

**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TARHANA İZOLATI BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN  
BAKTERİYOSİNLERİ VE FERMANTASYONDA PATOJEN BAKTERİLER  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Halil İbrahim KAYA**

**Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK**

**TEMMUZ, 2013**

## YÜKSEK LİSANS TEZ ONAY FORMU

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 101161018 nolu öğrencisi **Halil İbrahim KAYA** tarafından hazırlanan “**TARHANA İZOLATI BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİNLERİ VE FERMANTASYONDA PATOJEN BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİSİ**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK (Pamukkale Üniversitesi)  
(Jüri Üyesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. İlyas ÇELİK (Pamukkale Üniversitesi)

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10.07.2013. tarih ve 22/13..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Prof. Dr. Nuri KOLSUZ

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

İmza

: *Halil İbrahim Kaya*

Öđrenci Adı Soyadı : Halil İbrahim KAYA

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada tarhanadan izole edilen en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip iki laktik suşun tarhana hamuru ortamında bakteriyosin üretimi izlenmiş ve bu bakteriyosinlerin belirtilen patojen bakteriler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda bakteriyosin üreticisi laktik suşlar kullanılarak tarhana hamuru hazırlanmış, söz konusu suşların in vivo koşullarda bakteriyosin üretimleri tespit edilmiş ve üretilen bakteriyosinlerin patojen bakterilerin gelişiminin engellenmesi yönündeki verimliliği tespit edilmiştir.

Çalışmalarım sırasında bana her türlü desteği sağlayan beni yönlendiren ve deneyimlerimden yararlandığım danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e, bilgilerini benimle paylaşan ve destek olan öğretim elemanları ve diğer bölüm öğretim elemanlarına teşekkürlerimi sunarım.Çalışmamı maddi olarak destekleyen PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne katkılarından dolayı teşekkür ederim. Eğitim hayatım boyunca tüm çalışmalarımda bana her zaman maddi ve manevi açıdan destek olan varlıklarıyla beni cesaretlendiren çok sevdiğim aileme, çalışma arkadaşlarım Burcu KÖRDİKANLIOĞLU ve Derya AKTAŞ'a ve de tarhana üretiminde bilgilerinden faydalandığım Aysel ÖZER'e teşekkür ederim.

Temmuz, 2013

Halil İbrahim KAYA

Gıda Mühendisi

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>ix</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	2
1.2 Literatür Özeti .....	2
<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>20</b>
2.1 Mikroorganizmalar ve gelişme ortamları .....	20
2.2 Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesi .....	21
2.3 Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi..	21
2.4 Bakteriyosinlerin saflaştırılması.....	23
2.5 Bakteriyosinlerin moleküler büyüklüğünün tespiti .....	23
2.6 Bakteriyosin üreticisi suşların genomunda bakteriyosin üretimiyle ilişkili temel genlerin varlığının araştırılması ve DNA dizi analizi .....	26
2.7 Tarhana hamurunun hazırlanması .....	27
2.8 Tarhana hamuru fermantasyonunda mikrobiyolojik analizler .....	29
2.9 Tarhana hamuru fermentasyonunda kimyasal analizler .....	30
2.10 Tarhana hamuru fermentasyonunda mikrobiyal floranın ve bakteriyosin üreticisi <i>L. lactis</i> PFC77 ve <i>P. acidilactici</i> PFC69 suşlarının izlenmesi.....	30
2.10.1 Tarhana hamurundan bakteriyal genomik DNA'nın izolasyonu .....	30
2.10.2 PZR-DGGE analizi .....	31
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>33</b>
3.1 <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşlarının antimikrobiyal etki spektrumu .....	33
3.2 Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi..	37
3.3 <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 bakteriyosinlerinin saflaştırılması ve moleküler büyüklüğü.....	40
3.4 <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşlarının genomunda bakteriyosin üretimiyle ilişkili temel genler ve DNA dizisi .....	44
3.5 Tarhana hamurlarının mikrobiyolojik özellikleri .....	46
3.6 Tarhana hamurlarının pH, asitlik ve kurumadde özellikleri .....	53
3.7 Tarhana hamuru fermantasyonunda <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşlarının canlılığının stabilitesi ve hamur mikroflorasının değişimi .....	55
3.8 Tarhana hamur örneklerinde bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesi .....	60
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>64</b>

## **KISALTMALAR**

<b>APS</b>	: AmonyumPer sülfat
<b>AS</b>	: Asitlik Sayısı
<b>BPA</b>	: Baird Paker Agar
<b>DGGE</b>	:Denatüre Gradient Gel Electrophoresis
<b>DRBC Agar</b>	: Dichloren Rose Bengal Chlortetracycline Agar
<b>LAB</b>	: Laktik Asit Bakterisi
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>TAMB</b>	: Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
<b>TFA</b>	: Tri Fluoro Acetic Acid

## TABLO LİSTESİ

### Tablolar

1.1 : Bakteriyosinlerin güncellenmiş sınıflandırılması .....	8
1.2 : Sıcaklık, pH ve enzim uygulamalarının çeşitli pediosinlerin antimikrobiyal aktivitesine etkisi.....	16
2.1 : Çalışmada kullanılan LAB ve indikatör bakteriler .....	20
2.2 : Çalışmada kullanılan bakteriyosinlerin genlerine ait özgül primerler .....	27
2.3 : Tarhana üretiminde kullanılan bileşenler ve miktarları .....	28
2.4 : Hazırlanan tarhana hamurlarının isimlendirilmeleri ve bakteri içerikleri.....	29
2.5 : Denatüre gradiyent jelin hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve oranları.....	31
3.1 : <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşlarının antimikrobiyal etkisi.....	34
3.2 : <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşlarının kültür üst sıvısında ölçülen antimikrobiyal aktivite .....	37
3.3 : <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitesine farklı pH koşullarının etkisi.....	38
3.4 : <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi .....	39
3.5 : <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesine farklı enzim uygulamalarının etkisi .....	40
3.6 : Saflaştırma basamaklarında <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 kültür üst sıvısından kazanılan bakteriyosinin aktivitesi.....	41
3.7 : Farklı fermantasyon günlerinde tarhana hamurlarının mikrobiyolojik özellikleri .....	50
3.7 (Devam) : Farklı fermantasyon günlerinde tarhana hamurlarının mikrobiyolojik özellikleri.....	51
3.8 : Tarhana hamurlarının farklı fermantasyon günlerindeki kimyasal analiz sonuçları .....	54
3.8 (Devam) : Tarhana hamurlarının farklı fermantasyon günlerindeki kimyasal analiz sonuçları.....	55

## ŞEKİL LİSTESİ

### Şekiller

1.1 : Nisin A, Z, Q ve U'nun yapısı .....	14
1.2 : Pediosin PA-1'in yapısı .....	17
3.1 : <i>P. acidilactici</i> PFC69 suşunun <i>S. aureus</i> ATCC29213 suşuna karşı antimikrobiyal etkisi (a), <i>L. lactis</i> PFC77 suşunun <i>S. aureus</i> ATCC29213 suşuna karşı antimikrobiyal etkisi (b) .....	35
3.2 : <i>L. lactis</i> PFC77 suşunun <i>B. cereus</i> ATCC11778 suşuna karşı antimikrobiyal etkisi .....	36
3.3 : <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşlarının kültür üst sıvılarının <i>M. luteus</i> 'a karşı inhibisyon zonları .....	36
3.4 : PFC69 bakteriyosinin HPLC kromotogramı .....	41
3.5 : PFC77 bakteriyosinin HPLC kromotogramı .....	42
3.6 : PFC69 bakteriyosininin SDS-PAGE analizi.....	42
3.7 : PFC77 bakteriyosininin SDS-PAGE analizi.....	43
3.8 : <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşlarında bakteriyosin üretimi ile ilişkili <i>papA</i> ve <i>nisZ</i> genlerinin DNA fragmenti .....	44
3.9 : <i>P. acidilactici</i> PFC69 ve <i>L. lactis</i> PFC77 suşlarında bakteriyosin üretimi ile ilişkili <i>pedA</i> ve <i>lcnB</i> genlerinin DNA fragmenti .....	45
3.10 : <i>lcnB</i> , <i>nisZ</i> ve <i>pedA</i> genlerine spesifik primerler ile çoğaltılan DNA bölgelerinin dizisi ve homolojisi.....	46
3.11 : Tarhana hamurlarında <i>S. aureus</i> sayısının fermantasyon günlerine göre değişimi. ....	52
3.12 : Tarhana hamurlarında <i>B. cereus</i> sayısının fermantasyon günlerine göre değişimi. ....	52
3.13 : A tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili. 56	
3.14 : B tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili .57	
3.15 : BP tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili .....	57
3.16 : BL tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili .....	58
3.17 : S tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili..58	
3.18 : SP tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili59	
3.19 : SL tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili .....	59
3.20 : Farklı fermantasyon günlerinde BL Tarhana hamurundan ekstrakte edilen bakteriyosinlerin <i>M. luteus</i> NCIMB suşuna karşı antimikrobiyal etkisi.....	60
3.21 : Farklı fermantasyon günlerinde SP Tarhana hamurundan ekstrakte edilen bakteriyosinlerin <i>M. luteus</i> NCIMB suşuna karşı antimikrobiyal etkisi.....	61



## SEMBOL LİSTESİ

<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b>dk</b>	Dakika
<b>g</b>	Gram
<b>L(l)</b>	Litre
<b>mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>N</b>	Normalite
<b>nm</b>	Nanometre
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikrolitre
<b>sn</b>	Saniye
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	Santigrat derece
<b>%</b>	Yüzde
<b>&gt;</b>	Büyük
<b>&lt;</b>	Küçük

## ÖZET

### TARHANA İZOLATI BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİNLERİ VE FERMANTASYONDA PATOJEN BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİSİ

Tarhana Anadolu insanının yazdan kış için hazırladığı ve sıklıkla tükettiği fermente bir gıda ürünüdür. Tarhana hamuru fermantasyonu laktik asit bakterileri ve maya türlerinin yer aldığı yarışmacı bir mikrofloraya sahiptir. Bu florada bulunan LAB'de bakteriyosin üretim yetenekleri sebebiyle antimikrobiyal aktivite gösterirler.

Bu çalışmanın temel amacı tarhanadan izole edilmiş *Pediococcus acidilactici* PFC69 ve *Lactococcus lactis* PFC77 suşlarının antimikrobiyal aktiviteden sorumlu metabolitlerinin belirlenmesi ve karakterizasyonu, takiben bu suşların tarhana hamuru fermantasyonunda *Bacillus cereus* ATCC11778 ve *Staphylococcus aureus* ATCC29213 suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisinin araştırılmasıdır.

Yapılan çalışmada *Pediococcus acidilactici* PFC69 ve *Lactococcus lactis* PFC77 suşları gıda patojenlerine karşı farklı seviyelerde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Her iki laktik suşun 12800 AU/ml antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bakterilerin kültür üst sıvısındaki metabolitin; yüksek sıcaklık ve düşük pH koşullarında stabil, proteaz enzimlerine (proteinaz K, tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin ve pepsin) karşı hassas bakteriyosin tabiatında olduğu anlaşılmıştır. Üretici hücrelerin genomu kullanılarak yapılan PZR taramasında bu bakteriyosinlerin sırasıyla, pediosin ve nisin benzeri oldukları belirlenmiştir. Söz konusu bu bakteriyosinler, kültür üst sıvısından sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, katı faz ekstraksiyonu ve ters faz sıvı kromatografisi ile saflaştırılmış ve trisin-SDS PAGE ile moleküler büyüklükleri sırasıyla 5 ve 3,5 kDa olarak hesaplanmıştır.

Tarhana hamurunun hazırlanmasında *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının kullanılması durumunda fermantasyonun 5. gününden itibaren hamura ilave edilen *B. cereus* ATCC11778 ve *S. aureus* ATCC29213 sayılarında kontrol hamur örneklerine kıyasla önemli düşüşler tespit edilmiştir. Çalışmada bakteriyosin üreticilerini içeren hamur örneklerinde fermantasyonun sonunda *B. cereus* ATCC11778 suşlarının tamamı inhibe edilmiştir. *S. aureus* ATCC29213 suşlarının sayısı ise bakteriyosin üreticisi içermeyen hamurlara kıyasla 4 log düşük bulunmuştur. DGGE analizleri, *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının hamur ortamında canlılığını koruyabildiğine işaret etmiş ayrıca hamur ortamından yapılan ekstraksiyonla ise bu suşlardan bakteriyosin üretildiği saptanmıştır.

Tüm bu sonuçlar, *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının iyi birer bakteriyosin üreticisi olduklarını, ayrıca tahıl temelli fermente gıdalar için kullanılabilir potansiyel biyokoruyucu starter kültür niteliği taşıdıklarını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tarhana, Laktik Asit Bakterisi, Bakteriyosin, Patojen, Antimikrobiyal, Fermente Gıda

## SUMMARY

### **BACTERIOCINS OF SOME TARHANA LACTIC ACID BACTERIA ISOLATES AND THEIR ANTIMICROBIAL EFFECT ON PATHOGENIC BACTERIA AT FERMENTATION**

Tarhana is a fermented food product that has been consumed often and produced by Anatolian people at summer for winter. Tarhana dough fermentation has a competitive microflora including lactic acid bacteria and yeast species. In this flora LAB exhibit antimicrobial activity due to bacteriocin production capabilities.

The main purpose of this study is determination and characterization of metabolites of *P. acidilactici* PFC69 and *L. lactis* PFC77 strains that are responsible for their antimicrobial activity then investigation of antimicrobial effect of these relevant strains on *B. cereus* ATCC11778 and *S. aureus* ATCC29213 at tarhana dough fermentation.

In the study both lactic strains showed different level antimicrobial activity against food pathogens. Both lactic strains had 12800 AU / ml antimicrobial activity. The relevant metabolites at the culture supernatant was to be bacteriocin nature with high temperature and low pH stability and protease enzymes (proteinase K, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin and pepsin) sensitivity. In PCR screening with using the producer cells genome showed that these bacteriocins were similar with pediocin and nisin. These bacteriocins were purified from culture supernatant respectively by ammonium sulphate precipitation, solid phase extraction and reversed phase liquid chromatography and thereby molecular weights were calculated as 5 and 3,5 kDa with Tris-SDS-PAGE.

When the bacteriocin producer strains were inoculated to tarhana, significant reductions were determined at *B. cereus* ATCC11778 and *S. aureus* ATCC29213 numbers which were inoculated previously, from the fifth day of fermentation according to the control dough samples. At the end of fermentation, all *B. cereus* ATCC11778 strains were able to be inhibited in dough samples containing bacteriocin producers. Number of *S. aureus* ATCC29213 strain was 4 log lower when compared to bacteriocin producer free doughs. DGGE analysis pointed out that *P. acidilactici* PFC69 and *L. lactis* PFC77 strains were able to maintain their viability in dough and bacteriocin production was detected by extraction from dough where these strains were used

All these results demonstrated that, *P. acidilactici* PFC69 and *L. lactis* PFC77 strains were efficient bacteriocin producers and also can be used for potential bioprotective starter cultures especially at cereal-based fermented foods.

**Key Words:** Tarhana, Lactic Acid Bacteria, Bacteriocin, Pathogen, Antimicrobial, Fermented Food.

## 1. GİRİŞ

Her ülkenin kendi kültürü ile özdeşleşmiş çeşitli geleneksel fermente gıdaları mevcuttur. Orta Asya'dan Anadolu'ya tarihsel süreç içinde gelişerek ulaşmış olan tarhana da, ülkemiz için önemli örneklerden birisidir. Ülkemizde tarhana yazdan kış için, ev ekonomisi ölçeğinde geleneksel yöntemlere göre hazırlanarak, tüketilen bir fermente gıda ürünüdür. Tarhana; buğday unu, yoğurt ve çeşitli sebzeler ile baharatlar kullanarak hazırlanan hamurun fermente edilmesi, kurutulması ve öğütülmesi ile elde edilmektedir.

Tarhana gibi geleneksel gıdalar; yarışmacı mikrobiyel ekosisteme sahip yapısı gereği, farklı özellikteki fonksiyonel mikroorganizma suşlarının izolasyonu ve muhafazası için iyi bir kaynaktır. Tarhana fermentasyonunun mikroflorasında başlıca laktik asit bakterileri (LAB) ve mayalar bulunur. Bu florada LAB'i ortamın asitlendirilmesinden, mayalar ise CO<sub>2</sub> ve alkol üretimi ile hamurun kabarmasından ve aromatik olarak gelişmesinden sorumludurlar. Bununla birlikte LAB'inin bazı üyelerinin antimikrobiyel metabolitler üretebilmesi gıda güvenliğinin sağlanması ve artırılması açısından da oldukça önemlidir.

LAB'lerinin bilinen önemli antimikrobiyel metabolitlerinden birisi bakteriyosinlerdir. Bakteriyosinler, küçük peptid yapısında, membran aktif doğal antimikrobiyellerdir. LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinlerden, gıdaların korunması amacıyla ya üretici suşların doğrudan kullanılmasıyla ya da kısmi saflaştırılmış bu peptitlerin ilavesiile faydalanılmaktadır. Örneğin, nisin Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanımına izin verilmiş ilk bakteriyosindir. Bunun yanında bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerini içeren ticari preparatların biyokoruyucu starter kültür olarak kullanımı da mevcuttur.

Tarhana, geleneksel usullerle üretilmektedir. Bu ürünlerdeki fermentasyon,kullanılan bileşenler üzerinde taşınan mikroflora tarafından yürütülmektedir. Bu da ürün kalitesinin üretimden üretime değişmesine neden olmakta ve sağlık riskini de beraberinde getirmektedir. Tarhana fermentasyonunda her ne kadar asitliğin yükselmesi ve tarhananın kurutulması gibi faktörlerden dolayı patojen bakterilerin

canlılığının uzun süre devam etmediği öne sürülse de, fermentasyonun ilk günlerinde söz konusu suşlar hızla gelişerek çeşitli ısıya dirençli toksinleri üretebilmekte ve önemli sağlık riski oluşturmaktadır. Özellikle tarhana üretimi açısından *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* önemli iki patojendir. Son yıllarda damak zevki açısından taze tarhananın tüketimi de hızla artmaktadır. Dolayısıyla fermentasyonun ilk günlerinde bulunan bu türlerin canlılığının hızla durdurulması güvenli tarhana üretimini sağlayacaktır. Böylece immün sistemi zayıf kişilerin ve bebeklerin korunmasına imkân sağlanacaktır.

### **1.1 Tezin Amacı**

Bu tez çalışmasının iki temel amacı bulunmaktadır. Birincisi, tarhanadan izole edilmiş *Pediococcus acidilactici* PFC69 ve *Lactococcus lactis* PFC77 suşlarının bakteriyosin üretim yeteneklerinin tespiti, üretilen bakteriyosinlerin karakterize edilmesidir. Çalışmanın diğer amacı ise, tarhana hamuru ortamında *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının, *Bacillus cereus* ATCC11778 ve *Staphylococcus aureus* ATCC29213 suşları üzerindeki antimikrobiyel etkisinin araştırılmasıdır. Bunun yanı sıra, çalışmada laktik suşların gerçek sistemde bakteriyosin üretim yeteneklerinin izlenmesi de hedefler arasındadır.

### **1.2 Literatür Özeti**

Tarhana; buğday unu, yoğurt, maya ile çeşitli sebze ve baharatların (domates, kırmızı biber, soğan, nane, tuz vb.) karıştırılıp, fermente (laktik asit bakterileri ve ekme mayası vasıtasıyla) edildikten sonra kurutulup, öğütülerek elde edilen geleneksel fermente bir üründür (Anon., 1981, İbanoğlu ve İbanoğlu, 1999; Blandino ve diğ., 2003; Tarakçı ve diğ., 2004; Şengünve diğ., 2009; Settanni ve diğ., 2011). Türkiye'nin hemen her bölgesinde üretilen tarhananın bileşiminde kullanılan maddelerin çeşit ve miktarları ile üretim tekniklerinde yöresel farklılıklar bulunmaktadır (Temiz ve Pirkul, 1991; Tarakçı ve diğ., 2004). Türklerin Orta Asya'da yaşadıkları dönemden bu yana bilinen ve tüketilen geleneksel bir gıda olan tarhana, Orta Asya'dan göç eden Türkler ve Moğollar tarafından Anadolu, Orta Doğu, Macaristan ve Finlandiya'ya kadar yayılmıştır (İbanoğlu ve İbanoğlu, 1999; Çelik ve diğ., 2005 ). Türk tarhanasına benzer olan ürünler Yunanistan'da trahana, Mısır'da kişk, Irak'ta kushuk, Macaristan'da tahonya ve Finlandiya'da da talkuna

olarak bilinmektedir (Hayta ve diğ., 2002; Koca ve diğ., 2002; Settanni ve diğ., 2011). Türkiye sınırları içerisinde de farklı tipte tarhanaların üretimi mevcuttur. Bu farklılaşmanın temel nedeni, tarhana üretiminde uygulanan yöresel alışkanlıklar ve geleneklerdir. Örneğin Güneydoğu Anadolu bölgesindeki (Kahramanmaraş, Gaziantep) tarhana üretimlerinde buğday, İç Anadolu bölgesinde (Ankara, Konya, Karaman) ise un kullanımı söz konusudur. Ege bölgesindeki (Uşak, Denizli, Kütahya) tarhana üretimlerinde daha fazla çeşitte sebze kullanımı ve uzun fermentasyon uygulanmaktadır. Dolayısıyla da Türk Standartlarında ülkemizde üretilen tarhana, göce, un, irmik ve karışık olmak üzere 4 sınıfta toplanmıştır (Anon., 1981).

Tarhana hamuru, laktik asit bakterileri ile mayalar arasında etkileşimin meydana geldiği bir ekosistemdir. Bunlardan LAB' iorganik asit üretimi ile asitliğin artışından, mayalar ise CO<sub>2</sub> ve alkol üretimi ile hamurun kabarmasından ve aromatik olarak gelişmesinden sorumludurlar. Fermentasyonun başında mikrobiyel çeşitlilik fazla olsa bile, daha sonraki florada asit üreticisi LAB ile aside toleranslı olan mayalar baskın florayı oluşturmaktadır.

