *Lc. lactis*'in ürettikleri bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere duyarlı olduğunu ve aktivitelerini kaybettiklerini fakat katalazdan etkilenmediklerini bildirmişlerdir.

Tahiri ve ark. (154), dondurulmuş midyelerden izole ettikleri *Carnobacterium divergens* M35 izolatının ürettiği divergicin M35 bakteriyosinini saflaştırarak tanımlamışlardır. Bu yeni bakteriyosinin 121°C'de 10, 20 ve 30 d ısı uygulaması yapıldığında aktivitesini sırasıyla %50, %75 ve %78,5 kaybettiğini belirtmişlerdir.

Jamuna ve Jeevaratnam (86), geleneksel fermente gıdalardan bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerini tanımlamış oldukları çalışmalarında bakteriyosin ürettiğini belirledikleri iki izolatı, *Lb. casei* ve *Lb. acidophilus* olarak tanımlamışlardır. Bakterilerin ürettiği bakteriyosinler amilaz ve katalaz enzimlerinden etkilenmemiş fakat proteolitik enzim uygulamasında aktivitelerini tamamen kaybetmişlerdir. Isıya stabil olan bu bakteriyosinler, 121°C'de 15 d, 80°C'de 1 saat'lik ısı uygulamalarında aktivitelerini korumuşlardır. pH 3–8 gibi geniş bir pH aralığında aktivitelerini sürdürmüşlerdir.

1.3.10. Bakteriyosinlerin Biyosentezleri ve Etki Mekanizmaları

1.3.10.1. Bakteriyosinlerin Biyosentezleri: Bakteriyosinlerin çoğu biyolojik olarak inaktif prepeptitler şeklinde sentezlenir. Bu prepeptitler C-terminal propeptitlere bağlı olarak bir N-terminal peptit taşır. Lantibiyotikler propeptit bölümlerindeki serin, trionin ve sistein rezidülerinin post-translasyonel modifikasyona uğraması ile Lan/MeLan formuna dönüşür. Lantibiyotiklerin biyosentetik yolu genel bir şemayı izler; prepeptit oluşumu, modifikasyon reaksiyonları, öncü peptidin proteolitik olarak ayrılması ve modifiye prepeptidin translokasyonu veya olgun propeptidin sitoplazmik membrandan geçişi. Öncü peptidin ayrılması hücrenin dışına verilmesinden önce, sonra veya sırasında gerçekleşebilir (25).

Bakteriyosinler, prebakteriyosinler olarak ribozomlarda sentezlenir. İnaktif halde sentezlenen bu prebakteriyosinlerin aktif forma geçmeleri için N- terminal uçlarının uzayıp yapışık form alması gerekmektedir (165).

Lantibiyotiklerin biyosentetik genleri *Lan* sembolü ile gösterilir. Gen ürünleri şu şekilde sınıflandırılır. Prepeptit (Lan A), modifikasyon enzimi (Lan B, C / Lan M, Lan D ve Lan J), yöntem proteazı (Lan P ve Lan T) ABC taşıyıcı (Lan T), bağışıklık proteini (Lan FEG, Lan I ve Lan H) ve düzenleyici protein (Lan R, Lan K, Lan Q ve Lan X). Lantibiyotiklerin alt tip gruplandırılmalarına göre genetik organizasyonu iki sınıfa ayrılmıştır; Tip A(1) lantibiyotikler Lan B, C, T ve Lan P'den oluşurken, Tip A(II) ve Tip B lantibiyotikler Lan M ve T'den oluşur. Lantibiyotiklerin biyosentetik gen grupları kromozomlarda veya büyük plazmidler içerisine yerleşmiştir (116).

1.3.10.2. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizmaları: Bakteriyosinlerin, duyarlı hücrelere olan etki tarzları bakteriyostatik veya bakteriyosidal şeklindedir. Bu tanımlamaya göre bakteriyosinlerin etki tarzlarını ve etki kapasitelerini birçok faktör değiştirebilmektedir. Bunlar arasında bakteriyosinin saflık derecesi, bakteriyosinjenik suşun fizyolojik durumu ve deneysel şartlar (pH, ısı, diğer antimikrobiyel bileşikler vs) sayılabilir. Bakteriyosinlerin bakteriyosidal aktiviteleri duyarlı hücrelerin lizisine dayanır. Bu tür etkili bakteriyosinler, bakteriyolitik bakteriyosinlerdir (27).

Bakteriyosinler bakteriyosidal etkilerini duyarlı hücrelerin membranlarında permeabilitelerine ve destabilizetelerine bağlı olarak gerçekleştirirler (84).

Tip A lantibiyotikler esas olarak duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranlarında por şekillendirirken, Tip B lantibiyotikler duyarlı hücre metabolizmasının esansiyel enzimatik bileşiklerini hedef alırlar. Sitoplazmik zarıda oluşturulan porlardan intraselüler moleküllerin kaybı olur. Bu durumda glutamat, ATP gibi birçok önemli fonksiyona sahip moleküller hücre membranı dışına çıkar ve membranın iyon dengesi bozulur. K⁺ iyonları membran dışına sızar ve amino asit inhibisyonu gerçekleşir. Böylelikle birçok yaşamsal fonksiyon bloke olur. pH değerindeki düşüşe bağlı olarak glikolitik denge bozulur. ATP'nin hidroliziyle tüm yaşamsal faaliyetler durur ve hücre ölür (162).

1.3.11. Bakteriyosinlerin Üretimini ve Aktivitelerini Etkileyen Faktörler

Bakteriyosinlerin üretimi ve aktivitesini etkileyen çok fazla sayıda etken mevcuttur. Fakat bunlar arasında en önemli etkiyi gösterenler bakteriyosinogenik suşun fizyolojik durumu, bakteriyosinin saflık derecesi, besi ortamı ve ortamdaki diğer antimikrobiyel bileşiklerin varlığı ve fermantasyon şartları diye sıralanabilir.

Mikrobiyel Suş: Bakterinin bir türü veya aynı türe ait suşu tek bir bakteriyosin üretebileceği gibi birden fazla bakteriyosinde üretebilmektedir. Buna karşın bir bakteriyosin birden fazla tür veya suş tarafından sentezlenebilmektedir. Bakteriyosin üretimi suşun genetik ve biyokimyasal özelliklerine bağlıdır (21, 117, 128).

Besi Ortamı: Bakteriyosin üretimi ortamdaki karbon, azot ve fosfat, kationlar, surfaktanlar ve inhibitör maddelerin türüne ve miktarına bağlı olarak değişmektedir. Bakteriyosinler karbon kaynağı olarak kullanılan şekerlerin türüne bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda sentezlenebilmektedir. Bakteriyosin üretiminde karbon kaynaklarından ziyade organik azot kaynakları çok daha etkilidir. (128). Biswas ve ark. (13), pediocin AcH'nin optimum üretimi için en iyi karbon kaynağının glukoz olduğunu, glukozu ise sukroz, ksiloz ve galaktozun izlediğini belirtmişlerdir.

Fermantasyon Şartlarının Etkisi: Laktik asit bakterilerinin üremesinde ve bakteriyosin üretiminde pH ve sıcaklık değerlerinin kontrolü çok önemli bir etkiye sahiptir (128). Nisin Z'nin farklı sıcaklık derecelerinde farklı aktivite gösterdiği belirtilmiştir. *L. monocytogenes* inhibisyonu için Nisin Z'nin minimum inhibisyon değeri 7°C'de 400 µg/l iken 30°C'de 1200 µg/l'dir. *L. innocua* için ise 7°C'de 800 µg/l iken 30°C'de 400 µg/l'dir (1).

1.3.12. Bakteriyosinlere Direnç Mekanizması

Gıda güvenliği için yeni koruyucular bulunduğu için, bu koruyucuların kullanımı ile patojenler üzerinde gelişebilecek direnç mekanizması çok önem kazanmıştır. Bakteriyosinlerden lisanslı olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosin nisindir. Bu nedenle yapılan pek çok çalışmada nisin incelenmiştir.

Bakteriyosinlere direnç mekanizması da nisin üzerinde yapılan denemeler ile araştırılmıştır. Bakteriyosinler antibiyotiklerden farklı bir yapıya sahiptirler. Birçok antibiyotiğe karşı yüksek direnç kazanmış patojenler üzerinde bakteriyosinlerin direnç mekanizması ilgi odağı olmasına karşın bu konuda yeterli sayıda çalışma mevcut değildir. Her antimikrobiyel bileşikte olduğu gibi, direnç konusu bakteriyosinler için de mutlaka değerlendirilmesi gereken bir konudur. Her ne kadar tüm bakteriyosinler için bu mekanizmaların nasıl işlediği bilinmese de, düşük molekül ağırlıklı bakteriyosinlerin çoğunun bakteriyel membran ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle direnç genellikle bakteriyosinin hedeflediği bakterinin membranındaki değişikliklere bağlı olarak şekillenmektedir (149).

Ming ve Daeschel (112), tarafından yürütülen çalışmalar, *L. monocytogenes* Scott A'nın minimum inhibisyon konsantrasyonundaki nisine 2–8 defa maruz kalması halinde, 10^6 – 10^8 frekansında nisin direnci geliştirdiğini göstermiştir. Direnç, *Bacillus cereus* için belirtildiğinin aksine pasiftir, fakat nisin ve diğer bakteriyosinlere karşı gelişen direncin sıklığı, gıdaların korunması amacıyla kullanımı ile boy ölçüşecek düzeydedir. Antibiyotiklerin ve bakteriyosinlerin etki mekanizmaları birbirinden farklıdır. Bu konuda yapılan bir çalışmada birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanmış mikroorganizmalara 400 IU/ml nisin uygulandığında organizmalarda herhangi bir direnç gelişmediği, nisine karşı duyarlılıklarını korudukları belirtilmiştir (144).

Antibiyotik dirençliliği genellikle, genetik determinant ile türler, suşlar ve hücreler arası dirençliliğin transfer edilebilmesiyle alakalıdır. Fakat antibiyotik dirençliliğinin aksine bakteriyosin dirençliliği hedef hücre membranında fizyolojik değişiklikler sonucu gerçekleşir. Nisin dirençliliği için hücre membran bileşiklerinde değişiklik gözlemlendiği, enzimlerin ve nisini parçalayan nisinaz enziminin bazı mutantlar ürettiği belirtilmiştir (35, 135).

1.4. GIDA SANAYİNDE BAKTERİYOSİN UYGULAMALARI

Modern gıda üretim tekniklerinde güvenilir, sağlıklı ve raf ömrü uzun gıdalar üretmek esas hedeftir. Son zamanlarda gıdalarda kullanılan kimyasal koruyucuların bilinen ve/veya olası yan etkilerinden dolayı tüketiciler ciddi bir endişe içerisindeyler. Bu nedenle insanlar artık daha doğal ürünlere yönelmişlerdir. Araştırmacılar doğal ürünlere olan ilgiyi fark edince gıdanın üretim aşamalarını kolaylaştıracak, gıdanın raf ömrünü uzatacak doğal ve etkili koruyucu maddelerin gıda üretiminde kullanılabilirliği üzerine çok sayıda araştırma yapmaktadırlar. Bu doğal koruyucuların başında gelen ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler son zamanların en çok araştırılan ve ilgi duyulan biyokoruyuculardır.

Bakteriyosinlerin aktiviteleri gıdanın fiziksel özelliklerine ve kimyasal kompozisyonuna bağlıdır. Her ne kadar bakteriyosinlerin birçok gıda sisteminde koruyucu olarak uygulamaları denense de bakteriyosinlerin tek başına koruyucu olarak kullanımlarında bir engeller sistemiyle karşılaşmaktadır. Bakteriyosinlerin gıdalarda uygulamalarını sınırlayan en büyük engel, onların sınırlı aktivite spektrumları ve antibakteriyel etkilerinin az olmasıdır. Ayrıca genellikle Gram negatif bakterilere karşı aktif değildirler. Bu nedenle bakteriyosinler çoğu gıda üretim yöntemlerinde koruyucu olarak tek başına yetersiz kalmakta ve kombine bir sistemle bakteriyosinlerin aktiviteleri arttırılmaktadır. Buna göre Gram negatif bakterilerin dış membranlarının geçirgenlik bariyerleri etkisiz hale getirilirse bakteriyosinlerin Gram negatiflere etkilerinin artacağı belirtilmiştir. Örneğin, Gram negatiflerin dış membranlarında lipopolisakarit tabakadaki magnezyum iyonlarını bağlayan EDTA gibi çelat ajanları kullanılırsa, nisinin sitoplazmik zara geçişi sağlanabilir (25, 29).

Bakteriyosinler hedef mikroorganizmalara karşı laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda etkili olmasına karşın gıda ortamında etkisiz kalabilmektedir. Gıdalardaki birçok faktör bakteriyosinlerin aktivitelerini azaltmakta veya tamamen yıkımlamaktadır. Sınıf I ve sınıf II bakteriyosinler genellikle ısıya dayanıklıdır, fakat gıdalarda bulunan proteolitik enzimlerle inaktive olmaktadır. Çoğu bakteriyosin hidrofobik karakterli olup gıdadaki yağlar ve fosfolipitler tarafından tutulmaktadır (149).

Bakteriyosinler gıdalarda koruyucu olarak farklı yöntemlerle kullanılabilir. Fermente gıdalarda starter kültür olarak bakteriyosin üretici suşların kullanılması veya gıdanın yüzeyinde istenmeyen mikroorganizmaların üremesini engellemek için gıda yüzeyine koruyucu kültür olarak uygulanmaları kullanılan yöntemler arasındadır. Bir diğer uygulama ise, bakteriyosinlerin saf olarak veya kısmi saflaştırılmış konsantreleri halinde gıdaya uygulanmalarıdır (162).

Son yıllarda özellikle gıdalardan identifiye edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretebilme yetenekleri ve onların ürettiği bakteriyosinlerin tanımlanması yönünde araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan çoğu çalışma sonucu bakteriyosinlerin başta Gram pozitif mikroorganizmalar olmak üzere birçok patojene karşı bakteriyosidal ve bakterisit etki gösterdiği bildirilmektedir. Fakat gıda ortamında bakteriyosinlerin antimikrobiyel etkilerini araştıran çalışmalar göstermiştir ki; bakteriyosinlerin laboratuvar ortamındaki etkileri ile canlı sistemlerdeki etkileri çok farklılık göstermektedir. Dolayısıyla direk olarak gıda uygulamalarında aynı başarı söz konusu olmamaktadır (78).

1.4.1. Et Ürünlerinde Bakteriyosinler

Gıda kaynaklı pek çok zehirlenmede et ve ürünlerinin neden olduğu vakalar bilinmektedir. Özellikle geleneksel yöntemlerle üretilmiş fermente et ürünlerinde ve kanatlı etlerinde bu durum daha ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Kanatlı etlerinde ve et ürünlerinde mikrobiyolojik kaliteyi belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda bu bilgi çok daha net şekilde karşımıza çıkmaktadır (62, 63, 65).

Fermente sucuk üretiminde istenilen kırmızı rengin oluşması için ve özellikle *Clostridium botulinum* inhibisyonu için et ürünlerine katılan nitrit, etlerde sekonder aminlerle reaksiyona girerek karsinojenik nitrozaminler oluşturmaktadır. Bu olumsuz etkisi düşünüldüğünde et ürünlerinde kullanılan yüksek miktarlardaki nitrit hakkındaki endişelerden dolayı araştırmacılar nisin, nitritin tamamıyla olmasa da bir kısmı yerine kullanılabileceği üzerine çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Yüksek miktarlarda nisin *Clostridium botulinum* üzerinde oldukça etkilidir. Fakat yüksek miktarlarda nisin kullanımı ekonomik değildir (41). Pek çok ülkede gıdalara NO₂ (nitrat)'nin

200 mg/kg'dan, NO₃ (nitrit)'ün 500 mg/kg'dan fazla katılmaması yasal olarak belirtilmiştir (11).

Rayman ve ark. (132), 3000 IU/g nisin ve 40 ppm nitrit kombinasyonunun ette 37°C'de 56 gün *Clostridium sporogenes* sporlarını inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Erol ve ark. (48), bakteriyosin üreten *P. acidilactici* PCA 1.0 ile *Lb. sake* LB706 starter kültürlerinin ilavesi ile farklı sıcaklıklarda olgunlaştırılan fermente Türk sucuklarında *L. monocytogenes* inhibisyonunu araştırmışlardır. Bakteriyosin üreten kültürlerin ilavesiyle inokülasyon dozu 10⁵ kob/g olan *L. monocytogenes*'in olgunlaştırma periyodu sonunda 0,036–0,3 EMS/g seviyesine kadar düştüğü ve etkin bir korumanın sağlanabildiği belirtilmiştir.

Budde ve ark. (21), vakum paketlenmiş et örneklerinden izole ettikleri *Leuc. carnosum* 4010 suşunun güçlü bir antilisterial etkiye sahip olduğunu ve et ürünlerinin muhafazasında koruyucu olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Deneysel olarak üretilmiş vakum paketlenmiş sucuklara 10⁷ kob/g seviyesinde *Leuc. carnosum* ilave ettiklerinde *L. monocytogenes* sayısında çok ciddi ve hızlı bir azalma olduğunu belirten araştırmacılar, aynı zamanda 5°C'de 21 günlük muhafaza süresince de *L. monocytogenes* sayısında bir artış gözlemediklerini rapor etmişlerdir.

Nielsen ve ark. (119), bakteriyosin üreten *P. acidilactici*'in taze etlerde *L. monocytogenes* üzerine bakteriyosidal etkiye sahip olduğunu, buzdolabında 28 günlük muhafaza boyunca bakteriyosinin patojene karşı stabil bir koruma sağladığını ve patojeni inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Nisinin et ürünlerinde gösterdiği başarı süt ürünlerindekiyle karşılaştırıldığında farklı sonuçlar gözlenir. Nisin et ürünlerinde başarılı bir koruyucu değildir. Bunda birçok etken söz konusu olabilmektedir. Ette nisinin çözünürlüğünün azalması ve stabilitesini koruyamaması başta gelen nedenlerdir. Ayrıca kullanılan bakteriyosin miktarı incelendiğinde ekonomik sorunlarla karşılaşmaktadır. Aynı zamanda bazı laktik asit bakterileri üreme döneminin başında bakteriyosin üretirken bazıları bu dönemin sonunda bakteriyosin üretmektedir (78).

Fang ve Lin (49), domuz etinde bakteriyosinin tek başına kullanımı yerine modifiye atmosfer ile kombine kullanımının *L. monocytogenes* ile *Pseudomonas fragi* üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada nisinin modifiye atmosfer (%100 CO₂; %80 CO₂ + %20 hava) ambalajlama ile birlikte kullanılmasının çok

etkili olduğu bulunmuştur. Modifiye atmosfer ve nisin (10^3 , 10^4 IU/ml) her iki organizmayı da inhibe etmiştir ve bu kombinasyonun inhibitör etkisinin 4°C 'de 20°C 'ye göre daha belirgin olduğu belirtilmiştir.

Nisin ve pediocinin yanı sıra diğer laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri de *Listeria* üremesinin kontrolüne yönelik araştırmalarda denenmiştir. Laukova ve ark. (101), *L. monocytogenes* ile kontamine ettikleri fermente kuru salamlarda enterocin CCM 4231'in etkisini test etmişlerdir. İlave edilen enterocinin *L. monocytogenes* sayısını hızlı bir şekilde $1,7\text{-log}_{10}$ seviyesine düşürdüğünü belirlemişlerdir (inoküle edilen miktar 10^8 kob/ml). Salamda olgunlaşmanın ilk haftasından sonra kontrol grubunda *L. monocytogenes* sayısı 10^7 kob/g olmasına karşın bakteriyosin ilaveli grupta bu sayı 10^4 kob/g olarak belirlenmiştir. Olgunlaşmanın 2. ve 3. haftalarında da sayılardaki bu farklılık devam etmiştir.

1.4.2. Süt Ürünlerinde Bakteriyosinler

Beslenme açısından büyük önem taşıyan süt ve süt ürünlerinin tüketimi sonucu meydana gelebilen gıda kaynaklı zehirlenmelerin etkenlerinin başında *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 gelmektedir. Yapılan pek çok çalışma göstermiştir ki, üretimden tüketime kadar her aşamada bu gıdaların patojenlerle kontaminasyon riski yüksektir (59, 60). Bakteriyosinjenik suşların veya direk olarak bakteriyosinlerin koruyucu olarak bu gıdaların üretiminde kullanımı büyük ilgi çekmektedir.

Peynir yapımında kullanılan süt tozu, peynir altı suyu tozu, emülsifiye edici ajan olarak fosfat ya da sitrat tuzları çoğunlukla *Clostridium* sporlarıyla kontamine edilmiştir. Bu sporlar $85\text{-}100^\circ\text{C}$ 'de 6–10 d ısı uygulamasında canlı kalabilmektedirler. Peynir üretim tekniklerinde pH (5,6–6,0) ve nem içeriği, düşük redoks potansiyeli (anaerobik ortam) sporların vejetatif hale geçmesinde ve üremesinde en uygun şartlardır. *Clostridium* sporu (yaklaşık 200 spor/gr) ile kontamine edilerek üretilen peynirlerde 6,5 mg/kg nisin uygulamasıyla 37°C 'de depolama süresince bozulma önlenmiştir. 2,5 mg/kg nisin içeren örneklerde kısmi başarı sağlanmışken, kontrol örneklerinde (nisinsiz) bozulma olmuştur (41).

Davies ve ark. (40), 6-8°C'de uzun bir muhafaza süresi (70 gün) boyunca Ricotta tipi peynirlerde *L. monocytogenes* kontrolü için nisin'in etkisini araştırmışlardır. 2,5 mg/l nisin ilavesi 8 hafta ve daha fazla (peynir türüne bağlı olarak) bir süre için *L. monocytogenes* üremesini inhibe edici etki göstermiştir. Kontrol peynirlerinde 1-2 hafta depolama sonrası mikroorganizma sayısı güvensiz seviyelere ulaşmıştır.

Rodriguez ve ark. (137), *Lc. lactis* ve *P. acidilactici* ile bunların ürettiği bakteriyosinleri ve patojenleri (6 log kob/ml) inoküle ederek ürettikleri peynirlerde olgunlaşma boyunca gıda patojenlerinin inhibisyonunu araştırmışlardır. Muhafazanın 30. gününde sadece patojen inoküle ettikleri peynirlerde patojenlerin 5-4 log kob/g'a düştüğünü, bakteriyosinli starter katılan peynirlerde ise sayının 2-0 log kob/g'a düştüğünü ve özellikle pediocinin tüm olgunlaştırma periyodu boyunca etkisini koruduğunu belirtmişlerdir.

Rodriguez ve ark. (136), çiğ sütlerden yapılan peynirlerde *E. coli* O157:H7'nin inaktivasyonunda yüksek basınç ve bakteriyosin uygulamasının kombine etkisini araştırmışlardır. Süte inoküle ettikleri patojenin (10⁶ kob/ml) 60 gün sonunda kontrol örneklerinde 5,1 log kob/g'a düştüğünü, bakteriyosin katılmadan basınç uygulanan (300 MPa'da 50 gün) peynirlerde bu sayının 3,8 log kob/g olduğunu, hem basınç hem bakteriyosin uygulaması sonucunda ise sayının 2 log kob/g olduğunu belirtmişlerdir. Bu kombine sistemin güvenilir olduğunu rapor etmişlerdir.

1.4.3. Deniz Ürünlerinde Bakteriyosinler

Birçok araştırmacı, vakum ambalajlanmış soğuk tütülenmiş somon balığında *L. monocytogenes* üremesini kontrol için koruyucu kültür ve bakteriyosinin etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Salamura karideslerin raf ömrünü uzatmak için kullanılan tipik yöntem sorbik ve benzoik asit ilavesidir. Bu organik asitlerin kullanımından kaynaklanan endişe nedeniyle araştırmacılar, bakteriyosinlerin koruyucu olarak kullanılabilirliğini incelemişlerdir (25).

Einarsson ve Lauzon (46), karidesin muhafaza süresini uzatmak için nisin Z, carnocin U149 ve ham bavaricin A'nın etkilerini test etmişlerdir. Carnocin U149 ilavesinin, kontrol grubu (10 gün muhafaza edilmiş) ile karşılaştırıldığında raf ömrü

üzerinde bir etki göstermediği, buna karşın bavaricin A'nın ise raf ömrünü 16 güne çıkardığını belirlemişlerdir. Nisin Z ise 31 gün muhafazaya olanak vermiştir. Benzoat-sorbat solüsyonu ise 59 günlük muhafaza süresinde en iyi korumayı sağlamıştır.

Brillet ve ark. (19), tütülenmiş somon balığında *L. monocytogenes*'e karşı biyokoruyucu olarak *Carnobacterium divergens* kullanarak başarılı bir koruma sağlanabileceğini belirtmişlerdir.

1.4.4. Ambalaj Materyalinde Bakteriyosinler

Son on yıldır, bakteriyosinlerle ambalaj materyalinin birleştirilmesi suretiyle çürükçül ve patojenlerin kontrolü üzerine çok etkin çalışmalar yapılmıştır. Et ve peynir gibi gıdaların yüzeyi ile direk temas eden antimikrobiyel ambalajlama materyali gıda yüzeyinde mikrobiyel gelişmeyi önler. Bu yöntemde materyal ile gıda yüzeyi mutlaka temas etmek zorunda olduğundan bakteriyosin yüzeye difüze olur. Bakteriyosinin ambalaj materyalinden gıda yüzeyine kademeli salınımı, gıdaya bakteriyosinin spreyle uygulanmasından veya gıdanın bakteriyosin çözeltisine daldırılmasından çok daha avantajlıdır. Spreylemede antimikrobiyel aktivite gıda bileşenleriyle ya da gıdaya nüfuz edebilen miktarına bağlı olarak azalabilir veya tamamen kaybolur (25).

1.4.5. Bakteriyosin Uygulamalarındaki Engeller

Yapılan çalışmalar ve var olan bilgiler göstermiştir ki, koruyucu kültürlerin ve doğal antimikrobiyellerin gıda sanayinde kullanımlarında güvenilirliklerini ve etki kapasitelerini etkileyen bir takım engeller mevcuttur. Bu etkenlerin en büyüğü, hedef kitle veya hedef sistemin gıda olmasıdır. Canlı bir sistem olan gıda ortamında çok sayıda faktör bakteriyosinlerin aktivitesine etki gösterir ve bu faktörlerin hepsini aynı zamanda kontrol altına almak oldukça zordur.