Oldukça zengin bileşen içeriğine sahip tarhana hamurunun laktik asit mikroflorası da önemli ölçüde çeşitliliğe sahiptir. Nitekim Şengün ve diğ. (2009) tarafından tarhana üretiminde önem taşıyan laktik asit bakterilerinin tanımlanması için yapılan çalışmada izolatların %27'sinin *Pediococcus acidilactici*, %19'unun *Streptococcus thermophilus*, %19'unun *Lactobacillus fermentum*, %12'sinin *Enterococcus faecium*, %7'sinin *Pediococcus pentosaceus*, %5'inin *Leuconostoc pseudomesenteroides*, %4'ünün *Weissella cibaria*, %2'sinin *Lactobacillus plantarum*, %2'sinin *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*, %2'sinin *Leuconostoc citreum*, %1'inin *Lactobacillus paraplantarum* ve % 0.5'inin *Lactobacillus casei*'den meydana geldiği tespit edilmiştir.

Settanni ve diğ. (2011) tarafından yapılan araştırmada, 30 °C ve 40 °C'de fermente edilen iki farklı tarhana hamurunda 0, 2, 4, 6 ve 8. günlerdeki LAB florasının gelişimi değerlendirilmiştir. Tarhana fermentasyonu esnasında toplam 222 LAB kolonisi izole edilerek, fenotipik ve polimorfik özelliklerine göre tanımlanmıştır. Buna göre LAB izolatları RAPD-PZR ile gruplandırılmış ve 16S rDNA dizi analiziyle nihai tanımlanmıştır. Tüm bu analizlerin sonucunda LAB izolatları; *P. acidilactici*, *L.brevis* ve *L. plantarum* olarak belirlenmiştir. 30 °C sıcaklıkta

sürdürülen fermantasyonda çoğunlukla Laktobasillerin; 40 °C sıcaklıkta ise Pediokokların baskın florayı oluşturduğu gözlenmiştir.

Benzer şekilde polifazik bir yaklaşımla kültüre bağımlı ve kültürden bağımsız yöntemlerin kullanıldığı ve ev ve işletme tipi tarhana hamurlarının mikroflorasının araştırıldığı çalışmada (Özel, 2012) toplanan 43 adet farklı (GTG)<sub>5</sub> profiline sahip laktik asit bakterilerin; *Lactobacillus plantarum* (16), *Lactobacillus brevis* (7), *Leuconostoc mesenteroides* (2), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1), *Pediococcus acidilactici* (1), *Lactococcus lactis* (3), *Lactobacillus fobifermentas* (1), *Lactobacillus mindensis* (1), *Lactobacillus paralimentarius* (1), *Lactobacillus alimentarius* (1), *Lactobacillus namurensis* (3), *Lactobacillus casei* (1), *Lactobacillus pentosus* (1), *Lactobacillus farciminis* (3), *Leuconostoc citreum* (1) türlerinden oluştuğu belirlenmiştir.

Laktik asit bakterileri, düşük G+C oranına sahip, Gram-pozitif, fakültatif anaerob, sporsuz, ve asit tolerant olan türleri içeren heterojen bir gruptur. Karbohidratları heterofermentatif veya homofermentatif yolla laktik asite indirgerler. Heterofermentatif türleri yan ürün olarak asetik asit, formik asit, etanol ve karbondioksit oluşturabilmektedir. Bitkisel ve hayvansal hammaddelerin fermentasyonunda endüstriyel starter kültür olarak kullanılan bu bakteriler; *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* olarak adlandırılan 12 cins içermektedir. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* cinsi üyeleri, fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültürler olarak kullanılmaktadır (De Vuyst ve Leroy 2007).

Morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren (kısa veya uzun çomak veya kok şekilli) LAB, fizyolojik açıdan oldukça benzer özellik göstermektedirler. Gram-pozitif, katalaz negatif (düşük oranda şeker ihtiva eden ortamda pseudokatalaza sahip suşlar görülebilir), spor oluşturmayan (*Sporolactobacillus inulinus* hariç), *Pediococcus* cinsi hariç tek düzlemde bölünen hareketsiz, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Sharpe ve diğ., 1966; Şahin, 1990; Çon, 1995). Mutlak fermantatifler ve asıl fermantasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Doğal habitatları süt ve süt mamülleri, işlenmemiş, taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların bağırsak mukoza ve içerikleridir (Schlegel, 1986; Tunail ve Köşker, 1989).

*Lactobacillaceae* familyasına ait laktik asit bakterileri, doğada çok yaygın oluşları çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanılan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında teknolojik açıdan önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır (Çon, 1995). Yeni gıdaların üretilmesi ve çeşitli gıdaların muhafazasında çok eski yıllardan beri kullanılmaktadır. Tüm dünyada fermente et, süt, tahıl, meyve ve sebze ürünlerinin hazırlanması ve muhafaza edilmesinde kullanılmaktadırlar (Gökalp, 1982; Andersson, 1989; Mayra-Makinen ve Bigret, 1993; Sánchez ve diğ., 2000).

Dünyada asidik gıda fermentasyonlarının yaygınlaşması ve endüstriyel üretimin başlamasıyla, starter laktik asit bakterilerinin kullanımı büyük önem taşımaya başlamıştır. Starter laktik asit bakterileri; mikrobiyal güvenliği sağlama, daha iyi organoleptik özellik gösterme, şeker polimerleri, tatlandırıcılar, aromatik bileşenler, vitaminler ve yararlı enzimler üretme gibi teknolojik anlamda faydaları ile besin değerini artırıcı ve probiyotik özellik göstermesi gibi avantajlarıyla önem taşımaktadır. Bu bakterilere karşı endüstriyel ilgi, bu bakterilerin endüstriyel ve medikal alandaki uygulamaları her geçen gün hızla artmaktadır (Ross ve diğ., 2002; De Vuyst ve Leroy, 2007; Temmerman ve diğ., 2004; Salminen ve diğ., 2006).

Laktik asit bakterileri fermente gıda ürünlerindeki yapısal ve aromatik özelliklerin iyileştirilmesi yönündeki katkılarının yanında, ürettikleri çeşitli antimikrobiyel metabolitler aracılığıyla ürünü mikrobiyal bozulmalara veya oluşabilecek mikrobiyal hastalık risklerine karşı korumaktadır. Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin laktik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diasetil ve en önemlisi bakteriyosin üretimiyle antimikrobiyel niteliğe sahip oldukları rapor edilmiştir (Galvez ve diğ., 2007).

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenerek ortama salgılanan ve genelde yakın akraba türlerin inhibisyonunda etkili olan peptid veya protein yapıdaki metabolitlerdir (Delves-Broughton ve diğ. 1996). Başta *Lactobacillus* olmak üzere *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinsi laktik asit bakterilerine ait pek çok tür bakteriyosin üretme yeteneğine sahiptir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda tespit edilen bakteriyosinlerin kendi yakın akraba türlerine ve gıdalarda önem taşıyan *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, gibi Gram pozitif patojen bakterilere karşı inhibitif etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir.



Bakteriyosinler, benzer aktivite özelliklerinden dolayı, birçok kaynakta antibiyotiklerle karıştırılmaktadır. Bakteriyosinleri antibiyotiklerden ayıran temel kriter, bakteriyosinlerin antibiyotiklere nazaran çok daha dar bir etki spektrumuna ve sadece yakın akraba türler üzerinde bakteriyosidal ya da bakteriostatik etkiye sahip olmalarıdır (Margaret ve diğ. 2002). Bu antimikrobiyel bileşik grupları arasındaki diğer farklılıklar ise şu şekilde sıralanabilir:

1. Bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenen ürünlerdir. Antibiyotikler ise enzimatik işleme sonucu aktif formlarını kazanırlar.
2. Her bakteriyosinin kendi dirençlilik proteini vardır. Bu dirençlilik proteinlerini kodlayan genler, bakteriyosinlerin yapısal genleri ile bağlantılıdır. Antibiyotik dirençliliğini yöneten genetik determinantlar ise, yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir.
3. Bakteriyosinler genellikle bakterilerin gelişme fazında üretilir (birincil metabolitler) ve iki bileşenli bir sistem tarafından regüle edilir. Antibiyotikler ise, gelişimin durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Nes ve diğ. 2001).

Yapılan çalışmalarla bakteriyosinlerin büyük bir çoğunluğunun plazmid kodlu olduğu ve hatta tek bir plazmidin üç farklı bakteriyosini kodladığı gösterilmiştir (Davey 1984, Martinez ve diğ. 1999, Foschino ve diğ. 2001, Soomro ve diğ. 2002). Bununla beraber, bazı bakteriyosinlerin gen kodunun kromozomal DNA üzerinde bulunduğu da tespit edilmiştir (Malik ve diğ. 1994, Delgado ve Mayo 2004). Bakteriyosinlerin sentezlenebilmesi için, en az 4 farklı fonksiyona sahip gen ya da genlere gereksinim vardır. Bu genler, fonksiyonları esas alınarak aşağıdaki gruplara ayrılmaktadır:

1. Öncü bakteriyosinlerin sentezlenmesinde görev alan yapısal genler
2. Öncü peptidin olgunlaştırılmasında ve hücre dışına salgılanmasında görev alan genler
3. Hücreyi kendi bakteriyosinine karşı koruyan proteinleri sentezleyen dirençlilik genleri

4. Bakteriyosin sentezinin regülasyonundan sorumlu genler (Klaenhammer 1993, Nes ve Tagg 1996, Delgado ve Mayo 2004).

Farklı gruplarda değerlendirilen bakteriyosinler, etki mekanizmaları bakımından da farklılık göstermekle birlikte, büyük bir çoğunluğunun ana hedefi konak hücre sitoplazmik membranıdır. Bu hedef üzerindeki etki biçimlerinde ise farklılıklar bulunmaktadır. Bakteriyosinlerin hedef hücrelerin membranı üzerinde temelde iki etki mekanizması mevcuttur. Söz konusu etki mekanizmaların ilki, spesifik bağlanma noktası gerektirmeksizin, sadece kütle etkisine bağlı olarak hücre membranının yapısını tahrip etmek suretiyle gerçekleşen inhibisyon şeklindedir. Bu etki mekanizması bakteriyosinlerin yüksek konsantrasyonda bulunması durumunda meydana gelir. Bakteriyosinleri önemli kılan diğer etki mekanizması ise, özellikle hedef hücrelerin anti-listeryal bakteriyosinlerde görülen ve spesifik bağlanma bölgesine ihtiyaç duyan inhibisyon şeklindedir. Bu gruptaki bakteriyosinlerin N-terminalinde bulunan YGNGV amino asit dizisi, sadece bu diziyi tanıyan spesifik bir membran resptörüne bağlanır ve membran üzerinde iyon kanal yapısı oluşturarak potasyum ve magnezyum gibi önemli iyonların dışarı akmasına yol açar. Yine benzer şekilde nisininin antimikrobiyal etkisi için hedef hücrede bulunan ve hücre duvarı sentezinde görev alan lipit II molekülü oldukça önemlidir. Nitekim nisin hücre yüzeyinde bu moleküle tutunduktan sonra sitoplazmik membrana transloke olmaktadır. Bakteriyosinlerin sahip olduğu bu antimikrobiyal etki sonucunda proton itici kuvvetin bozulması ve çeşitli iyon kayıpları ile hücresel eletrolitin düşüşü ortaya çıkmaktadır (Jack ve diğ. 1995, Cuesta ve diğ. 2000, Sullivan ve Nord 2005 ).

Bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında; üretici mikroorganizma, bakteriyosinin moleküler büyüklüğü, fiziksel özelliği, kimyasal yapısı, ısı stabilitesi ve bakteriyosinin etki mekanizması dikkate alınmaktadır. Gram pozitif bakterilerin sınıflandırılmasına yönelik ilk öneri Klaenhammer (1993) tarafından yapılmış, bu araştırmacı bakteriyosinleri temelde post translasyonel modifiye bakteriyosinler lantibiyotikler (Grup I bakteriyosinler), modifiye olmamış ısıya dayanıklı membran aktif bakteriyosinler (Grup II bakteriyosinler), ısıya duyarlı bakteriyosinler (Grup III bakteriyosinler) ve lipit ve karbonhidrat içeren kompleks bakteriyosinler (Grup IV bakteriyosinler) olmak üzere dört gruba ayırmıştır. Ancak bu konu üzerindeki bilgi birikiminin artması ile ve de her geçen gün yeni bakteriyosinlerin keşfedilmesi

sonucunda sınıflandırmada revizyona gidilmektedir. Bakteriyosinlerle ilgili yapılan son sınıflandırma Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1 : Bakteriyosinlerin güncellenmiş sınıflandırılması (Rea ve diğ. 2011)

Grup	Tanımı	Alt gruplandırılması
I	Modifiye peptitler (a) Lantibiyotikler ve lantipeptitler  (b) Labyrinthopeptinler  (c) Saktibiyotikler	Altgrup I ve II (LanBC ve LanM proteinleri tarafından modifiye edilir) Altgrup III ve IV (RamC benzeri ve LanL proteinleri tarafından modifiye edilir)  İki alt grup mevcuttur. Tekli ve ikili peptitler
II	Modifiye olmamış peptitler (a) Pediosin benzeri (b) İki peptitli bakteriyosinler (c) Sirküler bakteriyosinler (d) Linear pediosin olmayan bakteriyosinler	Dört altgrup mevcuttur.(I-IV) İki altgrup mevcuttur. Örn. A ve B İki altgrup mevcuttur. Örn. 1 ve 2
Bakteriyolisinler (Önceki isimlendirme sınıf III)	Bakteriyosin olmayan litik proteinler	

Grup I Bakteriyosinler; post-translasyonel olarak modifiye edilen aminoasitleri içerir ve lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadırlar. Günümüzde ilave post-translasyonel modifiye bakteriyosinlerin tanımlanması devam etmektedir. Yeni tanımlanan bakteriyosinlerin de dahil edilmesiyle Grup I bakteriyosinler; lantibiyotikler, labyrinthopeptinler, saktibiyotikler olmak üzere üç gruba ayrılmıştır.

Grup Ia yapılarında bilinen aminoasitlerden farklı olarak lanthionin (Lan) ve beta metil lanthionin (MeLan) türevlerini içermeleri sebebiyle lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadırlar. Bunun yanısıra; bu grup bakteriyosinlerin yapılarında biyokimyasal özelliklerini etkileyen dehidro-alanin ve dehidro-bütirin de bulunmaktadır (Twomey ve diğ. 2002). Bu grup bakteriyosinler 19-28 aminoasit uzunluğunda olup moleküler ağırlıkları 1.9 ile 4.6 kDa arasında değişmektedir (Oscariz ve Pisabarro 2001). Bu grubun üyeleri tip A ve tip B olmak üzere iki alt gruba ayrılmışlardır (Cotter ve diğ. 2005, Wiley ve Vander 2007, Heng ve diğ. 2007). Tip A grubu bakteriyosinler net pozitif yüke ve hidrofobik polipeptid yapısına sahiptir. Hedef hücrelerde membranda porlar oluşturmak suretiyle antimikrobiyal

etkinliğini göstermektedirler. Tip A lantibiyotikler kendi içinde Ia ve IIa olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Bu ayrım modifikasyon enzimleri ve biyosentetik yol farkına göre yapılmaktadır (Pag ve Sahl 2002). B grubu lantibiyotikler ise yüksüz veya negatif yüke sahiptirler ve globüler peptid yapısındadırlar. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite gösterirler (Twomey ve diğ. 2002). A tipi lantibiyotiklere örnek, en sık çalışılan ve birçok ülkede gıdalarda koruyucu madde olarak kullanımına izin verilen nisin'dir (Nes ve diğ. 2007). İki nisin varyantı (nisin A ve nisin Z) *Lactococcus lactis* bakterisinden, Nisin U olarak adlandırılan diğer bir varyantı ise *Streptococcus uberis*'ten üretilmekte olup, Nisin U, Nisin A ile % 78 oranında benzerlik göstermektedir (Wescombe ve diğ. 2006). Bu gruptaki diğer önemli bakteriyosinler ise laktisin 481, mutasin A ve duramisindir (Oscariz ve Pisabarro 2001, Siegers ve diğ. 1996).

Grup Ibyapılarında bilinen aminoasitlerden farklı olarak modifiye labionin aminoasitini içeren ve *Actinomadura namibiensis* DSM 6313 tarafından üretilen Labyrinthopeptinlerdir. Labyrinthopeptinler *Herpes simplex* virüsüne karşı aktiftirler. Bu nedenle nöropatik tedavi uygulamalarında potansiyel bir ajan olarak dikkat çekmektedirler (Meindl ve diğ. 2010).

Grup Ic Subtilosin A ve thurisin CD'nin dahil edildiği saktibiyotiklerdir. Subtilosin A *Bacillus subtilis* tarafından üretilen siklik bir bakteriyosin olmasına rağmen post-translasyonel modifikasyon içermesinden dolayı bu gruba dahil edilmiştir (Marx ve diğ. 2001, Kawulka ve diğ. 2003, Martin-Visscher ve diğ. 2009). Grup üyelerinden iki peptid bakteriyosin olarak bilinen ve *Bacillus thuringiensis* 6431 tarafından üretilen thurisin CD ise sisteinler arasında alfa karbon köprüleri içermektedir (Rea ve diğ. 2011).

Grup II bakteriyosinler modifiye olmamış türlerdir. Ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptidlerin çoğunluğunu oluşturan, küçük, ısıya dayanıklı bakteriyosinleri kapsamaktadırlar. Grup II bakteriyosinler post-transyoneel modifikasyona uğramadıkları ve sadece gerekli bakteriyosini, immunitiyi ve transportu kodlayan genlere sahip oldukları için yapısal olarak lantibiyotiklerden daha basittirler. Bu grup bakteriyosinler 4 alt gruba ayrılmaktadır. Grup IIa; pediyosin benzeri güçlü antilisterial bakteriyosinleri, Grup IIb; iki peptid bakteriyosinleri, Grup IIc; halkasal bakteriyosinleri ve Grup IId ise diğer lineer bakteriyosinleri kapsamaktadır (Rea ve diğ. 2011).

Grup II bakteriyosinlerinin en büyük grubu olan Grup II bakteriyosinleri, *Listeria* inhibisyonuna neden olan pediyosin benzeri bakteriyosinler olarak adlandırılmaktadırlar (Ennahar ve diğ. 1999, Drider ve diğ. 2006). Farklı aminoasit içeriklerine sahip, 10 kDa'dan küçük, yüksek sıcaklık ve ekstrem pH'lara dayanıklı bakteriyosinlerdir. Birçok LAB suşları tarafından üretilen farklı tür ve suşlarda yaklaşık 30 pediyosin benzeri bakteriyosin tanımlanmıştır (Nissen-Meyer ve diğ. 2009). Bu gruba ait tanımlanan ve karakterize edilen bakteriyosinler pediyosin PA-1, enterosin A, lökosin A-UAL 187, mesenterisin Y105, sakasin P ve kurvasin A'dır (Drider ve diğ. 2006, Hastings ve diğ. 1991, Hechard ve diğ. 1992, Henderson ve diğ. 1992, Nieto-Lozano ve diğ. 2010, Tichaczek ve diğ. 1992, Aymerich ve diğ. 1996). Bu grubun üyeleri benzer aminoasit dizi homolojisine sahiptirler ve korunmuş bir amino terminal dizisi ile amino terminal ucunda sistein disülfid köprüsü içermeleri sebebiyle diğer gruplardan farklıdırlar.

Antimikrobiyal etki spektrumu açısından oldukça dar bir spektruma sahip olan bakteriyosinler duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler (Drider ve diğ. 2006, Hill ve diğ. 2011). Antilisterial özellikleriyle bilinen ve Gram-pozitif bakterilere karşı bakteriosidal etki gösteren pediyosin benzeri bakteriyosinlerin muhtemel etki mekanizması hücre zarını hedef alan ve spesifik bağlanma bölgesi gerektiren inhibisyon etkisidir. Grup IIa bakteriyosinlerinin sahip olduğu YGNGV aminoasit dizisi sadece bu diziyi tanıyan spesifik bir zar reseptörüne bağlanmaktadır (Papagianni 2003). Grup IIa bakteriyosinlerin mutantları ve analogları ile yapılan çalışmalarda sonuçlar tüm dizinin ve üç boyutlu yapının etkileşimde oldukça önemli olduğunu göstermiştir. Üç boyutlu yapı özellikle hücre zarında spesifik bölgelere bağlanarak etkili olan bakteriyosinler için son derece önemli olmakta ve bakteriyosin molekülleri duvardan geçebilir hale gelmektedir. Bakteriyosin molekülleri hücre duvarından geçip sitoplazmik zarla temas ettikten sonra sitoplazmik zarın fonksiyonunu bozmaktadırlar. Sonuç olarak zar geçirgenliği değişmekte, zar transport mekanizması bozulmakta ve proton itici kuvvet (PMF) dağılmaktadır bu durum hücre lizisi ile sonuçlanmaktadır. Bütün bunlar enerji üretiminin engellemesine ve protein, nükleik asit gibi temel moleküllerin biyosentezlerinin durmasına yol açmaktadır (Hill ve diğ. 2011).

Grup IIb iki peptidli bakteriyosinlerdir. İki peptidli bakteriyosinler de üç temel kriter esastır. İlk olarak; iki peptid birlikte antimikrobiyal aktiviteye sahiptir, fakat tek

başlarına aktivite göstermezler. Bunun yanı sıra bir immunité proteinini içerir. Ayrıca genetik organizasyonlarında immunité genini takiben birbirini izleyen iki bakteriyosin yapısal genleri bir arada bulunur (Nes ve diğ. 2007). Bu güne kadar 16 adet iki peptidli modifiye olmamış bakteriyosin tanımlanmıştır (Nissen-Meyer ve diğ. 2009). İki peptidli bakteriyosinler üç boyutlu olarak incelendiğinde Grup IIa ve Grup IId tek peptidli bakteriyosinler ile benzer fonksiyonlara sahip oldukları tespit edilmiştir (Rea ve diğ. 2011).