Bakteriyosin üreten mikroorganizmaların veya direkt olarak bu kültürlerin ürettiği bakteriyosinlerin gıda sanayinde kullanımlarını sınırlayan faktörler sıralanacak olursa (76);

- Adaptasyon
- Ürün grubuna ait faktörler,
- Dayanıklılık ve rekabet gücü
- Yöntem parametrelerine duyarlılık
- Metabolik aktivite
- Gıda sistemindeki gereklilikler (İnaktivasyon riski)
- Duyusal özelliklere muhtemel olumsuz etkiler
- Bakteriyosin gibi spesifik antibakteriyel faktörler
- Aktivite spektrumu,
- İnaktivasyon (Spesifik proteazlar vs)
- Katı materyalde difüzyonun sınırlı olması
- Dirençlilik gelişimi, gıda bileşenleriyle spesifik olmayan bağlanma (Lipitlerin neden olabileceği inaktivasyon)

Bakteriyosinlerin gıdalarda uygulamalarını sınırlayan en büyük engel, onların sınırlı aktivite spektrumları ve antibakteriyel etkilerinin az olmasıdır. Ayrıca genellikle Gram negatif bakterilere karşı aktif değildirler. Bu sorunlara çözüm bulmak için araştırmacılar gıda güvenliğini ve raf ömrünü arttırmak için engeller teknolojisi kavramını kullanmışlardır (25). Engeller teknolojisi mikroorganizma üremesini inhibe etmek için farklı koruyucu yöntemlerin bir arada kullanılmasını içerir. Bu teknolojinin temel prensibi, gıda sistemlerindeki engellerin yanı sıra tüm işlem aşamalarında oluşabilecek engelleri ortadan kaldırmaktır (29).

Bakteriyosinlerin büyük bir çoğunluğu Gram pozitif bakteriler üzerinde büyük bir antimikrobiyel etki göstermesine karşı Gram negatif bakteriler üzerinde etkisizdir. Buna göre Gram negatif bakterilerin dış membranlarının geçirgenlik bariyerleri etkisiz hale getirilirse bakteriyosinlerin Gram negatiflere etkilerinin artacağı belirtilmiştir. Örneğin, Gram negatiflerin dış membranlarında lipopolisakkarit tabakadaki magnezyum iyonlarını bağlayan EDTA gibi çelat ajanları kullanılırsa nisinin sitoplazmik zara geçişi sağlanarak antimikrobiyel etkinliği artırılabilir (1).

Tablo 14'de engeller teknolojisinde bakteriyosinlerin aktivasyonunu arttıran yöntemler verilmiştir (25).

Tablo 14. Gıda Güvenlik Zincirinde Engeller (Hurdling) Teknolojisi (25)

| Bakteriyosin | İnaktivasyon Etkisi | Referans |
|---|--|------------------------------|
| Isıyla Kombinasyon | | |
| Nisin | Nisin (1000IU/g) ve hafif ısı uygulaması (60-65°C) ile ıstakozda <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonu | Budu-Amoako ve ark.1999 |
| Nisin | Nisin (500-2500IU/g) ve hafif ısı uygulaması (55°C) ile <i>S. enteritidis</i> inaktivasyonu | Boziaris ve ark.1998 |
| Nisin, pediocin AcH | Her iki bakteriyosinin ve sublethal baskı uygulanması ile Gram(-)/Gram(+) bakterilerde canlı hücre sayısında azalma | Kalchayanand ve ark.1992 |
| Çelat Ajanlarıyla Kombinasyon | | |
| Nisin | EDTA, sitrat ya da laktat ile nisin (2000IU/g) ve modifiye atmosfer (MAP) ambalajlama, Gram(-) bakterilere (<i>S. typhimurium</i> ve <i>E. coliO157:H7</i>) karşı etkilidir. | Cutter ve Siragusa, 1995 |
| Nisin | MAP, düşük ısı ve Nisin (400IU/g) <i>L. monocytogenes</i> lag fazında azalma, 1250IU/g seviyesinde nisin kullanıldığında ise üremede inaktivasyon | Szabo ve Cahil, 1998 |
| Nisin | MAP (%100 CO ₂ , %80 CO ₂ + %20 hava) ve nisin (1000 ya da 10000IU/g) <i>L. monocytogenes</i> ve <i>Pseudomonas fragi</i> üremesini inhibe eder. | Fang ve Lin, 1994 |
| Antimikrobiyellerle Kombinasyon | | |
| Nisin | %0,3 potasyum sorbat ile nisin (400IU/g) <i>L. monocytogenes</i> üremesini inhibe eder. | Buncic ve ark. 1995 |
| Pediocin AcH | %0,3-0,5 sodyum diasetat ile pediocin nisin (5000IU/g) <i>L. monocytogenes</i> üremesini inhibe eder. | Schlyter ve ark. 1993 |
| Nisin | Sukroz, yağ asitleri ve nisinin sinerjistik etkisi Gram(+)'leri inhibe eder. | Thomas ve ark. 1998 |
| Nisin | CO ₂ ve nisin, <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı sinerjistik etki gösterir. | Nilsson ve ark. 2000 |
| Nisin | Carvacrol (0.3mmol/l), nisin (6 IU/ml) kombinasyonu, nisin tek başına etkisine göre <i>Bacillus cereus</i> sayısını azaltmada daha çok etkilidir. | Periago ve ark. 2001 |
| Nisin | Monolaurin (0.25mg/l) ile nisin (100 IU/ml) kombinasyonu, sütte <i>Bacillus ssp.</i> 'nin vejetatif hücrelerine karşı sinerjistik etkilidir. | Mansour ve Milliere, 2001 |
| Laktoperoksidaz Sistemle Kombinasyon | | |
| Nisin | Laktoperoksidaz sistem ve nisin (100 ya da 200 IU/ml), <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı bakteriasidal etki gösterir | Boussouel ve ark. 2000 |
| Nisin | Laktoperoksidaz sistem ve nisin (10 ya da 100 IU/ml), yağsız sütte <i>L. monocytogenes</i> 'in inaktivasyonunda sinerjistik etki gösterir | Zapico ve ark. 1998 |
| Diğer Bakteriyosinlerle Kombinasyon | | |
| Pediocin AcH | Lacticin 481, lacticin F, pediocin AcH nisinle birlikte kullanıldığında sinerjistik etki gösterir. | Mulet- powell ve ark.1998 |
| Leucocin F10 | Nisin ve leucocin F10 kombinasyonu <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı çok etkilidir. | Parente ve ark. 1998 |
| Curvaticin | Nisin (50 IU/ml), ve curvaticin 13 nisin (160 AU/ml), aynı anda ilavesinde, tek başına yaptıkları etkiye göre <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı daha fazla etkililerdir. | Bouttefroy ve Milliere, 2000 |

1.5. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanılabilen antimikrobiyel etkili maddelerin belirlenmesinde fazla sayıda farklı yöntemler mevcuttur. Hem yöntemlerin farklılığı hem de antimikrobiyel maddelerin farklılığı yapılan araştırma sonuçlarının karşılaştırılmasında sorunlar çıkarabilmektedir. Bu nedenle standart bir analiz yönteminin geliştirilmesi büyük bir ihtiyaçtır. Fakat var olan veriler değerlendirildiğinde her antimikrobiyel maddenin aktivite spektrumunun farklı olması, etki tarzının değişkenliği, kullanılan patojenlerin veya hedef mikroorganizmaların farklı olması gibi birçok etken bu standart yöntemin bulunmasında en büyük engellerdir. Antimikrobiyel etki testlerinde sonuçları etkileyen birçok faktör mevcuttur. Öncelikle gıda ortamında yani canlı sistemde yapılan çalışmalar ile laboratuvar şartlarında yapılan araştırmalar arasında büyük farklılıklar göze çarpmaktadır. Canlı sistemlerde antimikrobiyel maddenin etkisini sınırlayan birçok etken mevcuttur ve canlı sistemlerde bu faktörlerin birçoğunu aynı anda kontrol etmek imkansız denecek kadar çok zordur. Laboratuvar ortamında ise gıdaya kıyasla ortam şartları çok daha kolay kontrol edilebilmektedir. Kullanılan besiyerlerinin bileşimi ve pH değerleri, inkübasyon ısıları, inoküle edilen miktar, seçilecek patojen gibi. Yapılacak denemelerde mutlaka tüm etkenlerin belirlenip kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu şekilde daha doğru sonuçlar elde etmek mümkün olacaktır (39).

Antimikrobiyel etki denemelerinde özellikle kullanılacak antimikrobiyel maddenin miktarı ve konsantrasyonu en büyük etkidir. Kullanılan çoğu yöntemde istatistiksel olarak oluşturulan ve MIC olarak belirtilen bir değer hesaplanır. MIC değeri antimikrobiyel maddenin farklı miktarlarının denendiği çalışmalar sonucu belirlenen, hedef mikroorganizmanın gelişmesini önleyen en düşük konsantrasyondur. Davidson ve Parish (39), antimikrobiyel etkili bileşiklerin gıda kaynaklı mikroorganizmalar üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde çok sayıda yöntem olduğunu fakat bu yöntemlerinin hiç birinin standart olmadığını ve sonuçların çok sayıda faktöre bağlı olarak değişebileceğini belirtmiştir. Test sonuçları, antimikrobiyel aktivitesi test edilecek mikroorganizmanın cinsi, türü ve

susu; test yönteminde kullanılacak olan besiyeri veya gıda ortamına; antimikrobiyel maddenin saflaştırma aşamasında uygulanabilecek işlemlere (sterilizasyon, membran filtrasyon, ısı vs); kullanılacak çözücü maddelere ve antimikrobiyel maddenin saflık derecesine; atmosfer şartlarına (Anaerobik- aerobik); ortamın pH değerlerine bağlı olarak değişmektedir.

1.5.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

Yapılan birçok çalışmada bakteriyosinlerin özellikle patojenler başta olmakla birlikte çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktiviteleri test edilmiştir. Özellikle gıda kaynaklı patojenler üzerinde çalışılmaktadır. Antibakteriyel aktivitesi belirlenecek bakteriyosin üreten mikroorganizmaların hem aktif kültürü hem de MRS Broth içerisinde üretilerek, santrifüj edilmesi ile ayrılan süpernatantlarının indikatör mikroorganizma üzerindeki antibakteriyel etkisinin belirlenmesi prensibiyle en çok kullanılan yöntemlerin başında kuyucuk difüzyon yöntemi, agar disk difüzyon yöntemi ve mikrotiter yöntemi gelmektedir. Yöntemlerin değerlendirilmesinde gözlemlenen zonların değerlendirilmesi, zon çapının büyüklüğüne göre yapılabilmektedir. Fakat bu ölçümler tamamen nitel sonuçlar vermektedir. Zon çapı 30-35 mm'den küçük olduğunda hedef mikroorganizma duyarlı, 20-30 mm çapından bir zon orta seviyede duyarlılığı, 15-20 mm'den küçük zonlar veya hiç zon olmayışı ise hedef mikroorganizmanın test edilen antimikrobiyel maddeye karşı dirençli olduğunu göstermektedir (130).

a. Kuyucuk Difüzyon Yöntemi (Turbidite): Yöntemde agar yüzeyine 10^6 kob/ml olacak şekilde hedef mikroorganizma ekilmiş besiyeri yüzeyine kuyucuklar açılır. Kuyucukların dibi birer damla agar ile kapatılır. Antimikrobiyel etkisi belirlenecek olan izolatların MRS Broth içerisinde 18 saatlik aktif kültürleri hazırlanır. Kuyucuklara 100-500 µl aktif kültür konulduktan sonra 30°C'de 24-48 saat inkübe edilir. Zon veren izolatlar belirlenir. Süre sonunda petrielerde oluşan inhibisyon zonu bir kumpas yardımıyla ölçülür (153, 171).

b. Agar Disk Difüzyon Yöntemi: Hedef mikroorganizmalar ve laktik asit bakterilerinin bir gecelik taze kültürleri hazırlanır. Hedef mikroorganizma ekilmiş besiyeri yüzeyine 6 mm çaplı kağıt diskler yerleştirilir. Disklere emdirilen laktik asit bakterilerinin kültür brothlarının patojen bulunan petrideki besiyeri üzerinde iyi bir şekilde difüze olabilmesi için, diskler yerleştirildikten sonra petriyerler düz olarak 5°C’de 2 saat bekletilir ve sonra ters çevrilerek 37°C’de 24–30 saat inkübe edilir. Disk etrafında zon oluşumu gözlemlenir (22, 173).

c. Mikrotiter Yöntemi: Mikrotiter plaklarına 100 µl Mueller Hinton Broth konulur. Test mikroorganizmalarının $A_{600} = 0,1$ değerini veren dilüsyonu belirlenerek mikrotiter plaklarına 50 µl konulduktan sonra üzerine 50 µl süpernatant konulur. 30°C’de 24 saat inkübe edilir. Hazırlanan plakların, kuyucuklara konulan pozitif (süpernatantsız) örneklerle karşı 600 nm’de absorbanı ölçülür. Test mikroorganizmalarının üremesini %50 inhibe eden izolatlar etkili kabul edilir (74, 118).

d. Spot-on The Lawn Yöntemi: İzolatların MRS Agar’da 18 saat inkübe edilmiş kültürleri hazırlanır. Petri kutularına dökülmüş Agar üzerine 10^5 – 10^6 konsantrasyonunda olacak şekilde sıvı besiyerinde hazırlanmış hedef mikroorganizmalarının kültürlerinden 100 µl ekim yapılır. Besiyeri üzerine laktik asit bakteri kültürlerinin taze kolonilerinden nokta tarzında ekim yapılarak 30°C’de 24–48 saat inkübe edilir. Zon veren izolatlar belirlenir (104).

Lewus ve Montville (104), spot-on-the-lawn yönteminin flip-plate ve kuyucuk difüzyon metoduna göre çok daha kolay, tekrarlanabilirliği yüksek ve çok daha hızlı değerlendirme yapılabilen bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Burada en çok kullanılan yöntemlerden bahsedilmiştir. Fakat bu yöntemlerin modifikasyonu olan çok sayıda metot mevcuttur. Yöntemlerin her birinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Davidson ve Parish (39), Lewus ve Montville (104) ve Piddock (130) antimikrobiyel etkili maddelerin aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemleri, yapıları ve bu yöntemlerin avantaj/dezavantajlarını detaylı olarak rapor etmişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkisinin hidrojen peroksit, organik asitler (laktik asit ve asetik asit) veya diğer inhibitörlerden mi yoksa bakteriyosinden mi kaynaklandığını belirlemek için bakteriyosinlerin dışında kalan diğer inhibitör etkenleri elimine etmek gerekir.

- **Organik Asitlerin Antimikrobiyel Etkisinin Elimine Edilmesi:** Birçok araştırma da nötralizasyon basamağı olarak saflaştırma aşamalarında yer alan bu işlemde steril süpernatantların pH'ları NaOH veya HCl kullanılarak bakteriyosinlerin optimum etki edebileceği pH değerlerine ayarlanır (20, 171).

- **Hidrojen Peroksitin Antimikrobiyel Etkisinin Elimine Edilmesi:** Çoğu araştırmacı yaptıkları denemelerde antimikrobiyel etkisini belirledikleri hidrojen peroksitin, bakteriyosinlerin etkileriyle karıştırılmaması için pH değeri nötralize edilmiş steril süpernatantlara, hidrojen peroksiti parçalamak için katalaz enzimi uygulayarak aktivitenin devam edip etmediğini belirlemişlerdir (142, 171).

1.5.2. Etki Biriminin Ölçümü

Antimikrobiyel etkili laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etki biriminin belirlenmesi amacıyla kullanılan yöntem mikrotiter metodudur. Bu yöntemde izolatların 18 saatlik aktif kültürlerinin süpernatantları hazırlanır. Mikrotiter plaklarına 100 µl Mueller Hinton Broth konulur. Test mikroorganizmalarının $A_{600} = 0,1$ değerini veren dilüsyonu belirlenerek mikrotiter plaklarına 50 µl konulduktan sonra üzerine 50 µl süpernatant konulur. 30°C'de 24 saat inkübe edilir. Hazırlanan plakların, kuyucuklara konulan pozitif (süpernatantsız) örneklere karşı 600 nm'de absorbansı ölçülür. Test mikroorganizmalarının üremesini %50 inhibe eden bakteriyosin konsantrasyonu etki birimi olarak değerlendirilir (74, 118).

1.5.3. Proteaz Uygulaması

Organik asitlerin ve H₂O₂'nin etkisinin elimine edilmesinden sonra yapılan antimikrobiyel etki belirleme testlerinin sonucunda zon veren izolatların bakteriyosin

ürettikleri belirlenmiş olur. Bakteriyosinlerin hemen hepsi protein yapısındadır. Gözlemlenen antimikrobiyel aktivitenin protein yapısında bir maddeden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi amacı süpernatantlara proteolitik enzimler uygulanarak antimikrobiyel test yenilenir. Enzim uygulaması sonucunda etkinin kaybolması, antimikrobiyel etkinin protein tabiatında bir maddeden kaynaklandığını gösterir (20, 104).

1.5.4. Bakteriyosinlerin Saflaştırılması

Herhangi bir maddenin bakteriyosin olarak tanımlanabilmesi için protein yapısında, en az 10 aminoasitten oluşması ve üretici suş tarafından düzenli olarak sentezleniyor olması gerekir (95). Bakteriyosinlerin laboratuvar koşullarında saflaştırılması prosedürü genellikle amonyum sülfat presipitasyon basamağını izleyen iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi kombinasyonları sonrasında RP-HPLC purifikasyon basamağı ile tamamlanır (128). Kromatografi basamağı, preparatif izoelektrik focus ile yer değiştirebilmektedir (170). Bunun dışında yapılan pek çok çalışma saflaştırma aşamasını mümkün olduğunca kısaltmaya yöneliktir.

Uteng ve ark. (163), bakteriyosinlerin saflaştırılmalarında kullanılan birçok basamağı kısaltarak daha kolay ve hızlı bir şekilde saflaştırmanın yollarını denemiş ve iki basamakta saflaştırmanın yapılacağını göstermişlerdir. İlk basamakta katyon değişim kromatografisi kullanmış ikinci basamakta ise düşük basınçlı reverse faz kolonunu önermişlerdir.

Suarez ve ark. (151), yaptıkları araştırmalarında geliştirdikleri purifikasyon yönteminde, immunoaffiniti kromatografisi kullanarak bakteriyosinlerin tek aşamada saflaştırılmalarının mümkün olduğunu belirtmişlerdir.

Özellikle büyük miktarlarda bakteriyosinlerin adsorpsiyonunu sağlayacak bir yöntem geliştiren Yang ve ark. (174), pH değerleriyle ve çözücü maddelerin kullanımıyla bu işlemlerin daha da kolay olabileceğini belirtmişlerdir.

Fakat kullanılan yöntem her ne olursa olsun, yapılacak çalışmada hedeflenen amaca göre uygun olanı tercih edilmelidir. Eğer üretici suş ve üretebileceği

bakteriyosin biliniyorsa bakteriyosinin özelliklerine göre kromotografik aşamaların seçimi çok daha kolay ve başarılı bir analiz sonucu verir.

1.5.4.1. Antimikrobiyel Etkili Proteinlerin Çöktürülmesi: Antimikrobiyel etkili proteinlerin çöktürülmesinde butanol (81) ve aseton (86) ile çöktürme yöntemleri yanı sıra en çok tercih edilen amonyum sülfat ile çöktürme yöntemidir.

Amonyum Sülfat ile Çöktürme: Bu yöntemde göre 100 ml MRS Broth içerisinde 18–20 saat üretilen sıvı kültür önce 5000 devir/d hızla 15 d santrifüjlenerek hücre parçacıkları ve kaba partiküller ayrılır. Santrifüjleme işleminin ardından süpernatant içerisine proteinlerin çöktürülmesi amacıyla % 35–70 oranında amonyum sülfat kristalleri ilave edilir. 4°C’de 18 saat karıştırılır ve süre sonunda 10.000 x g’de 20–30 d santrifüjlenir. Presipitat uygun bir tampon çözelti içerisinde çözülerek -18°C’de saklanır (21, 173).

1.5.4.2. Diyaliz: Amonyum sülfatın belirlenen uygun konsantrasyonu ile çöktürülen bakteriyosin örneklerinden hem amonyum sülfatın uzaklaştırılabilmesi, proteinin konsantre edilmesi için hem de çözeltinin kısmi olarak saflaştırılabilmesi için ozmatik basınç ilkesine dayanan diyaliz işlemi uygulanır (21, 173). Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin belirlenmesinde genellikle 1.000 Da molekül ağırlıklı diyaliz poşetleri kullanılmaktadır.

Diyaliz sonrası elde edilen diyalizatın antimikrobiyel etkisi test edilerek kısmi saflaştırılmış, ham bakteriyosin çözeltisi olarak adlandırılır.

1.5.4.3. İnhibitör Proteinlerin Belirlenmesi: Saflaştırma aşamasında elde edilen inhibitör etkiye sahip proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde SDS-PAGE yöntemi kullanıldığı gibi Tricine-SDS-PAGE yöntemi son yıllarda çok daha fazla tercih edilmektedir. Bu yöntemde, proteinler çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanabilen poliakrilamit jel üzerinde elektrik potansiyel farkı yaratılarak birbirinden ayrılmaktadır. Ayrımı sağlanan proteinlerin molekül büyüklükleri tanımlanıp bazı proteinlerle karşılaştırılarak tespit edilir.

Schagger (141), özellikle düşük molekül ağırlıklı proteinlerin saptanabilmesi amacıyla kullanılmasını tavsiye ettiği yöntemde 3–5 kDa molekül ağırlıklı proteinlerin bile Tricine-SDS-PAGE yöntemiyle kolaylıkla belirlenebileceğini belirtmiştir.

1.5.4.4. Kromatografik Yöntemler ile Bakteriyosinlerin Saflaştırılması:

Kısmi olarak saflaştırılmış bakteriyosinlerin tam olarak saflaştırılmasında çoğu araştırmacı ya saflaştırma tekniklerinin birçoğunu kombine ederek kullanmış ya da birkaç kromatografik yöntemi bir arada kullanmıştır. Bakteriyosinlerin hidrofobik hidrofilik özellikleri, anyonik veya katyonik tabiatları gibi birçok faktör göz önüne alınarak saflaştırma da kullanılabilecek yöntemler seçilebilmektedir.

Bu yöntemlerin başında iyon değişim kromatografisi, reverse phase HPLC, FPLC, jel filtrasyon, hidrofobik etkileşim kromatografisi gibi farklı yöntemler gelmektedir (5, 42, 47, 74, 163).

Tablo 15’de bazı araştırmacıların bakteriyosinleri saflaştırmada kullandıkları yöntemler verilmiştir.

Tablo 15. Bakteriyosinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler

| Laktik Asit Bakterisi | Gıda | Bakteriyosin | Saflaştırma Tekniği | Kaynak |
|---|--------------------|-------------------------|--|---------------|
| <i>Lb. acidophilus</i> DSM 20079 | | Acidocin D20079 | Amonyum sülfat ile çöktürme, Diyaliz CM sepharose kolon Octyl sepharose kolon İzoelektrik fokus | 42 |
| <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> <i>biovar. diacetyllactis</i> UL719 <i>P. acidilactici</i> UL5 | | Nisin Z Pediocin PA1 | Amonyum sülfat ile çöktürme, Diyaliz Kasyon değişim kromatoğrafisi HPLC | 161 |
| <i>Strep. thermophilus</i> ACA-DC 0040 | | ThermophilinT | Amonyum sülfat ile çöktürme, Diyaliz İyon değişim kromatoğrafisi Gel permeation kromatoğrafisi | 5 |
| <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> B14 | Boza | Bozacin 14 | Amonyum sülfat ile çöktürme, Diyaliz Sep-pack C18 kolon RP-HPLC | 80 |
| <i>Enterococcus faecium</i> NIAI 157 | Fermente sebzeler | Enterocin ON-157 | Ultrafiltrasyon Amonyum sülfat ile çöktürme, Diyaliz Kasyon değişim kromatoğrafisi | 123 |
| <i>Carnobacterium divergens</i> M35 | Midye | Divergicin M35 | Kasyon değişim kromatoğrafisi Sep-pack C18 kolon RP-HPLC | 154 |
| <i>P. acidilactici</i> | Fermente sucuk | Pediocin L50 | Amonyum sülfat ile çöktürme Kasyon değişim kromatoğrafisi Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi RP-HPLC | 28 |
| <i>Leuc. carnosum</i> 4010 | Vakum ambalajlı et | Leucocins 4010 | Amonyum sülfat ile çöktürme, Diyaliz Kasyon değişim kromatoğrafisi | 21 |

Çalışmanın amacı;

Gıdaların muhafazası halk sağlığı ve ekonomik açısından önemli bir konudur. Gıda muhafaza yöntemlerinden biri de fermantasyondur. Fermente gıdaların ise büyük çoğunlunu fermente et ürünleri ve fermente süt ürünleri oluşturur. Laktik asit bakterileri fermente gıdaların temel mikrofloralarını oluşturmaktadırlar. Laktik asit bakterileri gıda içerisinde şekerleri fermente ederek asit oluşturur. Oluşan organik asitlerin zararlı mikroflora üzerinde yıkılmayıcı etki yapması sayesinde gıda içerisinde doğal bir güvenlik ve koruma meydana gelir. Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu mikroflora üzerinde yapılan çalışmalarda, bu floranın ürettiği bakteriyosin adındaki protein tabiatlı maddelerin de tıpkı organik asitler gibi diğer mikroflora üzerinde yıkılmayıcı etki yaptığı ve aynı şekilde doğal bir koruma meydana getirdiği tespit edilmiştir. Son yıllarda gıdalarda doğal koruyucu katkı maddeleri olarak gündemde olan maddelerin başında laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler yer alır ve bu maddeler üzerinde sayısız çalışma mevcuttur. Fakat çalışmaların nerdeyse tamamında bakteriyosinler ve bakteriyosin üreten suşlar hakkında daha detaylı ve güvenilir bilgiye ihtiyaç duyulduğundan bahsedilmektedir. Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin tanımlanması ve bakteriyosinogenik laktik asit bakterilerinin identifikasyonu konusunda ülkemizde az sayıda çalışma mevcuttur. Fermente gıdalardaki laktik asit bakteri florasının gıdanın çeşidine, üretim metoduna ve çevresel faktörlere bağlı olarak büyük bir değişim gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle özellikle yöremizdeki fermente gıdalarda bakteriyosinogenik laktik asit bakterileri hakkında da araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, özellikle mikroflorasını laktik asit bakterilerinin oluşturduğu geleneksel yöntemlerle üretilmiş bazı fermente gıdalar (kaşar peyniri, tulum peyniri, beyaz peynir, krema, tereyağı, yoğurt ve sucuk) ile çiğ süt ve laboratuvar ortamında farklı kefir taneleri ve kefir kültürü kullanılarak üretilen kefirde bakteriyosinogenik laktik asit bakterilerini tanımlamak ve seçilen gıda patojenlerine karşı en etkili olan bakteriyosini kısmi olarak saflaştırmak hedeflendi. Elde edilecek olan güçlü bakteriyosinogenik suşlar ve bu suşların bakteriyosin üretme potansiyeli tanımlanarak, gıda muhafazasında kullanılabilme olanakları üzerinde durulması amaçlandı.

Çalışma kapsamında;

- ✓ Gıdalardan laktik asit bakterilerinin izole edilmesi,
- ✓ İzolatların antimikrobiyel etkisinin belirlenmesi,
- ✓ Antimikrobiyel etki gösteren izolatların identifiye edilmesi,
- ✓ Suşların çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyel etkisinin tespiti,
- ✓ Belirlenen antimikrobiyel etkinin bakteriyosinlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi,
- ✓ Bakteriyosinlerin kısmi karakterizasyonu,
- ✓ Patojenlere karşı en etkili bakteriyosinin kısmi olarak saflaştırılması amaçlandı.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

2.1.1. Örnekler

Kars ili piyasasından geleneksel yöntemlerle üretilen kaşar peyniri, beyaz peynir, tulum peyniri, yoğurt, tereyağı, krema ve sucuk örnekleri ile çiğ süt numuneleri her bir örnekten 50'şer adet olmak üzere alınarak laboratuvara getirildi. Laboratuvarda kefir taneleri ve kefir kültürü kullanılarak üretilen 50 adet farklı kefir örneği de çalışmada numune olarak kullanıldı.

2.1.2. Test Suşları

Çalışmada test mikroorganizması olarak *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellebiosis*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Streptococcus lactis*, *Micrococcus*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* O:3 kullanıldı. Tablo 16'da kullanılan test suşları ve temin edildiği kaynaklar verilmiştir.

Tablo 16. Test Mikroorganizmaları ve Temin Edildiği Kaynaklar

| Suş Adı | Kodu | Temin Edildiği Kaynak |
|--------------------------------------|---------------|---|
| <i>Lactobacillus casei</i> | | Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı |
| <i>Lactobacillus cellebiosis</i> | | Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı |
| <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> | | Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı |
| <i>Streptococcus lactis</i> | | Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı |
| <i>Micrococcus</i> | | Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı |
| <i>Micrococcus luteus</i> | RSKK No 1123 | Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | RSKK No 475 | Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | RSKK No 25923 | Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi |
| <i>Bacillus subtilis</i> | RSKK No 389 | Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | RSKK No 538 | Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi |
| <i>Escherichia coli</i> | RSKK No 97010 | Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> O3 | RSKK No 920 | Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi |

2.1.3. Alet ve Ekipman

Bu çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Laboratuvarlarından, Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarından, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarından, Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarından temin edildi. Bakteriyosinlerin saflaştırılması ve tanımlanması aşamaları Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü laboratuvarında ve ODTÜ Merkez Laboratuvarında yapıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Örneklerin Toplanması

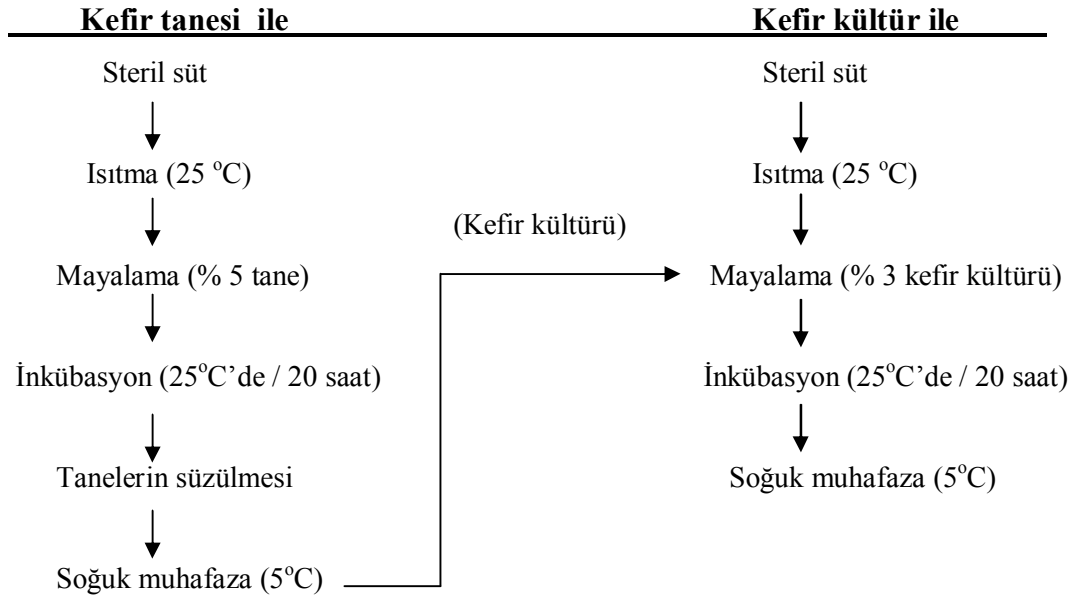
Çalışmada özellikle mikroflorasını laktik asit bakterilerinin oluşturduğu geleneksel yöntemlerle üretilmiş bazı gıdalar (kaşar peyniri, tulum peyniri, beyaz peynir, krema, tereyağı, yoğurt ve sucuk), çiğ süt ve laboratuvar ortamında kefir taneleri ve kefir kültürü kullanılarak üretilen kefir materyal olarak kullanıldı.

2.2.2. Kefir Örneklerinin Hazırlanması

Kefir üretimi geleneksel yöntem kullanılarak yapıldı. Kefir üretiminde hem kefir tanesi hem de kefir kültürü kullanıldı. Erlene 100 ml UHT steril süt konuldu. Sütler 25°C'ye kadar ısıtıldıktan sonra %5 oranında kefir tanesi veya %3 kefir kültürü ile mayalanıp 25°C'de 20 saat ağzı kapalı olarak inkübe edildi.

İnkübasyon süresince belli aralıklarla pıhtı karıştırıldı. İnkübasyon süresi sonunda taneler steril bir süzgeç yardımıyla pıhtıdan ayrıldı ve steril su ile yıkandı. Kefir 5°C'ye soğutulduktan sonra 5°C'de olgunlaşmaya bırakıldı (109).

Şekil 2'de kefir mayası ve kefir kültürü kullanımı ile kefir üretim şeması verilmiştir.



Şekil 2. Kefir Üretim Şeması

2.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Gruplandırılmaları

İzolasyon amacıyla süt ve süt ürünlerinin homojenizasyonu ve dilüsyonu için ¼ Ringer çözeltisi, et ve et ürünleri için ise tamponlanmış peptonlu su kullanılarak uygun dilüsyonlar hazırlandı. İzolasyon şansını arttırmak için seçilen dilüsyonlardan MRS Agar (Oxoid, CM361), modifiye Chalmers Agar (167) ve M17 Agar (Oxoid, CM0785) besiyerlerine ekim yapılarak, 30°C'de 48–72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her besiyerinden tipik koloniler, tipik koloni olmayan petrilere ise rastgele 5'er koloni seçildi. Gram boyama, mikroskopik morfoloji, katalaz reaksiyonu, oksidaz testi ve glukozdan gaz oluşturma gibi öncelikli testler uygulanarak izolatlar gruplandırıldı (91).

İzolatlar çalışma süresince BHI Yatık Agar'da (Oxoid CM375) çoğaltılarak 4°C'de muhafaza edildi. Çalışma sırasında taze kültür hazırlamak için izolatlar MRS Broth'a ekilerek 30°C'de 18 saat inkübe edildi.

2.2.3.1. Gram Reaksiyonu ve Mikroskopik Morfolojileri: Bu amaçla izolatların 18–24 saatlik taze bakteri kültürleri kullanıldı. Temiz bir lam üzerine yuvarlak uçlu öze ile bir damla bakteri kültürü alınarak boyama prosedürü uygulandı.

- Preparat hazırlanıp, kuruması beklendikten sonra fikse edildi.
- Metilen mavisi solüsyonu ile 2 dakika boyandı.
- Boya dökülerek uzaklaştırıldıktan sonra preparat üzerine lugol solüsyonu konarak 1 dakika beklendi. Lugol solüsyonu dökülerek uzaklaştırıldı.
- Saf alkolde 15–30 saniye dekolere edildi (Alkol renksiz akıncaya dek).
- Preparat saf su ile yıkandı.
- Sulu fuksin boyası ile 30 saniye boyandı.
- Saf su ile yıkanarak boya giderildi. Kurutma kağıdında kurutuldu.
- Sedir yağı konarak immersiyon objektifi ile incelendi.

Gram boyama yapıldıktan sonra, immersiyon objektifinde incelenen kültürlerden mavi-mor renkte olanlar Gram pozitif, pembe-kırmızı olanlar ise Gram negatif olarak değerlendirildi. Kontrol suş olarak Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* kullanıldı. Mikroorganizmaların büyüklüğü, şekli ve dizilişi gibi morfolojik özellikleri Gram boyama ile boyanan preparatlarda incelendi (9).

2.2.3.2. Katalaz Testi: Taze bakteri kültürü, bir öze yardımıyla temiz bir lam üzerine alınıp yayıldı. Üzerine 1–2 damla %3'lük hidrojen peroksit damlatıldı. Kabarcıkların çıkması pozitif olarak kabul edildi. Pozitif kontrol suş olarak *Escherichia coli* kullanıldı (9).

2.2.3.3. Oksidaz Testi: MRS Broth içerisinde izolatların 18 saatlik taze kültürleri hazırlandı. Bactident Oxidase (Merck 1.13300) hazır test kiti üzerine bir öze dolusu kültür aktarıldı, 20 – 60 saniye içinde renk değişimi incelendi. Mavi-menekşe renk pozitif olarak kabul edildi. Pozitif kontrol suş olarak *Pseudomonas aeruginosa* kullanıldı (8).

2.2.3.4. Glukozdan Gaz Oluşturma: MRS Broth bileşiminde olduğu gibi hazırlanmakla birlikte triamonyum sitrat yerine %5 glukoz ilave edilerek MRS-

Glukoz Broth besiyeri hazırlandı. Besiyerinden 8'er ml konulmuş tüplerin içine Durham tüpü yerleştirildi. Sterilizasyon sonrası tüplere taze kültürlerden 0,5 ml inokülasyon yapıldı ve 30 °C de 24–48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplerde gaz oluşumu pozitif olarak kabul edildi (143).

2.2.4. Test Suşlarının Aktif Hale Getirilmesi

Çalışmada kullanılan test suşlarından laktik asit bakterileri MRS Broth (Oxoid CM359) içerisinde, 30°C'de 18 saat inkübe edildi. Modifiye Chalmers Agar'da saflıkları kontrol edildikten sonra, çalışma süresince BHI Yatık Agar'da muhafaza edildi. Diğer test suşları ise BHI Broth (Oxoid, CM225) içerisinde 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra her bir bakteri kendi selektif besiyerine ekilerek çoğaltıldı ve saflıkları kontrol edildikten sonra BHI Yatık Agar'da 4°C'de muhafaza edildi.

2.2.5. İzolatların Antimikrobiyel Etkisinin Belirlenmesi

Antimikrobiyel testlerin tümünde test bakterisi olarak kullanılan laktik asit bakterileri için MRS Broth ve MRS Agar kullanıldı. Diğer test mikroorganizmaları için ise Mueller Hinton Broth (Oxoid, CM405) ve Mueller Hinton Agar (Oxoid, CM337) kullanıldı. Tablo 16'da antimikrobiyel etkinin belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaların listesi verilmiştir.

İzolatların antimikrobiyel etkisinin belirlenmesi için üç farklı metot kullanıldı. Bu metotların birinde izolatların kolonilerinin, diğer iki yöntemde ise izolatların süpernatantlarının antimikrobiyel etkisi test edildi.

Yöntem 1. Yöntemlerin ilkinde, izolatların MRS Agar'da 30°C'de 48 saat inkübe edilmiş kültürleri hazırlandı. Petri kutularına dökülmüş Mueller Hinton Agar üzerine 10^5 – 10^6 konsantrasyonunda olacak şekilde sıvı besiyerinde hazırlanmış test mikroorganizmalarının kültürlerinden 100 µl ekim yapıldı. Besiyeri üzerine izolatların kültürlerinin taze kolonilerinden nokta tarzında ekim yapılarak 30°C'de 24–48 saat inkübe edildi. Zon veren izolatlar belirlendi (104).

Yöntem 2. Bu yöntemde ise izolatların MRS Broth içerisinde 30°C’de 18 saat inkübe edilerek aktif kültürleri hazırlandı. Kùltürler 10.000 x g’de 10 dakika 4°C’de santrifüj (Hettich, Universal 32 R) edilerek süpernatantları alındı. Petri kutularına dökülmüş Mueller Hinton Agar üzerine 10⁵–10⁶ konsantrasyonunda olacak şekilde sıvı besiyerinde hazırlanmış test mikroorganizmalarının kùltürlerinden 100 µl ekim yapıldı. Bu aşamadan sonra iki farklı yöntemle işleme devam edildi.

Kağıt Disk Metodu: Test mikroorganizması ekilmiş besiyeri yüzeyine boş kağıt diskler (Oxoid CM0998) yerleştirildi. Kağıt disklere 100 µl süpernatant damlatıldıktan sonra petriler 30°C’de 24–48 saat inkübe edildi. Zon veren izolatlar belirlendi (22, 173).

Kuyucuk Yöntemi: Test mikroorganizması ekilmiş besiyeri yüzeyine 6 mm çapında 1 cm yüksekliğinde kuyucuklar açıldı. Bu amaçla ağzı kesilmiş steril ependorf tüpleri kullanıldı. Kuyucukların dibine 10 µl Mueller Hinton Agar konularak kuyucukların dibi kapatıldı. Kuyucuklara 500 µl süpernatant konulduktan sonra 30°C’de 24–48 saat, petriler ters çevrilmeden inkübe edildi. Zon veren izolatlar belirlendi (153, 171).

Yöntem 3. İzolatların antimikrobiyel etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılan üçüncü yöntem ise **mikrotiter** yöntemidir. Bu yöntemde izolatların 18 saatlik aktif kùltürlerinin süpernatantları hazırlandı. Mikrotiter plaklarına 100 µl Mueller Hinton Broth konuldu. Test mikroorganizmalarının A₆₀₀ = 0,1 değerini veren dilüsyonu belirlenerek mikrotiter plaklarına 50 µl konulduktan sonra üzerine 50 µl süpernatant konuldu. Plak, 30°C’de 24 saat inkübe edildi. Hazırlanan plakların, kuyucuklara konulan pozitif (süpernatantsız) örneklere karşı 600 nm’de absorbansı ölçüldü. Test mikroorganizmalarının üremesini %50 inhibe eden izolatlar etkili kabul edildi (74, 118).

2.2.6. Bakteriyosinlerin Varlığının Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkisinin hidrojen peroksit, organik asitler (laktik asit ve asetik asit) veya diğer inhibitörlerden mi; yoksa bakteriyosinden mi kaynaklandığını belirlemek için bakteriyosinlerin dışında kalan diğer inhibitör etkenleri elimine etmek gerekir. Bu amaçla laktik asit bakteri izolatlarının MRS Broth içerisinde 18 saatlik aktif kültürleri hazırlandı. 10.000 x g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılarak 0,22 µm por çaplı mikrofiltre (Millipore-SLGV 033RS) ile süzülerek steril edildi. Bu aşamadan sonra süpernatantlara aşağıdaki testler ayrı ayrı uygulanarak bakteriyosinlerin varlığı tespit edilmeye çalışıldı.

2.2.6.1 Organik Asitlerin Antimikrobiyel Etkisinin Elimine Edilmesi:

Bunun için steril süpernatantların pH değerleri nötrlenerek antimikrobiyel etkinin devam edip etmediği araştırıldı. Nötralizasyonda bakteriyosinlerin Broth içerisindeki konsantrasyonlarını azaltmamak amacıyla derişik NaOH veya derişik HCl kullanıldı. Steril süpernatantların pH'ları 5 N NaOH veya 5 N HCl kullanılarak pH 6,5–7 olarak ayarlandı. Antimikrobiyel etkinin belirlenmesi için Bölüm 2.2.5'de anlatıldığı şekilde test yapıldı (20, 171).

2.2.6.2. Hidrojen Peroksitin Antimikrobiyel Etkisinin Elimine Edilmesi:

Bu amaçla pH değeri nötralize edilmiş steril süpernatantlara, olası hidrojen peroksiti parçalamak için 1 mg/ml katalaz enzimi (Sigma C9322) uygulandı. 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda 60°C'lik su banyosunda (Nüve BM 402) 10 dakika bekletilerek enzimin etkisi inhibe edildi. Daha sonra antimikrobiyel etkinin belirlenmesi için Bölüm 2.2.5'de anlatıldığı şekilde test yapıldı (142, 171).

2.2.7. Duyarlılık Testleri ve Proteolitik Enzim Uygulaması

Organik asitlerin ve hidrojen peroksitin etkisinin elimine edilmesinden sonra yapılan antimikrobiyel etki belirleme testlerinin sonucunda zon veren izolatların bakteriyosin ürettikleri belirlenmiş oldu. Fakat yine de kesin bir şekilde bu ifadeyi

kullanabilmek için etkiye neden olan maddenin protein tabiatında olup olmadığını belirlemek amacıyla süpernatantlara proteolitik enzimler uygulanarak antimikrobiyel etki testi yenilendi. Enzim uygulaması sonucunda etkinin kaybolması, antimikrobiyel etkinin protein tabiatında bir maddeden kaynaklandığını gösterir (20, 104). Bu amaç için nötralize edilmiş steril süpernatantlara çeşitli proteolitik enzimler, farklı ısı dereceleri ve değişik pH değerleri uygulanarak antimikrobiyel etki test edildi.

Tablo 17’de süpernatantlara uygulanan proteolitik enzimler, ısı ve pH değerleri verilmiştir.

Tablo 17. Süpernatantlara Uygulanan Proteolitik Enzimler, Isı ve pH Değerleri.

| Enzimler | pH | Isı |
|---|-------|--------------------|
| α -chymotrypsin (Sigma SIC 4129) | pH 2 | 4°C’de 7 gün |
| Protease (Sigma P4860) | pH 12 | 65°C’de 30 dakika |
| Trypsine (Sigma T1426) | | 121°C’de 15 dakika |

2.2.7.1. Enzim Uygulaması: Nötralize edilmiş steril süpernatantlara 1 mg/ml proteolitik enzim (α -chymotrypsin, protease, trypsine) ilave edilip, 37°C’de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda 60°C’lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek enzimlerin etkisi inhibe edildi. Uygulama sonrası antimikrobiyel etki test edildi. Test sonrası antimikrobiyel etkinin kaybolması, etkili maddenin protein tabiatında olduğunu gösterir (20, 42).

2.2.7.2. Isı Uygulaması: Nötralize edilen steril süpernatantlara, 4°C’de 7 gün, 65°C’de 30 dakika, 121°C’de 15 dakika ısı uygulaması yapıldı. Uygulama sonrası antimikrobiyel etki test edildi (42, 47).

2.2.7.3. pH Uygulaması: Steril süpernatantların pH değerleri 5 N NaOH ve 5 N HCl kullanılarak pH değerleri ayrı ayrı pH 2 ve pH 12’ye ayarlandı. 37°C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra pH değeri nötrlenerek antimikrobiyel test yenilendi (42, 47).

2.2.8. Bakteriyosinogenik İzolatların İdentifikasyonu

Laktik asit bakterileri izolatlarının tanımlanabilmesi ve karakterizasyonu amacıyla morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri içeren klasik identifikasyon yöntemleri kullanıldı. İzolatlara argininden amonyak oluşturma, farklı pH (4 ve 9,6), farklı tuz konsantrasyonu (%6 ve 10), farklı ısı dereceleri (0, 10, 15 ve 45°C'de) üreme testleri ile dekstran oluşturma, Voges prouskauer testi, Asetat Agar'da üreme, % 0,1 metilen mavisinde üreme testleri ve karbonhidrat fermantasyon testleri uygulandı (24, 67, 91, 143).

2.2.8.1. Tolerans Testleri: İzolatların 0, 10, 15 ve 45°C'de üreyebilme yetenekleri, %6 ve %10 NaCl'de üreme, pH 9,6'da ve pH 4'de üreyebilme yeteneklerinin tespiti amacıyla izolatlar MRS Broth'a ekildi. İnkübasyon sonrası besiyerlerinde görülen bulanıklık ve tortu oluşumu üreme açısından pozitif olarak kabul edildi. İnokülasyon yapılan tüpler 15–45 °C'de 3 gün, 0-10°C'de 7 gün inkübe edildi (91, 143).

2.2.8.2. Argininden Amonyak Oluşturma: MRS besiyeri bileşiminden glukoz, amonyum sitrat ve meat ekstrakt çıkarılarak MRS Broth hazırlandı. Broth içerisine % 0,3 L-arginin ile % 0,2 sodyum sitrat eklendi. Broth tüplere dağıtıldıktan sonra, 121°C'de 15 dakika steril edildi. İzolatlar broth'a ekilerek, 30°C'de 7 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra temiz bir tüpe 1 ml üreme görülen besiyerinden konulup üzerine 1 ml Nessler çözeltilisi damlatıldı. Turuncu kahverengi renk pozitif olarak değerlendirildi (8, 143).

2.2.8.3. Dekstran Oluşturma: MRS Agar içerisine %5 sukroz ilave edilerek hazırlanan MRS-Sukroz Agar'a, izolatların MRS Broth'taki 18 saatlik taze kültürlerinden ekim yapıldı. Petriler 30°C de 24–48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda petri yüzeyinde dekstran oluşumu incelendi. Oluşan kolonilerin sulu yapışkan viskoz hali pozitif olarak değerlendirildi (24, 143).

2.2.8.4. Voges Prouskauer Testi: İzolatların glukozu fermente ederek asetil metil karbonil meydana getirip getirmediğini belirlemek amacıyla, izolatlar MR-VP Broth'a (Oxoid, CM 43B) ekildi. 30°C de 2–7 gün inkübasyondan sonra, temiz bir deney tüpüne 1 ml kültür konuldu, bunun üzerine 0,6 ml α -naftol çözeltisi (% 96'lik etil alkolde hazırlanmış) ve 0,2 ml % 40'luk KOH çözeltisinden eklendi ve tüp kuvvetlice çalkalandı. Tüplerde 5 dakika içinde meydana gelen kırmızı renk pozitif kabul edildi (8).

2.2.8.5. Asetat Agar'da Üreme: İzolatların MRS Broth'taki 18 saatlik taze kültürlerinden, Acetate Agar (Fluka, 17114)'a (pH 5,4) ekim yapıldı. Petriler 30°C de 24–48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreyen izolatlar belirlendi (67).

2.2.8.6. % 0,1 Metilen Mavisinde Üreme: Steril süt içerisine % 1 oranında metilen mavisi eklenerek izolatların MRS Broth'taki 18 saatlik taze kültürlerinden ekim yapıldı. Tüpler 30°C de 1–7 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerindeki mavi rengin açılması pozitif kabul edildi (9).

2.2.8.7. Karbonhidrat Fermantasyon Testleri: MRS Broth bileşiminden lab-lembo ve glukoz çıkarılmış halde besiyeri bileşimine göre fermantasyon Broth hazırlandı. Besiyeri bileşimine girecek olan 1000 ml saf suyun 800 ml'si besiyerine konarak 200 ml'si ayrıldı. Besiyerine % 0,05 g klorofenol red (Aldrich, 199524) indikatörü konuldu. Ayrılan suda test edilecek şekerlerin % 2'lik çözeltileri hazırlandı. Şekerler 0,22 μ m por çaplı filtreler ile sterilize edildi. Bu çözeltilerden steril edilen besiyerlerine % 1 oranında ilave edildi. Besiyeri şeker ile iyice karıştırılıp tüplere 8–10 ml konuldu. Besiyerine aktif kültürlerden %1 oranında ekim yapıldı. 30°C'de 48–72 saat inkübe edildi. Asit oluşturarak besiyeri rengini sarıya dönüştüren izolatlar pozitif olarak değerlendirildi (91).

Karbonhidrat fermantasyon testleri ayrıca API test kiti kullanılarak da yapıldı. Çalışmada laktik asit bakterilerinin tanımlanmasına yönelik üretilmiş API 50 CH (Biomerieux) test kiti kullanıldı. Testin esasları farklı karbonhidratların, izolatlar tarafından fermente edilip edilmemesinin belirlenmesine dayanmaktadır. İzolatların modifiye Chalmers Agar'da saf kolonileri üretildi. Saf kolonilerinden MacFarland 2

(Biomerieux 70900)'ye göre uygun konsantrasyonlar belirlenerek API CHL (Biomerieux 50410) besiyerine ekim yapıldı. Broth, karbonhidrat emdirilmiş API test kitlerine (Biomerieux 50300) konulduktan sonra ağzları mineral yağ ile kapandı. 30°C'de 24–48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun 24. ve 48. saati sonunda besiyerindeki renk değişimleri takip edilerek görülen sarı renk pozitif, mavi mor renk ise negatif olarak ayrı ayrı kaydedildi. Test sonuçları API Web CD Ram (Biomerieux 40012) programı ile okunarak değerlendirildi.

2.2.9. Bakteriyosinlerin Kısmi Saflaştırılması

2.2.9.1. Amonyum Sülfat ile Proteinlerin Çöktürülmesi: Laktik asit bakteri izolatlarının MRS Broth içerisinde 18 saatlik aktif kültürleri hazırlandı. 10.000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılarak 0,22 µm por çaplı mikrofiltre ile süzülerek steril edildi. Süpernatantların pH değerleri 5 N NaOH ve 5 N HCl kullanılarak nötrüldü.