Grup IIc halkasal bakteriyosinlerdir. Bu bakteriyosinler de diğér bakteriyosinler gibi ribozomal olarak sentezlenmekte ve bu nedenle gramisidin-S ve mikosubtilin gibi enzimatik olarak sentezlenen siklik antimikrobiyal peptidlerden kesin olarak ayrılmaktadırlar (Mogi ve Kita 2009). Grup IIc bakteriyosinleri, N ve C terminalleri halkasal yapıyı oluşturmak üzere kovalent bağlanan bakteriyosinlerdir. NMR ve X-ray çalışmaları karnosiklin A ve *Enterococcus faecalis* tarafından üretilen AS-48 bakteriyosinlerinin bu gruba dahil olduğunu göstermiştir (Kawulka ve diğ. 2003, Martin-Visscher ve diğ. 2009, Jimenez ve diğ. 2005, Van Belkum ve diğ. 2011). Bu peptidler genellikle ısıya dayanıklı olup, proteolitik enzimlere dirençlidirler ve antilisterial aktiviteye sahiptirler. Günümüze kadar tanımlanan halkasal bakteriyosinlerden altı tanesi LAB orijinli olup (gasserin A, reuterisin 6, enterosin AS-48, enterosin 4, karnosiklin A, laktosiklin Q), diğér iki tanesi ise *Clostridium beijerinckii* tarafından üretilen sirularin A ve *Butyrivibrio fibrisolvens* tarafından üretilen butirivibriosin AR10'dur (Cotter ve diğ. 2005, Rea ve diğ. 2011, Martin-Visscher ve diğ. 2009).

Grup IId diğérlerinden farklı bakteriyosinlerdir. Bu bakteriyosinler diğér gruplara dahil olmayan, modifiye olmamış, lineer ve pediosin benzeri olmayan bakteriyosinleri içerir (Cotter ve diğ. 2005, Nissen-Meyer ve diğ. 2009). Grup IId bakteriyosinleri çeşitli kaynaklardan izole edilen geniş çeşitlilikteki antimikrobiyal peptidleri içermektedir. Laktokoksin A ilk izole edilen bakteriyosin olup diğér bakteriyosinler gibi homolog bir diziyeye sahip değildir (Nissen-Meyer ve diğ. 2009). *Propionibacterium* sp. türleri tarafından üretilen bakteriyosinlerin de bu gruba dahil edilmektedirler (Heng ve diğ. 2007).

Grup III bakteriyosinler bakteriyolizinler olarak adlandırılan, ısı dayanıklılığı olmayan büyük moleküler ağırlıklı antimikrobiyal peptidlerdir. *Lactobacillus helveticus* tarafından üretilen helvetisin J, *Streptococcus zooepidermicus* tarafından

üretilen zoosin A, *Enterococcus faecalis* tarafından üretilen enterolisin A, *Streptococcus milleri* tarafından üretilen millerisin B, *Brevibacterium linens* tarafından üretilen linosin M18 bu gruba dahil edilmektedir (Joerger ve Klaenhammer 1986, Valdes-Stauber ve Scherer 1994, Simmonds ve diğ. 1997, Beukes ve diğ. 2000).

Grup IV bakteriyosinler ise büyük kompleks moleküller olup aktiviteleri için karbonhidrat ve lipidlere ihtiyaç duyan bakteriyosinlerdir. Bu grupta yer alan glikoproteinlere laktosin 27 ve lipoproteinlere ise lakstrepsinler örnek olarak verilebilir (Chen ve Hoover. 2003, Upreti ve Hinsdill. 1975, Kozak ve diğ. 1978).

Tüm bu bilgiler ışığında LAB'i tarafından sentezlenen bakteriyosinlerin temel karakteristikleri şöyle özetlenebilir;

I. İnhibitör etki spektrumu hedef mikroorganizmaya özgüdür.

II. İnhibitör etki hücreye özgül reseptörler ile ilgilidir.

III. Bakteriyosin üretimi ve üretici hücrenin bakteriyosin immunitesinin genetik belirleyicisi genellikle plazmid DNA kaynaklıdır. Bazı türlerde bakteriyosin üretiminin kromozomal DNA kaynaklı olduğu da ifade edilmektedir (Barefoot ve Klaenhammer, 1983; Juven ve diğ. 1991; Hastings ve diğ. 1991).

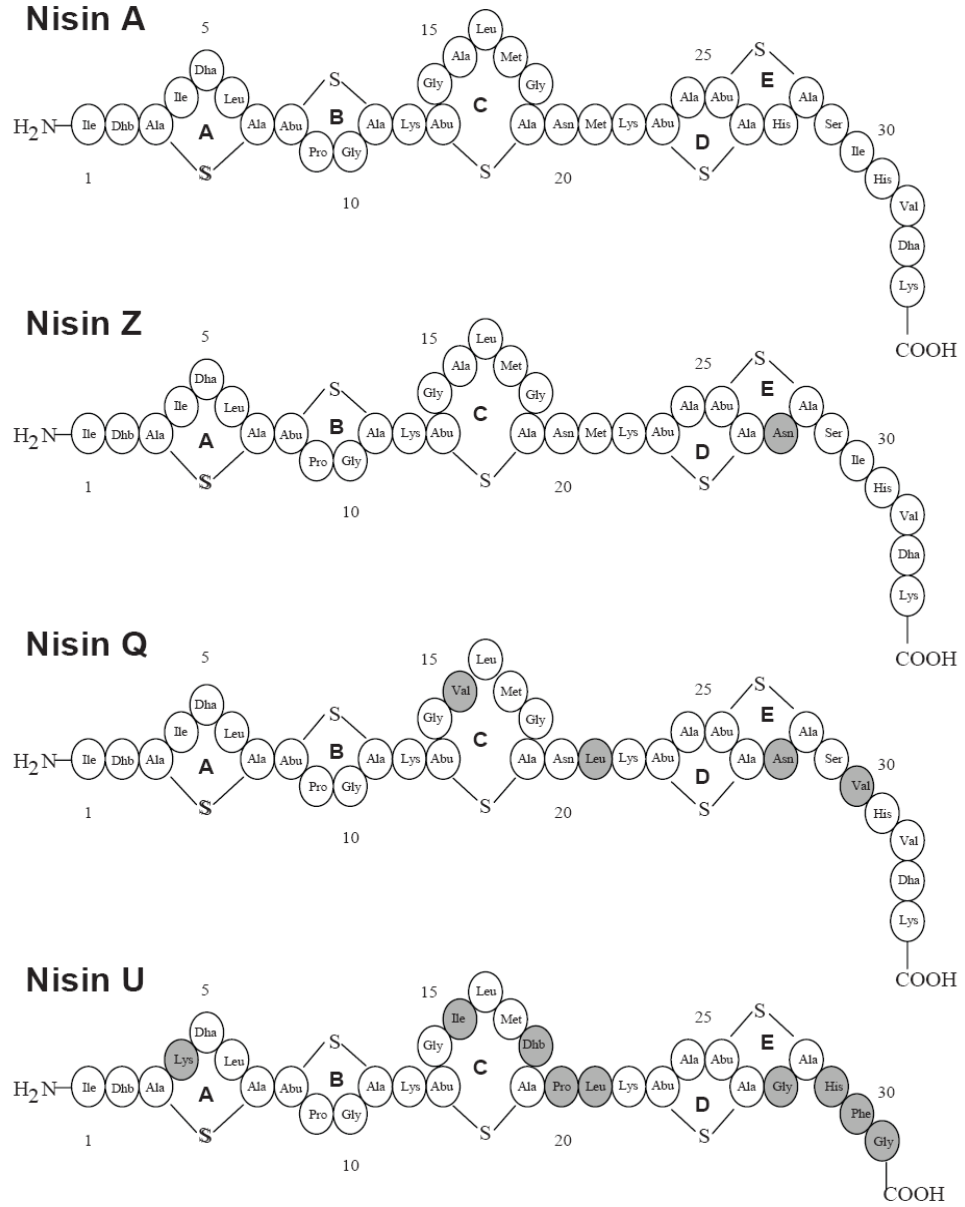
Laktik asit bakterileri tarafından üretildiği tespit edilmiş birçok bakteriyosin olmasına rağmen, gıdalarda kullanımına izin verilmiş tek bakteriyosin nisin'dir. Nisin, tip I lantibiyotik grubuna dahil olan ve laktik asit bakterileri üyesi *Lactococcus lactis* tarafından sentezlendiği tespit edilmiş ilk bakteriyosindir. Bu bakteriyosin oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle gıda endüstrisinde koruyucu, medikal alanda ise terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Nisin FDA tarafından GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir) statüsünde bir ajan olarak tanımlanmış ve belgelendirilerek (E234) kullanımına izin verilmiştir. Bu bakteriyosin günümüzde 50'den fazla ülkede süt ve süt ürünleri, konserve ürünler ve hazır çorbalar gibi gıdaların korunmasında kullanılmaktadır. Ayrıca diğ macunu ve sargı bezlerini içeren çeşitli sağlık ürünlerinde de kullanımı mevcuttur (Delves-Broughton ve diğ. 1996).

Nisinin primer yapısı 1971 yılında Gross ve Morell tarafından yürütülen çalışmalar neticesinde aydınlatılmıştır. Nisinin moleküler ağırlığı yaklaşık 3350 dalton

olup,yapısında 34 aminoasit bulunmaktadır. Bu yapıtaşlarının bazıları; lantiyonin, metillantiyonin (Met Lan), 2-3 dehidroksialanin (Dha) ve 2-3 dehidroksibutirin (Dhb) gibi doğada ender rastlanan amino asitlerdir. Nisinin yapısındaki bu lantiyoninler 5 adet halka yapısı oluşturmaktadır (Bu halkalar A, B, C, D ve E olarak isimlendirilmiştir) (Şekil 1.1). İçerdiği lantiyonin köprülerinden dolayı, nisin lantibiyotikler sınıfına dahil edilmiştir (Schnell ve diğ. 1988).

Bugüne kadar nisin A (Gross and Morell 1971), nisin Z (Graeffe ve diğ. 1991; Mulders ve diğ. 1991), nisin Q (Zendo ve diğ.2003), nisin U (Wirawan ve diğ. 2006) ve nisin F (Kwaadsteniet ve diğ.2008) olmak üzere 5 farklı nisin varyantı karakterize edilmiştir (Şekil 1.1). Bu varyantlardan nisin A, Z, U üreticileri süt ve süt ürünlerinden (Gross and Morell 1971, Graeffe ve diğ. 1991, Mulders ve diğ. 1991), nisin Q üreticisi nehir suyundan (Zendo ve diğ. 2003), nisin F üreticisi (Kwaadsteniet ve diğ. 2008) ise yayın balığından izole edilmiştir. Bu varyantlardan yalnız nisin U, *L. lactis* suşları dışında bir bakteri tarafından (*Streptococcus uberis*) üretilmektedir.





Şekil 1.1 : Nisin A, Z, Q ve U'nun yapısı. Lantionin köprüleri A-E olarak gösterilmiştir. Dha= Dehidroalanin, Dhb= Dehidrobütrin; Ala-S-Ala, lantionin; Abu-S-Ala,  $\beta$ -metil lantionin. Varyantlarda Nisin A'dan farklı olan amino asitler gri tonla işaretlenmiştir (Gross ve Morell 1971; Chatterjee ve diğ. 2005; Wirawan ve diğ. 2006)

Nisin varyantları arasındaki temel farklılık, primer yapının bazı pozisyonlarında görülen amino asit değişimleridir. Nisin Z, nisin A'dan farklı olarak 27. pozisyonda histidin yerine asparajin aminoasitini içermektedir (Graeffe ve diğ.1991, Mulders ve diğ. 1991). Nisin Q'da nisin Z'ye göre üç amino asit (Val 15, Leu 21, Val 30) bakımından farklı bulunmuştur. Bugüne kadar bu varyant üreticisi olan sadece bir suş tanımlanmıştır (Zendo ve diğ. 2003). *Streptococcus uberis* tarafından üretilen nisin

U; yaygın rastlanılan nisin A ve nisin Z'ye göre 9 amino asit (Lys 4, Lle 15, Dhb 18, Pro 20, Leu 21, Gly 27, His 29, Phe 30 ve Gly 31) bakımından farklılık göstermektedir. Ayrıca diğer varyantlardan farklı olarak 34 aminoasit yerine, 31 amino asit içermektedir. Bununla birlikte bu varyantta da modifiye amino asitlerin ve lantiyonin köprülerinin yerleşimi, diğer varyantlarla benzerdir. Son olarak yayın balığı izolatu olan *L. lactis* tarafından üretilen nisin F, nisin A ve nisin Z'den sadece 30. pozisyondaki aminoasitin valin olmasıyla farklılaşmıştır. Ancak bu varyanta ait lantiyonin köprülerinin yerleşimi henüz aydınlatılmamıştır (Kwaadsteniet ve diğ. 2008).

Nisin molekülü katyonik özellikte olup, nisin A'nın pozitif net yükü 5, diğer varyantların ise 4'tür. Bu moleküllerin tümü alkali ortamda izoelektrik noktaya sahiptir (Jung 1991). Nisin molekülü, yapısında aromatik amino asitlerin bulunmaması nedeniyle 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ışık absorbe etmez. Nisin molekülünün stabilitesi, çözünürlüğü ve biyolojik aktivitesi, pH değerinin artışıyla birlikte azalmaktadır. Özellikle alkali ortamlarda çözünürlüğü tamamen düşmektedir. Örneğin, ticari kullanımı bulunan nisin A'nın çözünürlüğü pH 2'de 57 mg mL<sup>-1</sup> iken, pH 6'da 1.5 mg mL<sup>-1</sup>'ye düşmektedir. pH 8.5'in üzerinde ise bu değer 0.25 mg mL<sup>-1</sup> civarındadır (Hurst 1981, Liu ve Hansen 1990). Alkali ortamlarda, molekül içi veya moleküller arası kimyasal modifikasyonlar nedeniyle, nisin molekülünde geri dönüşümsüz inaktivasyon meydana gelmektedir. Özellikle hidroksil (OH) iyonlarının etkisiyle dehidro amino asitler modifiye olabilmektedir (Liu and Hansen 1990). Nisin Z ve nisin Q, nisin A'ya göre daha fazla çözünebilme yeteneğindedir. Bu durum asparajin amino asitinin histidine göre daha fazla hidrofilik özellikte olmasından kaynaklanmaktadır (Davies ve diğ. 1998). Nisin pH 2'de aktivite kaybı olmadan sterilize edilebilir. Ancak pH 5'de % 90'dan fazla aktivite kaybı meydana gelir. Ayrıca nisin molekülü  $\alpha$ -kimotripsin ve proteinaz K uygulamasına karşı duyarlıdır (de Vuyst ve Vandamme 1994, Motlagh ve diğ.1991).

Patojen bakterilerin nisine karşı oluşturduğu direnç ve nisinin kullanım maliyetinin yüksek olmasından dolayı, son yıllarda nisine alternatif bakteriyosin arayışı da sürmektedir. Bu yönde yürütülen çalışmalarda *P. acidilactici* ve *L. lactis* suşlarından üretilen pediosin ve laktisin bakteriyosinlerinin detaylı biyokimyasal ve genetik özellikleri tamamlanmış ve endüstriyel kullanıma en hazır iki bakteriyosin özelliği taşımaktadır (Papagianni ve Anastasiadou 2009; Bierbaum ve Sahl 2009). Ancak

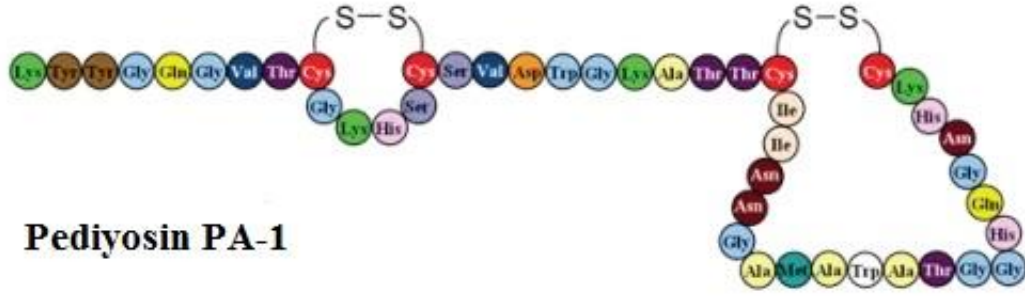
laktik asit bakterilerince zengin fermente gıdalardan farklı bakteriyosin üreticisi suşların izolasyonu ve üretilen bakteriyosinlerin karakterizasyonu çalışmaları halen devam etmektedir (Devi ve Halami 2011; de Vuyst ve Leroy 2007; Jamuna ve Jeevaratnam 2004). Nitekim ekşihamur, kimchi gibi yarışmacı laktik mikrofloradan bakteriyosin üreticisi yeni suşlar izole edilmiştir (de Vuyst ve Leroy 2007; Jamuna ve Jeevaratnam 2004).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda birçok gıda kaynağından izole edilen *Pediococcus* cinsi üyelerinin pediosin benzeri bakteriyosinleri üretebildikleri tespit edilmiştir. Bu cins içerisinde pediosin ürettiği rapor edilen türler; *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* ve *P. damnosus*'tur. İyi bir şekilde saflaştırılmış ve moleküler yapısı belirlenmiş bazı pediosinler ve çeşitli özellikleri Tablo 1.2'de gösterilmiştir. *P. acidilactici* PAC1.0 suşundan izole edilen pediosin AcH/PA-1 en iyi bilinen örneklerden birisidir (Şekil 1.2). Sosisten izole edilen *P. acidilactici* L50, *P. acidilactici*M, *P. acidilactici* F türlerinden sırasıyla pediosin L50, AcM ve F üretildiği tespit edilmiştir. Bunların dışında bozadan izole edilmiş *P. pentosaceus* ST18 ve Kore'de geleneksel bir içki olan kimchi'den izole edilen *P. pentosaceus* K23-2 suşlarından da pediosin üretildiği rapor edilmiştir. Tüm bunlardan farklı olarak *P. damnosus* tarafından da pediosin PD-1 üretilmediği gösterilmiştir (Schved ve diğ. 1993; Strasser de Saad ve diğ. 1995; Cintas ve diğ. 1995; Elegado ve diğ. 1997; Millerve diğ. 1998; Yin ve diğ. 2003; Wu ve diğ. 2004; Bauer ve diğ. 2005; Anastasiadou ve diğ. 2008; Papagianni ve Anastasiadou 2009).

Tablo 1.2 : Sıcaklık, pH ve enzim uygulamalarının çeşitli pediosinlerin antimikrobiyal aktivitesine etkisi (Papagianni ve Anastasiadou 2009).

	Uygulamalar*								
	Sıcaklık		pH		Proteolitik Enzim				
Pediosin	100°C/60dk	121°C/60dk	2-10	4-7	Pepsin	Papain	Tripsin	$\alpha$ -kimotripsin	Proteinase K
SM-1	+	+	+	+	-	-	-	-	-
pK23-2			+	+					
SA-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ACCEL	+	±	+	+	-	-	-	-	-
PD-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SJ-1	+	+	-	+	TE	-	-	-	-
N5p	+	+	-	+	TE	TE	TE	TE	TE
AcH	+	+	+	+	TE	-	-	-	-
PA-1	+	±	+	+	-	-	TE	TE	TE

\* +, Aktivite var; -, Aktivite yok; TE, Tespit edilemedi.



Şekil 1.2 : Pediosin PA-1'in yapısı (Desriac ve diğ. 2010)

Daha önce de belirtildiği gibi sınıf IIa grubuna dahil olan pediosinler katyonik peptitler olup benzer primer yapıya sahiptir. Pediosinlerin iki önemli yapısal bölgesi bulunmaktadır. Bunlar yüksek korunmuş olan ve -YGNGV- konsensus motifini içeren N-terminal ile daha az korunmuş olan C-terminal bölgeleridir. Her iki ayrı bölge de özellikleri dolayısıyla pediosinlerin antimikrobiyal özelliklerinde doğrudan etkilidir. N-terminalde bulunan -YGNGV- konsensus dizisinde oluşturulan mutasyonların antimikrobiyal kayıp ile sonuçlandığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin pediosin AcH/PA-1 yapısında 5. pozisyonadaki Asn'in Lys'e dönüştürülmesi durumunda aktivite kaybı gözlenmiştir. Pediosin yapısında pozitif yüklü rezidüer genellikle hidrofilik N-terminal kısımdadır. Dolayısıyla bu bölgenin elektrostatik interaksiyonu pediosinlerin fosfolipit yapıya bağlanmasını sağlamaktadır. Pediosinlerin C-terminali ise hedef hücrenin belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu bilgi özellikle hibrit pediosin yapıları oluşturularak daha net anlaşılmıştır. Ayrıca pediocin AcH/PA-1 üzerinde yapılan çalışmalarda 20. ve 24. rezidü arasında yapılan değişiklik antimikrobiyal aktivitenin kaybı ile sonuçlanmıştır (Quadri ve diğ. 1997; Chen ve diğ. 1997; Miller ve diğ. 1998; Uteng ve diğ. 2003; Drider ve diğ. 2006).

Pediosinler genellikle dar antimikrobiyal spektruma sahiptir. Pediosinler özellikle *Listeria*'ya karşı yüksek inhibitif etkili olarak bilinirler. Ancak bu bakteriyosinlerin diğer Gram pozitif bakteriler üzerinde de çeşitli seviyelerde antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır. Eijsink ve diğ. (1998) tarafından yapılan çalışmada pediosin AcH/PA-1 suşlarının *Listeria*'ya karşı etkili oldukları saptanmıştır. Yapılan diğer spektrum çalışmalarında pediosinlerin *Listeria* dışında *C. sporogones*,

*C. thiaminolyticum* ilaveten *B. cereus*, *E.fecalis*, *S.carnosus* gibi bakterilere karşı orta ve düşük seviyelerde antimikrobiyal etkili oldukları belirlenmiştir (Anastasiadou ve diğ. 2008; Drider ve diğ. 2006).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanımlama çalışmaları, belirlenen bakteriyosinlerin gıdalardaki kullanımı ve etkisi yönündeki çalışmalarla paralel yürütülmektedir. Bakteriyosinlerin suşlar tarafından üretim miktarı ve patojenler üzerindeki etkisi farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle model sistemlerde alınan olumlu sonuçların in vivo koşullarda belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda yapılan bir çalışmada, peynir ortamında *L. plantarum* LMG P-26358 suşunun *L. innocua* türünü inhibe edebildiği rapor edilmiştir (Mills ve diğ.,2011). Benzer şekilde De Vuyst ve Leroy (2007) tarafından yapılan bir çalışma da Belçika'ya has fermente bir sosis ortamında *L. curvatus* LTH 1174suşunun *Listeria innocua* LMG 13568 türünü inhibe ettiği bildirilmiştir. Nakamura ve arkadaşlarının (2013)*Lactobacillus gasseri* LA39 tarafından üretilen gasserisin A (GA) koyu kremaya ilave ederek yaptığı çalışmada, hacimce % 0,5 glisin ve % 5 GA içeren örnekte, *B. cereus* AK1124 ve *L. lactis* subsp. *lactis* AK1155 suşlarının tamamen inhibe oldukları bildirilmiştir. Sarika ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmada *L. lactis* PSY2 suşunun ürettiği PSY2 bakteriyosininin 1,600 AU/ml'lik solüsyonundan *Epinephelus diacanthus*balığı fletolarına 2 ml sprey halinde püskürtülmüş, paketlenmiş ve 4 °C'de depolanmıştır. Bakteriyosinle muamele edilen örneklerin kontrol örneklerine göre muhafaza süresinin 7 gün uzadığı tespit edilmiştir. 14 günlük depolama süresince bozulmaya neden olan bakteri sayısında kontrol örneğine kıyasla 2,5 logaritmalık bir düşüş tespit edilmiştir.