Nötralize edilmiş steril süpernatantlardaki proteinlerin çöktürülmesi ve konsantre edilmesi amacıyla amonyum sülfat tuzu (Merck, 31119) kullanıldı. Uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla %30'dan %80'e kadar amonyum sülfatın farklı konsantrasyonları test edildi. Bu amaçla, her bir amonyum sülfat konsantrasyonuna uygun olacak miktarlarda tuz soğuk havanda iyice ezilerek pudra haline getirildi ve 4°C'de yavaş yavaş süpernatantlara ilave edildi. Etüv (Nüve ES 110) içerisinde 4°C'de 18 saat boyunca magnetik karıştırıcı (SBS A-160) kullanılarak karıştırıldı. İşlem sonrası örnekler 15.000 x g'de 30 d santrifüj edildikten sonra hem süpernatantın hem de çökeltinin antimikrobiyel etkisi belirlendi. Bu şekilde süpernatantta en az etkili protein bırakan veya hiç bırakmayan amonyum sülfat konsantrasyonu belirlendi (10, 21, 173). Amonyum sülfat ile çöktürme sonrası elde edilen çökelti ve süpernatanta antimikrobiyel etki testleri yapıldı.

2.2.9.2. Diyaliz: Amonyum sülfatın belirlenen uygun konsantrasyonu ile çöktürülen bakteriyosin örneklerinden hem amonyum sülfatın uzaklaştırılabilmesi ve proteinin konsantre edilmesi için, hem de çözeltinin kısmi olarak saflaştırılabilmesi için ozmatik basınç ilkesine dayanan diyaliz işlemi uygulandı (10, 21, 173).

Diyaliz işlemi için, amonyum sülfat ile çöktürme sonrası elde edilen çökelti 10 katı hacminde steril 10mM sodyum fosfat (pH 6,5) tampon çözeltisi ile sulandırıldı. Süspansiyon 12 cm boyutunda kesilmiş 1.000 Da molekül ağırlıklı (Spectra/Por 7 – 132104) diyaliz poşeti içerisine konuldu. Diyaliz poşetinin iki ucu 3 cm'lik aralıkla ve hava boşluğu kalacak şekilde ipek iplikle sıkıca bağlandı. Bu aşamada poşetin yırtılmaması için bağlarken çok sıkmaktan kaçınıldı. Etüv içerisinde 4°C'de 24 saat süresince hacminin 100 katı, 10mM sodyum fosfat (pH 6,5) tampon çözeltisine karşı magnetik karıştırıcıda sürekli karıştırılarak diyaliz edildi. Diyaliz işlemi süresince her 3 saatte bir diyaliz tamponu olarak kullanılan sodyum fosfat çözeltisi değiştirildi.

Diyaliz sonrası elde edilen diyalizatın antimikrobiyel etkisi test edildi. Diyaliz işlemi sonrası elde edilen diyalizat kısmi saflaştırılmış, ham bakteriyosin çözeltisi olarak adlandırıldı.

2.2.9.3. İyon Değişim Kromotoğrafisi: Diyalizatın saflaştırılması amacıyla iyon değişim kromotoğrafisi uygulandı (21, 42, 90, 169).

İyon değişim kromotoğrafisi için kolon yerine Batch yöntemi kullanıldı. Yöntemde aşağıda verilen aşamalar takip edildi.

1. İyon değiştirici olarak karboksimetil selüloz (CM52 Whatman 4037050) kullanıldı.
2. Karboksimetil selüloz tampon çözelti ile yıkanıp şişirildi. Bunun için bir erlen içerisine 10 g karboksimetil selüloz konuldu. Üzerine 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,5) konularak bir cam çubuk yardımıyla yavaş yavaş karıştırıldı ve jel 24 saat bekletilerek şişmeye bırakıldı.
3. Beherde şişmeye bırakılan jel 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,5) ile 3–5 kez yıkanarak bir Pastör pipeti yardımıyla tampon çözelti jel üzerinden çekilerek uzaklaştırıldı.
4. Jel üzerine diyalizattan 15–20 ml eklendi. Karışım 1 saat süresince 4°C'de cam çubuk ile karıştırıldıktan sonra sinter filtreli nuçe erlenine yerleştirildi ve süzüldü.
5. Süzüntüden (anyonik karakterli protein çözeltisi) antimikrobiyel etki testi için örnek alındı.

6. Filtrede kalan jelden katyonik proteinleri almak için jel, 0,3 M NaCl ile yıkanarak süzüntü alındı. Süzüntü katyonik karakterli protein çözeltisi olarak ayrıldı ve antimikrobiyel etki testi için örnek ayrıldı.

Anyonik ve katyonik karakterli protein çözeltilerine Bölüm 2.2.5.'de belirtildiği şekilde antimikrobiyel etki testleri uygulandı.

2.2.10. Örneklerin Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Örneklerin protein konsantrasyonları Bicinchoninic acid (BCA) yöntemi ile yapıldı. Yöntemde Bicinchoninic acid protein assay kiti (Sigma BCA1 ve B 9643) kullanıldı. Örneklerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için 562 nm'de verdikleri absorbans Elisa reader ile okundu.

Bisinsinonik asit yönteminin prensibi, Lowry yöntemine benzemektedir. Yöntemde alkali koşullarda Cu^{+2} iyonlarıyla proteinlerin kompleksi sonucu Cu^{+2} iyonları Cu^{+1} 'e indirgenir ve bu aşamada bisinsinonik asit, Cu^{+1} iyonları ile birleşerek mavi-mor bir renk oluşmasını sağlar. Oluşan renk 562 nm'de okunarak absorbans ölçülür.

Yöntemin uygulanmasında öncelikle çözelti A (Bicinchoninic acid solüsyonu) ile çözelti B (Bakır II sülfat) 50:1 oranında karıştırılarak bundan sonraki aşamalarda çalışma çözeltisi olarak kullanıldı. Örneklerin saf su ile uygun dilüsyonları hazırlandı. Protein standardının 0, 200, 400, 600 ve 800 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarında dilüsyonları hazırlandı. Protein örnekleri ile çalışma çözeltisi 1:8 oranında karıştırılarak 96 kuyucuklu pleytlere pipetlendi. 37°C 'de 30 d inkübe edildi. Süre sonunda hızlı bir şekilde elisa reader ile 562 nm'de absorbansları ölçüldü. Okunan absorbanslar ile standart eğri hazırlanarak protein örneklerinin konsantrasyonları hesaplandı.

2.2.11. Bakteriyosinin Saflığının Belirlenmesi ve Tanımlanması

Saflaştırma işleminin her aşamasında inhibitör etki gösteren örnekler Tricine-SDS-PAGE yöntemi ile jelde yürütülerek hem saflaştırma kontrol edildi hem de proteinlerin molekül ağırlıkları belirlenmeye çalışıldı. Bu yöntemde %10'luk ve

%16'lık farklı konsantrasyonlardaki iki jel kullanılarak gradient jel hazırlandı. Örnekler 80 mA'de ortalama 2,5 saat yürütüldü. Jelde proteinlerin görülmesi için, jel öncelikle Coomassie Boya ile boyanarak incelendikten sonra Gümüş boyama yöntemi ile boyanarak ayrı ayrı tekrar incelendi (16, 141).

Tricine-SDS-PAGE yöntemi Schagger (141)'ın belirttiği yöntemeye göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

Öncelikle % 16'lık ayırma (Seperating) jeli hazırlandı ve mini elektroforezin (Biorad 165-3359 Mini-protan-com) cam aparatına (9 x 7 cm) döküldü. Jel donduktan sonra üzerine 1 cm kalınlığında %10'luk ayırma (Seperating) jeli döküldü ve donduktan sonra üzerine %4'lük yükleme (Stacking) jeli konup, taraklar takılarak donması beklendi. Örneklerde protein konsantrasyonunun ayarlanmasında Coomassie blue boyama için her bir kuyucuğa 0,2-1,0 µg konsantrasyonunda protein yüklendi. Gümüş boyama için ise 100 kat daha az protein yüklendi. Örneklerin hazırlanmasında 15 µl örnek ile 5 µl sample buffer (Buffer A) karıştırıldı. Örnekler 100°C'de 5 d kaynatıldı. Elektroforez haznesinde anot buffer (kırmızı) aşağıya, katot buffer (siyah) yukarıya dolduruldu. Katot buffer altında, örnekler kuyucuklara 10 µl yüklendi. İlk ve en son kuyucuk boş kalacak şekilde ve ikinci kuyucuğa marker (protein standardı) konacak şekilde yükleme yapıldı. Elektroforezde yürütmeye 30 V ile başlandı ve örnekler yükleme jeline tamamen girene kadar 30 V kullanıldı. Daha sonra yürüme hızına bağlı olarak 50, 70, 90 V kullanıldı.

Yürütme tamamlandıktan sonra jel Coomassie blue ile boyandı. Bunun için jel fiksasyon solüsyonunda 45 d bekletildi. Fiksasyon için kullanılan sürenin iki katı kadar bir süre içerisinde boyama yapıldı. Jel iki kere %10 asetik asit çözeltisi ile 15-60 d yıkandı. Jel saf suya alınarak işlem tamamlandı.

Coomassie blue ile boyanmış jel %50 metanol, 50 mM amonyum hidrojen karbonat çözeltisi ve birkaç kez saf su ile yıkanıp Coomassie blue boyası tamamen akıtılana kadar yıkandıktan sonra gümüş boyama yapıldı. Jel, fiksasyon (fixer) çözeltisinde 1 saat 10 d bekletildi. %50 etanol ile 20 d iyice çalkalandı. Alkol dökülerek uzaklaştırıldıktan sonra bu işlem iki kere daha tekrar edildi. Ön işlem (Pretreatment) çözeltisinde 1 d çalkalandı. 3 kez 20 saniye saf su ile çalkalandı. Gümüş nitrat çözeltisinde 20 d çalkalandı. 2 kez 20 saniye saf su ile çalkalandı. Bant belirginleştirici (Developing) çözelti eklenerek 3-5 dakika boyunca çalkalandı, fakat

jelin kararmasına çok fazla izin verilmeden bantlar belirginleşince saf su ilave edilerek çözelti uzaklaştırıldı. 2 kez saf su ile 2 şer d daha yıkandı. Durdurucu (Stop) solüsyon konarak jel muhafaza edildi (16).

3. BULGULAR

3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çalışmada izolasyon şansını arttırmak ve farklı morfolojilerde koloniler elde etmek için MRS Agar, M17 Agar ve modifiye Chalmers Agar olmak üzere 3 farklı besiyeri kullanıldı. Her besiyerinde her örnekten tipik olan tüm koloniler ve tipik olmayan kolonilerden ise rastgele 5'er adet alındı. Bu şekilde 3 farklı besiyerinde tipik ve tipik olmayan koloniler olmak üzere her bir örnekten toplam 30'şar koloni alındı. Toplam 450 adet gıda örneğinden 13500 adet koloni izole edildi. İzolatların gruplandırılması amacıyla, izolatlara Gram boyama ve katalaz testleri yapıldı. Bu iki temel test sonrası laktik asit bakteri özelliği gösteren (Gram pozitif, katalaz negatif) 12700 koloni ayrıldı. Tablo 18'de örneklerden elde edilen izolat sayıları verilmiştir.

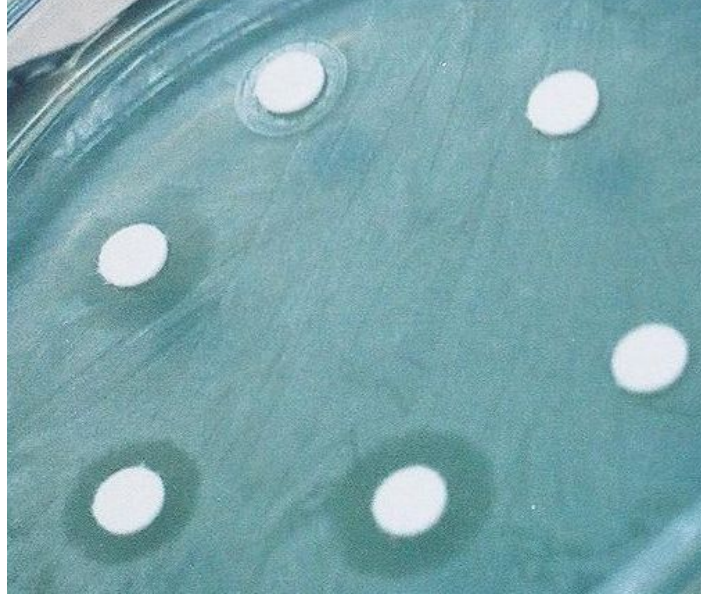
Tablo 18. Örneklerden Elde Edilen İzolat Sayısı

| | Süt | Yoğurt | Kefir | Tereyağı | Krema | Tulum Peyniri | Kaşar Peyniri | Beyaz Peynir | Sucuk |
|---------------|------|--------|-------|----------|-------|---------------|---------------|--------------|-------|
| Örnek sayısı | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| İzolat sayısı | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |

3.2. İzolatların Antimikrobiyel Etkisinin Belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyel etkisinin belirlenmesi için üç farklı metot kullanıldı. Bu amaçla hem izolatların aktif kültürleri hem de izolatların MRS Broth içerisinde 18 saat üretilmiş aktif kültürlerinin 10.000 x g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilmiş süpernatantları kullanıldı. Birçok araştırmada kağıt disk, kuyucuk ve mikrotiter yöntemlerinin inkübasyon süreleri 24–48 saat olarak belirtilmiş olmasına karşın, bu çalışmada yapılan denemelerde inkübasyon boyunca ilk 6. ve 8. saatin antimikrobiyel etkiyi belirlemede çok önemli olduğu, bu süre boyunca oluşan zonların çok net gözlemlendiği ve ilerleyen her saat diliminde zonun

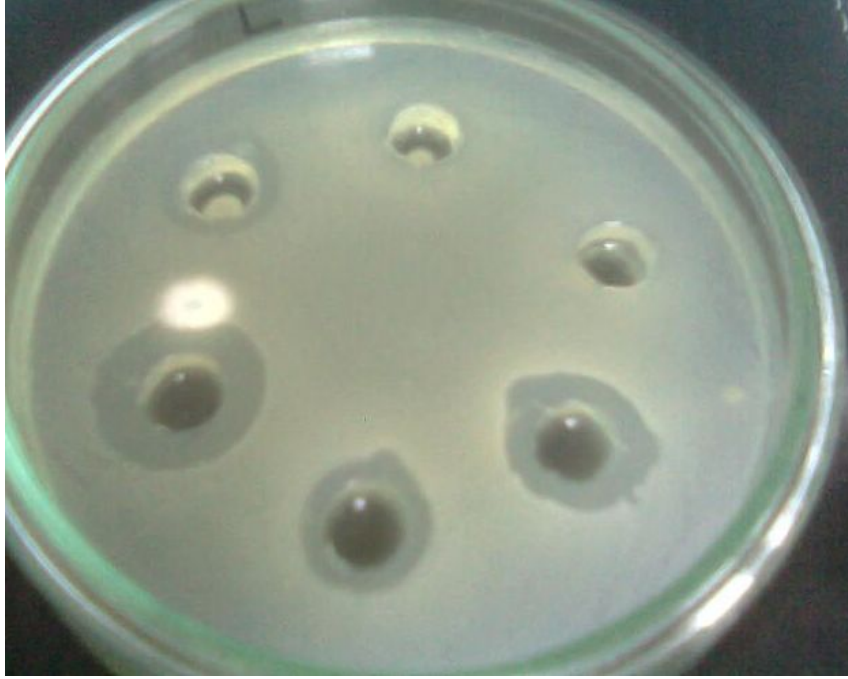
kaybolduğu ve 24. saat sonunda çok nadir olsa da sadece birkaç izolatın antimikrobiyel etkisini koruduğu gözlendi. Bu nedenle çalışma boyunca her antimikrobiyel etki testi yapılışında mutlaka 6. ve 8. saatler özellikle takip edildi. Zon veren izolatlar işaretilenerek yine de 12–24 saatlik inkubasyon periyodunun dolması beklendi ve sonuçlar tekrar okundu.



Resim 1. Antimikrobiyel Etki Belirleme Testleri; Kağıt Disk Yöntemi, Test mikroorganizması: *L. monocytogenes*



Resim 2. Antimikrobiyel Etki Belirleme Testleri; Kağıt Disk Yöntemi, Test mikroorganizması: *S. aureus*



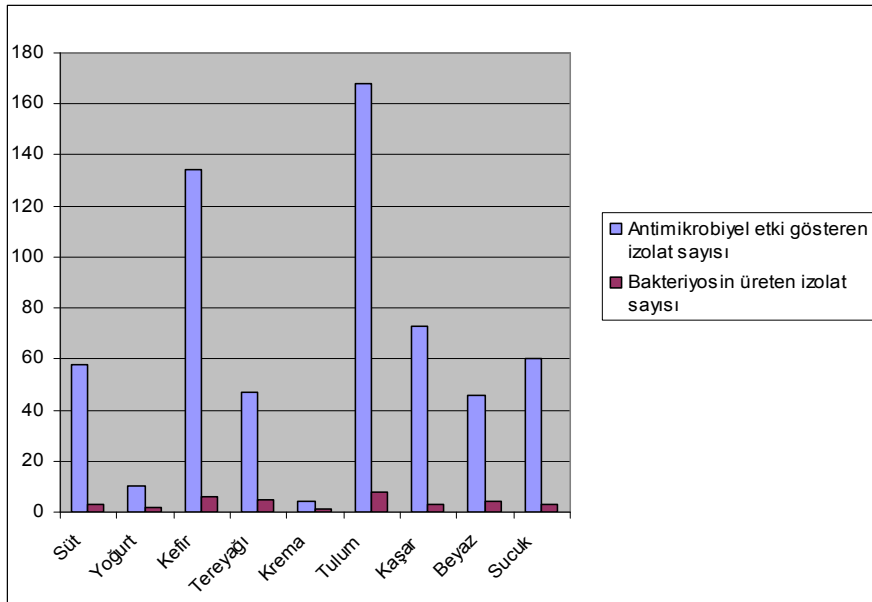
Resim 3. Antimikrobiyel Etki Belirleme Testleri; Kuyucuk Yöntemi, Test mikroorganizması: *L.monocytogenes*

Resim 1, 2 ve 3'te antimikrobiyel etki belirleme yöntemlerinden bazılarının resimleri verilmiştir.

Tablo 19. Antimikrobiyel Etki Gösteren İzolat Sayısı

| | Süt | Yoğurt | Kefir | Tereyağı | Krema | Tulum Peyniri | Kasar Peyniri | Beyaz Peynir | Sucuk | Toplam |
|-------------------------------------|------|--------|-------|----------|-------|---------------|---------------|--------------|-------|--------|
| Örnek sayısı | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 500 |
| İzolat sayısı | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 13500 |
| Antimikrobiyel etkili izolat sayısı | 58 | 10 | 134 | 47 | 4 | 168 | 73 | 46 | 60 | 601 |
| Bakteriyosinjenik izolat sayısı | 3 | 2 | 6 | 5 | 1 | 8 | 3 | 4 | 3 | 35 |

Antimikrobiyel etkinin belirlenmesi için çok fazla sayıda yöntem olması, dolayısıyla bu çalışmada en uygun yöntemi seçmek adına, bilinen farklı metotlar karşılaştırıldı. En iyi sonuç veren yöntemlerin kağıt disk yöntemi ile kuyucuk yöntemi olduğu belirlendi. Fakat bir yöntemde antimikrobiyel etki göstermeyen bir izolatın diğer yöntemde etkili görüldüğü belirlendiğinden dolayı çalışmanın her aşamasında mutlaka her 3 yöntem de birlikte kullanıldı. Tablo 19 ve 20’de yapılan antimikrobiyel etki belirleme test sonuçlarında 12 test mikroorganizmasına karşı antimikrobiyel etki gösteren izolat sayısı ve çeşitli patojenlere karşı izolatların antimikrobiyel etkisi verilmiştir. Grafik 1’de antimikrobiyel etki gösteren izolatların gıda örneklerine göre dağılımı sunulmuştur.



Grafik 1. Antimikrobiyel Etki Gösteren İzolatların Sayısı

3.3. Bakteriyosinlerin Varlığının Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkisinin H_2O_2 , organik asitler (laktik asit ve asetik asit) veya diğer inhibitörlerden mi yoksa bakteriyosinden mi kaynaklandığını belirlemek için bakteriyosinlerin dışında kalan diğer inhibitör etkenleri elimine etmek için laktik asit bakteri izolatlarının MRS Broth içerisinde 18

saatlik aktif kültürleri hazırlandı. 10.000 x g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılarak 0,22 µm por çaplı mikrofiltre ile süzülerek steril edildi.

Organik Asitlerin Antimikrobiyel Etkisinin Elimine Edilmesi: Steril süpernatantların pH'ları 5 N NaOH veya 5 N HCl kullanılarak pH 6,5–7 olarak ayarlandı. Antimikrobiyel etki belirleme testleri uygulandı. Testlerin yapılmasında kontrol grubu olarak 100 kat sulandırılmış laktik asit örneği de deneye alındı. Nötralizasyon işlemi sonrasında daha önceden antimikrobiyel etki gösteren izolatların çok büyük bir kısmının etkisini kaybettiği gözlemlendi.

Tablo 20. Çeşitli Patojenlere Karşı İzolatların Antimikrobiyel Etkisi

| İzolat | <i>L. monocytogenes</i> | <i>S. aureus</i> | <i>Micrococcus luteus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>E. coli</i> |
|--------|-------------------------|------------------|---------------------------|--------------------------|----------------|
| 1 | + | + | + | + | + |
| 2 | + | + | + | + | + |
| 3 | + | + | + | + | + |
| 4 | + | + | + | + | - |
| 5 | + | + | + | + | - |
| 6 | + | + | + | + | - |
| 7 | + | + | + | + | - |
| 8 | + | + | + | + | - |
| 9 | + | + | + | + | - |
| 10 | + | + | + | + | - |
| 11 | + | + | + | + | - |
| 12 | + | + | + | + | - |
| 13 | + | + | + | + | - |
| 14 | + | + | + | + | - |
| 15 | + | + | + | + | - |
| 16 | + | + | + | + | - |
| 17 | + | + | + | + | - |
| 18 | + | + | + | + | - |
| 19 | + | + | + | + | - |
| 20 | + | + | + | + | - |
| 21 | + | + | + | + | - |
| 22 | + | + | + | + | - |
| 23 | + | + | + | + | - |
| 24 | + | + | + | + | - |
| 25 | + | + | + | + | - |
| 26 | + | + | + | + | - |
| 27 | + | + | + | + | - |
| 28 | + | + | + | + | - |
| 29 | + | + | + | + | - |
| 30 | + | + | + | + | - |
| 31 | + | + | + | + | - |
| 32 | + | + | + | + | - |
| 33 | + | + | + | + | - |

| | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|
| 34 | + | + | + | + | - |
| 35 | + | + | + | + | - |

* İzolatların hiç biri *S. enteritidis* ve *Y. enterocolitica* O:3'e karşı antimikrobiyel etki göstermemiştir.

İzolatlar incelendiğinde antimikrobiyel etkili 601 izolattan nötralizasyon sonrası sadece 35 adedinin antimikrobiyel etkisini koruduğu görüldü. Nötralizasyon sonrası antimikrobiyel etkisini koruyan izolatların etkilerinin pH'dan kaynaklanmadığı belirlendi.

Hidrojen Peroksitin Antimikrobiyel Etkisinin Elimine Edilmesi: Bu amaçla pH değeri nötralize edilmiş steril süpernatantlara, hidrojen peroksiti parçalamak için 1 mg/ml katalaz enzimi uygulandı ve antimikrobiyel etki test edildi. Katalaz enzimi uygulaması sonucunda yapılan antimikrobiyel testte hiç bir izolatın etkisini kaybetmediği gözlemlendi. Sonuç itibariyle belirlenen antimikrobiyel etkinin hidrojen peroksitten kaynaklanmadığı anlaşıldı.

Bakteriyosin ürettiği belirlenen izolatlar ve izolatların elde edildiği gıda örnekleri Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. Bakteriyosin Ürettiği Belirlenen İzolatların Elde Edildiği Örnekler

| İzolat | Örnek | İzolat | Örnek | İzolat | Örnek |
|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|
| 1 | Kefir | 13 | Yoğurt | 25 | Tulum peyniri |
| 2 | Kefir | 14 | Süt | 26 | Tulum peyniri |
| 3 | Kefir | 15 | Süt | 27 | Tulum peyniri |
| 4 | Kefir | 16 | Kaşar peyniri | 28 | Tulum peyniri |
| 5 | Kefir | 17 | Beyaz peynir | 29 | Tulum peyniri |
| 6 | Sucuk | 18 | Beyaz peynir | 30 | Tereyağı |
| 7 | Sucuk | 19 | Beyaz peynir | 31 | Tereyağı |
| 8 | Süt | 20 | Beyaz peynir | 32 | Tereyağı |
| 9 | Kaşar peyniri | 21 | Tulum peyniri | 33 | Tereyağı |
| 10 | Kaşar peyniri | 22 | Tulum peyniri | 34 | Tereyağı |
| 11 | Krema | 23 | Kefir | 35 | Sucuk |
| 12 | Yoğurt | 24 | Tulum peyniri | | |

3.4. Duyarlılık Testleri ve Proteolitik Enzim Uygulaması

Organik asitlerin ve H₂O₂'nin etkisinin elimine edilmesinden sonra yapılan antimikrobiyel etki belirleme testlerinin sonucunda bakteriyosin üreten izolatlar belirlendi. Fakat yine de kesin bir şekilde bu ifadeyi kullanabilmek için etkiye neden olan maddenin protein tabiatında olup olmadığını belirlemek amacıyla

süpernatantlara proteolitik enzimler uygulanarak antimikrobiyel test tekrarlandı. Uygulanan proteolitik enzimler sonrasında hiçbir izolatın antimikrobiyel etkisini koruyamadığı belirlendi. Bu da etkinin protein tabiatında bir maddeden kaynaklandığını göstermektedir. Tablo 22’de duyarlılık test sonuçları verilmiştir.

Tablo 22. Süpernatantlara Uygulanan Duyarlılık Testlerinin Sonuçları

| | Enzime duyarlılık (1mg/ml) | | | | Isıya duyarlılık | | | pH’ya duyarlılık | |
|----|---|----------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| | α - chymotrypsin 37°C’de 2 h | Protease 37°C’de 2 h | Trypsine 37°C’de 2 h | Katalaz 37°C’de 2 h | 4°C’de 7 gün | 65 °C’de 30 d | 121 °C’de 15 d | pH 2 37°C’de 30 d | pH 12 37°C’de 30 d |
| 1 | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 2 | + | + | + | - | - | - | - | - | + |
| 3 | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 4 | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| 5 | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| 6 | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 7 | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 8 | + | + | + | - | - | + | + | - | + |
| 9 | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 10 | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 11 | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 12 | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 13 | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 14 | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| 15 | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 16 | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| 17 | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| 18 | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 19 | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| 20 | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 21 | + | + | + | - | + | - | + | - | - |
| 22 | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 23 | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 24 | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 25 | + | + | + | - | - | + | + | - | - |
| 26 | + | + | + | - | - | + | + | - | - |
| 27 | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 28 | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 29 | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 30 | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 31 | + | + | + | - | - | + | + | - | + |
| 32 | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 33 | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| 34 | + | + | + | - | - | + | + | - | + |
| 35 | + | + | + | - | + | + | + | - | + |

(+), Duyarlı; (-), Duyarsız

Duyarlılık testlerinden, farklı pH denemeleri sonucunda etkinin pH 2–12 arasındaki değerlerde bazı izolatların etkisi için stabil olduğu ve etkisini yitirmediği bazı izolatların etkisinin ise kaybolduğu gözlemlendi. Yine aynı şekilde farklı ısı uygulamalarında özellikle pastörizasyon ve sterilizasyon ısı derecelerinde etkinin azaldığı hatta çoğu izolatta kaybolduğu gözlemlendi. Özellikle gıda üretim ve muhafaza teknikleri gereği kullanılan ısı-zaman değerlerinde (4°C’de 7 gün, 65°C’de 30 d, 121°C’de 15 d) aktivitesini koruyan izolatların gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanılabilirliği dikkat çekmektedir.

3.5. Bakteriyosinojenik İzolatların Gruplandırılması ve İdentifikasyonu

Laktik asit bakterileri izolatlarının tanımlanabilmesi ve karakterizasyonu amacıyla bunların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerini belirlemek için klasik identifikasyon yöntemleri kullanıldı. Tablo 23 ve 24’de yapılan öncelikli testlerin ve tolerans testlerinin sonuçları verilmiştir.

Yapılan testlerin sonuçlarına göre laktik asit bakteri izolatları gruplandırıldığında heterofermantatif *Lactobacillus* grubu olan *Betabacterium* grubuna ait 4 izolat, fakültatif heterofermantatif *Lactobacillus* grubu olan *Streptobacterium* grubuna ait 18 adet izolat, laktik *Streptococcus* grubuna ait 12 adet *Lactococcus* izolatu ve *Leuconostoc* cinsine ait 1 adet izolat belirlendi. Laktik asit bakterilerinin gruplandırılmasından sonra identifikasyonda ikinci aşamaya geçilerek karbonhidrat fermentasyon testleri yapıldı.

Karbonhidrat Fermentasyon test sonuçları incelendiğinde görüleceği gibi, bu test, klasik yöntemle veya test kitiyle yapıldığında bazı şekerleri tüm izolatların fermente ettiği, bazı şekerleri ise tüm izolatların fermente edemediği belirlendi. Bu nedenle tablolarda sadece farklı sonuçlar elde edilen şekerlerin test sonuçları verilmiştir. Klasik yöntemde D-laktoz, D-galaktoz, D-fruktoz, D-mannitol, D-glukoz, D-mannoz, sukroz, eskulin ve maltoz tüm izolatlar tarafından fermente edilmiştir. API test kiti kullanıldığında ise D-riboz, D-galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, N-asetilglukozamin, Eskulin, Salisin, D-maltoz, D-laktoz’un tüm izolatlar tarafından fermente edildiği belirlenmiştir. Arada gözlemlenen bu farkın, identifikasyon süresinden kaynaklandığı belirlendi. Klasik yöntemle yapılan

karbonhidrat fermantasyon testlerinde 4–7 gün kadar uzun bir fermantasyon süresi verilirken, API test kitleri için bu süre 24–48 saattir. Dolayısıyla şekerleri çok yavaş fermente edebilen izolatların varlığı söz konusu olabilir. Tablo 25 ve 26’da karbonhidrat fermantasyon test sonuçları verilmiştir.

Tablo 23. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda Yapılan Temel Testlerin Sonuçları

| Gram Pozitif, Katalaz Negatif, Oksidaz Negatif | | | | | | | | |
|--|-----------|------|----|----|-----|---------------|----|----|
| İzolat | Morfoloji | NaCl | | pH | | Sıcaklık (°C) | | |
| | | %10 | %6 | 4 | 9,6 | 0 | 10 | 45 |
| 1 | Kok | + | + | Z | + | Z | + | - |
| 2 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 3 | Basil | + | + | + | + | Z | + | - |
| 4 | Kok | Z | + | Z | + | - | + | - |
| 5 | Kok | Z | + | Z | + | - | + | - |
| 6 | Kok | Z | + | Z | + | - | + | - |
| 7 | Kok | Z | + | Z | + | - | + | - |
| 8 | Basil | - | + | Z | + | - | + | - |
| 9 | Kok | Z | + | Z | + | - | + | - |
| 10 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 11 | Basil | Z | + | + | + | Z | + | - |
| 12 | Basil | Z | + | + | + | + | + | - |
| 13 | Basil | Z | + | + | + | + | + | - |
| 14 | Kok | Z | + | Z | + | Z | + | - |
| 15 | Basil | Z | + | + | + | + | + | - |
| 16 | Basil | Z | + | + | + | + | + | - |
| 17 | Kok | Z | + | - | + | + | + | - |
| 18 | Kok | Z | + | - | + | + | + | - |
| 19 | Kok | Z | + | - | + | + | + | - |
| 20 | Kok | Z | + | - | + | + | + | - |
| 21 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 22 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 23 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 24 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 25 | Basil | - | + | + | + | + | + | - |
| 26 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 27 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 28 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 29 | Basil | + | + | + | + | + | + | - |
| 30 | Basil | Z | + | + | + | + | + | - |
| 31 | Basil | Z | + | + | + | + | + | - |
| 32 | Basil | Z | + | - | + | Z | + | - |
| 33 | Basil | Z | + | - | + | Z | + | - |

| | | | | | | | | |
|----|-----|---|---|---|---|---|---|---|
| 34 | Kok | - | + | + | + | + | + | - |
| 35 | Kok | Z | + | - | + | + | + | - |

Z, Zayıf Reaksiyon; +, Pozitif Reaksiyon; -, Negatif reaksiyon.

Tablo 24. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda Yapılan Metabolizma Testlerinin Sonuçları

| İzolat | %0,1 Metilen Mavisi | Asetat Agar | Voges Prouskauer | Argininden NH ₃ | Dekstran Üretme | Glukozdan Gaz |
|--------|---------------------|-------------|------------------|----------------------------|-----------------|---------------|
| 1 | + | - | + | + | - | - |
| 2 | Z | + | + | - | - | - |
| 3 | + | + | + | - | - | - |
| 4 | + | - | + | + | - | - |
| 5 | Z | - | Z | + | - | - |
| 6 | + | - | + | + | - | - |
| 7 | + | - | + | + | - | - |
| 8 | + | - | + | - | - | - |
| 9 | + | - | + | + | - | - |
| 10 | - | + | Z | - | - | - |
| 11 | Z | - | - | + | + | + |
| 12 | + | + | + | - | - | - |
| 13 | + | + | + | - | - | - |
| 14 | + | - | + | + | - | - |
| 15 | + | + | + | + | - | - |
| 16 | + | + | + | - | - | - |
| 17 | Z | - | Z | + | - | - |
| 18 | Z | - | Z | + | - | - |
| 19 | + | - | + | + | - | - |
| 20 | + | - | + | - | - | - |
| 21 | + | + | + | - | - | - |
| 22 | + | - | + | - | - | - |
| 23 | + | - | + | + | - | + |
| 24 | + | + | + | - | - | - |
| 25 | + | - | + | - | - | - |
| 26 | + | + | + | - | - | - |
| 27 | + | + | + | - | - | - |
| 28 | + | + | + | - | - | - |
| 29 | + | + | + | - | - | - |
| 30 | + | - | - | + | + | + |
| 31 | - | - | - | + | + | + |
| 32 | + | - | Z | + | - | - |
| 33 | + | - | Z | + | - | - |
| 34 | + | - | - | - | + | + |
| 35 | - | - | + | + | - | - |

Z, Zayıf Reaksiyon; +, Pozitif Reaksiyon; -, Negatif reaksiyon.

Tablo 25. Karbonhidrat Fermantasyon Test Sonuçları

| İzolat | Ara | Arg | Niş | Ram | Sor | Ksi | GlkG | Raf |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| 1 | + | | + | | + | + | | |
| 2 | | | + | + | + | | + | |
| 3 | | | + | | + | + | + | + |
| 4 | | | + | | + | + | | + |
| 5 | + | | + | | + | + | | + |
| 6 | + | | + | | + | | | + |
| 7 | + | | + | + | + | + | | |
| 8 | | | | | + | + | + | + |
| 9 | + | | + | | | | | + |
| 10 | + | | + | | + | | + | + |
| 11 | + | | | | | + | + | + |
| 12 | + | | + | + | + | | + | + |
| 13 | + | | + | | + | + | + | + |
| 14 | + | | + | | + | + | + | |
| 15 | + | | + | | + | + | + | + |
| 16 | + | | + | | + | + | + | + |
| 17 | + | | + | | + | + | | |
| 18 | + | | + | | + | + | | + |
| 19 | + | | + | | + | + | | |
| 20 | | | + | | + | + | | + |
| 21 | + | | + | + | + | | + | + |
| 22 | + | | + | + | | | + | |
| 23 | + | | + | + | + | + | + | + |
| 24 | + | | | | + | | + | + |
| 25 | + | | + | | + | | + | + |
| 26 | + | | + | + | + | | + | + |
| 27 | | | + | + | + | + | + | + |
| 28 | | | + | | + | | + | + |
| 29 | | | | | + | | | + |
| 30 | | | + | + | + | + | + | + |
| 31 | | | + | + | + | + | + | |
| 32 | + | | + | + | + | + | + | + |
| 33 | + | | + | | + | + | | + |
| 34 | | | + | | + | + | + | + |
| 35 | + | | + | + | + | + | | + |

* Tüm izolatlar D-laktoz, D-sellebiyoz, D-galaktoz, D-fruktoz, D-mannitol, D-glukoz, D-mannoz, sukroz, maltoz, D-salisin, D-trehaloz, eskulin ve D-ribozu fermente etmiştir.

* Ara, L-Arabinoz; Arg, L-Arginin; Niş, Nişasta; Ram, L-Ramnoz; Sor, Sorbitol; Ksi, D-Ksiloz; GlkG, Sodyum D-Glukonattan gaz; Raf, D-Rafnoz.

Tablo 26. Karbonhidrat Fermentasyon Test Sonuçları (API Test Kiti ile)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Ara | + | | | | | | | | | | | + | + | | + | + | | + |
| Ksi | | | | | | | | | | | + | | | | | | | + |
| Ram | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dul | | + | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| Man | | + | + | | | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | | + |
| So | + | + | + | | | | | + | | | | + | + | | + | + | | |
| MDM | | | | | | + | + | + | | | | + | + | + | + | + | | + |
| MDG | | | | | + | | | | | | + | | | | | | | |
| Amy | | + | + | + | | | | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | |
| Arb | | + | + | + | | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + |
| Sel | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Mel | + | | | | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | | + |
| Sak | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | | + |
| Tre | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Inu | | + | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mlz | | + | + | | | | | + | | | + | | + | | + | + | | |
| Raf | | | | | + | | | + | | | + | + | + | | + | + | | + |
| Niş | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gen | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + |
| Tur | | + | + | | + | | | + | | | + | + | + | | + | + | | |
| Tag | + | + | + | | | | | | + | + | | | | | | | | |
| Arb | | | | | | | | + | | | | | | | | | | |
| Glk | | | | | | | | + | | | + | + | + | | + | + | | |

* **Ara**, L-arabinoz; **Ksi**, D-ksiloz; **Ram**, L-Ramnoz; **Dul**, Dulsitol; **Man**, D-Mannitol; **Sor**, D-sorbitol, **MDM**, Metil- α -Dmannopiranosidaz; **MDG**, Metil- α -Dglukopiranosidaz; **Amy**, Amygdalin; **Arb**, Arbutin; **Sel**, Sellebiyoz; **Mel**, D-Mellibioz; **Sak**, Sakaroz; **Tre**, Trehaloz; **Inu**, Inulin; **Mlz**, Melezitoz; **Raf**, D-Rafinoz; **Niş**, Nişasta; **Gen**, Gentiobioz; **Tur**, D-turanoz; **Tag**, Tagatoz; **Arb**, D-arabitol; **Glk**, Potasyum Glukonat.

Tablo 26. Karbonhidrat Fermentasyon Test Sonuçları (API Test Kiti ile) (**Devamı**)

| | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Ara | | | | | + | + | + | + | | | | | | | | | |
| Ksi | | | | | | | | | | | | + | | + | | + | + |
| Ram | | | | | | | | | + | | | | + | + | | | |
| Dul | | | | | | | | | | + | | | | + | | | |
| Man | | | | | | + | + | + | + | + | + | | + | + | | | + |
| So | | | | | | + | + | + | | + | | | + | + | | | |
| MDM | | | | | | + | | | + | | | | | + | | | + |
| MDG | | | | | | | | | | | | + | | + | | + | |
| Amy | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | |
| Arb | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | | | + |
| Sel | + | | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + |
| Mel | | | | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | | + | + |
| Sak | | | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + |
| Tre | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + |
| Inu | | | | | | | | | | + | | | | + | | | |
| Mlz | | | | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | | | |
| Raf | | | | | + | + | | + | + | | | + | | + | | + | + |
| Niş | | + | + | | | | | | | | | | | | | | |
| Gen | | | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + |
| Tur | | | | | | + | | | + | + | | + | + | + | | | |
| Tag | | | | | | | | | | + | | | | + | | | |
| Arb | | | | | | | | | + | | + | | + | + | | | |
| Glk | | | | + | + | + | | | | | | + | | + | | | |

* **Hepsi negatif sonuç verenler:** Gliserol, Eritritol, D-arabinoz, L-ksiloz, D-adonitol, Metil β D-ksilopiranosidaz, L-sorboz, İnositol, Glikojen, ksilitol, D-lyksoz, D-fukoz, L-fukoz, L-arabitol. **Hepsi pozitif sonuç verenler:** D-riboz, D-galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, N-asetilglukozamin, Eskulin, Salisin, D-maltoz, D-laktoz,



Resim 4. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda Kullanılan API Test Kiti

Yapılan testlerin sonuçlarına dayanarak izolatlar gruplandırıldığında 35 izolat *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* cinsi üyesi olarak belirlendi. *Lactobacillus* cinsine giren izolatlar, *Streptobacterium* ve *Betabacterium* gruplarına ait izolatlar şeklinde gruplandırıldı. *Streptococcus* cinsindeki izolatların ise laktik *Streptococcus* oldukları belirlendi. Tablo 27’de izolatların grupları verilmiştir.

Tablo 27. İzolatların Gruplandırılması

| Cins | Grup | İzolat No |
|---------------|------------------|---|
| Lactobacillus | Streptobacterium | 2, 3, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 33 |
| | Betabacterium | 11, 23, 30, 31 |
| Leuconostoc | Leuconostoc | 34 |
| Streptococcus | Lactococcus | 1, 4, 5, 6, 7, 9, 14, 17, 18, 19, 20, 35 |

İdentifikasyon testleri sonucunda 35 izolatın 15 adetinin *Lb. plantarum*, 12 adetinin *Lc. lactis ssp. lactis*, 4 adetinin *Lb. brevis*, 3 adetinin *Lb. paracasei ssp. paracasei*, 1 adetinin ise *Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides* olduğu belirlendi.

Bu araştırmada analize alınan örnekler içerisinde bakteriyosinjenik suşların dağılımını incelenirse, kefir, tereyağı ve tulum peynirinin florası önem kazanır. Kefirde, *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lb. paracasei ssp. paracasei* ve *Lb. brevis* identifiye edildi. Tereyağında, *Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides*, *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum*, tulum peynirinde ise *Lb. paracasei ssp. paracasei* ve *Lb. plantarum* identifiye edildi.

Tablo 28'de identifiye edilen izolatların isimleri ve izole edildikleri gıda örnekleri verilmiştir.

Tablo 28. İdentifiye Edilen İzolatların İsimleri ve Kaynakları

| No | Kaynak | Suş | No | Kaynak | Suş |
|----|---------------|-------------------------------------|----|---------------|---|
| 1 | Kefir | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> | 19 | Beyaz peynir | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> |
| 2 | Kefir | <i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i> | 20 | Beyaz peynir | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> |
| 3 | Kefir | <i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i> | 21 | Tulum peyniri | <i>Lb. plantarum</i> |
| 4 | Kefir | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> | 22 | Tulum peyniri | <i>Lb. plantarum</i> |
| 5 | Kefir | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> | 23 | Kefir | <i>Lb. brevis</i> |
| 6 | Sucuk | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> | 24 | Tulum peyniri | <i>Lb. plantarum</i> |
| 7 | Sucuk | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> | 25 | Tulum peyniri | <i>Lb. plantarum</i> |
| 8 | Süt | <i>Lb. plantarum</i> | 26 | Tulum peyniri | <i>Lb. plantarum</i> |
| 9 | Kaşar peyniri | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> | 27 | Tulum peyniri | <i>Lb. plantarum</i> |
| 10 | Kaşar peyniri | <i>Lb. plantarum</i> | 28 | Tulum peyniri | <i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i> |
| 11 | Krema | <i>Lb. brevis</i> | 29 | Tulum peyniri | <i>Lb. plantarum</i> |
| 12 | Yoğurt | <i>Lb. plantarum</i> | 30 | Tereyağı | <i>Lb. brevis</i> |
| 13 | Yoğurt | <i>Lb. plantarum</i> | 31 | Tereyağı | <i>Lb. brevis</i> |
| 14 | Süt | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> | 32 | Tereyağı | <i>Lb. plantarum</i> |
| 15 | Süt | <i>Lb. plantarum</i> | 33 | Tereyağı | <i>Lb. plantarum</i> |
| 16 | Kaşar peyniri | <i>Lb. plantarum</i> | 34 | Tereyağı | <i>Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides</i> |
| 17 | Beyaz peynir | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> | 35 | Sucuk | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> |
| 18 | Beyaz peynir | <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> | | | |

3.6. Bakteriyosinlerin Kısmi Saflaştırılması

Bu aşamaya kadar çok sayıda laktik asit bakteri izolatıyla çalışılmasına karşın, proteinlerin saflaştırılmasındaki zorluklar nedeniyle 35 adet suşun bakteriyosininin saflaştırılması yerine içlerinden bir tanesi seçilerek tek bir suşun ürettiği bakteriyosin kısmi olarak saflaştırılmaya ve tanımlanmaya çalışıldı.

3.6.1. Amonyum Sülfat İle Çöktürme: Nötralize edilmiş steril süpernatantlardaki proteinlerin çöktürülmesi ve konsantre edilmesi amacıyla amonyum sülfat tuzu kullanıldı. Uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla %30'dan %80'e kadar amonyum sülfatın farklı konsantrasyonları test edildi. Tablo 29'da farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında test edilen antimikrobiyel etki verilmiştir.

Tablo 29. Farklı Amonyum Sülfat Konsantrasyonlarında Test Edilen Antimikrobiyel Etki

| | Amonyum Sülfatın Konsantrasyonu | | | | | |
|-------------|--------------------------------------|------|------|------|------|------|
| | Antimikrobiyel Etki Zon Çapları (cm) | | | | | |
| | % 30 | % 40 | % 50 | % 60 | % 70 | % 80 |
| Süpernatant | 1,5 | 1,35 | 1,45 | 1,5 | 1,15 | 1,6 |
| Çökelti | 1,5 | 1,95 | 1,75 | 1,75 | 1,4 | 1,65 |

Amonyum sülfatın farklı konsantrasyonlarında süpernatantlarının ve çökeltilerinin hepsinde antimikrobiyel etki gözlemlendi. Belirlenen antimikrobiyel etkide zon çaplarının da birbirine çok yakın değerler verdiği belirlendi. En etkili konsantrasyon %40 olarak belirlenmesine rağmen %80'lik konsantrasyon uygulandığında etkili proteinin çoğunluğunun çökeltiye geçtiği belirlendi. Bu aşamada elde edilen bulgular sonucunda, bakteriyosinin amonyum sülfat ile çökmediği, çöktürme işleminin yapıldığı erlenin iç cidarına yapışıp toplandığı gözlemlendi. Proteinin bu özelliği nedeniyle amonyum sülfat ile çöktürme işlemi sonrası çözeltinin, özellikle toplanan proteinlerin yapışkanlıkları nedeniyle erlenden

tam olarak alınmadığı, santrifüjleme aşamasında proteinin çökmediği ve süpernatantın yüzeyinde kaldığı görüldü. Sonuçlarda gözlemlenen dalgalanmaların nedeni buna bağlandı.

Yapılan denemelerde amonyum sülfat ile çöktürme işlemi için santrifüjlemenin uygun olmadığı, bu işlem yerine çöktürme işlemi sonrası filtrasyonun daha uygun olduğu belirlendi ve %80'lik amonyum sülfat ile çöktürme sonrası örnek, Whatman (12,5 cm, 1441 125) filtre kağıdından süzüldü. Süzüntünün antimikrobiyel etkisi test edildiğinde hiçbir etki gözlenemedi. Süzme sırasında erlene yapışıp kalan çökelti, erlene 10 mM sodyum fosfat tamponundan 1–2 ml konup çalkalayarak çözündürüldü ve aynı tampon çözeltiden 8 ml eklenerek antimikrobiyel etkisi test edildi. Test sonucu çökeltinin antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlendi ve direk olarak diyalize alındı.

3.6.2. Diyaliz İşlemi

Amonyum sülfatın % 80'lik konsantrasyonu ile çöktürülen ham bakteriyosin örneğinden amonyum sülfatın uzaklaştırılabilmesi, proteinin konsantre edilmesi ve aynı zamanda çözeltinin kısmi olarak saflaştırılabilmesi için diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz işlemi için, amonyum sülfat ile çöktürme sonrası elde edilen çökelti toplam 10 ml sodyum fosfat tamponu ile sulandırıldıktan sonra diyaliz edildi.

Diyaliz işlemi sonrası elde edilen diyalizatın hacminin arttığı ozmatik basınç nedeniyle diyaliz poşeti içerisine saf su girişi olduğu tespit edildi. Bu nedenle bu aşamada mutlaka diyaliz poşetinin kullanılan hacimden daha fazla bir hacimde kesilmesi gerektiği ve diyaliz işlemi boyunca poşetin tamamının tampon çözelti içerisinde kalması gerektiği aksi halde kuruyarak çatladığı gözlemlendi. Ham bakteriyosin olarak adlandırılan diyalizatın antimikrobiyel etkisi test edildi.

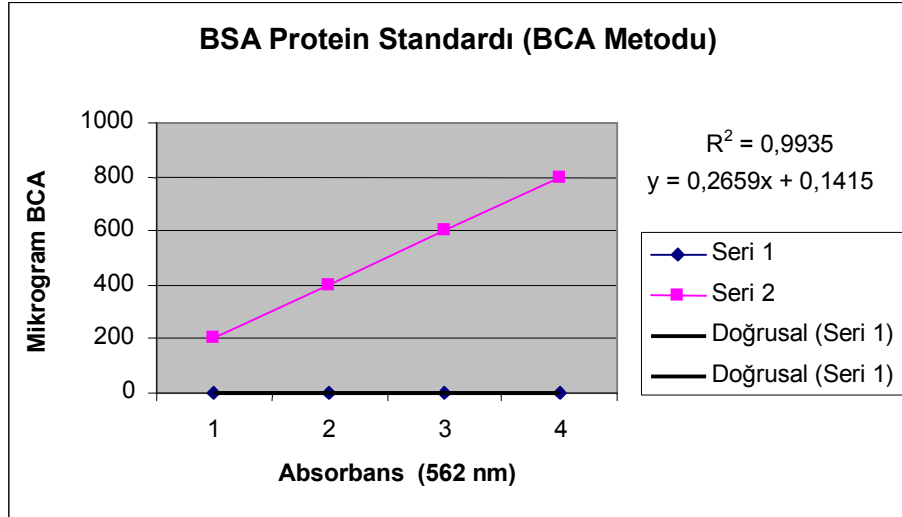
Antimikrobiyel etkinin test edildiği yöntemlerde 6. ve 8. saatten sonra etkinin kaybolduğu gözlemlenmesine karşın, ham bakteriyosin ile yapılan etki denemelerinde tam tersi bir sonuçla karşılaşıldı. Etkinin saatler hatta günler sürdüğü belirlendi.

3.6.3. İyon Değişim Kromatoğrafisi

Diyaliz sonrası elde edilen diyalizatın saflaştırılması amacıyla iyon değişim kromatoğrafisi uygulandı. İyon değişim kromatoğrafisi için kolon yerine batch yöntemi kullanıldı. İşlem sonrası elde edilen anyonik karakterli protein çözeltisine antimikrobiyel etki belirleme testi uygulandığında hiçbir antimikrobiyel etki gözlemlenememesi etkili proteinin anyonik karakterli olmadığını göstermiştir. Buna karşın elde edilen katyonik proteinlerin ise antimikrobiyel etkiye sahip olması bu bulguları doğrulamıştır.

3.7. Örneklerin Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Örneklerin protein konsantrasyonları BCA yöntemi ile yapıldı. Yöntemde Bicinchoninic acid protein assay kiti kullanıldı. Örneklerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için 562 nm'de verdikleri absorbans Elisa reader ile okundu. Tablo 30'da örneklerin protein konsantrasyonları verilmiştir.