Mitra ve diğ. (2010) tarafından yapılan çalışmada, nisin pastörize süt içerisine ilave edilmiş ve pastörizasyon sonucunda canlılığını koruyan ve bozulmaya neden olan bakterilerin tespit edilemez düzeylere kadar inhibe edilmiştir. Böylece pastörize sütün raf ömrü buzdolabı koşullarında 2 aya kadar uzatılabilmiştir. Dal Bello ve diğ. (2012)'nin yaptığı çalışmada İtalyan fermente gıdalarından izole edilen bakteriyosin üreticisi suşlar kullanılmıştır. Nisin A, nisin Z ve lactisin 481 üreticisi suşların süzme peynirlere starter kültür olarak ilave edilmesi sonucu *Listeria monocytogenes*ve diğer patojenbakterilerin gelişiminin başarılı bir şekilde kontrol altına alındığı bildirilmiştir.

Tarhana hamuru fermantasyonunda asitlik miktarının giderek artmasına rağmen, fermantasyonunun ilk zamanlarında *B. cereus* ve *S. aureus* gibi patojenlerin canlılıklarını sürdürebildiği bilinmektedir. Bu bakteriler tarhanaya, kullanılan hammadde kalitesine ve uygulanan işlem koşullarına bağlı olarak bulaşabilmektedir. Her ne kadar fermantasyonda biriken asitlik miktarına bağlı olarak son üründe büyük bir çoğunluğu canlılığını kaybedebiliyorsa da, ürettikleri toksinler insan sağlığını olumsuz etkileyebilmektedir.

*Bacillus cereus* yaygın bir toprak saprofiti olup fırsatçı patojen olarak artan bir öneme sahiptir. Gıdalarda intoksikasyon oluşturan *Bacillaceae* familyasının *Bacillus* genusuna ait aerobik, spor oluşturan bir bakteri olup toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Toprak kökenli olması nedeniyle tarla ve bahçe ürünlerine rahatlıkla bulaşabilmektedir. Gıdalla taşınan bir patojen olarak dikkate alınan *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi gıda zehirlenmesine neden olabilmektedir. Zehirlenme tehlikesini elimine etmek amacıyla kontamine olmuş gıdaya genellikle sıcaklık uygulaması etkili bir çözüm yöntemi değildir. Çünkü işlem sonrası canlılığını koruyan sporerler daha sonra çimlenebilmektedir. Özellikle bazı gıda ürünleri *B. cereus* kontaminasyonu açısından daha büyük risk taşımaktadır. Bunlar arasında, işlenmemiş tahıllar, nişastalı besin maddeleri, et ve süt ürünleri, kuru gıdalar ile baharatlar yer almaktadır (Elicevik ve diğ., 2008).

*Staphylococcus aureus*, insanlarda gıda kaynaklı hastalıkların en önemli etkenlerinden birisidir. *S. aureus* başta ısıl işlem olmak üzere mikroorganizmaların indirgenmesine yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek bir duyarlılık göstermesine rağmen, insanlarda hastalığa neden olan ve yüksek derecede ısı stabilitesi gösteren protein yapısında 5 tip toksin üretir. Bazı suşları yüksek konsantrasyonda tuza ve bazı antibiyotiklere de dirençlidirler. Ortam şartlarına dayanıklı olduklarından dolayı doğada çok yaygındırlar. Gıda zehirlenmelerine neden olan *S. aureus* 'un gıdaya bulaşmasındaki en önemli etkenin insan olduğu saptanmıştır. İnsanlar taşıyıcı olarak bu bakteriyi diğer insanlara ve gıdalara bulaştırırlar. Doğal olarak en fazla burun ve boğaz boşluğunda, insan ve hayvan dışkılarında, ciltte apseli yaralarda ve sivilcelerde yoğun olarak bulunurlar. Gıdalarda ve gıda işletmelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Gülbandılar, 2009).

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Mikroorganizmalar ve gelişme ortamları

Çalışmada kullanılan tarhana hamurundan izole edilmiş laktik asit bakterileri ve indikatör suşları Tablo 2.1.'de verilmiştir. Söz konusu tüm suşlar Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonundan (PUFECC) sağlanmıştır. Laktik asit bakterilerin geliştirilmesinde MRS-5C (10 g Tripton, 5 g Et Özütü, 5 g Maya özütü, 10 g Maltoz, 5 g Fruktoz, 5 g Glukoz, 5 g C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, 3 g Amonyum Klorür, 2,6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>, 0,05 g MnSO<sub>4</sub>, 0,5 g Cystein-HCl, 1 ml Tween 80, pH 5,8) (Meroth ve diğ. 2003), indikatör suşların geliştirilmesi için ise BHI, LB sıvı ve katı besiyeri ortamları kullanılmıştır. Suşlar %20 gliserol ilave edilerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 2.1 :Çalışmada kullanılan LAB ve indikatör bakteriler

Koleksiyon Adı	Mikroorganizma Adı	Özelliği
PFC69	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediosin üreticisi, tarhana izolatu
PFC77	<i>Lactococcus lactis</i>	Nisin üreticisi, tarhana izolatu
PSC1	<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB	İndikatör bakterisi
PSC16	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	İndikatör bakterisi
PSC18	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	İndikatör bakterisi
PSC19	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	İndikatör bakterisi
PSC22	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	İndikatör bakterisi
PSC23	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC14028	İndikatör bakterisi
PSC25	<i>Enterobacter coloea</i> ATCC23355	İndikatör bakterisi
PSC26	<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	İndikatör bakterisi
PSC31	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	İndikatör bakterisi
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Metisillin dirençli indikatör
VRE	<i>Enterococcus faecium</i>	Vankomisin dirençli indikatör

## **2.2 Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesi**

Antimikrobiyal aktiviteye sahip suşların bakteriyosin üretim yeteneklerinin tanımlanması amacı ile agar noktalama ve kuyu difüzyon testleri uygulanmıştır. Test edilecek laktik asit bakteri suşları 30°C’de 18 saat geliştirildikten sonra, MRS agar plaklarına sürme ekim yapılmış ve aynı koşullarda bir gece daha inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda gelişen kolonilerden steril kürdan aracılığıyla MRS agar ortamına, bir petride 3 farklı suş olacak şekilde nokta ekim yapılmış ve 30 °C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. MRS, LB ve BHI sıvı ortamlarında geliştirilen indikatör bakteriler; % 0.7 oranında agar içeren 5 ml yumuşak agar (MRS, LB ve BHI) ortamlarına inoküle edilerek, noktalama ekim yapılan MRS agar plaklarının üzerine ikinci tabaka halinde dökülmüş ve homojen bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra bu ortamlar indikatör bakterilerin gelişimi için uygun sıcaklıkta 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, suşların indikatör bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir (van Belkum ve diğ. 1989). Antimikrobiyal aktiviteye sahip suşların bakteriyosin üretim özelliğinin kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmesi için 30°C’de 18 saat geliştirilen kültürler, 6000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj (Hettich Universal 30 RF) işlemine tabi tutulmuştur. Üst sıvı, çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek yeni tüplere aktarılmış 6N NaOH kullanılarak pH 6'ya ayarlanmış ve bu ortamlar 0.45 µm por çaplı membran filtreden (Millex-Millipore) geçirilerek sterilize edilmiştir. MRS, LB ve BHI sıvı ortamlarında geliştirilen indikatör bakteriler, % 0.7 oranında agar içeren 5 ml yumuşak agar (MRS, LB ve BHI) ortamlarına inoküle edilerek MRS agar plaklarının üzerine ikinci bir tabaka halinde, homojen şekilde yayılmıştır. MRS agar plakları üzerinde steril bir şekilde 6 mm çapında kuyucuklar açılarak bakteri üst sıvıları kuyucuklara 100 µL aktarılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda kuyucukların etrafında inhibisyon zonu oluşumu incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Tagg ve McGiven 1971).

## **2.3 Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi**

Bakteriyosin üreticisi laktik asit bakteri suşlarında üretilen bakteriyosinlerin ileri düzeyde tanımlanmaları; farklı enzim, pH ve sıcaklık uygulamalarına karşı davranışları esas alınarak yapılmıştır.



30°C’de 18 saat geliştirilen bakteri kültürleri, 6000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiş ve kültür üst sıvılarının pH’ları 6N NaOH veya 6N HCl kullanılarak 2.0-11.0 değerleri arasına ayarlanmıştır. pH’ları ayarlanan kültür üst sıvıları 0,45 µm por çaplı membran filtrelerden (Millex-Millipore) geçirilerek sterilize edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ortamlar +4 °C’de 24 saat bekletilmiştir. pH değişimlerinin bakteriyosinlerin inhibisyon düzeyleri üzerindeki etkisi, membran filtreden geçirildikten sonra hiçbir işleme tabi tutulmayan kültür üst sıvılarının inhibisyon etkilerinin, pH düzeyleri ayarlanan kültür üst sıvılarının inhibisyon etkileri ile karşılaştırılması sonucu tanımlanmıştır. Değişik pH düzeylerinde bakteriyosin aktivitelerindeki değişmeler, duyarlı indikatör bakterilere karşı kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bakteriyosin aktiviteleri, inhibisyon zonu alınan en yüksek dilüsyon oranının, 1000/aktarılan miktar ile çarpımından elde edilen Arbitrary Unite (AU) cinsinden hesaplanmıştır (Franz ve diğ. 1997).

Nötralize edilmiş kültür üst sıvılarında bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi, söz konusu ortamların 80, 90, 100 °C’de 5, 10, 15 dakika su banyosunda (Mermert) ve 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda (Hirayama HV-50L) sıcaklığa tabi tutulmasından sonra, bu ortamlardan alınan örneklerin duyarlı indikatör bakterilere karşı denenmesi suretiyle belirlenmiştir. Kontrol olarak sıcaklık uygulanmamış kültür üst sıvıları kullanılmıştır. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi, kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Franz ve diğ. 1997).

Bakteriyosin aktivitesi üzerine değişik enzimlerin etkisi, pH ve sıcaklığın etkisinin belirlendiği testlerde olduğu gibi, kültür üst sıvıları kullanılarak tanımlanmıştır. Nötralize edilmiş kültür üst sıvılarına, son enzim konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde tripsin (pH 7.0 Merck, Germany), α-kemotripsin (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), proteinaz K (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), pepsin (pH 3.0 Sigma Chem. Co., USA), α-amilaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), lipaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), katalaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA) ve lizozim (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA) enzimleri ilave edilerek, 30°C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktiviteleri, 100 °C’de 5 dakika ısı uygulaması ile sonlandırılmıştır. Bakteriyosin aktiviteleri, kritik dilüsyon yöntemi esas alınarak belirlenmiştir (Franz ve diğ. 1997).

## **2.4 Bakteriyosinlerin saflaştırılması**

Bakteriyosin üreticisi kültürlerden, 500 mL MRS sıvı ortamına % 1 oranında ekim yapılmış ve 37 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kültürler 9000 devirde 30 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek kültür üst sıvısı steril bir erlen içerisinde toplanmıştır. Bu kültür üst sıvısının 50 ml’sine son konsantrasyonu % 40-80 arasında olacak şekilde amonyum sülfat ilavesi yapılmış ve bakteriyosinin çökmesini sağlayan optimum amonyum sülfat konsantrasyonu belirlenmiştir. Takiben en verimli amonyum sülfat konsantrasyonu kültür üst sıvısına ilave edilerek + 4°C’de bir gece karıştırılmıştır(WiseShake SHO-1D). Bu sürenin sonunda örnekler + 4°C’de 14000 devirde bir saat süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitiminde üst faz dökülmüş ve çökelti 0.005 M sodyum fosfat (pH 6.0) tamponu içerisinde çözülmüştür. (Moreno ve diğ. 2003). Bu çözelti daha sonra Strata C18-E SPE (5g, 20 ml) kolondan geçirilmiştir. Öncelikle söz konusu kolonlar % 30 etanol ile iyice yıkanmış ardından bakteriyosin içeren çözelti kolona yüklenmiştir. Bakteriyosinler kolondan % 70 izopropanol ve % 0,1 TFA ile geri kazanılmıştır (Mills ve diğ. 2011). İzopropanol rotari evaporatör (BUCHİ Rotavapor R-114) ile uzaklaştırılmış ve geri kazanılan bakteriyosin ters faz HPLC sisteminde (Shimadzu LC-20AD, Japonya) ileri düzeyde saflaştırılmıştır. Bu sistemde bakteriyosin çözeltisi HPLC üzerinde takılı olan C18 (Nükleosil, Supelco) kolonundan gradient koşullarda geçirilmiştir. Sistemde mobil faz olarak % 0,1 TFA içeren ultra saf su (Solvent A) ve % 0,1 TFA içeren % 60 Asetonitril (Solvent B) kullanılmıştır. HPLC sisteminde 1 ml akış hızı ve 0-5. dk % 70 A, % 30 B, 5-40. dk % 30 A, % 70 B, 40-50. dk % 100 B, 50-60. dk % 100 A programı uygulanmıştır. Dedektörde okuma 220 nm dalgaboyunda gerçekleştirilmiştir (Simha ve diğ. 2012).

## **2.5 Bakteriyosinlerin moleküler büyüklüğünün tespiti**

Laktik asit bakterilerinin kültür üst sıvısından kısmen saflaştırılan bakteriyosinlerin moleküler büyüklükleri, trisin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforez (Trisin-SDS-PAGE) sistemi kullanılarak belirlenmiştir (Schagger ve von Jagow 1987).

Trisin-SDS-PAGE uygulamasında, Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Dikey jel elektroforez sisteminde, 10x8 cm ve 10x7.5 cm ebatlarındaki cam plakalar % 70'lik etanol çözeltisi ile yıkanıp kurutulduktan sonra, Bio-Rad jel hazırlama sistemine yerleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra jel tarağının 1 cm altına kadar gelecek şekilde % 12'lik ayırıcı jel dökülmüştür. Üzerine yaklaşık 1 mL destile su ilave edilen ayırıcı jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklenmiş ve ortamdaki su filtre kağıdı ile alınmıştır. Plakanın kalan kısmına yığma jel dökülerek tamamlanmış ve tarak yerleştirilmiştir. Yığma jelin polimerizasyonu için 20 dk kadar beklendikten sonra sırasıyla plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiş, elektrot tamponu ilave edilmiş ve tarak çıkarılmıştır. Hazırlanan örnekler jel kuyucuklarına mikropipet aracılığıyla 15 µL olacak şekilde doldurulmuştur. Jel sistemine; yığma jeldeki göç için 75 V, ayırıcı jelde göç için ise 100 V akım uygulanmıştır. Yaklaşık 2 saat ayırıcı jelde yürütülen örnekler jelin son kısmına ulaştığında sistem durdurulmuştur. Sistemden çıkarılan jel, boyama çözeltisinde 45 dk, ardından boya giderme çözeltisinde 45 dk tutulmuştur. Beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek alınan jel fotoğraflarında proteinlerin moleküler büyüklükleri, marker proteinlerin (Thermo) bağıl hareketlilik (Rf) değerleri ve moleküler büyüklüklerinin logaritmalarından yararlanılarak çizilen standart eğri kullanılmak suretiyle belirlenmiştir. Sistemin hazırlanmasında ve yürütülmesinde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

#### **Ayırıcı Jel**

Akrilamit (% 30) / bisakrilamit (% 8) (Sigma)	6 mL
4xTris-Cl / SDS (pH 8.8)	3.75 mL
Steril destile su	5.25 mL
% 10 Amonyum persülfat	50 µL
TEMED (N'N'N'N'-Tetra-Metilendiamin)	10 µL

#### **Yığma Jel**

Akrilamit (% 30) / bisakrilamit (% 8) (Sigma)	0.65 mL
4xTris-Cl / SDS (pH 6.8)	1.25 mL
Steril destile su	3.05 mL
% 10 Amonyum persülfat	25 µL
TEMED	5 µL

Dökmeden önce her iki jele, % 10 amonyum persülfat ve TEMED ilave edilmiştir.

**4xTris-Cl / SDS (pH 8.8)**

Tris	91 g
Destile su	300 mL

pH 8.8 (1N HCl ile)

Destile su ile toplam hacim 500 mL'ye tamamlanmış ve 2 g SDS ilave edilip çözülmüştür.

**4xTris-Cl / SDS (pH 6.8)**

Tris	6.05 g
Destile su	40 mL

pH 6.8 (1N HCl ile)

Destile su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmış ve 0.4 g SDS ilave edilip çözülmüştür.

**Amonyum Persülfat (% 10)**

Amonyum Persülfat	0.1 g
Destile su	1 mL

**Tris-Glisin Tamponu (5x)**

Tris	15.0 g
Glisin	94 g
SDS (% 10)	50 mL

Bu karışım 700 mL destile su içerisinde çözülmüş ve toplam hacim destile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

**Boyama Çözeltisi**

Commasie Brilliant Blue	1 g
Metanol	400 mL
Glasiyel Asetik Asit	100 mL
Destile su	500 mL

## **Boya Giderme Çözeltisi**

Metanol	400 mL
Glasiyel asetikasit	100 mL
Destile su	500 mL

## **2.6 Bakteriyosin üreticisi suşların genomu bakteriyosin üretimiyle ilişkili temel genlerin varlığının araştırılması ve DNA dizi analizi**

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanımlanması; üretimle ilişkili temel genler araştırılarak ve de dizi analizi ve homolojisi belirlenerek yapılmıştır. Öncelikle DNA izolasyon kiti (Invitrogen) kullanılarak üretici hücrelerin genomik DNA'sı izole edilmiştir. Takiben Tablo 2.2 de yer alan referans genler üzerinden hazırlanan primerler kullanılarak PZR aracılığıyla ilişkili genlere ait kısa bölgeler çoğaltılmıştır (Macvana ve Muriana, 2012). PZR, toplam 40 µL hacimde, 4 µL master mix (5\*FIREPol<sup>R</sup> Master mix, SOLIS/Bio Dyne), 1 µL primer ve 2 µL genomik DNA'dan kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR'unda 95°C'de 5 dk ön denetürasyon, 30 çevrim 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 dk ve 72°C'de 10 dk son uzama süre ve sıcaklık kombinasyonundan oluşan program kullanılmıştır. PZR ile çoğaltılan fragmentler agaroz jel elektroforez sisteminde (Thermo) %1 agaroz (Sigma) ve 100 baz marker (Fermentas) kullanılarak 100 V'da 30 dk yürütülmüştür. Jel üzerinde DNA fragmentleri jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat) kullanılarak izlenmiştir.

Agaroz jel üzerinde doğru büyüklükteki fragmentlerin tespiti ve saflık kontrolü yapıldıktan sonra, PZR ürünleri, PZR saflaştırma kiti (Fermentas) kullanılarak temizlenmiş ve DNA dizi analizine gönderilmiştir. Çoğaltılan fragmentlerin DNA dizi analizi REFGEN Biyoteknoloji ve Gen Araştırmaları firması (Teknokent, Ankara) tarafından yeni nesil sekanslama sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bakteriyosin üretimi ile ilişkili temel genlerin DNA dizileri EMBL ([www.ebi.ac.uk/EMBL](http://www.ebi.ac.uk/EMBL); Hinxton, UK) veri tabanında taranmış ve veri tabanında kayıtlı olan referans genler ile benzerliği tespit edilmiştir.

Tablo 2.2 : Çalışmada kullanılan bakteriyosinlerin genlerine ait özgül primerler  
(Macwana ve Muriana. 2012)

Kod	Organizma	Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Büyükük kb
1	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	lclA	aaaccaagtctctcgattggc	ggcacgttgatctcttacct	200
2	<i>Lactococcus lactis</i>	Ltn A	ccagttacatggttgaagaag	tttacaccaagccatacattca	150
3	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	lcnB	agttaatggaggaagcttgacag	tagtggaaatgttttcccctac	156
4	<i>Lactococcus lactis</i>	LtnB	caattgggaaaaatcttgaaaga	caagcagctgtacattttgtgt	152
5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	LacA	agtgtattcaaaattctggcg	taatccaacctccggaataaga	217
6	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	IcpJ	tggaccttttttaggtgcaaaa	gagcagcaagtaatacaaaagtcc	100
7	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	papA	ttactgtggcaaacattctg	tgattacctgatgtccaccag	106
8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	ped A	ctgccgaagaaaacaaagtct	ctattggctaggccacgtattg	110
9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	plnc8A	ctagaaaagatctctggcggtg	catatgggtgctttaaattcca	100
10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	plnc8B	ggcaagagtagctgtctcaaa	caatcgttttgcgatgattat	106
11	<i>Lactobacillus curvatus</i>	cur A	acagaattacaacaattaccggc	cattccagctaaaccactagcc	150
12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	plaA	aaaaattaactgaaaagaaatggc	acttccatgaccgaagttagc	150
13	<i>Lactobacillus sakei</i>	sakA	acagaattacaacaattaccggc	cattccagctaaaccactagcc	150
14	<i>Lactobacillus salivarius</i>	abp118 $\alpha$	agttagcaaaaggttgatggtg	aacaagtaagtgtccgcctac	156
15	<i>Lactobacillus salivarius</i>	abp118 $\beta$	aatggtgtaaaaatggttatgg	ttaacggcaactgtgaaacca	150
16	<i>Lactobacillus plantarum C11</i>	pln A	agcaacttagtaataaggaatgcaaa	acagttcttacctgttaattgcag	102
17	<i>Lactobacillus plantarum TMW1.25</i>	pln B	tagcattgattgatggagaaa	gcatgccgtgtaagtgttaga	176
18	<i>Lactococcus lactis</i>	NisZ	atgagtacaaaagatttaactgg	ttattgtctacgtgaactactaca	174
19	<i>Lactobacillus gasseri ATCC33323</i>	helveticin	atgattgaaaagaactcaatac	aataaaggcaatcaccagtactt	919
20	<i>Lactobacillus brevis</i>	breB	atggagaaatccagctgttatc	tgattattaggcagctaattgca	217
21	<i>Lactobacillus brevis</i>	breC	atgtataagaattaacagttgatgaatt	gtgcatgccgtgtaagtgt	207
22	<i>Lactobacillus curvatus K12-3</i>	curvacin A	atgaataatgtaaaagaattaagtgaca	tccagctaaaccactagccc	174

## 2.7 Tarhana hamurunun hazırlanması

Tarhana üretimi Tablo 2.3'de verilen bileşenler ve miktarları kullanılarak hazırlanmıştır. Kırmızıbiber, yeşilbiber ve soğan yıkanıp temizlendikten sonra küçük parçalar halinde doğranmış ve parçalayıcıda (Arzum Prokit 444)

parçalanmıştır.Kırmızıbiber, yeşilbiber, soğan, nane ve yoğurt karıştırılarak tarhana ezesi hazırlanmış, bu karışım bir gece buzdolabı koşullarında bekletilmiştir. Ertesi gün söz konusu karışım buğday unu (Tip 550)ile karıştırılmış,orta sertlikte hamur haline getirilinceye kadar hamur spiral mikserde (Günsa) yoğrulmuştur. Çalışma kapsamında denenen bakteriyosin üreticileri ve indiktor suşlar hamur hazırlama aşamasında inoküle edilmiştir.Hazırlanan tarhana hamuru kontaminasyona maruz vermeyecek şekilde steril kapalı kaplara konulmuş ve 24 °C sıcaklıkta 21 gün fermantasyona bırakılmıştır. Kimyasal ve mikrobiyolojik analizler için fermantasyonun 0., 1., 3., 5., 10., 15. ve21. günlerinde örnek alımı yapılmıştır.