Grafik 2. Standart Eğrinin Hesaplanması

Tablo 30. Örneklerin Protein Konsantrasyonları

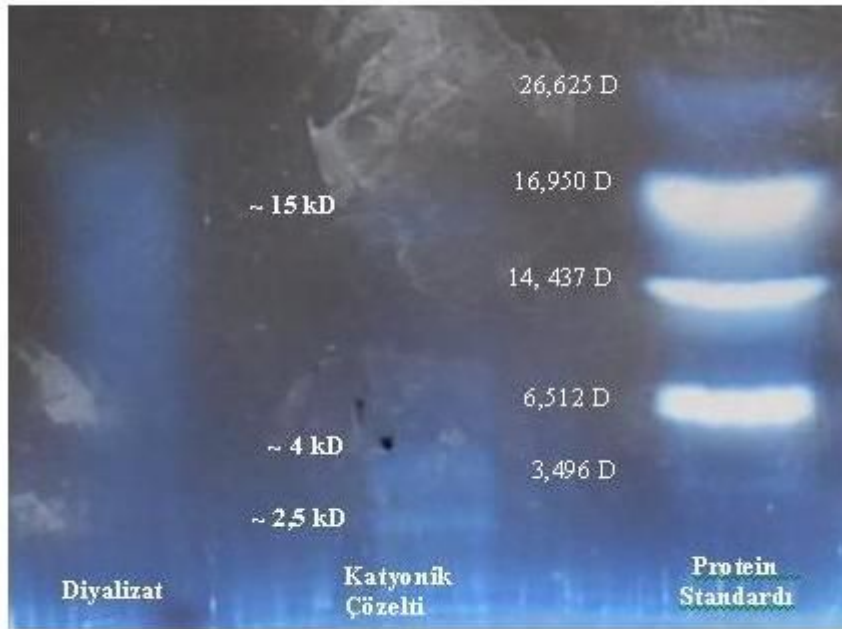
| Örnekler | Protein konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$) |
|----------------------------|--|
| Steril süpernatant | 3,552 |
| Amonyum sülfat süpernatant | 3,083 |
| Amonyum sülfat presipitat | 3,597 |
| Diyaliz süpernatant | 1,570 |
| Diyaliz presipitat | 2,464 |
| Anyonik proteinler | 2,685 |
| Katyonik proteinler | 2,012 |

3.8. Bakteriyosinin Saflığının Belirlenmesi ve Tanımlanması

Saflaştırma işleminin her aşamasında inhibitör etki gösteren örnekler öncelikle Tris-SDS-PAGE yöntemi ile elektroforez yapıldı. Fakat örnekteki proteinlerin molekül ağırlıkları çok küçük olduğundan bu yöntemde başarı sağlanamadı. Denemeler sonucu proteinlerin ya jele difüze olarak hiç ayrışmadığı ya da hiçbir bandın görülmediği belirlendi. Bu nedenle örneklerin elektroforezi için özellikle küçük molekül ağırlığına sahip proteinlere özel olarak geliştirilmiş Tricine-SDS-PAGE yöntemi denenerek örneklerde hem saflaştırma kontrol edildi hem de proteinlerin molekül ağırlıkları belirlenmeye çalışıldı. Bu yöntemde %10'luk ve %16'luk farklı konsantrasyonlardaki iki jel kullanılarak gradient jel hazırlandı. Örnekler 80 mA'de ortalama 2,5 saat yürütüldü. Jelde proteinlerin görülmesi için, jel öncelikle Coomassie Boyama yöntemi ve daha sonra Gümüş boyama yöntemi ile boyanarak ayrı ayrı incelendi. Coomassie blue ile yapılan boyamada küçük bantlar görünmediği için (Resim 5), gerekli işlemlerden geçirildikten sonra aynı jel Gümüş boyama ile boyandı. Gümüş boyamada 2–4 kDa'lık bantlar rahatlıkla (Resim 6) görülmektedir.



Resim 5. Tricine –SDS-PAGE’de Jelin Coomassie Blue ile Boyanması



Resim 6. Tricine –SDS-PAGE’ de Jelin Gümüş Boyama ile Boyanması

Geleneksel yöntemlerle üretilmiş yöresel bazı gıdalardan izole ettiğimiz laktik asit bakterilerinin çoğunluğunun antimikrobiyel etkiye sahip olduğu fakat bu etkinin de yine büyük oranda organik asitlerin varlığından kaynaklandığı belirlendi. Organik asitlerin ve olası H₂O₂'nin antimikrobiyel etkisini elimine edildiğinde 601 adet antimikrobiyel etkili izolattan sadece 35 adedinin etkisini koruduğu görüldü. Bu 35 izolat identifiye edildiğinde *Lactococcus*, *Lactobacillus* (*Streptobacterium*-*Betabacterium*), *Leuconostoc* cinsi üyeleri oldukları belirlendi.

Bu araştırmada, *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei ssp. paracasei* ve *Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides* olarak identifiye edilen suşların ürettiği antimikrobiyel etkili maddelerin özellikle Gram pozitif bakteriler olan *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* olmakla birlikte bazı önemli gıda kaynaklı patojenler üzerinde antimikrobiyel etki gösterdikleri belirlendi. Bunların arasında en önemlisi *Listeria*'ya karşı gösterdikleri antilisterial etkidir.

Bakteriyosinlerin Gram negatif mikroorganizmalar üzerinde tek başlarına etkisiz oldukları bilinmesine karşın bu araştırmada kefirde izole edilen *Lc. lactis ssp. lactis* ile yine kefirde izole edilen *Lb. paracasei ssp. paracasei*'nin ürettiği antimikrobiyel etkili maddelerin Gram negatif bir mikroorganizma olan *E. coli*'ye karşı gösterdiği antimikrobiyel etki önem kazanmaktadır. Ayrıca bu suşların ürettiği bakteriyosinin gıda üretim ve muhafazasında kullanılan ısı- süre değerlerine karşı da oldukça dayanıklı olması ve stabiliteelerini korumaları da ayrı bir önem arz etmektedir.

Bu çalışmada yapılan denemeler sonucu Gram pozitif bakterilere ve özellikle *L. monocytogenes* üzerine olan güçlü antimikrobiyel etkisinden dolayı, kaşar peyniri örneklerinden izole edilen *Lc. lactis ssp. lactis* suşunun ürettiği antimikrobiyel etkili madde kısmi olarak tanımlanmaya çalışıldı. Bu maddenin protein tabiatında, proteolitik enzim uygulamalarında aktivitesini kaybeden, fakat önemli ısı değerlerinde aktivitesi koruyan katyonik özellikli bir bakteriyosin olduğu belirlendi. Yapılan bu denemeler sonucu kaşar peynirinden izole edilen *Lc. lactis ssp. lactis* suşunun ürettiği antimikrobiyel etkili maddenin yaklaşık olarak 2,5 kDa, 4 kDa veya 15 kDa büyüklüğünde ve büyük bir antilisterial aktiviteye sahip bir bakteriyosin olabileceği söylenebilir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada geleneksel yöntemlerle üretilmiş, florasını laktik asit bakterilerinin oluşturduğu bazı gıdalardan bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri tanımlanmaya çalışıldı.

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması üzerine daha önce yapılan bir çalışmada (145) belirtildiği gibi laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması aşamalarında zorluklar yaşandı. İzolasyon için MRS ve M17 Agar'ın seçiciliğinin yetersiz olduğu buna karşın modifiye Chalmers Agar kullanıldığında çok daha başarılı sonuçlar elde edildiği gözlemlendi. Tanımlanması aşamasında ise laktik asit bakterileri hakkında birçok derleme ve makale olmasına karşın hala gerçek bir sınıflandırmanın mevcut olmaması karışıklıklara neden olmaktadır. Dalezios ve Siebert (38)'in de belirttiği gibi temel gruplandırmalarda kullanılan kriterlerden özellikle üreme ısıları, alt grup üyelerinde değişkenlik gösterebilmektedir. Fenotipik özellikler türle suş arasında değişebilmektedir. Fenotipik özellikleri birbirine çok benzeyen iki suşun genotipik özellikleri birbirinden tamamen farklı olabilmektedir. Bu yüzden laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında klasik sınıflandırma yerine mutlaka moleküler yöntemlerin tercih edilmesi gerekmektedir.

Laktik asit bakterileriyle yapılan çalışmalarda izolatları muhafaza etmek ve biyokimyasal özelliklerini korumak oldukça zordur. Çünkü zamanla ve her pasajlamada özelliklerini yitirebilmektedirler.

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkisinin belirlenmesinde çok sayıda yöntem mevcut olmakla birlikte tek başına %100 sonuç veren güvenilir bir yöntem bulunamamıştır. Yöntemlerde birçok faktör, sonucu etkilemektedir. Bir yöntemde etki gösteren izolat diğer yöntemde tamamen etkisiz görülebilmektedir. Bu çalışmada bakteriyosinlerin etki spektrumları dahilinde farklı patojenlere karşı farklı etkiler gösterdikleri belirlendi. Bu nedenle mutlaka tek bir patojen yerine birkaç farklı patojenle aynı izolata karşı etki denenmelidir. Antimikrobiyel etkinin test edilmesinde özellikle ilk önce Gram pozitif test bakterilerine öncelik verilmelidir. Çünkü bakteriyosinler özellikle yakın türlere karşı etki etmektedirler. *Listeria*, *Micrococcus* ve *Bacillus*'lara olan büyük antimikrobiyel etkilerinin sebebi de budur. Sınıflandırmaya dikkat edilecek olunursa *Listeria* ile laktik asit bakterileri arasında

çok büyük bir benzerlik söz konusudur. Ayrıca yapılan denemeler göstermiştir ki, birçok yöntemde bahsedildiği şekilde inkübasyon süresi 18–24 saat değil, kesinlikle 8 saati geçmemeli ve mutlaka 6. saatte zonlar incelenmelidir. Özellikle antimikrobiyel etkili izolatların belirlenmesi aşamasında kullanılan süpernatant saf ve konsantre olmadığından 8. saatin sonunda antimikrobiyel etkisini kaybetmekte ortama yeniden test mikroorganizmaları hakim olmaktadır. Yapılan antimikrobiyel etki belirleme yöntemlerinden birinde de koloninin bizzat kendisi kullanılmaktadır. Fakat bu çalışmada yapılan denemeler sonucu göstermiştir ki, antimikrobiyel etkili izolatların kolonileri yerine bizzat sıvı besiyerinde üretilmiş kültürleri çok daha başarılı sonuçlar vermektedir.

Antibakteriyel etkinin belirlenmesi için yapılan işlem basamakları çok aşamalı olduğundan ve fazla zaman gerektirdiğinden daha pratik daha kısa süren yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyaçtır. Örneğin, bakterinin aktif kültürünün hazırlanması, santrifüj edilmesi, nötralizasyon, filtrasyon, patojenlerin hazırlanması, ekim yöntemine göre besiyerlerinin hazırlanması, ekimin yapılması, bu işlemler günün büyük çoğunluğunu kapsadığından gece geç saatlere kalan ekim sonrası 6. saati takip etmek gece yarısına denk gelmektedir. Bu nedenle çoğu zaman ekim yapıp inkübasyonu başlatmak ertesi sabah petriyi değerlendirmek sonuçları değerlendirmede hatalara neden olmaktadır.

Artık standartlaşmış yöntemler olarak değerlendirilebilecek aşamalar çoğu çalışmalarda izolatın MRS Broth'a ekimi ve 18 saat inkübasyonu şeklindedir. İnkübasyon sonrası 4°C'de santrifüjleme basamağı yerine soğuk odada Whatman kağıdı ile süzme işlemi daha kolay ve pratiktir. Bu şekilde hem soğukta çökmesi istenen maddeler süzülecek hem de santrifüjleme sonrası yapılması gereken sterilizasyon işleme için filtreleme kolaylaşacaktır.

Yapılan pek çok çalışma göstermektedir ki, gıdalardan identifiye edilen laktik asit bakterilerinin büyük bir çoğunluğu antimikrobiyel etkiye sahiptir (56, 57,123, 131, 172). Fakat bu etkinin %70-80'i organik asitlerin ve düşük pH değerlerinin etkisinden kaynaklanmaktadır. Süpernatantların pH değerleri nötrlendiğinde etkisini koruyabilen suş sayısı % 5 gibi çok düşük değerleri bulmaktadır. İzolatların 18 saatlik aktif kültürlerinde süpernatantın pH değeri nötrlenip düşük pH değerlerinin neden olabileceği antimikrobiyel etki ile katalaz enzimi uygulanması sonucu hidrojen

peroksitin neden olabileceği antimikrobiyel etki elimine edildiğinde etkili izolat sayısında büyük bir düşüş gözlemlendi sayının 601'den 35'e düştüğü belirlendi. Bu veriler birçok çalışma sonucuyla uygunluk göstermektedir (56, 57, 123, 131, 172).

Bu çalışmada incelenen 13500 izolattan sadece 35 adet gibi çok düşük bir sayıda bakteriyosin üreticisi olması da bu verileri doğrulamaktadır.

Gıdalarda bakteriyosinjenik laktik asit bakterilerinin sayıca az bulunmasının birçok nedeni olabilir. Bunların başında analizde kullanılan besi ortamı, inkübasyon şartları, hedef mikroorganizmalar, antimikrobiyel etki belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin değişkenliği ve hassasiyeti sayılabilir.

Fermente sucuklardan izole edilen 1500 laktik asit bakterisinden sadece 60 adedi antimikrobiyel etki göstermiştir. Bu izolatlardan da sadece 3 adedinin bakteriyosin üreticisi olduğu tespit edildi. Bu sonuç, Cintas ve ark. (28)'nin verileriyle uygunluk göstermektedir. Cintas ve ark. (28), fermente sucuklardan izole ettikleri 500 adet laktik asit bakterisinin sadece 55 adedinin antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu 55 adet izolattan da sadece bir tanesinin (*P. acidilactici*) bakteriyosin üreticisi olduğunu bildirmişlerdir. Yine benzer bir çalışma yapan Albano ve ark. (6), fermente sucuklardan izole ettikleri 226 adet laktik asit bakterisinin antilisterial etkisini araştırdıkları çalışmada, 40 adet izolatın Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğunu fakat hiçbirinin Gram negatif bakterilere karşı etki göstermediğini tespit etmişlerdir. 40 izolattan 14 adedini inceleyerek bunların steril süpernatantlarına katalaz enzimi uyguladıklarında sadece 2 adedinin etkisini koruduğunu belirtmişlerdir. Bu iki izolat *P. pentosaceus* olarak tanımlanmıştır. Bromberg ve ark. (20), yaptıkları çalışmalarında 285 adet et örneğinden 813 adet laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. İzolatların 128 adedinin çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı şekilde Tahiri ve ark. (154), ticari olarak üretilmiş ve ambalajlanmış 60 adet et örneğinden bakteriyosin üreten izolatları belirledikleri çalışmalarında özellikle *Listeria*'ya karşı etkili olduğu ve en yüksek zon çapını veren izolatı *Carnobacterium divergens* olarak tanımlanmıştır.

Fermente süt ürünlerinde bakteriyosinjenik laktik asit bakterilerinin dağılımı incelendiğinde florasını laktik asit bakterilerinin oluşturduğu iki önemli gıda göze çarpmaktadır. Tulum peyniri ve kefirde izole edilen laktik asit bakterilerinin diğer

örneklerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek sayıda antimikrobiyel etkili izolatin olduğu görülebilir. Bu da floranın zenginliği ile açıklanabilir. Kefirden izole edilen 134 adet antimikrobiyel etkili izolattan sadece 6 adedi bakteriyosin üreticisidir. Bu da Powell ve ark. (131)'nin yaptıkları çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Powell ve ark. (131), kefirde izole ettikleri antimikrobiyel etkili 48 adet izolatin sadece 35 adedinin antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu fakat süpernatantın pH'sı nötrlendiğinde etkili izolat sayısının 1'e düştüğünü (*Lb. plantarum*) belirtmişlerdir. Yine kefir gibi geleneksel bir fermente süt ürünü olan kimchide Lee ve ark. (102), izole ettikleri yaklaşık 4000 adet laktik asit bakterisinin 25 adet indikatör suşa karşı antimikrobiyel etkisini test ettikleri çalışmalarında sadece 10 adet izolatin antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki fermente süt ürünlerinden özellikle peynir çeşitlerinden bakteriyosin izolatların araştırılmasında yine bu çalışmadaki verilere benzer şekilde çok düşük sayılarda bakteriyosin üreticisi bulunmuştur. Bu çalışmada çiğ sütlerden elde edilen 58 adet antimikrobiyel etkili izolattan sadece 1 adedinin bakteriyosin üreticisi olduğu belirlendi. Bu sonuç Villani ve ark. (172)'nin bulduğu verilere benzerlik göstermektedir. Yine bu araştırmada yoğurt, tereyağı, krema, tulum, kaşar ve beyaz peynirlerde yapılan denemelerde süpernatantın pH değeri nötrlendiğinde oldukça düşük sayıda bakteriyosin izolatı elde edilmiştir. Bu veriler Herreros ve ark (72)'nin peynirde yaptıkları çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Peynir örneklerinden izole ettikleri 31 adet laktik asit bakterisinin 4 adedinin antimikrobiyel etkili olduğunu belirtmişlerdir. Gonzalez ve ark. (56), fermente süt ürünlerinden 75 adet laktik asit bakterisi izole etmişler ve bu izolatların antimikrobiyel etkilerini test etmişlerdir. Toplam 10 izolatin antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Süpernatantların pH değeri nötrlendiğinde ve katalaz enzimi uygulandığında ise sadece 3 izolatin (*Lb. plantarum*) antimikrobiyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Gonzalez ve ark. (57), peynir örneklerinden izole ettikleri 395 laktik asit bakterisinin antimikrobiyel etkisini test ettikleri çalışmalarında süpernatantın pH değeri nötrlendikten ve katalaz enzimi ilave edildikten sonra sadece 24 adet izolatin antimikrobiyel etkisini koruduğunu belirlemişlerdir. Ohmomo ve ark. (123), çeşitli fermente gıdalardan 700 adet laktik asit bakterisi izole ederek bunların bakteriyosin üretebilme yeteneklerini

araştırmışlardır. 700 izolatın 30 adedi antimikrobiyel etkili bulunmuş, fakat pH nötürlendiğinde sadece 9 adedinin etkisini koruduğunu ve bakteriyosin ürettiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada identifiye edilen bakteriyosinojenik suşların tamamının Gram pozitif mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlendi. Fakat 3 suş hariç diğer 32 suş Gram negatif mikroorganizmalara karşı herhangi bir antimikrobiyel etki göstermedi. Delves-Broughton (41), nisinin *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* üzerinde oldukça etkili olduğunu, *Clostridium ssp.*'nin toksin üretimini ve sporlanmasını engellediğini buna karşın Gram negatif bakteriler, maya ve küflere karşı etkisiz kaldığını belirtilmiştir. Todorov ve Dicks (159), bozadan izole ettikleri 40 izolatın antimikrobiyel etkilerini araştırmışlardır. İzolatların, *Lb. casei*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, Klebsiella ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel etkili olduklarının fakat Gram negatif bakterilere karşı sadece *Strep. thermophilus*'un ürettiği thermophilin 81, *Lc. lactis* KCA2386'in ürettiği bakteriyosinin, *Lb. plantarum*'un ürettiği plantaricin 35d ve *Lc. lactis* NK24'ün ürettiği lacticin NK24 bakteriyosininin etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen bulguların aksine Vignolo ve ark. (171), fermente sucuklardan izole ettikleri 100 adet *Lc. lactis* ve *Lb. plantarum* izolatlarının bakteriyosin ürettiğini ve bunların özellikle birçok Gram negatif (*E. coli*, Proteus, Serratia, Shigella, Klebsiella, Salmonella, Pseudomonas) bakteriler ile Gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*) bakteriler üzerinde antimikrobiyel etki gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Tahiri ve ark. (154), dondurulmuş midyelerden izole ettikleri *Carnobacterium divergens* M35 izolatının ürettiği divergicin M35 bakteriyosinin güçlü bir antilisteriyal etki gösterdiğini ve özellikle *L. monocytogenes*'e karşı yüksek antimikrobiyel etki gösterdiğini fakat *E. coli*'ye karşı etkili olmadığını belirtmişlerdir.

Bakteriyosinlerin Gram negatif mikroorganizmalara karşı etkisiz olması veya sınırlı bir etki göstermesi Gram negatiflerin dış membrandaki lipopolisakkaritin koruyucu bariyerine bağlanabilir. Gram negatif bakterilerin hücre geçirgenliği, elektrostatik basınç, yüksek hidrostatik basınç gibi koruma metotları kullanılarak arttırılabilir. Buna ilaveten, lipopolisakkarit tabakasında Mg iyonu tutan sitrat, EDTA

gibi çelatların kullanılması yoluyla da Gram negatiflerin membranının bütünlüğü bozularak bu bakterilere karşı bakteriyosinlerin etkisi arttırılabilir (23, 27, 142).

Yapılan testlerin sonuçlarına göre laktik asit bakteri izolatları gruplandırıldığında heterofermantatif *Lactobacillus* grubu olan *Betabacterium* grubuna ait 4 izolat, fakültatif heterofermantatif *Lactobacillus* grubu olan *Streptobacterium* grubuna ait 18 adet izolat, laktik *Streptococcus* grubuna ait 12 adet *Lactococcus* izolatı ve *Leuconostoc* cinsine ait 1 adet izolat belirlendi. İdentifikasyon testleri sonucunda 35 izolatın 15 adetinin *Lb. plantarum*, 12 adetinin *Lc. lactis ssp. lactis*, 4 adetinin *Lb. brevis*, 3 adetinin *Lb. paracasei ssp. paracasei*, 1 adetinin ise *Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides* olduğu belirlendi.

Çalışmada analize alınan örnekler içerisinde bakteriyosinojenik suşların dağılımı incelenirse, kefir, tereyağı ve tulum peynirinin florası önem kazanır. Kefirde *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lb. paracasei ssp. paracasei* ve *Lb. brevis* identifiye edildi. Tereyağında *Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides*, *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum*, tulum peynirinde ise *Lb. paracasei ssp. paracasei* ve *Lb. plantarum* identifiye edildi.

Bakteriyosinler ve bakteriyosinojenik laktik asit bakterileri üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde en çok araştırmanın nisin ve *Lc. lactis ssp. lactis*'e yönelik olduğu görülebilir. Bunda etkili olan faktörlerin başında nisinin gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin resmi olarak onaylanmış olması ve genetiği en iyi bilinen laktik asit bakterisinin *Lactococcus lactis* olması sayılabilir.

Araştırmada identifiye edilen 12 adet *Lc. lactis ssp. lactis* suşunun antimikrobiyel etkili maddeleri, tolerans testlerinde ve antimikrobiyel etki deneme sonuçlarında farklı bulgular göstermiştir. Her ne kadar bu şusun ürettiği nisin bilinen bir bakteriyosin olsa da aynı suş farklı bakteriyosin türleri de üretmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada farklı bulgular elde edilmesi bu ayrıntıyla açıklanabilir. *Lc. lactis ssp. lactis* türünün ürettiği bakteriyosinlerin lactococcin, lacticin, nisin olduğu yapılan araştırmalarda belirlenmiştir (95, 118, 129).

Kefirden izole edilen *Lc. lactis ssp. lactis* suşlarından birinin *E. coli* üzerinde güçlü bir antimikrobiyel etki gösterdiği belirlendi. Özellikle Gram negatif bakterilere karşı etkileri sınırlı veya hiç olmayan laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri içerisinde *E. coli*'ye karşı etkili bir antimikrobiyel madde salgılıyor olması bu suşa

önem kazandırmaktadır. Ayrıca bu izolatların çoğu 121°C'de 15 d gibi bir ısı değerinden ve pH 2–12 gibi geniş bir pH aralığından hiç etkilenmeden aktivitelerini sürdürebilmişlerdir. Özellikle gıda koruyucusu olarak kullanılabilirliklerinde bu önemli bir özelliktir. Lee ve ark. (102), fermente gıdalardan izole ettikleri *Lc. lactis ssp. lactis* suşunun ürettiği bakteriyosinin 100°C'de 10 d ısı uygulamasında aktivitesini koruduğunu fakat 121°C'de 10 d'da aktivitesinin yarısını kaybettiğini ve bu bakteriyosinin *E. coli* gibi Gram negatif bakterilere karşı etkisiz olduğunu belirtmişlerdir. Ivanova ve ark. (80), bozadan izole ettikleri *Lc. lactis ssp. lactis* suşunun *E. coli* üzerinde oldukça etkili bir bakteriyosin ürettiğini 30-80°C'de arasında aktivitesini koruduğunu, fakat 90°C'de ve üzeri ısılarda ve aktivitesini kaybettiğini belirlemişlerdir. Gharairi ve ark. (54), peynirlerden izole ettikleri *Lc. lactis ssp. lactis* suşunun ürettiği lactococcin MMT24'ün 100°C'de 15 d ısı uygulamasında ve pH 3–10 değerleri arasında aktivitesini koruduğunu ayrıca bu bakteriyosinin özellikle peynir yapımında kontamine flora olan *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* üzerinde oldukça büyük bir antimikrobiyel etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bu araştırmada identifiye edilen *Lb. plantarum*'un antimikrobiyel etkili madde ürettiğini belirten çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Belirlenen antimikrobiyel etkili maddeler proteolitik enzimlere karşı tamamen duyarlıdır. İdentifiye edilen *Lb. plantarum* izolatlarının antimikrobiyel etkili maddelerinin ısı ve pH değerlerine farklı tolerans gösterdiği görüldü. Analize alınan gıdaların orjinleri dikkate alınarak incelendiğinde neredeyse tüm örnek gruplarında bu suş izole edilmiştir. Fakat bu suşların antimikrobiyel etkili maddeleri farklı özellikler taşımaktadır. pH 2'de tüm *Lb. plantarum* suşlarının antimikrobiyel etkili maddeleri etkisini korurken, pH 12'de bir kısmı etkisini yitirirken bir kısmı korumuştur. Aynı durum farklı ısı kombinasyonları içinde geçerlidir. Fakat tüm *Lb. plantarum* suşlarının bakteriyosinleri 121°C'de 15 d ısı uygulaması ile etkilerini kaybetmişlerdir. *Lb. plantarum*'un ürettiği antimikrobiyel etkili maddeler üzerine pek çok araştırma mevcuttur (73, 120, 124, 160, 166,). Fermente gıdalardan izole edilen bu suşun ürettiği bakteriyosinler üzerine yapılan çalışma sonuçlarında antimikrobiyel spektrumu ve özellikleri hakkında farklı veriler elde edilmiştir. Powell ve ark. (131), kefirde izole ettikleri *Lb. plantarum*'un ürettiği bakteriyosinin

121°C’de 20 d ısıya ve pH 2–10 değerlerine dayanıklı olduğunu fakat proteolitik enzimlerle etkisini tamamen yitirdiğini belirtmişlerdir. Gonzalez ve ark. (56), süt orjinli bir izolat olan *Lb. plantarum*’un ürettiği plantaricin C’nin Gram negatif bakterilere karşı etkisiz olmasına karşın Gram pozitif mikroorganizmalar için geniş bir antimikrobiyel spektruma sahip olduğunu belirtmişlerdir. Aslim ve ark. (12), süt ürünlerinden izole ettikleri *Lb. plantarum*’un ürettiği antimikrobiyel etkili maddenin *Yersinia enterocolitica* ve *E. coli* üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir. Probiyotik bir bakteri olarak bilinen *Lb. plantarum* süt, kaşar peyniri, yoğurt, tereyağı ve tulum peynirlerinden izole edildi. Suşların sayısı incelendiğinde tulum peyniri bu probiyotik kültürü oldukça yüksek sayıda içermektedir.

Leuconostoc’ların ürettiği bakteriyosinler; leucocin A, leucocin C mesentericin Y105, leucocin A-UAL 187, mesenterocin 5, leuconocin S ve carnosin MA araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (36, 70, 148, 169). Tereyağından tanımlanmış *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* suşunun ürettiği bakteriyosinin özelliklerine bakıldığında, bu bakteriyosinin *L. monocytogenes* ve *S. aureus*’a karşı etkili olduğu fakat test bakterisi olarak kullanılan hiçbir Gram negatif mikroorganizmayı inhibe etmediği belirlendi. Buna karşın pH 2’de etkisini koruduğu fakat pH 12’de etkisini kaybettiğini, aynı şekilde 65°C’de 30 d ve 121°C’de ısı uygulamalarına çok hassas olduğu fakat 4°C’de 7 gün boyunca etkisini koruduğu gözlemlendi. Choi ve ark. (26) fermente sebzelerden tanımlanmış *Leuconostoc sp. J2* suşunun leuconocin ürettiğini ve bu bakteriyosinin *E. coli* ve *Y. enterocolitica* gibi Gram negatif mikroorganizmalara karşı da büyük bir antimikrobiyel etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı bakteriyosinin pastörizasyon ısı değerlerine dirençli olduğu fakat ısı değeri arttıkça aktivite de azalma gözlemlendi vurgulanmıştır.

Bu araştırmada tereyağı, krema ve kefir’den izole edilen *Lb. brevis*’in ürettiği antimikrobiyel etkili maddeler hakkında yapılan çalışmalar çok az sayıdadır. *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* ve *Lb. acidophilus*’un bakteriyosinleri üzerine çok fazla sayıda araştırma mevcut olmasına karşın, *Lb. brevis* ve *Lb. paracasei ssp. paracasei* bakteriyosinleri üzerinde az sayıda çalışmaya ulaşılabildi. *Lb. brevis* izolatlarının ürettiği antimikrobiyel etkili maddelerden biri hariç diğerlerinin 121°C’de 15 d ısı işlem uygulamasına ve pH 12’ye duyarlı oldukları belirlendi. Proteolitik enzimlerin hepsine duyarlı olan bu maddeler, test mikroorganizması olarak kullandığımız tüm

Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyel etki gösterirken Gram negatif bakterilere karşı herhangi bir etki göstermemişlerdir. Lewus ve Montville (104), *Lb. brevis*'in bakteriyosin ürettiğini belirlemişlerdir. Ogunbanwo ve ark. (122), fermente gıdalardan izole ettikleri *Lb. brevis*'in ürettiği bakteriyosinin *E. coli* NCTC10418 ve *Enterococcus faecalis* EF1 üzerinde büyük bir antimikrobiyel etki gösterdiğini fakat *Candida albicans* ve *Klebsiella sp.* UCH15'e karşı etkisiz olduğunu belirtmiştir. *Lb. brevis* bakteriyosininin 121°C'de 15 d ısı uygulamasına ve pH 2–8 değerleri arasında oldukça stabil olduğunu vurgulamışlardır.

Kefir ve tulum örneklerinden izole edilen *Lb. paracasei ssp. paracasei* suşunun ürettiği antimikrobiyel etkili maddesinin *E. coli* üzerinde oldukça etkili olduğu belirlendi. 3 farklı *Lb. paracasei ssp. paracasei* suşlarının ürettiği antimikrobiyel etkili maddelerden bir tanesi tüm ısıl işlem uygulamalarında stabilitesini korurken diğer ikisi ısıl işlemlerde aktivitelerinin bir kısmını kaybetmişlerdir. Lozo ve ark. (106), geleneksel yöntemlerle üretilmiş ev yapımı beyaz peynirlerden izole ettikleri *Lb. paracasei ssp. paracasei* BGBUK2-16'nın ürettiği Bacteriocin 217'nin ~7 kDa molekül ağırlığında olduğunu ve *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde antimikrobiyel etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Todorov ve Dicks (159), fermente bir içecek olan bozadan izole ettikleri *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. paracasei*'nin ürettikleri bakteriyosinlerin proteolitik enzimlerde aktivitelerini tamamen yitirdiklerini fakat amilaz enziminden etkilenmediklerini, pH 2–10 gibi geniş bir pH aralığında aktivitelerinin stabil olduğunu, 30-100°C'de 1 saat ve 121°C'de 20 d ısı uygulamasında aktif kaldıklarını, fakat Triton X–100, Triton X–114 ve tween 80'de aktivitelerini kaybettiklerini buna karşın SDS, Tween 20 ve üreye karşı aktivitelerini koruduklarını belirtmişlerdir.

Bir türe ait bakterinin farklı izolatlarının ürettiği antimikrobiyel etkili maddelerinin ısı, pH, enzim uygulamalarına gösterdiği tolerans veya patojenlere karşı gösterdiği inhibisyon spektrumu değişkendir. Bunda birçok faktörün rol oynadığı bilinmektedir. Bu araştırma bulguları, yapılan diğer araştırma sonuçları ile karşılaştırıldığında en önemli faktörün, izolatın orjini, izolatın alt türlerinin farklı maddeler salgılayabileceği, kullanılacak test mikroorganizmasının türü, bakteriyosinlerin saflaştırma ve identifikasyon yöntemlerindeki farklılıklar,

antimikrobiyel etki deneme yöntemlerinin değişkenliği ve hassasiyeti olabileceği söylenebilir.

Çalışmada ham bakteriyosin örneklerinin farklı proteolitik enzimlere, farklı ısı uygulamaları ve pH değerlerine toleransları incelendiğinde tüm örneklerin proteolitik enzimlerden etkilendiğini ve enzim uygulaması sonucunda aktivitelerini tamamen kaybettikleri gözlemlenmiştir. Bu da birçok kaynakta bahsedildiği üzere etkili maddenin protein tabiatında olduğunu göstermektedir (6, 22, 131, 159, 160).

Ohmomo ve ark. (123), fermente sebzelerden izole ettikleri *Enterococcus faecium* NIAI 157'nin ürettiği enterocin ON-157'nin proteolitik enzimlerden α -chymotrypsin ve pepsin uygulamalarında tamamen diğer proteolitik enzimlerde ise kısmen aktivitesini yitirdiğini belirtmişlerdir.

Isıya duyarlılıklarının belirlenmesinde seçilecek ısı değerlerinin özellikle gıda üretim ve muhafazasında kullanılan ısı değerleri olmasına dikkat edilerek yapılan bu araştırmada 4°C'de 7 gün, 65°C'de 30 d ve 121°C'de 15 d ısı uygulaması denendi. Örneklere göre tolerans değişmekle birlikte genel olarak ilk iki ısı kombinasyonuna dayanıklı olan örnekler sterilizasyon ısı kombinasyonunda çoğunlukla aktivitelerini kaybetmişlerdir. Fakat sterilizasyon ısı değerlerinde bile aktivitesini kaybetmeyen 3 örnek değerlendirildiğinde bunların ısıya karşı olan stabiliteleri önem kazanmaktadır.

Laktik asit bakterileri özellikle düşük pH değerlerinde aktifirler ve ürettikleri bakteriyosinlerinde en iyi çalışma pH değerleri yine asidik karakterlidir. Yapılan denemelerde pH 2 gibi düşük bir pH değerinde hiçbir örneğin aktivitesini kaybetmemiş olması buna bağlanabilir. Fakat tam aksine bazik pH değerlerinde özellikle pH 12 gibi yüksek bir değerde örneklerin bir kısmı aktivitesini yitirmesine karşın bazıları korumuştur.

Ohmomo ve ark. (123), fermente sebzelerden izole ettikleri *Enterococcus faecium* NIAI 157'nin ürettiği enterocin ON-157'nin pH 4 değerinde en yüksek aktiviteyi veren bakteriyosin, aynı şartlarda pH 8'de aktivitesini kaybetmiştir. Albano ve ark. (6), sucuklardan izole ettikleri *P. acidilactici*'nin ürettiği iki farklı bakteriyosinin (Bacteriocin HA-6111-2 ve Bacteriocin HA-5692-3) pH 10'da aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybettiklerini hatta pH 12'de tamamen inaktif olduklarını, 100°C'de 60 d'da aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybettiklerini 121°C'de 20 d'da tamamen inaktif olduklarını belirtmişlerdir. Jamuna ve

Jeevaratnam (86), geleneksel fermente gıdalardan bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerini tanımladıkları çalışmalarında bakteriyosin ürettiğini belirledikleri iki izolatı *Lc. casei* ve *Lb. acidophilus* olarak tanımlamışlardır. Bakterilerin ürettiği bakteriyosinler amilaz ve katalaz enzimlerinden etkilenmemiş fakat proteolitik enzim uygulamasında aktivitelerini tamamen kaybetmişlerdir. Isıya stabil olan bu bakteriyosinler, 121°C'de 15 d, 80°C'de 1 saat'lik ısı uygulamalarında aktivitelerini korumuşlardır. pH 3–8 gibi geniş bir pH aralığında aktivitelerini sürdürmüşlerdir.

Bakteriyosinlerin saflaştırılması aşamasında uygulanan amonyum sülfatla çöktürme işleminde birçok çalışmada da (5, 21, 28, 42, 80) vurgulandığı şekilde ve yöntemin esası olarak belirtilen bakteriyosinlerin amonyum sülfat ile çöktüğü bilgisinin aksine bu çalışmada yapılan denemelerde bakteriyosinlerin amonyum sülfat ile çökmediği, sıvının yüzeyinde toplandığı veya erlenin iç cidarına yapıştığı gözlemlendi. Bu nedenle belirtilenin aksine amonyum sülfat uygulamasının ardından santrifüjleme işlemi değil filtrasyon yapılması çok daha uygun bulundu.

Saflaştırma aşamalarında hem saflaştırmayı kontrol edip belirleyebilmek amacıyla hem de bakteriyosinin molekül ağırlığını tespit edebilmek için yapılan elektroforez işleminde SDS-PAGE kullanıldığında protein bantlarının ayrışmadığı, jelle difüze olduğu ya da hiçbir bantın görülemediği belirlendi. Bu nedenle özellikle küçük molekül ağırlıklı proteinlerin elektroforezi için önerilen Tricine-SDS-PAGE yöntemi kullanıldı (141). Yine de yapılan bazı çalışmalarda belirtildiği gibi bazı durumlarda hiçbir şekilde bant görülemeyebilmektedir. Piard ve ark. (129), yaptıkları çalışmada SDS-PAGE ile bakteriyosinin molekül ağırlığını belirlemeye çalışmış fakat ne gümüş boyama ne de Coomassie blue boyama ile bantları görememişlerdir. Özellikle dondurulmuş bakteriyosin örneklerinde elektroforez sonuç vermeyebilir. Elektroforezde küçük peptitlerin jelle difüze olmasında boyama yöntemi de etkili olabilmektedir. Yapılan denemelerde Coomassie blue ile yapılan boyamada küçük bantlar hiç görünmezken gümüş boyama sonrası 2–4 kDa'luk bantların çok net şekilde görüldüğü belirlendi. Bunda her iki boyama yöntemi karşılaştırıldığında ilk farkın fiksasyon çözeltisi olduğu göze çarpmaktadır. Coomassie blue boyamada metanol ve asetik asit ile fiksasyon yaparken gümüş boyamada formaldehit gibi daha etkili bir fiksasyon söz konusudur. Hastings ve ark (70), yaptıkları çalışmada küçük molekül ağırlıklı peptitlerin jelle gözlemlenmesinin zor olduğunu çünkü jelle difüze

olduklarını fiksasyonda formaldehit ilavesi gerektiğini belirtmişlerdir. Muriana ve Klaenhammer (115), tanımlamaya çalıştıkları lactacin F bakteriyosininin, SDS-PAGE ile molekül ağırlığını belirlemeye çalıştıkları denemelerinde jelin Coomassie blue ile boyanamadığını fakat gümüş boyama ile 2,5 kDa'luk bandın görülebildiğini belirtmişlerdir. Araştırmacıların belirttikleri veriler ile bu çalışmadaki elektroforez bulguları benzerlik göstermektedir.

Bakteriyosinlerin saflaştırılması aşamasında karşılaşılan en büyük sorun, saflaştırmanın her aşamasında aktivitenin kaybolup kaybolmadığının belirlenmesi oldu. Aktivite test sonuçlarını alabilmek için en az 6 saat beklemek gerekmektedir. Bu da her bir saflaştırma aşamasının gecikmesine neden olur. Bakteriyosinlerin stabil aktiviteli olanlarının yanında çeşitli faktörlerle aktiviteyi kolaylıkla kaybedebilenleri de mevcuttur.

Bakteriyosinlerin bahsedilen yöntemlerle elde edilmesi çok masraflı ve zaman alıcı olmasına karşın elde edilen bakteriyosin miktarı çok azdır. Gıda sanayinde doğal koruyucu olarak kullanılabilirliğinin denenmesi için bile çok fazla miktarda bakteriyosin gerekmektedir. Bir de bunun sanayide kullanıldığı hesaplanırsa, büyük miktarlarda üretim için ekonomik metotlarının araştırılması ve belirlenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak sterilizasyon ısısına, düşük pH değerlerine stabil bakteriyosinler birçok araştırmada detaylı olarak incelenmiştir. Ekonomik üretim yöntemleri geliştirilerek büyük miktarlarda üretim yöntemleri geliştirilirse günümüzde doğal gıda koruyucusu olarak kullanılan nisin gibi diğer bakteriyosinler de gıda sanayinde doğal koruyucu olarak yerini alabilir. Son 20 yıldır üzerinde detaylı olarak çalışılan ve birçok araştırmanın konusu olan bakteriyosinin saflaştırılması ve tanımlanması ile gıdalarda koruyucu olarak kullanımı üzerine farklı sonuçlar vardır. Laboratuvar ortamında patojenlere karşı oldukça etkili olan bakteriyosinlerin mutlaka gıda ortamında da çok fazla sayıda denenmesi ve güvenilirliğinin kesinleşmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada yöresel gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretebilme yetenekleri incelenerek bakteriyosinjenik izolatlar tanımlanmaya çalışıldı. Toplam 13500 izolattan 601 adet antimikrobiyel etkili izolat tespit edildi. 601 izolattan sadece 35 adedinin bakteriyosinjenik olduğu

belirlendi. 35 izolat *Lb. plantarum*, *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *Lb. brevis*, *Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides* olarak identifiye edildi. Bunlar içerisinde *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* üzerine en etkili olan *Lc. lactis ssp. lactis*'in ürettiği bakteriyosin (veya bakteriyosinlerin) kısmi olarak tanımlanmaya çalışıldı. Tam olarak bir saflaştırma yapılamadığı için antimikrobiyel etkili tek bir proteinin mi yoksa bir den fazla proteinin mi olduğu kesin olarak söylenemez. Yapılan çalışmada bu bakteriyosinin proteolitik enzimlere duyarlı olduğu ve tamamen aktivitesini yitirdiği, 4°C'de 7 gün ve 65°C'de 30 d ısı işleme karşı dayanıklı olduğu ve aktivitesini koruduğu özellikle 121°C'de 15 d ısı uygulamasında aktivitesinin stabil olduğu belirlendi. Bakteriyosinin katyonik özellikte olduğu ve pH 2–12 arasında aktivitesini koruduğu tespit edildi. Kısmi saflaştırma sonucu bu bakteriyosin (veya bakteriyosinlerin) molekül ağırlığının yaklaşık olarak 15 kDa – 4 kDa veya 2,5 kDa olabileceği söylenebilir. 3 farklı molekül ağırlığında görülen bantların sadece biri antimikrobiyel etkili olabileceği gibi birden fazlası da antimikrobiyel etkili olabilir. Birçok bakteriyosinogenik suş sadece bir bakteriyosin sentezlerken, bazı suşların birden fazla (2 veya 3) bakteriyosin sentezlediği belirtilmiştir (117). Tam olarak saflaştırılabilmesi ve tanımlanabilmesi için kromatografik yöntemler uygulanması ve bakteriyosinin amino asit diziliminin tespit edilmesi gerekecektir. Var olan imkanlar dahilinde daha sonra yapılacak çalışmalarda bu 35 adet bakteriyosinin tam olarak saflaştırılması ve tanımlanması planlanmaktadır.

5. ÖZET

Bu çalışmada geleneksel yöntemlerle üretilmiş yöresel gıdalardan bakteriyosinjenik izolatlar identifiye edilerek, ürettikleri antimikrobiyel maddeler kısmi olarak saflaştırılmaya çalışılmıştır. Materyal olarak kullanılan 450 adet gıda örneğinden 601 adet antimikrobiyel etkili laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Bu etkinin büyük oranda organik asitlerden kaynaklandığı belirlenmiştir. Organik asitlerin ve hidrojen peroksitin antimikrobiyel etkisi elimine edildiğinde izolatlardan sadece 35'inin etkisini koruduğu tespit edilmiştir.

Araştırmada, *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei ssp. paracasei* ve *Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides* olarak identifiye edilen bakterilerin ürettiği antimikrobiyel maddelerin, özellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili oldukları ve güçlü bir antilisterial etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bunun yanında, kefirde izole edilen *Lc. lactis ssp. lactis* ile *Lb. paracasei ssp. paracasei*'nin ürettiği antimikrobiyel maddelerin *E. coli*'ye karşı etki göstermesi ve gıda üretim ve muhafazasında kullanılan ısı değerlerinde stabilitelelerini korumaları önemli görülmüştür.

Denemeler sonucunda, özellikle güçlü antilisterial etkisi göz önünde tutularak, kaşar peynirinden izole edilen *Lc. lactis ssp. lactis* suşunun ürettiği antimikrobiyel etkili madde kısmi olarak saflaştırılmaya çalışılmıştır. Bu maddenin protein tabiatında, proteolitik enzimlerle aktivitesini kaybeden, fakat önemli ısı uygulamalarında aktivitesini koruyan, katyonik özellikli, yaklaşık 2,5 kDa, 4 kDa veya 15 kDa büyüklüğünde bir bakteriyosin olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Fermente Gıda, Starter Kültür, Laktik Asit Bakterileri, Bakteriyosin, Lantibiyotik.

6. SUMMARY

In this study, strains producing bacteriocins were isolated from local foods and antimicrobial compounds produced by that strains were partially purified. 601 isolates had antimicrobial activity were obtained from 450 samples of fermented meat and dairy products. It was found that major antimicrobial effect was due to organic acids produced by these organisms. Just 35 isolates remained active as antibacterial when organic acid and hydrogen peroxide effect had been eliminated.

In the present study, compounds produced by isolates identified as *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei ssp. paracasei* and *Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides* demonstrated antibacterial activity against some Gram positive food pathogens specifically *L. monocytogenes*.

In this study products of *Lc. lactis ssp. lactis* and *Lb. paracasei ssp. paracasei* isolated from kefir samples showed antibacterial activity against *E. coli* one of the Gram negative microorganisms. It was also found that these bacteriocins were stable at temperatures used in food manufacturing and storage.

Antimicrobial product of *Lc. lactis ssp. lactis* isolated from kashar samples was partially purified due to its antimicrobial activity against *L. monocytogenes*. The findings indicated that this was a proteinaceous compound that inactivated by proteolytic enzymes. But it was stable at important temperatures. It was also found that this bacteriocin was cationic and sized about 2,5 kDa, 4 kDa or 15 kDa.

Key Words: Fermented Food, Starter culture, Lactic Acid Bacteria, Bacteriocin, Lantibiotic.

7. KAYNAKLAR

1. **Abee, T., Krockel, L., Hill, C.:** Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, 28, 169-185, 1995.
2. **Adams, M.R., Hall, C.J.:** Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acid and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Techn.*, 23, 287-292, 1988.
3. **Adams, M.R., Nicolaidis, L.:** Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control.*, 8 (5-6): 227-239, 1997.
4. **Aksu, M.İ., Kaya, M.:** Pastırma üretiminde starter kültür kullanımının son ürün özellikleri üzerine etkisi. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 25, 847-854, 2001.
5. **Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis in't Veld, J.H., ten Brink, B.:** Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *J. Appl. Microbiol.*, 84 (4): 568-76, 1998.
6. **Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T., Teixeira, P.:** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from "Alheiras" (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays *Meat Sci.*, 76 (4): 796-800, 2007.
7. **Ammor, M.S., Mayo, B.:** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci.*, 76, 138-146, 2007.
8. **Anonim:** Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Ed: Halkman AK, Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa. 2005.
9. **Arda, M.:** Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi: 45, (2.baskı), 548 sayfa, Ankara, 2000
10. **Arda, N., Ertan, H.:** Proteinlerin izolasyonu, analizi ve saflaştırılması. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Ed: Temizkan G, Arda N. Bölüm 7. Sayfa 161-274. İstanbul Üniv., BİYOGEN, Yayın No: 2. Genişletilmiş 2. Baskı. Nobel Kitabevleri. 2004.
11. **Arslan, A.:** Et Muayenesi ve et ürünleri teknolojisi. Özkan Matbaacılık LTD. ŞTİ. Ankara. 2002.

12. **Aslim, B., Yüksekdağ, Z.N., Sarikaya, E., Beyath, Y.:** Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT*, 38, 691–694, 2005.
13. **Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., Ray, B.:** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1265–1267, 1991.
14. **Bjornsdottir, K., Breidt, F.J., McFeeters, R.F.:** Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (1): 660–4, 2006.
15. **Blom, H., Mortvedt, C.:** Antimicrobial substances produced by food associated microorganisms. *Biochem. Soc. Trans.*, 19 (3): 694–698, 1991.
16. **Blum, H., Beier, H., Gross, H.J.:** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8 (2): 93–99, 1987.
17. **Boone, D.R., Castenholz, W.:** The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. Eds: Garrity GM, Editor-in-chief. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume one. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg. 2001.
18. **Bostan, K., Uğur, M., Çiftçioğlu, G.:** Tulum peynirlerinde laktik asit bakterileri ve küf florası. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 17 (2): 111–118, 1992.
19. **Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Cardinal, M., Leroi, F.:** Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.*, 104 (3): 309–24, 2005.
20. **Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.L., Delboni, R.R., Olivera, J.:** Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Braz. J. Microbiol.*, 35, 137–144, 2004.
21. **Budde, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., Koch, A.G.:** *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *Int. J. Food Microbiol.*, 83 (2): 171–84, 2003.

22. **Campos, C.A., Rodriguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M., Barros-Velazquez, J.:** Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Intern.*, 39 (3): 356–364, 2006.
23. **Caplice, E., Fitzgerald, G.F.:** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 131–149, 1999.
24. **Carr, F.J., Chill, D., Miada, N.:** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28 (4): 281–370, 2002.
25. **Chen, H., Hoover, D.G.:** Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety.*, 2, 81–100, 2003.
26. **Choi, H.J., Lee, H.S., Her, S., Oh, D.H., Yoon, S.S.:** Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc sp.*J2 isolated the Korean fermented vegetable Kimchi. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 175–181, 1999.
27. **Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernandez, P.E.:** Review: Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.*, 7 (4): 281–305, 2001.
28. **Cintas, L.M., Rodriguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Holo, H.:** Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (7): 2643–8, 1995.
29. **Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L.:** Bacteriocins: safe, naturel antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 1–20, 2001.
30. **Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbank, S., Williams, A.M.:** 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 453–460, 1989.
31. **Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Fergus, S., Jones, D.:** Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogeneous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 310–316, 1987.

32. **Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S.:** Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 595-603, 1993.
33. **Collins, M.D., Williams, A.M., Wallbank, S.:** The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, 70, 255–262, 1990.
34. **Coşkun, T.:** Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Derg.*, 48, 69–84, 2005.
35. **Crandall, A.D., Montville, T.J.:** Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (1): 231–237, 1998.
36. **Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J., Lacroix, C.:** Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (12): 3450–5, 1991.
37. **Daeschel, M.A.:** Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, 43, 164–166, 1989.
38. **Dalezios, I., Siebert, K.J.:** Comparison of pattern recognition techniques for the identification of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 225–236, 2001.
39. **Davidson, P.M., Parish, M.E.:** Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Tech.*, 1, 148–155, 1989.
40. **Davies, E.A., Bevis, H.E., Delves-Broughton, J.:** The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta type cheeses to control the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 343–346, 1997.
41. **Delves- Broughton, J.:** Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 57 (12): 525–527, 2005.
42. **Deraz, S.F., Karlsson, E.N., Hedstrom, M., Andersson, M.M., Mattiasson, B.:** Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *J. Biotechnol.*, 117 (4): 343–54, 2005.
43. **Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J.:** New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.*, 14, 273–285, 2004.

- 44. Dicks, L.M.T., Dellaglio, F., Collins, M.D.:** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* (corrig.) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 395–397, 199
- 45. Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J., Vogel, R.F.:** Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 966–975, 2002.
- 46. Einarsson, H., Lauzon, H.L.:** Biopreservation of Brined Shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (2): 669–679, 1995.
- 47. Equchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S.H., Doi, K., Ohmomo, S., Ogata, S.:** Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (2): 247-253, 2001.
- 48. Erol, İ., Çelik, H., Şireli, T., Özdemir, H.:** Bakteriyosin oluşturan starter kültürlerin fermente Türk sucuklarında *Listeria monocytogenes* üzerine etkisi. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 23 (4): 793–802, 1999.
- 49. Fang, T.J., Lin, L.W.:** Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on Cooked Pork in a Modified Atmosphere Packaging/Nisin Combination System. *J. Food Prot.*, 57 (6): 479-485, 1994.
- 50. Fox, P.F., Lucey, J.A., Cogan, T.M.:** Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 29, 237- 253, 1990.
- 51. Fox, P.F., McSweeney, L.H.:** Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev. Int.*, 12 (4): 457–509, 1996.
- 52. Garvie, E.I.:** Gram positive cocci. Genus *Leuconostoc*. In: Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol.2, Williams and Wilkins, Baltimore M D, 1071–1075, 1986a.
- 53. Garvie, E.I.:** Gram positive cocci. Genus *Pediococcus*. In: Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol.2, Williams and Wilkins, Baltimore M D, 1075–1079, 1986b.
- 54. Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J.M., Mania, M.:** Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, 389–398, 2005.