Tablo 2.3 : Tarhana üretiminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktarları (%)
Buğday Unu	29,55
Kırmızı Biber	24,63
Yoğurt	19,70
Soğan	14,77
Yeşil Biber	9,85
Tuz	0,98
Nane	0,49

Çalışmada *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının *B. cereus* ATCC11778 ve *S. aureus* ATCC29213 indikatör suşlarına karşı antagonistik etkisinin izlenmesi için kontrol grubu dahil toplam 7 farklı tarhana hamuru örneği hazırlanmıştır.Yukarıda ifade edilen amaç doğrultusunda çalışmada kullanılan deneme deseni ve kodlaması Tablo 2.4’de verilmiştir.

Tablo 2.4 :Hazırlanan tarhana hamurlarının isimlendirilmeleri ve bakteri içerikleri

Hamur	İnoküle Edilen Mikroorganizmalar ve Miktarları
<b>A hamuru</b>	Mikroorganizma inokulasyonu yapılmadı.
<b>B hamuru</b>	$10^4$ kob/g <i>B. cereus</i> ATCC11778
<b>BP hamuru</b>	$10^4$ kob/g <i>B. cereus</i> ATCC11778 $10^6$ kob/g <i>P. acidilactici</i> PFC69
<b>BL hamuru</b>	$10^4$ kob/g <i>B. cereus</i> ATCC11778 $10^6$ kob/g <i>L. lactis</i> PFC77
<b>S hamuru</b>	$10^4$ kob/g <i>S. aureus</i> ATCC29213
<b>SP hamuru</b>	$10^4$ kob/g <i>S. aureus</i> ATCC29213 $10^6$ kob/g <i>P. acidilactici</i> PFC69
<b>SL hamuru</b>	$10^4$ kob/g <i>S. aureus</i> ATCC29213 $10^6$ kob/g <i>L. lactis</i> PFC77

## 2.8 Tarhana hamuru fermantasyonunda mikrobiyolojik analizler

Örneklerdeki mikrobiyolojik sayımların yapılması amacıyla fermantasyonun 0, 1, 3, 5, 10, 15 ve 21.günlerinde alınan 10 g tarhana hamuru örneğine 90 ml peptonlu su ilave edilmiş ve stomacherde (Seward Medical, London, UK) 1,5 dk homojenize edildikten sonra seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Takiben, bu dilüsyonlar kullanılarak, % 0,01 sikloheksimid içeren MRS-5C agar petrilinde LAB sayımı (Meroth ve diğ., 2003), Plate Count Agar (PCA) ortamında da Toplam Aerobik Mezofil Bakteri (TAMB) sayımı 30 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda tespit edilmiştir. Tarhana hamurundaki maya ve küf sayımı ise Dichloran Rose Bengal Chlortetracycline Agarda (DRBC agar) 28-30 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda belirlenmiştir. *S. aureus* sayımı ise Baird Parker Agar (BPA agar) ortamında 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda tespit edilmiştir. *Bacillus cereus* sayımı için uygun dilüsyonlardan steril petrilere 1 ml aktarılmış ve üzerine 45°C'ye kadar soğutulmuş ve Chromogenic *Bacillus cereus* Supplement (Oxoid) ilavesi yapılan Chromogenic *Bacillus cereus* agar (Oxoid) dökülerek karıştırılmıştır. Petri plakları 30°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra Chromogenic *Bacillus cereus* agar



üzerinde gelişen mavi-yeşil kolonilerin sayımı yapılmıştır (Anonim, 2000; Anonim, 2007). Tüm mikrobiyolojik sayımlar iki tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

## **2.9 Tarhana hamuru fermentasyonunda kimyasal analizler**

Tarhana hamurlarının asitlik derecesi tayini hazırlandığı gün ve fermentasyon periyodu boyunca TS 2282'ye göre yapılmış ve 10 g tarhanadaki serbest asitleri nötralize etmek için kullanılan 0.1 N NaOH'ın hacmi (ml) "asitlik sayısı" olarak ifade edilmiştir. pH tayini İbanoğlu ve diğ.(1999) tarafından verildiği şekilde yapılmıştır. Tarhana hamurlarının su aktivitesi değerleri TESTO marka (ABD) cihaz kullanılarak okunmuştur. Tüm kimyasal analizler ikinci defa tekrarlanmıştır.

## **2.10 Tarhana hamuru fermentasyonunda mikrobiyal floranınve bakteriyosin üreticisi *L. lactis* PFC77 ve *P.acidilactici* PFC69 suşlarının izlenmesi**

Tarhana hamuruna inoküle edilen bakteriyosin üreticisi *L. lactis* PFC77 ve *P.acidilactici* PFC69 suşları ile patojen mikroorganizmalar olan *B. cereus* ATCC11778 ve *S. aureus* ATCC29213 suşlarının fermentasyon sürecindeki değişiminin izlenmesi amacıyla kültürden bağımsız PZR-DGGE yönteminden faydalanılmıştır (Miambi ve diğ., 2003; Van der Meulen ve diğ., 2007; Lacumin ve diğ., 2009; Oguntoyinbo ve Dodd, 2010; Tu ve diğ., 2010). Bu yöntemde fermentasyonun 0, 1, 3, 5, 10, 15 ve 21. günlerde toplanan hamurlardan kazanılan bakteriyal genomik DNA kullanılmıştır.

### **2.10.1 Tarhana hamurundan bakteriyal genomik DNA'nın izolasyonu**

Hamurdan bakteri genomik DNA izolasyonu Picther ve diğ. (1989) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Yönteme göre 10 g tarhana örneği 90 ml peptonlu fizyolojik suda iyice homojenize edilmiş, takiben bu homjenizattan 50 ml alınarak 1000 devirde 5 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant başka bir tüpe alınmış ve 5000 devirde 15 dk santrifüj işlemi uygulanarak üst faz uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan hücre pelletleri yıkanarak ileri çalışmalar için -20 °C'de muhafaza edilmiştir. DNA ekstraksiyonunda LAB'lerinin hücre duvarının parçalanması için 50 mg/mL lizozim kullanılmıştır. Bakteri genomik DNA ekstrasyonu için, DNA izolasyon kiti (Invitrogen) kullanılmıştır.

### 2.10.2 PZR-DGGE analizi

PZR-DGGE analizinde, LAB'lerin izlenmesi için %25-50 aralığında üre-formamid gradiyentine sahip poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Bu oranlarda poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve 100 ml için miktarları aşağıdaki Tablo 2.5'de verilmiştir.

Tablo 2.5 : Denatüre gradiyent jelin hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve oranları

Materyal	Denatüre Çözeltinin Bileşimi	
	%25	%50
%40 Akrlamid/Bis (37.5:1) (ml)	20	20
50*TAE Tampon (ml)	2	2
Formadid (ml)	10	20
Üre (g)	10,5	21
Steril Saf Su (ml)	57,5	37
Toplam Hacim (ml)	100	100

Tablo 2.4'de belirtilen bileşenler kullanılarak 100ml olarak hazırlanan çözeltinin jelleşmesi için çözeltiliye 0,1g/ml'lik Amonyum Persülfat'dan (APS) 815 µl ve diğer jelleşme ajanı olan TEMED'den de 63 µl ilave edilmiş ve hızlı hareket edilerek gradiyent karıştırıcı sisteminin (Bio Rad Gradient Former) haznesine konulmuştur. Hızlı bir şekilde hazırlanan gradiyent poliakrilamid jel +4°C'de bir gece bekletildikten sonra elektroforez sisteminde kullanılmıştır.

PZR-DGGE analizi, laktik asit bakterilerine ait ribozomun V3 bölgesindeki nükleotit farklılıkları ile suşların ayrılmasını ve takip edilmesini sağlamaktadır. Bu amaçla bakteri hücrelerin ribozomal bölgesine özgül F338 ön primeri (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 3' terminaline GC DNA kıskacı (5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGG CACGGGG-3') takılarak ve 518R geri yöndeki primer (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') ile birlikte kullanılmıştır (Van der Meulen ve diğ., 2007; Tu ve diğ., 2010).

PZR karışımı için master mix'den (5\*FIREPol<sup>R</sup> Master Mix/ SOLIS Bio Dyne) 8 µl, primerlerden 1 µl, DNA'dan 2µl eklenerek toplam hacim 40 µl olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Uygulanan PZR programı için 95 °C 5

dk ön denatürasyon, 30 çevrim 95 °C 30 sn, 55 °C 45 sn, 72 °C 1 dk ve son olarak 72 °C 10 dk; ve son olarak 72 °C 7 dk sıcaklık ve süre kombinasyonları uygulanmıştır. PZR ürünleri için %25-50 denaturant (7M üre ve %40 formadit) içeren poliakrilamid jel (%8) elektroforezde, 15 dk 50 V, 4 saat 150 V akımda, 1\*TAE ortamında ve 60 °C sabit sıcaklıkta yürütülmüştür. Jeller son aşamada Ethidyum Bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir. Jel üzerindeki bantların değerlendirilmesi aynı jel üzerindeki referans suşların verdiği bantlarla karşılaştırılarak yapılmıştır. (Miambi ve diğ., 2003; Van der Meulen ve diğ., 2007; Lacumin ve diğ., 2009; Oguntoyinbo ve Dodd, 2010; Tu ve diğ., 2010).

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının antimikrobiyal etki spektrumu

Çalışmada kullanılan *L. lactis* PFC77 ve *P. acidilactici* PFC69 suşlarının indikatör mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi Tablo 3.1’de verilmiştir. Agar üzerinde *L. lactis* PFC77; *M. luteus* NCIMB, *L. monocytogenes* ATCC7644 ve *B. cereus* ATCC11778 suşlarına yüksek seviyede, *S. aureus* ATCC29213, *S. aureus* ATCC25923 ve *E. fecalis* ATCC19633 suşlarına orta düzeyde antimikrobiyal etki göstermiştir. *P. acidilactici* PFC69 ise; *M. luteus* NCIMB, *L. monocytogenes* ATCC7644, *S. aureus* ATCC25923, *E. fecalis* ATCC19633 ve *S. Typhimurium* ATCC14028 suşlarına yüksek, *S. aureus* ATCC29213, *E. coli* ATCC25922 suşlarına orta, *B. cereus* ATCC11778 suşlarına düşük seviyede antimikrobiyal etkili bulunmuştur(Şekil 3.1 ve 3.2). Her iki hücrenin kültür üst sıvılarının kullanılması durumunda; *L. lactis* PFC77’nin *M. luteus* NCIMB ve *L. monocytogenes* ATCC7644 suşlarına karşı yüksek, *E. fecalis* ATCC19433 suşuna orta, *S. aureus* ATCC29213, *S. aureus* ATCC25923 ve *B. cereus* ATCC11778 suşlarına düşük seviyede antimikrobiyal etkili olduğu, *P. acidilactici* PFC69’un *M. luteus* NCIMB, *L. monocytogenes* ATCC7644 ve *E. fecalis* ATCC19433 suşlarına karşı yüksek, *S. aureus* ATCC29213 suşuna ise düşük seviyede antimikrobiyal etkisi tespit edilmiştir(Şekil 3.3). Bunlara ilaveten, *P. acidilactici* PFC69’un kullanılan 50 vankomisin dirençli *E. faecium* izolatını hem agar üzerinde hem de kültür üst sıvısı ile yüksek düzeyde inhibe edebildiği belirlenmiştir.

Farklı kaynaklardan izole edilen LAB’lerin ürettikleri çeşitli metabolitler (laktik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diasetil ve bakteriyosin) nedeniyle çeşitli seviyelerde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları birçok çalışma ile gösterilmiştir (Delves-Broughton ve diğ. 1996; de Vuyst ve Leroy, 2007). Ancak bu familya üyesi suşlarda antimikrobiyal etkinliği ayıran en temel metabolit bakteriyosinlerdir (Cintas ve diğ. 2001; Chen ve Hoover 2003; Hassan ve diğ. 2012) . Dolayısıyla bugüne kadar yapılan çalışmalarda laktik asit bakterileri tarafından üretilen birçok bakteriyosin ve üreticisi rapor edilmektedir. LAB’lerinin üyeleri arasında *Lactococcus* ve *Pediococcus* cinsin türleri en fazla üreticiler olarak dikkati çekmektedir. Özellikle bu cinse ait bazı türler arasında en çok bilinen nisin ve pediosin üreticileri yer almaktadır (Drider ve diğ. 2006; de Vuyst

ve Leroy 2007; Takala ve Saris 2007; Papagianni ve Anastasiadou 2009; Hassan ve diğ.2012).

Tablo 3.1 :*P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının antimikrobiyal etkisi

İndikatör suşlar	<i>P. acidilactici</i> PFC69		<i>L. lactis</i> PFC77	
	Agar noktalama	Kuyu difüzyon	Agar noktalama	Kuyu difüzyon
<i>M. luteus</i> NCIMB	+++	+++	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> ATCC29213	++	+	++	+
<i>S. aureus</i> ATCC25923	+++	-	++	+
<i>E. coli</i> ATCC25922	++	-	-	-
<i>S. typhimirium</i> ATCC14028	+++	-	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC11778	+	-	++	+
<i>E. fecalis</i> ATCC19433	+++	+++	++	++
VRE*	50/50	48/50	8/50	0/50
MRSA*	5/50	0/50	2/50	0/50

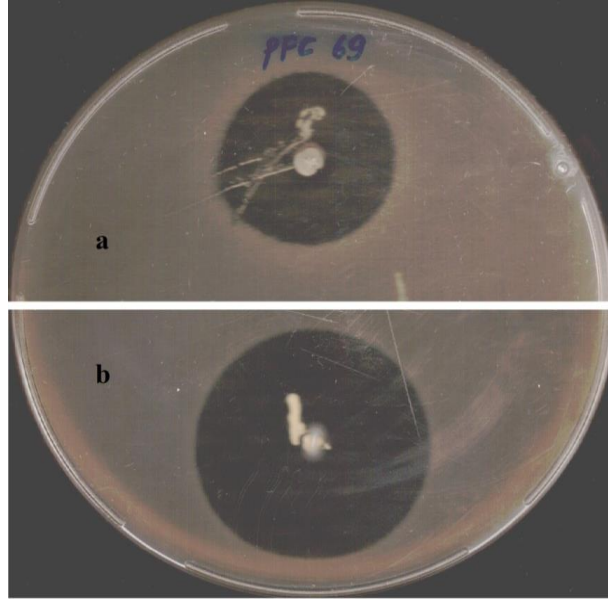
**Antimikrobiyal zon çapları:** - = < 1mm (etkisiz) + = 1-5 mm (düşük etkili)  
++ = 5-10 mm (orta etkili) +++ = > 15 mm (yüksek etkili)

\* : 50 adet ayrı Vankomisin Dirençli *E. faecium* (VRE) ve Metisillin Dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları kullanılmıştır. İnhibe edilmiş izolat/toplam kullanılan izolat

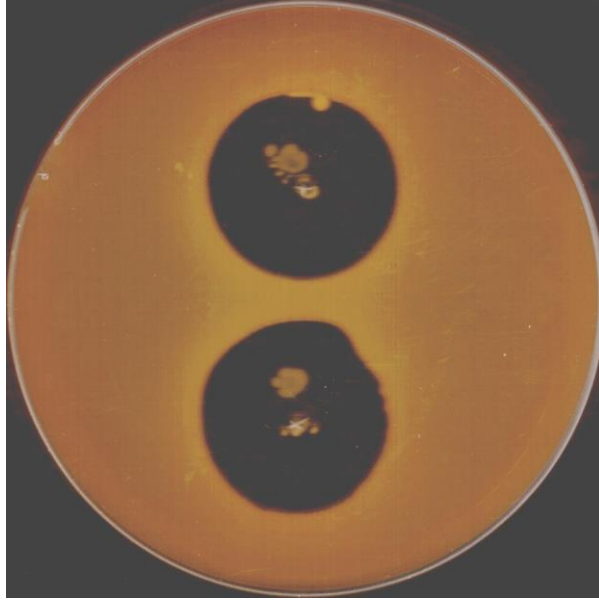
Çalışmada kullanılan her iki suşun agar üzerinde kültür üst sıvılarına kıyasla daha yüksek etkili oldukları belirlenmiştir. Bu durum birçok çalışmada da benzer olduğu gibi agar üzerinde laktik asit ve diğer metabolitlerin de katkısının olmasından ileri gelmektedir(Delves-Broughton ve diğ. 1996; de Vuyst ve Leroy, 2007). Ancak kültür üst sıvısındaki antimikrobiyal etki genellikle bakteriyosinlerin varlığına işaret etmektedir.

LAB'leri ürettikleri metabolitleri dolayısıyla farklı seviyelerde ve spekturma sahip antimikrobiyal etki göstermektedir. Çalışmamızda da her iki laktik suşun Gram

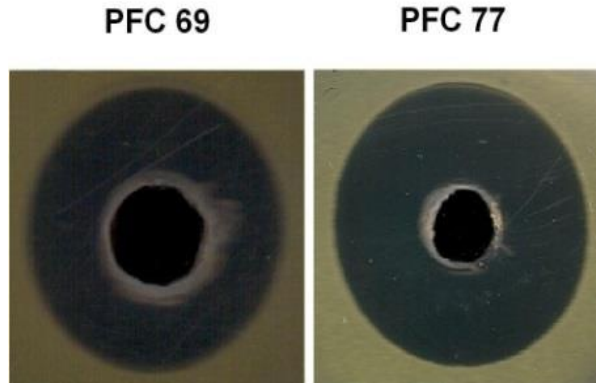
negatif bakteriler (*E. coli* ATCC25922 ve *S. Typhimirium* ATCC14028) üzerinde antimikrobiyal etkisi gözlenmemiştir. Bu durum laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Çünkü LAB bakteriyosinlerinin çoğunlukla Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili oldukları bilinmektedir (Chen ve Hoover 2003; de Vuyst ve Leroy 2007; Hassan ve diğ. 2012). Diğer taraftan, laktik suşlarda üretilen bakteriyosinlerin çeşitliliğine bağlı olarak antimikrobiyal spektrumu farklılık göstermektedir. Bu durum özellikle bakteriyosinlerin etki mekanizmasına bağlı olarak suş spesifik özellik göstermesinden kaynaklanmaktadır (Dobson ve diğ. 2012)



Şekil 3.1 : *P. acidilactici* PFC69 suşunun *S. aureus* ATCC29213 suşuna karşı antimikrobiyal etkisi (a), *L. lactis* PFC77 suşunun *S. aureus* ATCC29213 suşuna karşı antimikrobiyal etkisi (b)



Şekil 3.2 :*L. lactis* PFC77 suşunun *B. cereus* ATCC11778 suşuna karşı antimikrobiyal etkisi



Şekil 3.3 : *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının kültür üst sıvılarının *M. luteus*'a karşı inhibisyon zonları

Söz konusu çalışmada PFC69 ve PFC77 suşlarının kültür üst sıvılarının antimikrobiyal etkiye sahip bulunmasından dolayı, bu sıvılar içerisindeki antimikrobiyal bileşimin aktivitesi kritik dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir (Tablo 3.2). Buna göre antimikrobiyal aktivite testleri ile paralel bir şekilde PFC77 ve PFC69 suşlarının kültür üst sıvılarının 12800 AU/mL antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu suşların antimikrobiyal aktivite değerleriliteratür verileri ile kıyaslandığında oldukça iyi üreticiler oldukları öne sürülebilir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda 2400 ile 25600 AU/mL aktivite arasında üretim

yapabilen pediosin üreticilerinin bulunduğu rapor edilmiştir (Anastasiadou ve diğ. 2008; Shin ve diğ. 2008; Mandal ve diğ. 2011; Devi ve Halami 2011). Diğer yandan, yine yapılan çalışmalar neticesinde fermente süt ürünleri (Mitra ve diğ. 2005) geleneksel fermente sebze (Olasupo ve diğ. 1999), fermente et ürünleri (Choi ve diğ. 2000), nehir suyu (Zendo ve diğ. 2003) ve anne sütü (Beasley ve Saris 2004) gibi çeşitli kaynaklardan izole edilen *L. lactis* suşlarının farklı seviyelerde nisin üretebildikleri belirlenmiştir. Bu literatür verileriyle kıyaslama yapıldığında her iki suşunda yüksek üreticiler arasında yer alabileceği ifade edilebilir.

Tablo 3.2 :*P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının kültür üst sıvısında ölçülen antimikrobiyal aktivite(AU/ml)

Laktik Suş	Antimikrobiyal Aktivite (AU/ml)
PFC69	12800
PFC77	12800

### 3.2 Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi

Çalışma dahilinde kullanılan laktik suşlar tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitelerinin farklı pH koşullarındaki davranışı Tablo 3.3'de verilmiştir. Buna göre üretilen bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesinin pH'nın düşüşü ile birlikte arttığı gözlenmiştir. Aksine ortam pH'sının alkali değerlere çıkarılması durumunda ise, söz konusu antimikrobiyal aktivite hızla azalmıştır. Bu sonuçlar PFC69 ve PFC77 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin asidik koşullarda çözünürlüğünün ve stabilitesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, nisin, pediosin ve plantarasin gibi LAB'lerinin üyeleri tarafından üretildiği sıklıkla rapor edilen bakteriyosinlerin de aktivite ve stabilitelerinin asidik pH koşullarında yüksek olduğu birçok kez rapor edilmiştir (Parente ve Ricciardi 1999; O'Sullivan ve diğ. 2002; Twomey ve diğ. 2002; Beasley ve Saris 2004; Jozala ve diğ. 2005). Bakteriyosinlerde görülen bu davranışın özellikle asidik koşullardaki yüksek çözünürlüğünden kaynaklandığı belirtilmektedir (Takala ve Saris 2007).



Tablo 3.3 :*P. acidilactici* PFC69 ve *L. lacits* PFC77 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitesine farklı pH koşullarının etkisi (AU/ml).

	<b>PFC69</b>	<b>PFC77</b>
<b>Kontrol</b>	12800	12800
<b>pH</b>		
<b>2</b>	25600	25600
<b>3</b>	25600	25600
<b>4</b>	25600	25600
<b>5</b>	12800	25600
<b>6</b>	12800	12800
<b>7</b>	12800	12800
<b>8</b>	6400	6400
<b>9</b>	3200	3200
<b>10</b>	1600	1600
<b>11</b>	0	800

Tarhana izolatu PFC69 ve PFC77 suşlarının bakteriyosinlerine 80, 90, 100 ve 121°C sıcaklık ve farklı süre kombinasyonu uygulamalarının etkisi Tablo 3.4 'de verilmiştir. Buradan da izlenebildiği gibi PFC69 suşunun bakteriyosini sıcaklık uygulamasından etkilenmemiştir. PFC77 tarafından üretilen bakteriyosin ise 80 ve 90°C'de stabilken, 100 ve 121°C'de aktivitenin %50 azaldığı görülmüştür.

Tablo 3.4 :*P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi (AU/ml)

Sıcaklık Uygulaması	PFC69	PFC77
<b>Kontrol</b>	12800	12800
<b>80°C, 5 dk</b>	12800	12800
<b>80°C, 10 dk</b>	12800	12800
<b>80°C, 15 dk</b>	12800	12800
<b>90°C, 5 dk</b>	12800	12800
<b>90°C, 10 dk</b>	12800	12800
<b>90°C, 15 dk</b>	12800	12800
<b>100°C, 5 dk</b>	12800	6400
<b>100°C, 10 dk</b>	12800	6400
<b>100°C, 15 dk</b>	12800	6400
<b>121°C, 15 dk</b>	12800	6400

PFC69 ve PFC77 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitesine farklı enzimlerin etkisi Tablo 3.5’de gösterilmiştir. Buna göre her iki suşa ait bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesi, proteolitik enzimlerin bir veya birkaçı ile muamele edildiğinde kaybolurken, katalaz ve lizozim enzimi uygulamasından sonra devam etmiştir.

*Pediococcus* üyeleri tarafından üretilen bakteriyosinler (pediosinler), yapısal özelliklerine göre değişik alt gruplara ayrılmıştır. Bunların en bilinen örnekleri; *P. acidilactici* tarafından üretilen AcH, PA-1, JD, SJ-1, UL5 ve *P. pentosaceus* tarafından üretilen FBB-61, N5p ve ST18’dir (Cintas ve diğ. 1995, Albano ve diğ. 2007, Anastasiadou ve diğ. 2008, Millette ve diğ. 2006). Antimikrobiyal aktivite, pH, sıcaklık, ve enzim uygulamalarına karşı direnci esas alındığında; *P. acidilactici* PFC69 tarafından üretilen bakteriyosinin, pediosinlerin genel karakteristiklerini (Bhuniave diğ. 1988, Anastasiadou ve diğ. 2008) önemli ölçüde gösterdiği ortaya çıkmıştır. Özellikle PFC69 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin enzim duyarlılığı özellikleri değerlendirildiğinde, daha önce karakterize edilmiş AcH, PA-1, SJ-1 ve SM-1 pediosinlerine % 100 benzerdir (Papagianni ve Anastasiadou, 2009).

Tablo 3.5 :*P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesine farklı enzim uygulamalarının etkisi (AU/ml).

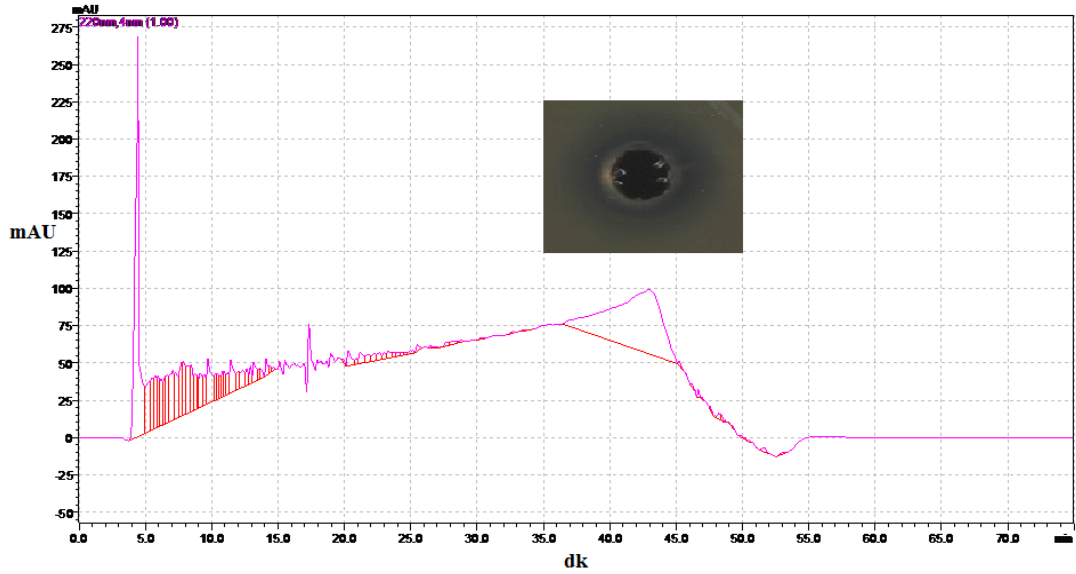
Uygulama	PFC69	PFC77
<b>Kontrol</b>	12800	12800
<b>Enzimler</b>		
<b>Katalaz</b>	12800	12800
<b>Lizozim</b>	12800	12800
<b><math>\alpha</math> Amilaz</b>	12800	12800
<b>Lipaz</b>	12800	12800
<b>Proteinaz-K</b>	0	0
<b>Tripsin</b>	0	0
<b>Pepsin</b>	0	12800
<b><math>\alpha</math> Kemotripsin</b>	0	0

### 3.3 *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 bakteriyosinlerinin saflaştırılması ve moleküler büyüklüğü

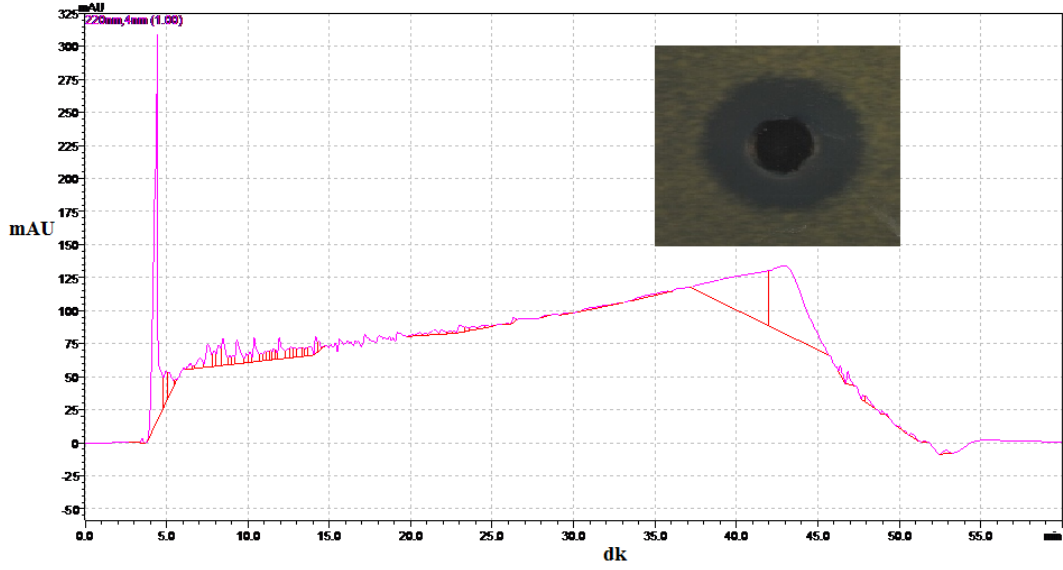
*P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının kültür üst sıvılarından ilişkili bakteriyosinlerin saflaştırılması üç aşamada gerçekleştirilmiş ve her aşamanın sonunda tespit edilen bakteriyosin aktivitesi Tablo 3.6'de verilmiştir. Buna göre kültür üst sıvısındaki protein fraksiyonu % 60 oranında amonyum sülfat ile çöktürülerek toplanmıştır. Akabinde protein çökeltisi katı faz ekstraksiyon kolonundan (C18, SPE, Strata) geçirilmiş ve safsızlıkların önemli bir kısmı uzaklaştırılmıştır. Son aşamada ise kolondan toplanan eluent HPLC sisteminden geçirilmiş ve tespit edilen pikler ayrı ayrı toplanarak antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. PFC69 ve PFC77 bakteriyosinlerine ait solüsyonların HPLC sisteminden geçirilmesiyle 37. dakikada gelen pikten sonra toplanan sıvıda antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5). Amonyum sülfat, katı faz ekstraksiyonu ve HPLC bakteriyosinlerin saflaştırılmasında sıklıkla kullanılan ve verimli çalışan sistemlerdir. Söz konusu bu sistemlerin kullanılmasıyla birçok yeni bakteriyosin veri tabanına (BAGEL, <http://bagel.molgenrug.nl>) kazandırılmıştır (Saavedra ve Sesma, 2011).

Tablo 3.6 : Saflaştırma basamaklarında *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 kültür üst sıvısından kazanılan bakteriyosinin aktivitesi (AU/ml).

Bakteriyosin	Uygulama	Hacim (ml)	Aktivite (AU/ml)	Toplam Aktivite (AU)
<b>PFC69</b>	<b>Kültür Üst Sıvısı</b>	500	12800	$6.4 \times 10^6$
	<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	50	25600	$1.3 \times 10^6$
	<b>Katı faz ekstraksiyonu</b>	5	12800	$6.4 \times 10^4$
	<b>HPLC</b>	1	800	$8.0 \times 10^2$
<b>PFC77</b>	<b>Kültür Üst Sıvısı</b>	500	12800	$6.4 \times 10^6$
	<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	50	25600	$1.3 \times 10^6$
	<b>Katı faz ekstraksiyonu</b>	5	800	$4.0 \times 10^3$
	<b>HPLC</b>	1	400	$4.0 \times 10^2$

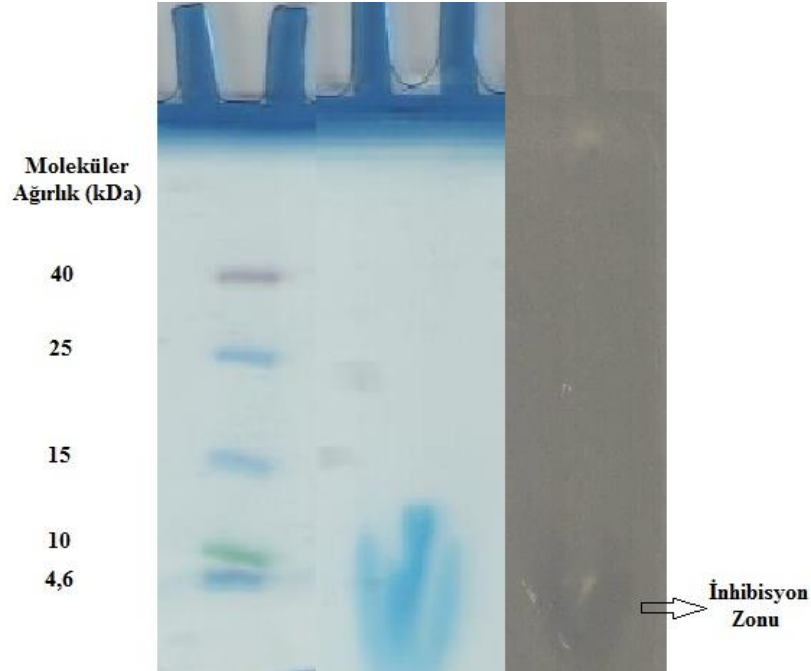


Şekil 3.4 : PFC69 bakteriyosinin HPLC kromotogramı

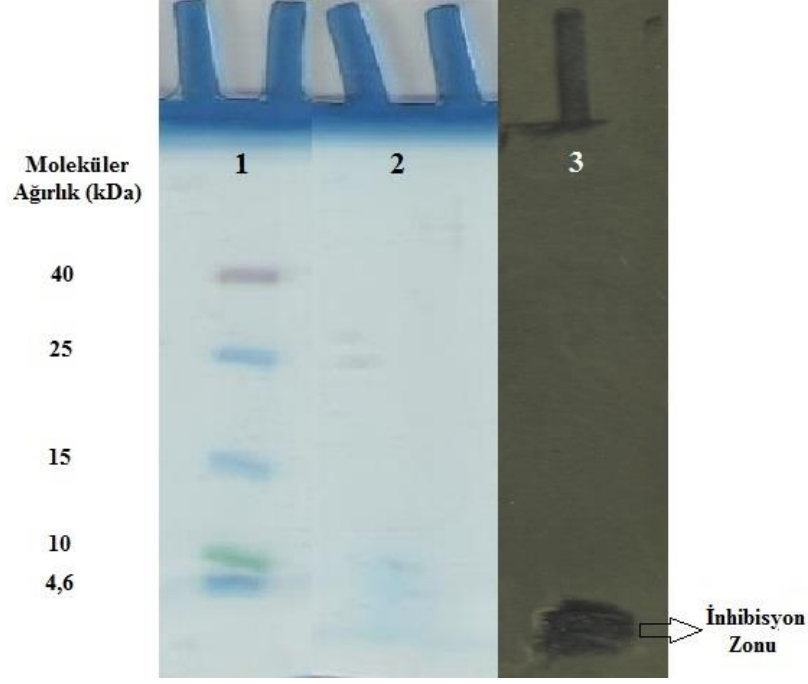


Şekil 3.5 : PFC77 bakteriyosinin HPLC kromotogramı

Saflaştırılan PFC69 ve PFC77 bakteriyosinlerin trisin sodyum dodezil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (Trisin-SDS-PAGE) sistemi kullanılarak yapılan analizleri sonucu; moleküler büyüklükleri, sırasıyla yaklaşık 5 ve 3.5 kDa tespit edilmiştir (Şekil 3.6 ve 3.7).



Şekil 3.6 : PFC69 bakteriyosininin SDS-PAGE analizi (1: Marker 2: PFC69 3: PFC69 İnhibisyon Zonu)

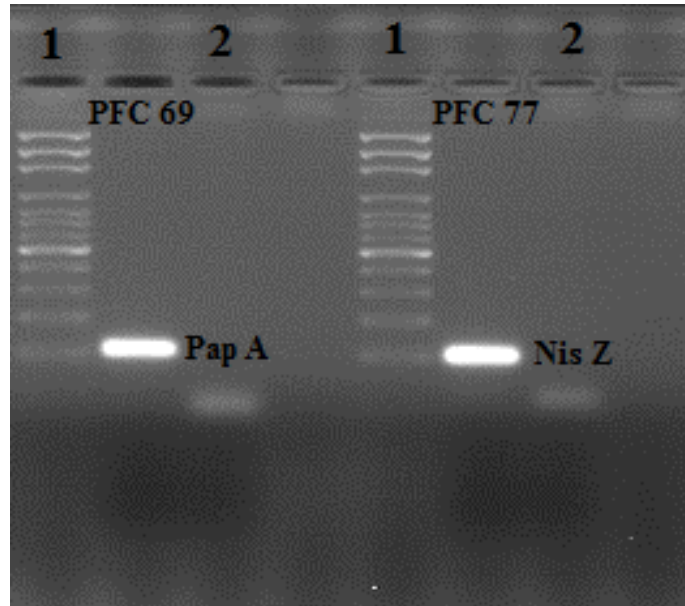


Şekil 3.7 : PFC77 bakteriyosininin SDS-PAGE analizi (1: Marker 2: PFC77 3: PFC77 İnhibisyon Zonu)

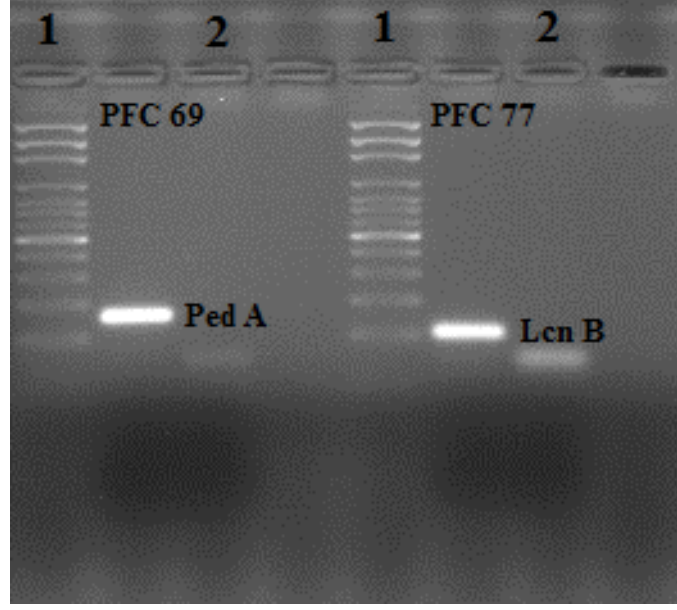
Çalışmamızda belirlenen PFC69 ve PFC77 bakteriyosinlerin moleküler büyüklükleri, literatür bulgularında bu gruplar için tanımlanan moleküler büyüklüklerle uyumlu bulunmuştur (Cintas ve diğ. 1995, Albano ve diğ. 2007, Anastasiadou ve diğ. 2008, Millette ve diğ. 2006, Takala ve Saris 2007). Bakteriyosinlerin bazı özel yapıları (Anastasiadou ve diğ. 2008, Milletteve diğ. 2006) SDS-PAGE sistemlerinde doğru moleküler büyüklüklerin saptanmasında sorunlara yol açmaktadır. Diğer yandan izolasyon yöntemine bağlı olarak yaygın bir şekilde ortaya çıkan bakteriyosin yan gruplarının kaybı da, elektroforetik sistemlerde kesin moleküler büyüklük tanısını güçleştirmektedir. Bu nedenle SDS-PAGE sistemlerinde gerçekleştirilen ön tanıların ileri biyokimyasal analizler yapılarak desteklenmesi zorunludur. Ancak PFC69 ve PFC77 bakteriyosinlerin moleküler boyutları dikkate alınarak değerlendirme yapıldığında bu bakteriyosinlerin sırasıyla pediosin ve nisin benzeri oldukları sonuca varılabilir.

### 3.4 *P.acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının genomunda bakteriyosin üretimiyle ilişkili temel genler ve DNA dizisi

*P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin nihai tanımlaması içerdikleri bakteriyosin üretiminden sorumlu genin araştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Buna ilaveten söz konusu suşlarda üretilen bakteriyosinlere ait temel genlerin DNA dizi homolojisi de tespit edilmiştir. Bu amaçlar doğrultusunda her iki hücrenin genomunda, LAB'lerinde sıklıkla tespit edilen 22 ayrı bakteriyosinin temel geni üzerinden hazırlanan primerler kullanılarak, geniş çaplı tarama gerçekleştirilmiştir. Yapılan PZR taraması sonucunda beklendiği gibi *P. acidilactici* PFC69 suşunun genomunda *papA* ve *pedA* genlerinin varlığına işaret eden DNA fragmentleri çoğaltılmıştır. İlaveten, *L. lactis* PFC77 suşunun genomunda ise *nisZ* ve *lcnB* genlerine ait DNA fragmentleri tespit edilmiştir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). Elde edilen bu sonuçlar *P. acidilactici* PFC69 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin pediosin olduğunu kanıtlamıştır. Diğer taraftan, *L. lactis* PFC77 suşunun ise nisin ve laktokoksin bakteriyosinlerini üreten bir suş olduğu anlaşılmıştır. Önceki sonuçlarla birlikte bu durum değerlendirildiğinde, *L. lactis* PFC77 suşunda laktokoksin üretimiyle ilişkili operonun aktif olmadığı, sadece nisini üretebildiği öngörülmüştür.