- 55. Gibson, G.R., Roberfroid, M.B.:** Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics. *J.Nutr.*, 125 (6): 1401–1412, 1995.
- 56. Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B., Suarez, J.E.:** Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (6): 2158–63, 1994.
- 57. Gonzalez, L., Sandoval, H., Sacristan, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadizo, M.E.:** Identification of lactic acid bacteria isolated from Genesto cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18, 716–722, 2007.
- 58. Gökalp, H.Y., Kaya, M., Zorba, Ö.:** Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 786, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 320, Ders kitapları Serisi No: 70, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum 1999.
- 59. Gülmez, M., Güven, A., Sezer, Ç., Duman, B.:** Evaluation of microbiological and chemical quality of ayran samples marketed in Kars and Ankara cities in Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 9 (1): 49–52, 2003.
- 60. Gülmez, M., Güven, A.:** Kars ilinde satışa sunulan çeçil (civil) peynirlerinin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 7 (1): 63–70, 2001.
- 61. Gülmez, M., Güven, A.:** Yoğurt, ayran ve kefir gibi fermente süt ürünlerinin mikrobiyolojik açıdan güvenilirliği. III. Ulusal Sindirim Yoluyla Bulaşan Enfeksiyonlar Sempozyumu, Nevşehir, 6–9 Mayıs–2003.
- 62. Güven, A.:** Elazığ İlinde Tüketime sunulan et ve bazı et ürünlerinde *Listeria* türlerinin araştırılması. Doktora Tezi. Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Elazığ 1994.
- 63. Güven, A., Gülmez, M., Duman, A., Sezer, Ç.:** The microbiological contamination of traditionally processed raw goose carcasses marketed in Kars (Turkey). *Int. J. Food Safety*, 3, 4–7, 2003.
- 64. Güven, A., Gülmez, M.:** Fonksiyonel gıdalar. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 12 (1): 91–96, 2006.

65. **Güven, A., Patır, B.:** Investigation of *Listeria ssp.* in meat and meat products sold in Elazığ (Turkey). *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 22, 205-212, 1998.
66. **Hammes, W.P., Bantleon, A., Min, S.:** Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 165–174, 1990.
67. **Hammes, W.P., Weiss, N., Holzapfel, W.:** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M. et al. (Eds). *The Prokaryotes*. 2.ed., Springer-Verlag, New York, Vol.2, p.1535-1594, 1992.
68. **Hardie, J.M.:** Gram positive cocci. Genus Streptococcus. Oral Streptococci. In: Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2*, Williams and Wilkins, Baltimore M D, 1054–1063, 1986a.
69. **Hardie, J.M.:** Gram positive cocci. Genus Streptococcus. Other Streptococci. In: Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2*, Williams and Wilkins, Baltimore M D, 1068–1071, 1986b.
70. **Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E.:** Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconstoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, 173 (23): 7491–7500, 1991.
71. **Helander, I.M., von Wright, A., Mattilla-Sandholm, T.:** Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram negative bacteria. *Trends Food Sci. Techn.*, 8, 146–150, 1997.
72. **Herrerros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castro, J.M., Frenso, J., Tornadijo, M.E.:** Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Food Microbiol.*, 22, 455–459, 2005.
73. **Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., Nes, I.F.:** Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, 147, 643–651, 2001.
74. **Holo, H., Nilssen, Q., Nes, I.F.:** Latococin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173 (12): 3879–3887, 1991.

- 75. Holzaphel, W.H.:** Appropriate starter culture Technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 75, 197–212, 2002.
- 76. Holzapfel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U.:** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Review. *Int. J. Food Microbiol.*, 24 (3): 343–62. 1995.
- 77. Holzapfel, W.H.N., Wood, B.J.:** Genera of Lactic Acid Bacteria. Series: The Lactic Acid Bacteria , Vol. 2, 420 p., Hardcover. ISBN: 978–0–7514–0215–5, 1998.
- 78. Hugas, M:** Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat product. *Meat Sci.*, 49 (1): 139–150, 1998.
- 79. Hugas, M., Monfort, J.M.:** Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chem.*, 59 (4): 547–554, 1997.
- 80. Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S., Dousset, X.:** Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis ssp. lactis* B14 isolated from boza- Bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatalysis.*, 41 (6): 47–52, 2000.
- 81. Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T.S., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., Moncheva, P., Nikolova, I., Dousset, X., Boyaval, P.:** Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int. J. Food Microbiol.*, 42 (3):147–58, 1998.
- 82. İnternet Materyali:** Fermented dairy products. <http://www.techno-preneur.net/timeis/technology/MaySciTech/DairyProduct.html>. 07.09.2004.
- 83. İnternet Materyali: Friedman, Y.:** Lactic acid bacteria as food preservatives. <http://www.nysaes.cornell.edu/fst/market/ferment.html>). 02.04.2004
- 84. Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B.:** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59 (2): 171–200, 1995.
- 85. Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, L., Wallman, E.:** Definition de quelques termes relatifs a la Pysogenie. *Ann Inst Pasteur Paris* 84, 222–4. 1953.
- Alınmıştır:“ Chen, H., Hoover, D.G.:** Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety.*, 2, 81–100, 2003”.

- 86. Jamuna, M., Jeevaratnam, K.:** Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50 (2): 79–90, 2004.
- 87. Jay, J.M.:** Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 (3): 525–532, 1982.
- 88. Jay, J.M.:** Modern food microbiology. Capter I. Apsen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. Sixth Edition. P. 679. 2000.
- 89. Josephsen, J.:** Bacteriophages and lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. Salminen S, Von Wright A (Eds.) 2nd Edition Marcel Dekker Inc, New York, pp.385–437, 1998.
- 90. Kanatani, K., Oshimura, M., Sano, K.:** Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (3): 1061–7, 1995.
- 91. Kandler, O., Weiss, N.:** Regular, Nonsporing Gram positive rods. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2*, Williams and Wilkins, Baltimore M D, 1208–1234, 1986.
- 92. Kaya, M., Gökalp, H.Y.:** Sucuk üretiminde starter kültür kullanımının ve farklı nirit dozlarının *Listeria monocuytogenes*'in gelişimi üzerine etkisi. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 28, 1121–1127, 2004.
- 93. Kılıç, S.:** Süt Endüstrisinde laktik asit bakterileri. Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayın No: 542, Ege Üniv. Basımevi, İzmir. 2001.
- 94. Klaenhammer, T.R.:** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337–349, 1988.
- 95. Klaenhammer, T.R.:** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 39–86, 1993.
- 96. Klaenhammer, T.R.:** Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J.Nutr.*, 130, 415-416, 2000.
- 97. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G.:** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 41, 103–125, 1998.

- 98. Komprda, T., Smela, D., Pechova, P., Kalhotka, L., Stenel, J., Klejdus, B.:** Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci.*, 67, 607–616, 2004.
- 99. Kosikowski, F.:** Cheese and fermented milks (3th ed). Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor and Michigan. 1997.
- 100. Kurt, A.:** Süt Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 573, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 257, Ders kitapları Serisi No: 40, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 1996.
- 101. Laukova, A., Czikkova, S., Laczkova, S., Turek, P.:** Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented hornadsalami. *Int. J. Food Microbiol.*, 52, 115–119, 1999.
- 102. Lee, H.J., Joo, Y.J., Park, C.S., Kim, S.H., Hwang, I.K., Ahn, J.S., Mheen, T.I.:** Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis* H-559 isolated from kimchi. *J. Biosci. Bioeng.*, 88 (2): 153–9, 1999.
- 103. Leroy, F., de Vuyst, L.:** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci.*, 15, 67–78, 2004.
- 104. Lewus, C.B., Montville, T.J.:** Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 13, 145–150, 1991.
- 105. Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J.:** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 149–164, 1990.
- 106. Lozo, J., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Topisirovic, L.:** Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *J. Food Prot.*, 67 (12): 2727–2734. 2004.
- 107. Manome, A., Okada, S., Uchimura, T., Komagata, K.:** The ratio L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44, 371–374, 1998.
- 108. Marshall, V.E.M.:** The microflora and production of fermented milks. *Prog. Und. Microbiol.*, 23, 1–44, 1986.

- 109. Marshall, W.M., Cole, W.M.:** Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. *J. Dairy Res.*, 52, 451–456, 1985.
- 110. Marya-Makinen, A., Bigret, M.:** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. Salminen S, Von Wright A (Eds.) 2nd Edition Marcel Dekker Inc, New York, pp.73–102, 1998.
- 111. Metin, M.:** Süt teknolojisi, sütün bileşimi ve işlenmesi. I.bölüm, Genişletilmiş 4.Baskı. Ege Üniv. Müh. Fak. Yayınları No:33 Ege Üniv. Basımevi Bornova, İzmir. 2001.
- 112. Ming, X., Daeschel, M.:** Nisin resistance of food-borne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J.Food Prot.*, 56, 944-948, 1993. **Alınmıştır: Stiles, M.E.:** Biopreservation by lactic acid bacteria. Review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70 (2–4): 331–45, 1996.
- 113. Mundt, J.O.:** Gram positive cocci. Genus Streptococcus. Enterococci. In: Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2*, Williams and Wilkins, Baltimore M D, 1063–1065, 1986a.
- 114. Mundt, J.O.:** Gram positive cocci. Genus Streptococcus. Lactic Acid Streptococci. In: Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2*, Williams and Wilkins, Baltimore M D, 1065–1066, 1986b.
- 115. Muriana, P.M., Klaenhammer, T.R.:** Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (1): 114–121, 1991.
- 116. Nagao, J., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., Sonomoto, K.:** Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.*, 102 (3): 139–149, 2006.
- 117. Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A.:** Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 39 (1): 13–126, 1999.
- 118. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., Nes, I.F.:** A novel Lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*, 174 (17): 5686–5692, 1992.

119. **Nielsen, J.W., Dickson, J.S., Crouse, J.D.:** Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (7): 2142–5, 1990.
120. **Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Sandholm, M., Haikara, A.:** New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 29–35, 1999.
121. **Nousiainen, J., Setälä, J.:** 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, pp.437–474, 1998.
122. **Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., Onilude, A.A.:** Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1 African *J. Biotechnol.*, 2 (8): 219–227, 2003.
123. **Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M., Nakanishi, K.:** Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 81–89, 2000.
124. **Omar, N.B., Abriouel, H., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Guyot, J.P., Galvez, A.:** Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from burkina Faso. *Int. J. Food Microbiol.*, 112, 44-50, 2006.
125. **Ouwehand, A.C.:** Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. Salminen S, Von Wright A (Eds.) 2nd Edition Marcel Dekker Inc, New York, pp.139–160, 1998.
126. **Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E.:** Probiotics: an overview of beneficial effects In: *Lactic acid bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Siezen R J, Kok J, Abee T, Schaafsma G.(eds.) *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279–289, Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 2002.
127. **Öztürk, B., Güven, A.:** Yoğurt ve kefirde aflatoksin detoksifikasyonu üzerine araştırmalar, "Türkiyede mikotoksin çalışmaları" II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiriler Kitabı, 23–24 Mayıs 2005, İstanbul. Ed: Diek Heperkan, Funda K.Güler, Gözde D. Kaya, s:158–163, 2005.

128. **Parente, E., Ricciardi, A.:** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 628–638, 1992.
129. **Piard, J.C., Muriana, P.M., Desmazeaud, M.J., Klaenhammer, T.R.:** Purification and partial characterization of lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (1): 279–284, 1992.
130. **Piddock, L.J.V.:** Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. A Review. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 307–318, 1990.
131. **Powell, J.E., Witthuhn, R.C., Todorov, S.D., Dicks, L.M.T.:** Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *Int. Dairy J.*, 17, 190–198, 2007.
132. **Rayman, M.K., Aris, B., Hurst, A.:** Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 (2): 375–80, 1981.
133. **Renault, P.:** Genetically modified lactic acid bacteria: Applications to food or health and risk assessment. *Biochimie*, 84, 1073–1087, 2002.
134. **Reuter, G., Klein, G., Goldberg, M.:** Identification of probiotic cultures in food samples. *Food Res. Int.*, 35, 117–124, 2002.
135. **Robichon, D, Goum, E., Debarbouille, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y., Hechard, Y.:** The *rpoN* gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.*, 179 (23): 7591–7594, 1997.
136. **Rodriguez, E., Arques, J.L., Nunez, M., Gaya, P., Medina, M.:** Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (7): 3399–404, 2005a.
137. **Rodriguez, E., Calzada, J., Arques, L., Rodriguez, J.M., Nunez, M., Medina, M.:** Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.*, 15. 51–57, 2005b.

138. **Rotta, J.:** Gram positive cocci. Genus Streptococcus. Pyogenic Hemolytic Streptococci. In: Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2, Williams and Wilkins, Baltimore M D, 1047–1054, 1986.
139. **Salminen, S., Roberfroid, M., Ramos, P., Fonden, R.:** Prebiotic substrates and lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects. Salminen S, Von Wright A (Eds.) 2nd Edition Marcel Dekker Inc, New York, pp.343–358, 1998a.
140. **Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T.:** Demonstration of safety of probiotics. A review. Int. J. Food Microbiol., 44 (1–2): 93–106, 1998b.
141. **Schagger, H.:** Tricine –SDS-PAGE. Protocol. Nature Protocols, 1, 16–22, 2006.
142. **Schillinger, U., Lücke, F.K.:** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol., 55 (8): 1901–1906, 1989.
143. **Schillinger, U., Lücke, F.K.:** Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiol., 4, 199–208, 1987.
144. **Severina, E., Severin, A., Tomasz, A.:** Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. J. Antimicrob. Chemother., 41, 341–347, 1998.
145. **Sezer, Ç., Güven, A.:** Kefirde laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde araştırılması. I. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. Ankara Üniv. Vet. Fak. 29 Eylül–1 Ekim 2004 Ankara. 2004.
146. **Silla Santos, M.H.:** Biogenic amines: Their importance in foods. Int. J. Food Microbiol., 29, 213–231, 1996.
147. **Somkuti, G.A.:** Lactic acid bacteria. In: Encyclopedia of Microbiology, volume 3. second edition. Editor –in- chief: Joshua Lederberg. by Academic Pres. 2000.
148. **Stiles, M.E.:** Bacteriocins produced by *Leuconostoc species*. J. Dairy Sci., 77 (9): 2718–24, 1994.

149. **Stiles, M.E.:** Biopreservation by lactic acid bacteria. Review. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 70 (2–4): 331–45, 1996.
150. **Stiles, M.E., Holzapfel, W.H.:** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Review. *Int. J. Food Microbiol.*, 36 (1): 1–29, 1997.
151. **Suarez, A.M., Azcona, J.I., Rodriguez, J.M., Sanz, B., Hernandez, P.E.:** One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (12): 4990–4992, 1997.
152. **Tagg, J.A., Dajani, A.S., Wanamaker, L.W.:** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40 (3): 722–756, 1976.
153. **Tagg, J.R., McGiven, A.R.:** Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, 21 (5): 943, 1971.
154. **Tahiri, I., Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Thibault, S., Ouellet, D., Fliss, I.:** Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.*, 97 (2): 123–36, 2004.
155. **Tamime, A.Y., Robinson, R.K.:** *Yoghurt-science and technology*. Pergamon Pres, Oxford. 1985. **Ahnmıştır:“Dellaglio, F.:** Starters for fermented milk. Section 3: Thermophilic Starters. Chapter II. pp: 27–34. IDF 227/1988.
156. **Taniguchi, M., Nakazawa, H., Takeda, O., Kaneko, T., Hoshino, K., Tanaka, T.:** Production of a mixture of antimicrobial organic acids from lactose by co-culture of *Bifidobacterium longum* and *Propionibacterium freudenreichii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 (8): 1522–7, 1998.
157. **Temmerman, R., Huys, G., Swings, J.:** Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, 348–359, 2004.
158. **Thomas, E.L., Milligan., T.W., Joyner, R.E., Jefferson, M.M.:** Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect. Immun.*, 62 (2): 529–35, 1994.
159. **Todorov, S.D., Dicks, L.M.T.:** Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41, 11–19, 2006.

160. **Todorov, S.D., Nyati, H., Meincken, M., Dicks, L.M.T.:** Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control.*, 18, 656–664, 2007.
161. **Turcotte, C., Lacroix, C., Kheadr, E., Grignon, L., Fliss, I.:** A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, 90, 283–293, 2004.
162. **Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B., Hill, C.:** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Review. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82 (1–4): 165–85, 2002.
163. **Uteng, M., Hauge, H.H., Brondz, I., Nissen-Meyer, J., Fimland, G.:** Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (2): 952–6, 2002.
164. **Üçüncü, M.:** A'dan Z'ye peynir teknolojisi. Ege Üniv., Müh. Fak., Gıda Müh. Bölümü. Cilt 1. Bornova/ İzmir, S. 543, 2004.
165. **Van Belkum, M.J., Stiles, M.E.:** Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 323–335, 2000.
166. **Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., Chikindas, M.L.:** Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 1131–1137, 1998.
167. **Vanos, V., Cox, L.:** Rapid routine method for the detection of lactic acid bacteria among competitive flora. *Food Microbiol.*, 3, 223–234, 1986.
168. **Varnam, A.H., Sutberland, J.P.:** Meat and meat products technology, chemistry and microbiology. Vol:3, Food Product Series, London, Chapman and Hall, p.428, 1995.
169. **Vaughan, A., Eijsink, V.G., O'Sullivan, T.F., O'Hanlon, K., van Sinderen, D.:** An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.*, 91 (1): 131–8, 2001.
170. **Venema, K., Chikindas, M.L., Seegers, J.F.M., Haandrikmn, A.J., Leenhouts, K.J., Venema, G., Kok, J.:** Rapid and efficient purification method

for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (1): 305–309, 1997.

171. **Vignolo, G.M., Suriani, F., Holgado, A.P.R., Oliver, G.:** Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 34–349, 1993.
172. **Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O., Moschetti, G.:** Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 430–439, 2001.
173. **Yamato, M., Ozaki, K., Ota, F.:** Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. *Microbiol. Res.*, 158, 169–172, 2003.
174. **Yang, R., Johnson, M.C., Ray, B.:** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (10): 3355–3359, 1992.
175. **Yaygın, H., Kılıç, S.:** Süt endüstrisinde saf kültürler. Altındağ Matbaacılık. İzmir. S. 107, 1993.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kars 1978 doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi aynı ilde tamamladım. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümünde 1995 yılında başladığım lisans eğitimimi, 1999 yılında “Gıda Mühendisi” unvanı alarak tamamladım. 2000 yılında, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde yüksek lisans programına katıldım. 2001 yılında adı geçen birime bağlı olarak Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. Tamamladığım yüksek lisans öğrenimimin ardından 2003 tarihinde aynı enstitü bünyesinde açılan doktora programına başladım. Eğitim sürecim içerisinde, 2005 yılında, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen aynı görevi sürdürmekteyim.

EKLER**AYIRIÇ VE ÇÖZELTİLER** **α - Naftol Çözeltisi**

5 g α - naftol, %96'lık 100 ml etil alkol içerisinde eritilerek hazırlanır.

AB-3 Solüsyonu

49,5 T, %3 C karışımı için 48 g arcylamide ve 1,5 g bisacrylamide 100 ml saf suda çözündürülür.

AB-6 Solüsyonu

49,5 T, %6 C karışımı için 46,5 g arcylamide ve 3 g bisacrylamide 100 ml saf suda çözündürülür.

Anot Buffer (x10)

18,171 g. Tris, 0,03 ml 1 N HCl ile karıştırılır. Bir miktar saf içerisinde eritilir. pH 8,9'a ayarlandıktan sonra son hacim 150 ml'ye tamamlanır.

Ayırma (Seperating) Jeli (% 10)

6 ml AB-6 solüsyonu, 10 ml gel buffer (x3) ve 3 ml gliserol karıştırılır. Son hacim saf su ile 30 ml'ye tamamlanır. 150 μ l %10'luk amonyum persülfat, 15 μ l TEMED ilave edilir.

Ayırma (Seperating) Jeli (% 16)

10 ml AB-6 solüsyonu, 10 ml gel buffer (x3) ve 3 ml gliserol karıştırılır. Son hacim saf su ile 30 ml'ye tamamlanır. 100 μ l %10'luk amonyum persülfat, 10 μ l TEMED ilave edilir.

Bant Belirginleştirici (Developing) Solüsyon

5,625 g potasyum karbonat ve 5 ml ön işlem (pretreatment) solüsyonu, 187,5 μ l % 37'lik formaldehit ilave edilir. Son hacim 250 ml'ye tamamlanır.

Buffer A (Sample Buffer)

%12 SDS, %6 mercaptoetanol, %30 gliserol, %0,05 coomassie blue tartılır. Bir miktar 150 mM Tris/HCl (pH 7,0) içerisinde eritilir. Son hacim 150 mM Tris/HCl (pH 7,0) ile 100 ml'ye tamamlanır.

Coomassie Boya Solüsyonu

Boyama için %10'luk 100 ml asetik asit çözeltisi içerisinde % 0,025'lik coomassie boyası hazırlanır.

Etanol Çözeltisi (%50)

%96'lik 500 ml etanol, saf su ile litreye tamamlanır.

Fiksasyon (Fixing) Solüsyonu (Coomassie Blue Boyama İçin)

%50 metanol, %10 asetik asit, 100 mM amonyum asetat çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.

Fiksasyon (Fixer) Solüsyonu (Gümüş Boyama İçin)

150 ml metanol, 36 ml asetik asit ve 150 µl %37'lik formaldehit, saf su ile 300 ml'ye tamamlanır.

Gel Buffer (x3)

18,16 g. tris, 0,15 g. SDS tartılır. 10ml 5 N HCl ile veya 4,31 ml %37'lik HCl ile pH 8,45'e ayarlanır. Son hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Gümüş Boyama Solüsyonu

0,5 g gümüş nitrat 250 ml saf su içerisinde çözündürülür. 187,5 µl % 37'lik formaldehit ilave edilir.

Katot Buffer (x10)

18,171 g. tris, 26,88 g. tricine, 1,5 g. SDS tartılır. 150 ml saf su ile çözündürülür. Yaklaşık pH 8,25'dir. pH ayarlaması yapılmaz.

Lugol Çözeltisi

2 g potasyum iyodür saf su içerisinde iyice çözüldükten sonra, iyice ezilmiş 1 g iyot kristali ilave edilir. Son hacim saf su ile 300 ml'ye tamamlanır. Tam bir çözünme sağlanana kadar karıştırılır.

Metilen Mavisi Kullanma Solüsyonu

Metilen mavisi (stok solüsyonu) 30 ml, saf su (%0.01 KOH'lı) 100 ml. Önce saf su içine %0.01 oranında KOH konur ve karıştırılır. Sonra 30 ml stok metilen mavisi solüsyonu katılır ve iyice karıştırılır. Bir gün bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülerek cam kapaklı şişelerde muhafaza edilir.

Metilen Mavisi Stok Solüsyonu

Metilen mavisi 1.5 g., alkol (%95) 100 ml. Metilen mavisi havana konur az miktarda alkol yardımıyla iyice ezilir. Bir şişeye alınan solüsyon 4-5 saat çalkalanır ve 24 saat bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülür ve şişelerde saklanır.

Modifiye Chalmers Agar

20 g laktoz, 20 g D(+) glukoz, 3 g soy peptone, 3 g meat ekstrakt, 3 g yeast ekstrakt, 20 g CaCO₃, 15 g agar, 1000 ml saf su, 0,5 ml %1'lik neutral red solüsyonu, sterilizasyon öncesi pH 6,0'a ayarlanır. 121°C'de 15 dk steril edilir.

Nessler Çözeltisi

7 g potasyum iyodür, 10 g civa iyodür, 10 g potasyum hidroksit tartılarak 100 ml saf su içerisinde çözündürülür.

Ön işlem (Pretreatment) Solüsyonu

0,05 sodyum tiyosülfat 250 ml saf su içerisinde cam çubuk ile çözündürülür.

Ringer Solüsyonu (1/4)

2,25 g NaCl, 0,105 g KCl, 0,06 g susuz CaCl₂, 0,05 g NaHCO₃ tartılır. Bir miktar saf su içerisinde eritilir. Son hacim 1 L'ye tamamlanır. Solüsyonun pH'sı $6,9 \pm 0,1$ 'e ayarlanır.

Sodyum Klorür Çözeltisinin Hazırlanması (0,3 M, pH= 6,5)

17,55 g NaCl bir miktar saf su içerisinde çözülür. Son hacim 1 L'ye tamamlanır.

Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanması (10 mM, pH= 6,5)

0.78 g NaH₂PO₄.2H₂O bir miktar saf su içerisinde çözülür. Üzerine 1.79 g Na₂HPO₄.12H₂O eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.

Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanması (50 mM, pH= 6,5)

3,9 g NaH₂PO₄.2H₂O bir miktar saf su içerisinde çözülür. Üzerine 8,95 g Na₂HPO₄.12H₂O eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.

Sulu Fuksin Kullanma Solüsyonu

Bazik fuksin (stok solüsyonu) 10 ml, saf su 100 ml. Fuksin stok çözeltisi ile saf su iyice karıştırılır ve filtre kağıdından süzülür.

Sulu Fuksin Stok Solüsyonu

Bazik fuksin 3 g., alkol (%95) 100 ml. Bazik fuksin havana konur az miktarda alkol yardımıyla iyice ezilir. Bir şişeye alınan solüsyon 4-5 saat çalkalanır ve 24 saat bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülerek koyu renkli cam kapaklı şişelerde saklanır.

Stop Solüsyon

125 ml metanol ve 30 ml asetik asit karıştırılır. Son hacim 250 ml'ye tamamlanır.

Yıkama (Destain) Çözeltisi

10 ml asetik asit, saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Yükleme (Stacking) Jeli (% 4)

1 ml AB-3 solüsyonu ve 3 ml gel buffer (x3) karıştırılır. Son hacim saf su ile 12 ml'ye tamamlanır. 90 µl %10'luk amonyum persülfat, 9 µl TEMED ilave edilir.