Şekil 3.8 : *P.acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarında bakteriyosin üretimi ile ilişkili *papA* ve *nisZ* genlerinin DNA fragmenti (1: Marker 1 kb 2: Negatif Kontrol)



Şekil 3.9 : *P.acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarında bakteriyosin üretimi ile ilişkili *pedA* ve *lcnB* genlerinin DNA fragmenti (1: Marker 1 kb 2: Negatif Kontrol)

Çalışmada PZR sonucunda çoğaltılan *lcnB*, *nisZ*, *pedA* fragmentlerinin nükleotit dizileri Şekil 3.10'da verilmiştir. *lcnB* dışındaki diğer fragmentlerin eşlenik genlerin bilinen dizileri ile %100 benzer oldukları anlaşılmıştır. Ancak, *lcnB* fragmentinin iki noktasında pürin pürin (A↔G) değişimi ve iki timin insersiyonu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar *P. acidilactici* PFC69 tarafından üretilen bakteriyosinin pediosin olduğunu önemli ölçüde göstermiştir. Diğer taraftan *L. lactis* PFC77 suşunda ise her ne kadar iki farklı bakteriyosin üretimine ait genetik determinantlar yer alsada laktokoksinin imünitesinden sorumlu *lcnB* geninin çoğaltılan kısmi bölgesinde mutasyonların tespiti bu suşta sadece *nisin Z*'nin üretildiğine işaret etmiştir. Bu çalışmada ilginç olan noktalardan birisi *L. lactis* PFC77 suşunun iki farklı bakteriyosine ait genetik determinantı içermesidir. Son yıllarda benzer şekilde bazı laktik suşlarda birden fazla bakteriyosin üreticisi laktik asit bakterisi üyeleri rapor edilmiştir. Sawa vd (2013) Shubo'dan (pirinç maltı) izole ettiği *L. sakei* D98 suşunun sakasin D98a, sakasin D98b ve sakasin D98c olan üç adet bakteriyosini ürettiğini göstermiştir. Benzer şekilde Ishibashi ve diğ.(2012) tarafından *E. faecium* NKR-5-3 suşunun birden fazla enterosin ürettiği belirlenmiştir. Ancak birden fazla farklı yapılarıdaki bakteriyosin üretimi mevcut değildir.



---

*lcnB*

```
TGTATGACTTGCTGTGTCAAGTTGTTTGTTTTACATATTGTTTTTCCTGTTCTAGTATCTTTATACC
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
TGTATAACTTGCTGTGTCAATTGTCTG--TTTACATATTGTTTTTCCTGTTCTAGTATCTTTATACC

AAGTATATGGTCCAGCACTCATGATATACTGCAAGCTTCCTCCATTA
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
AAGTATATGGTCCAGCACTCATAACATACTGCAAGCTTCCTCCATTA
```

---

*nisZ*

```
CTGTTTTTCATGTTACAACCCATCAGAGCTCCTGTTTTACAACCGGGTGACATAGCGAAATACTTGTA
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
CTGTTTTTCATGTTACAACCCATCAGAGCTCCTGTTTTACAACCGGGTGACATAGCGAAATACTTGTA

ATGCGTGGTGATGCACCTGAATCTTTCTTCGAAACAGATACCAAATCCAAGTTAAAATCTTTTGTAC
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
ATGCGTGGTGATGCACCTGAATCTTTCTTCGAAACAGATACCAAATCCAAGTTAAAATCTTTTGTAC
```

---

*pedA*

```
TCTAGCATGTTAAACTCGCCCCACCCTTTTTGAGAATGCGCCAATTCATTGATGGCTGCTAGAACTTT
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
TCTAGCATGTTAAACTCGCCCCACCCTTTTTGAGAATGCGCCAATTCATTGATGGCTGCTAGAACTTT

GTTTTCTAGAACTTTGTTTTCTTCGGCAG
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
GTTTTCTAGAACTTTGTTTTCTTCGGCAG
```

---

Şekil 3.10 : *lcnB*, *nisZ* ve *pedA* genlerine spesifik primerler ile çoğaltılan DNA bölgelerinin dizisi ve homolojisi. Koyu olarak işaretlenmiş DNA dizileri BLAST veri tabanında kayıtlı ilişkili genlere aittir. Üzeri renklendirilmiş bölgeler transisyon ve insersiyon varlığını göstermektedir.

### 3.5 Tarhana hamurlarının mikrobiyolojik özellikleri

Hazırlanan tarhana hamurlardaki LAB sayıları örnekler göre değişkenlik göstermiştir (Tablo 3.7). Hamur örneklerinin hazırlandığı ilk gün PFC69 ve PFC77 suşlarının ilave edilmediği hamur örneklerinde (A, B, S) LAB sayısı yaklaşık 4 log kob/g bulunmuştur. PCF69 ve PFC77 ilave edilen hamur örneklerinde ise 6 log kob/g olarak belirlenmiştir. Fermantasyonun ilk 5 gününde tüm hamur örneklerinde LAB sayısı hızla artış göstermiştir. En yüksek LAB sayısına BP ve BL hamurlarında 5. günde, A, B ve SP hamurlarında 10. günde S ve SL hamurlarında 15. günde

ulaşmıştır. Daha sonraki fermantasyon günlerinde sayısal değişimler yatay bir seyir izlemiştir. Soyyiğit (2004) tarafından Isparta ve yöresinde üretilen ev yapımı tarhanaların mikrobiyolojik ve teknolojik kalitesini belirlemek amacıyla yapılan tez çalışmasında LAB sayısı ortalama 5.81 log kob/g olarak bulunmuştur. Bu çalışmaya kıyasla daha yüksek LAB sayılarının bulunması tarhana hamurunun hazırlanırken bakteriyosin üreticilerinin ilavesinden kaynaklanmıştır. Erbaş ve diğ. (2005) tarafından yapılan çalışmada da yaş ve kuru tarhananın fermantasyon sırasında *Lactobacillus* spp. sayısının 6,47 log kob/g'dan 5,44 log kob/g'a düştüğü bildirilmiştir. Bu değerler çalışmamızda fermantasyonun sonunda tarhana hamurlarında elde edilen değerlerden daha düşüktür. Şengün ve diğ. (2009) tarafından tarhana hamuru örneklerindeki en yüksek LAB sayısı fermantasyon 0. ve 1. günlerinde tespit edilmiştir; bu sonuçların aksine çalışmamızda en yüksek LAB sayısına 5. gün ve sonraki günlerde ulaşılmıştır. Bu farklılık ise hamurların daha düşük sıcaklıkta ( $\pm 22^{\circ}\text{C}$ ) fermente edilmesi ve bileşenlerinin farklı olmasından ileri gelmiştir. Settanni ve diğ. (2011) tarafından da en yüksek laktik asit bakteri sayısı fermantasyonun 4. gününde belirlenmiştir. Bu verilere benzer şekilde bizim çalışmamızda da en yüksek LAB sayısı 5. günde elde edilmiştir. Özel (2012) tarafından yapılan çalışmada, ev tipi tarhanalarda LAB sayısı ortalama 7,71 log kob/g bulunmuştur. Çalışmamızda da bu sonuca benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Tarhana hamurlardaki toplam canlı bakteri sayıları örneklere göre değişkenlik göstermiştir (Tablo 3.6). Fermantasyonun ilk 5 gününde tüm hamur örneklerinde TAMB sayısı hızla artış göstermiştir. En yüksek TAMB sayısına A hamurunda 10. gün, S ve BP hamurunda 5. gün, B ve BL hamurlarında 10. gün, SL hamurunda 15. gün ve SP hamurunda 21. günde ulaşılmıştır. 3. güne kadar hızlı bir artış olmuş, 5. günden sonraki fermantasyon günlerinde tüm hamurlarda TAMB sayısında çok az bir değişim gözlenmiştir. Fermantasyon sonunda en yüksek TAMB sayısı SP hamurunda, en düşük ise BP hamurunda tespit edilmiştir.

Soyyiğit (2004) tarafından Isparta ve yöresinde üretilen 27 adet ev tarhanasında toplam mikroorganizma sayısı ortalama 6,17 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki değerlerden düşük bulunması, kurutmanın yapılmış olmasına bağlanmıştır. Erbaş ve diğ. (2005) tarafından yapılan çalışmada fermantasyon sırasında, tarhana hamurunun artan asit içeriği ile toplam mikroorganizma sayısının 6,43 log kob/g'dan 5,95 log kob/g'a düştüğü belirtilmiştir. Bu değerler çalışmada

elde edilen değerlerden daha düşüktür. Coşkun (1996) tarafından Trakya ve yöresinden toplanan 51 adet ev yapımı tarhanada en yüksek toplam mikroorganizma sayısının  $6,0 \times 10^4$  adet/g olarak tespit edildiği; 9 adedinde ise canlı mikroorganizmaya rastlanılmadığını bildirmiştir. Özel (2012) tarafından yapılan çalışmada, ev tipi tarhanalarda TAMB sayısı ortalama 7,12 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada da yine TAMB sayısı ortalama olarak aynı seviyelerde olduğu belirlenmiştir.

Tarhana hamurlarında maya-küf sayıları fermentasyonun ilk günlerinde dalgalı bir değişim izlemiştir (Tablo 3.6). S, SP ve SL hamurlarında ise maya-küf tespit edilememiştir. A hamurunda yaklaşık 2 log kob/g, B, BP ve BL hamurlarında ise 3 log kob/g olarak belirlenmiştir. Ancak fermentasyonun 3. gününden itibaren bütün hamur örneklerinde maya-küf sayıları artmıştır. En yüksek maya-küf sayılarına A, SP, B, BP ve BL hamurlarında 10. günde, S ve SL hamurlarında 21. günde ulaşılmıştır. B hamurunda maya-küf sayısı 10. günden itibaren düşüş göstermiş ve 15. günde maya-küf tespit edilememiştir. Temiz ve Pirkul (1991) tarafından yapılan çalışmada da maya-küf sayıları fermentasyonun 1. ve 2. günlerinde artış gösterirken; 3. gününde hızlı bir azalma gösterdiği ve fermentasyonun sonunda maya-küf sayısının 0. gününe göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Soyyiğit (2004) tarafından Isparta ve yöresinde üretilen ev yapımı tarhanalarda maya-küf sayısı ortalama 6,20 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise fermentasyonun ilk günlerinde dalgalı bir sayısal değişim, ilerleyen günlerde ise artış tespit edilmiştir. Özel (2012) tarafından yapılan çalışmada, ev tipi tarhanalarda ortalama 5,65 log kob/g seviyelerinde maya-küf tespit edilmiştir. Bu çalışmada maya-küf sayısı ise bu sonuca göre daha düşük bulunmuştur. Bu farklılık tarhana üretiminin laboratuvar ölçeğinde hazırlanmasından veya fermentasyon sürecinin daha kontrollü işletilmesinden kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda tarhana hamuru fermentasyonu boyunca bakteriyosin üreticisi *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının *S. aureus* ATCC29213 ve *B. cereus* ATCC11778 suşları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Buna göre farklı fermentasyon günlerindeki *S. aureus* ATCC29213 ve *B. cereus* ATCC11778 sayılarının değişimi Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de gösterilmiştir. Yapılan çalışmada fermentasyonun ilk beş gününde *S. aureus* sayısının bütün hamurlarda artış gösterdiği gözlenmiştir. Fermentasyonun ilerleyen günlerinde S hamuru dışında

diğer hamurlarda hızlı düşüş gözlenmiştir. Ancak bakteriyosin üreticisi *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarını içeren hamurlarda fermantasyonun son evresinde daha düşük ( $< 3 \log \text{ kob/g}$ ) *S. aureus* sayısına ulaşılmıştır. Bakteriyosin üreticileri kendi aralarında değerlendirildiğinde ise ve *L. lactis* PFC77 suşunun daha etkili olduğu gözlenmiştir. Çalışmada kontrol suşunda, bakteriyosin üreticisine benzer şekilde düşüş sağlanması özellikle yüksek asitlik sonucu ortaya çıkan bir antimikrobiyal etki gibi değerlendirilse de bakteriyosin üreticilerinin başlangıç sayısını daha fazla düşürmesi asitliğin yanında bu metabolitlerinde etkili olabileceğini göstermiştir. Fermantasyonun 5. gününden itibaren *S. aureus* sayısı düşmeye başlamış ve son günlere doğru bakteriyosin üreticilerini içeren hamurlarda daha düşük sayılarda *S. aureus* tespit edilmiştir. Bu sonuç bakteriyosin üretimi ile bakteriyosinlerin etkinliğinin sonucu olarak değerlendirilebilir.

A hamurunda *B. cereus* tespit edilmemiştir. BP ve BL hamurlarında yaklaşık 6 log kob/g, B hamurunda 4 log kob/g seviyesinde bulunmuştur. A, B ve BP hamurlarında fermantasyonun 5. gününe kadar artış gözlenirken BL hamurunda 1. güne kadar artış ve sonrasında hızlı bir düşüş gözlenmiş ve 21. gün sonunda tespit edilebilir miktarın altına düşmüştür. BP hamurunda 5. günden sonra hızlı düşüş gerçekleşmiş ve fermantasyon sonunda *B. cereus* tespit edilmemiştir. B ve A hamurlarında 5. günden sonra hızlı bir düşüş gözlenmiş ve sonuç olarak 3 log kob/g bakteri tespit edilmiştir. Bakteriyosin üreticileri kendi aralarında değerlendirildiğinde birbirine yakın sonuçlar verdikleri tespit edilmiştir. Bakteriyosin üreticisi suşların ilave edilmediği hamurlarda fermantasyon sonunda *B. cereus* bakterisinin canlılığını sürdürmesi ve 3 log kob/g seviyelerine düşmesi asitlik artışıyla izah edilebilirken, bakteriyosin üreticilerinin inoküle edildiği hamurlarda *B. cereus* bakterisinin canlılığını sürdürememesi bakteriyosinlerin etkinliğini göstermiştir.

Tablo 3.7 :Farklı fermantasyon günlerindetarhana hamurlarının mikrobiyolojik özellikleri

Hamur Adı	Gün	Mikrobiyolojik Sonuçlar (log kob/g)				
		LAB	TAMB	M-K	SA	BC
A	0.	3,79 ± (1,17)	4,49± (0,45)	1,70± (1,98)	4,18± (0,25)	<3
S		4,63± (0,06)	4,90± (0,00)	<1	4,30± (0,23)	TE
SP		6,13± (0,01)	7,03± (0,80)	<1	4,12± (0,03)	TE
SL		6,54± (0,01)	6,42± (0,02)	<1	4,07± (0,33)	TE
B		3,49± (0,16)	4,23± (0,09)	3,30± (0,76)	TE	4,53± (0,09)
BP		6,55± (0,63)	6,37± (0,33)	3,33± (0,62)	TE	6,12± (0,01)
BL		6,53± (0,10)	6,10± (0,28)	3,08± (0,12)	TE	6,49± (0,04)
A		1.	6,08± (0,08)	5,97± (0,17)	1,52± (1,76)	4,79± (0,02)
S	6,07± (0,04)		5,97± (0,03)	3,04± (0,06)	4,95± (0,12)	TE
SP	7,01± (0,05)		7,43± (0,05)	2,96± (0,08)	5,10± (0,14)	TE
SL	7,21± (0,08)		7,28± (0,03)	2,83± (0,24)	5,08± (0,12)	TE
B	5,36± (0,06)		5,32± (0,39)	<3	TE	5,13± (0,19)
BP	7,27± (0,28)		7,46± (0,09)	<3	TE	5,05± (0,08)
BL	7,86± (0,03)		8,39± (0,96)	<3	TE	7,71± (0,09)
A	3.		8,77± (0,5)	8,86± (0,4)	3,64± (0,76)	8,32± (0,06)
S		9,09±(0,02)	9,02±(0,04)	3,85±(0,08)	8,14±(0,06)	TE
SP		9,29±(0,06)	9,25±(0,03)	2,94±(0,06)	7,78±(0,07)	TE
SL		9,09±(0,08)	9,06±(0,05)	2,82±(0,03)	7,65±(0,01)	TE
B		7,72±(0,04)	8,21±(0,06)	3,87±(0,04)	TE	7,50±(0,14)
BP		9,34±(0,06)	9,33±(0,04)	4,79±(0,16)	TE	7,28±(0,16)
BL		8,76±(0,01)	8,95±(0,07)	2,99±(0,43)	TE	6,78±(0,01)
A		5.	9,68± (0,69)	9,05± (0,14)	4,58± (1,61)	8,06± (0,03)
S	9,26±(0,01)		9,32±(0,10)	4,01±(0,02)	8,04±(0,02)	TE
SP	9,55±(0,20)		9,66±(0,02)	3,60±(0,04)	7,94±(0,08)	TE
SL	9,17±(0,01)		9,05±(0,04)	3,30±(0,02)	8,06±(0,07)	TE
B	9,00±(0,03)		8,90±(0,00)	5,51±(0,16)	TE	7,48±(0,06)
BP	9,54±(0,01)		9,49±(0,08)	6,21±(0,13)	TE	7,02±(0,04)
BL	10,00±(0,02)		9,17±(0,04)	3,32±(0,03)	TE	6,74±(0,07)

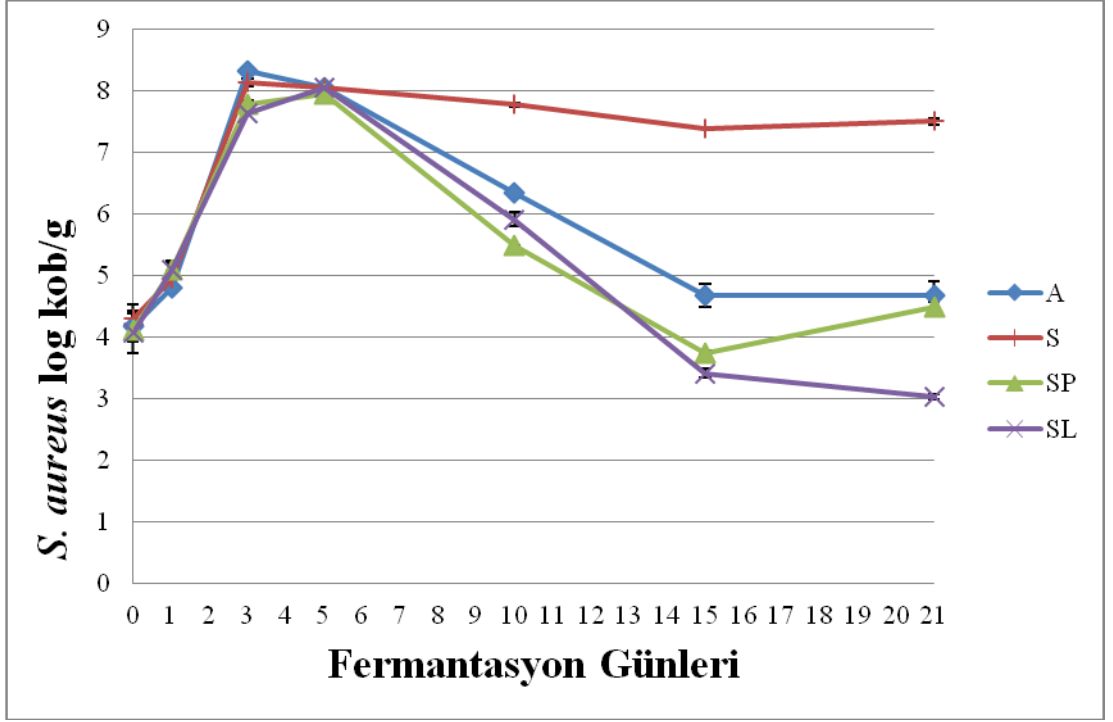
TE: Tespit edilmedi.

(Devam)

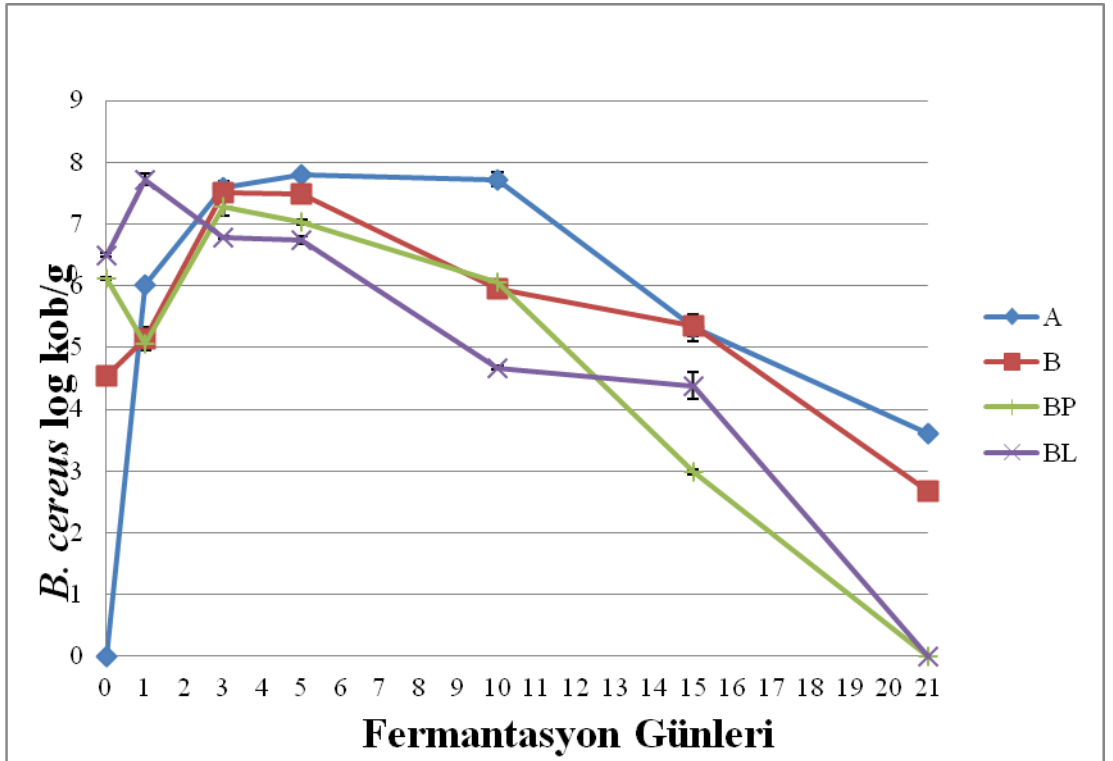
Tablo 3.7 (Devam) : Farklı fermantasyon günlerindetarhana hamurlarının mikrobiyolojik özellikleri (Sayısal sonuçlar iki tekrarın ortalama değerleridir.)

Hamur Adı	Gün	Mikrobiyolojik Sonuçlar (log kob/g)				
		LAB	TAMB	M-K	SA	BC
A	10.	9,70±(0,47)	9,50± (0,67)	6,47±(0,41)	6,35±(0,04)	7,72±(0,11)
S		9,08±(0,27)	8,63±(0,04)	4,33±(0,02)	7,78±(0,03)	TE
SP		9,60±(0,11)	9,69±(0,00)	6,63±(0,05)	5,49±(0,01)	TE
SL		9,17±(0,01)	9,14±(0,02)	5,65±(0,04)	5,91±(0,12)	TE
B		9,22±(0,04)	9,35±(0,19)	6,63±(0,02)	TE	5,95±(0,07)
BP		8,83±(0,09)	8,84±(0,22)	7,34±(0,06)	TE	6,05±(0,03)
BL		9,19±(0,11)	9,43±(0,06)	7,61±(0,11)	TE	4,67±(0,03)
A		15.	9,23±(0,07)	8,98±(0,37)	5,23±(1,07)	4,67±(0,18)
S	9,32±(0,05)		9,09±(0,01)	3,68±(0,12)	7,39±(0,01)	TE
SP	9,52±(0,04)		9,61±(0,01)	5,30±(0,04)	3,74±(0,04)	TE
SL	9,29±(0,02)		9,19±(0,01)	4,32±(0,06)	3,41±(0,08)	TE
B	9,03±(0,05)		9,02±(0,03)	<4	TE	5,35±(0,17)
BP	9,03±(0,05)		9,23±(0,33)	6,81±(0,09)	TE	2,97±(0,04)
BL	9,03±(0,05)		9,03±(0,05)	6,66±(0,15)	TE	4,37±(0,22)
A	21.		8,82±(0,35)	8,47±(0,03)	5,78± (0,8)	4,67± (0,23)
S		9,07±(0,06)	9,19±(0,02)	5,88±(0,05)	7,51±(0,06)	TE
SP		9,35±(0,03)	9,70±(0,04)	4,15±(0,03)	4,49±(0,08)	TE
SL		9,16±(0,04)	9,19±(0,06)	6,84±(0,07)	3,04±(0,04)	TE
B		8,84±(0,08)	8,98±(0,01)	<1	TE	2,67±(0,11)
BP		8,84±(0,08)	8,38±(0,12)	3,42±(0,17)	TE	<1
BL		9,13±(0,05)	8,35±(0,05)	5,37±(0,02)	TE	<1

TE:Tespit edilmedi.



Şekil 3.11 : Tarhana hamurlarında *S. aureus* sayısının fermentasyon günlerine göre değişimi.



Şekil 3.12 : Tarhana hamurlarında *B. cereus* sayısının fermentasyon günlerine göre değişimi.

### 3.6 Tarhana hamurlarının pH, asitlik ve kurumadde özellikleri

Hazırlanan tarhana hamurlarının pH, asitlik ve kurumadde sonuçları Tablo 3.8 'de gösterilmiştir. Tarhana hamuru örneklerinde pH düşüşü 10. güne kadar devam etmiştir. Hamur pH'ları 4 seviyelerine düştükten sonra yatay bir seyir izlemiştir. Tarhana hamurlarının tümünde asitlik fermantasyonun ilk 10 gününde hızlı artmıştır. Fermantasyon sonunda A, B ve S hamuru örneklerinde PFC69 ve PFC77 inoküle edilen örneklere kıyasla daha yüksek asitlik değerlerine ulaşılmıştır. Tüm fermantasyon günlerinde hamurların su aktivitesi değerleri 0,899 ile 0,942 arasında tespit edilirken fermantasyonun başında yaklaşık olarak 0,925 su aktivite değerleri tespit edilmiştir. Fermantasyonun 5. gününe kadar bütün hamur örneklerinde birbirine yakın su aktivitesi değerleri okunmuştur. Daha sonraki günlerde tüm hamurlarda benzer sonuçlar kaydedilmiştir. Fermantasyon sonunda S, SP ve SL hamurlarında ortalama 0,922, A, B, BP ve BL hamurlarında ortalama 0,910 değerleri kaydedilmiştir.

Soyyiğit (2004) tarafından Isparta ve yöresinde üretilen ev yapımı tarhanaların kimyasal analiz sonuçlarına göre; pH 3,61–4,86 değerleri arasında bulunmuştur. Settanni ve diğ. (2011) tarafından yapılan çalışmada da pH değeri A (30 °C fermantasyon) ve B (40 °C fermantasyon) örneklerinde 5 farklı fermantasyon gününde incelenmiştir. A ve B örneği için pH değerleri sırasıyla 0. gün 4,49 ve 4,49; 2. gün 3,73 ve 4,29; 4. gün 3,63 ve 4,02; 6. gün 3,61 ve 4,07; 8. gün 3,62 ve 4,05 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen pH değerleri literatür verileri ile uyum içindedir.

Soyyiğit (2004) tarafından Isparta yöresinde üretilen ev yapımı tarhanalarda belirlenen asitlik değerleri 4,91 ila 36,62 arasında; Settanni ve diğ. (2011) tarafından üretilen A (30 °C fermantasyon) ve B (40 °C fermantasyon) tarhana örneklerinde 5 farklı fermantasyon gününde yapılan çalışmada, asitlik değerleri sırasıyla 0. gün 4,54 ve 4,55; 2. gün 7,59 ve 6,07; 4. gün 10,61 ve 10,23; 6. gün 13,64 ve 11,37; 8. gün 12,88 ve 10,23 olarak bulunmuştur. Ayrıca Özel (2012) tarafından yapılan çalışmada tarhana örneklerinin fermentasyon günlerindeki pH değerlerinin sırasıyla 4.40, 3.76, 3.34, 3.18 ve 3.70 olarak, toplam asitlik değerlerinin ise 8.79, 9.22, 12.35, 15.70 ve



18.45 olarak ölçülmüştür. Buna göre çalışmada elde edilen veriler literatür ile uyum içindedir.

Tablo 3.8 :Tarhana hamurlarının farklı fermantasyon günlerindeki kimyasal analiz sonuçları

Hamur Adı	Gün	Kimyasal Sonuçlar		
		pH	Su Aktivitesi	Toplam Asitlik
A	0.	5,08	0,925	6,05
S		5,09	0,921	6,50
SP		5,10	0,926	7,50
SL		5,12	0,928	5,90
B		4,89	0,932	4,00
BP		4,92	0,933	4,50
BL		4,90	0,931	4,20
A	1.	4,92	0,933	8,45
S		5,03	0,927	7,50
SP		5,04	0,927	7,75
SL		5,08	0,927	7,50
B		4,66	0,942	8,50
BP		4,69	0,931	10,50
BL		4,69	0,931	9,25
A	3.	4,46	0,919	10,87
S		4,44	0,916	12,75
SP		4,31	0,921	10,50
SL		4,41	0,923	11,75
B		4,41	0,920	10,00
BP		4,25	0,920	9,10
BL		4,20	0,922	16,25
A	5.	4,23	0,919	12,92
S		4,29	0,921	16,25
SP		4,08	0,921	15,95
SL		4,26	0,920	15,85
B		4,17	0,919	11,00
BP		3,96	0,911	11,50
BL		4,08	0,916	18,75
A	10.	3,84	0,912	22,57
S		3,89	0,929	23,55
SP		3,95	0,930	21,90
SL		3,93	0,928	22,25
B		3,74	0,905	20,90
BP		3,87	0,902	19,50
BL		3,96	0,903	20,50

(Devam)

Tablo 3.8(Devam) : Tarhana hamurlarının farklı fermantasyon günlerindeki kimyasal analiz sonuçları

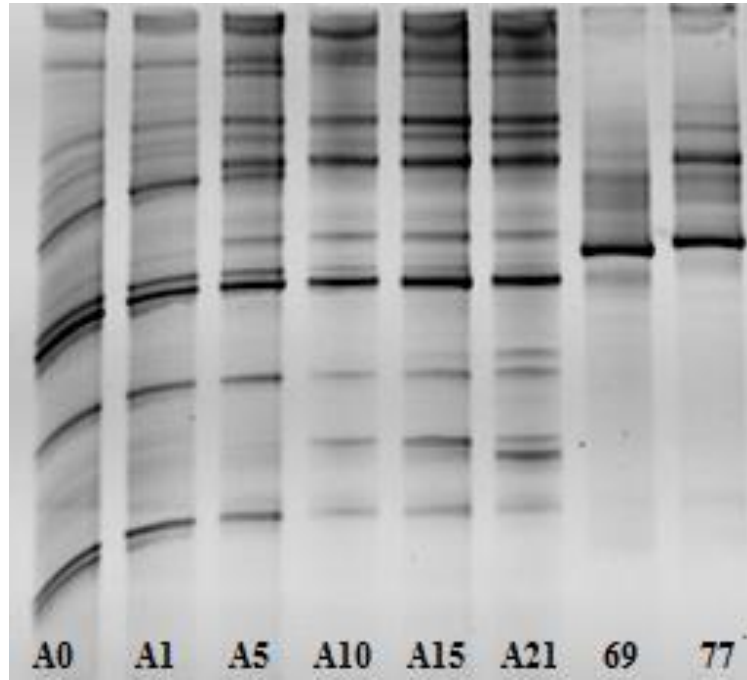
Hamur Adı	Gün	Kimyasal Sonuçlar		
		pH	Su Aktivitesi	Toplam Asitlik
A	15.	3,74	0,908	25,62
S		3,79	0,916	28,50
SP		4,00	0,924	23,50
SL		3,80	0,920	24,25
B		3,70	0,905	34,90
BP		3,86	0,907	22,25
BL		3,69	0,911	26,25
A	21.	3,69	0,910	31,50
S		3,73	0,925	33,50
SP		3,83	0,925	24,25
SL		3,75	0,922	26,00
B		3,75	0,908	35,05
BP		3,94	0,910	30,15
BL		3,67	0,909	26,50

### 3.7 Tarhana hamuru fermantasyonunda *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının canlılığının stabilitesi ve hamur mikroflorasının değişimi

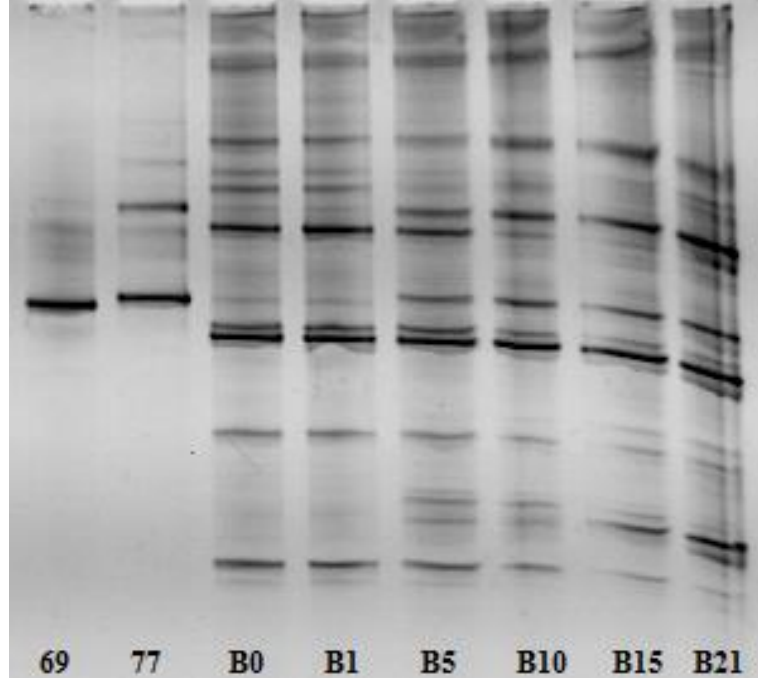
Tarhana hamuru ortamına fermantasyonun başında destek kültür olarak ilave edilen bakteriyosin üreticileri *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının fermentasyonun ilerleyen günlerinde tarhana mikroflorasındaki stabilitesinin izlenmesi ve buna ilaveten bakteriyosin üretim özelliklerinden dolayı yerleşik mikroflorasına etkisinin belirlenmesi için hamur ortamından toplanan bakteriyal genomlarından çoğaltılan 16S rDNA V3 bölgesi DGGE üzerinde yürütülmüştür (Şekil 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18 ve 3.19). Çalışma sonuçları incelendiğinde *P. acidilactici* PFC69 suşu ilave edilmiş BP ve SP hamurlarında referans banda eşdeğer bandın her iki hamurda 5. gününden sonra fermentasyonun sonuna kadar net bir şekilde izlenebildiği ancak kontrol hamurları olan A, B ve S’de referans bandın tüm fermentasyon günlerinde izlenmediği görülmektedir. Diğer taraftan *L. lactis* PFC77 suşunun ilave edildiği BL ve SL hamurlarında benzer şekilde 5. günden itibaren referans bandın izlendiği, kontrol hamurlarında *L. lactis* PFC77 suşunu açıkça işaret eden bandın bulunmadığı belirlenmiştir. Ancak *L. lactis* PFC77 suşuna ait referans bandının fermentasyonun ilk günlerinde zayıf da olsa izlenmesi, bu suşun *P. acidilactici* PFC69 kıyasla fermentasyonun başında daha aktif olduğuna işaret

etmektedir. Bu sonuçlar özellikle tarhana izolatu olan *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının hamur ortamında canlılığını sürdürebildiğini ve bu suşların fermentasyonun ilk başlarında zayıf ancak ortasından sonra daha fazla gelişebildiğini net bir biçimde ortaya çıkarmıştır.

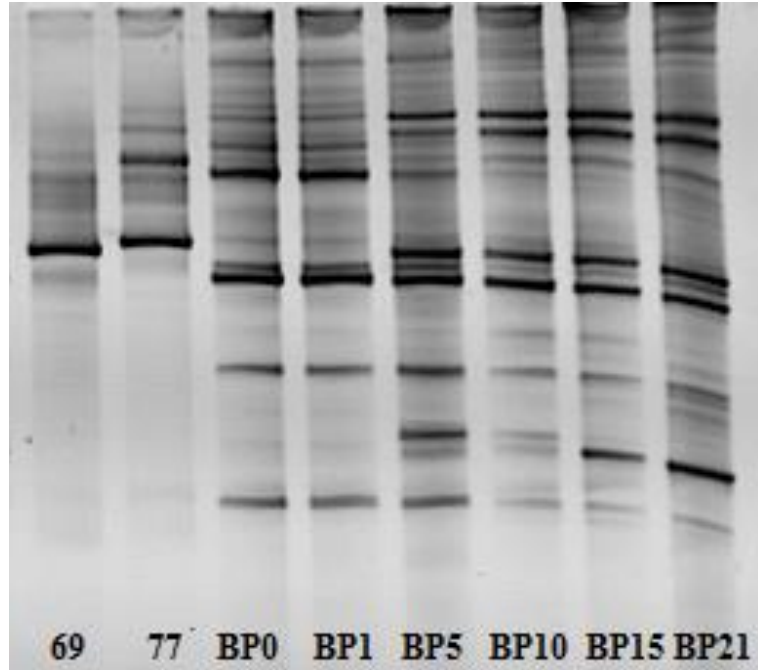
Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler yakın akraba türler üzerinde de etkilidir (Cintas ve diğ. 2001; Hassan ve diğ. 2012). Tarhana hamuru fermentasyonunda laktik asit bakterileri büyük rol oynamaktadır. Dolayısıyla tarhana hamurunun hazırlanmasında bakteriyosin üreticilerinin kullanımının hamur florasındaki etkisi de değerlendirilmesi gereken bir konudur. Bu tez çalışması kapsamında bakteriyosin üreticisi *P. acidilactici* PFC69'un ilave edildiği BP ve SP hamurlarının A, B ve S hamurları ile DGGE profilleri kıyaslandığında 5. günden sonra sadece üstten 7. bandın kaybolduğu izlenmiştir. Bunun dışında major bantlarda değişiklikler izlenmemiştir. Bu durum büyük oranda mikroflora stabilitesinin devam ettirildiği floradaki diğer laktik suşların çeşitliliğinde önemli bir değişikliğin meydana gelmediğine işaret etmektedir.



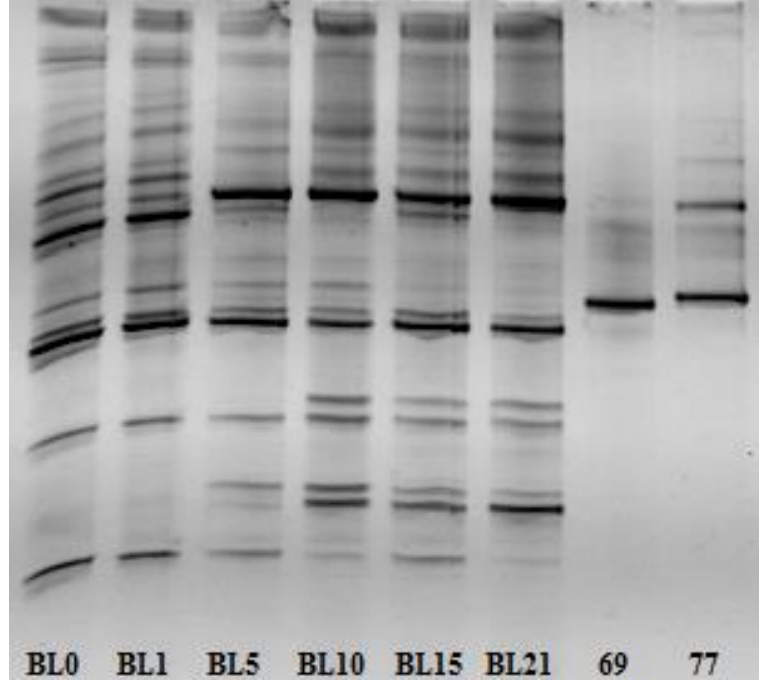
Şekil 3.13 :A tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili. 69 ve 77: *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarını temsil etmektedir.



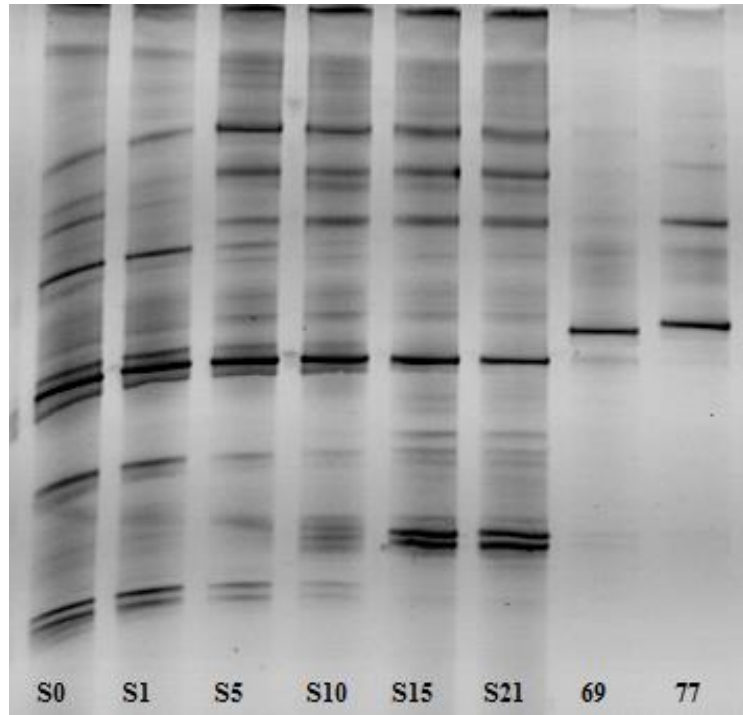
Şekil 3.14 : B tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili. 69 ve 77: *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarını temsil etmektedir.



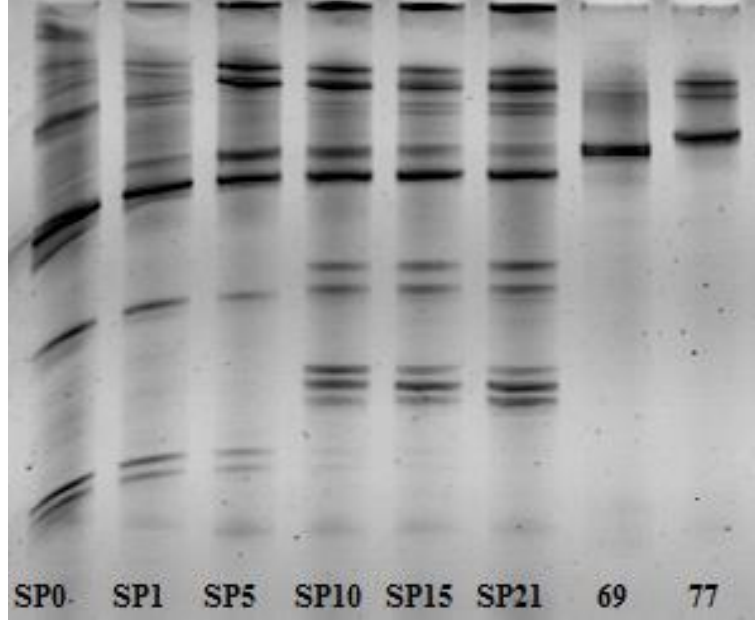
Şekil 3.15 :BP tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili. 69 ve 77: *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarını temsil etmektedir.



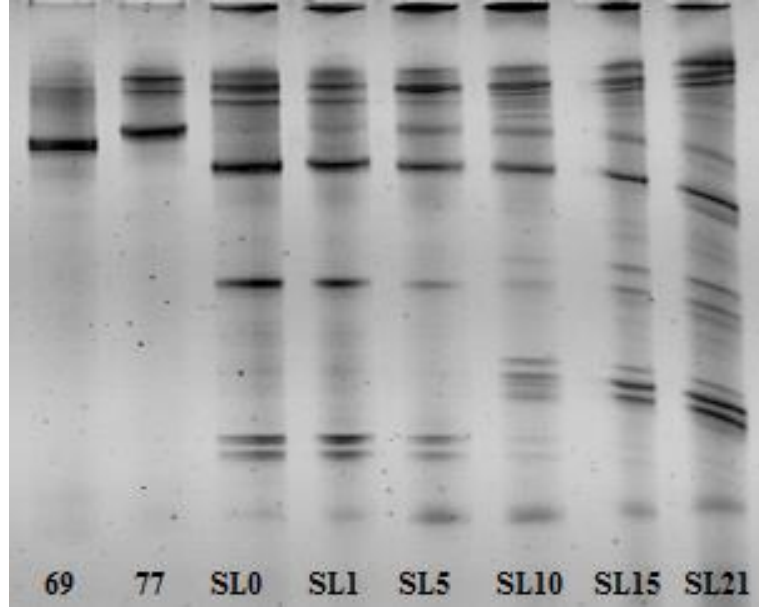
Şekil 3.16 :BL tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili. 69 ve 77: *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarını temsil etmektedir.



Şekil 3.17 :S tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili. 69 ve 77: *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarını temsil etmektedir.



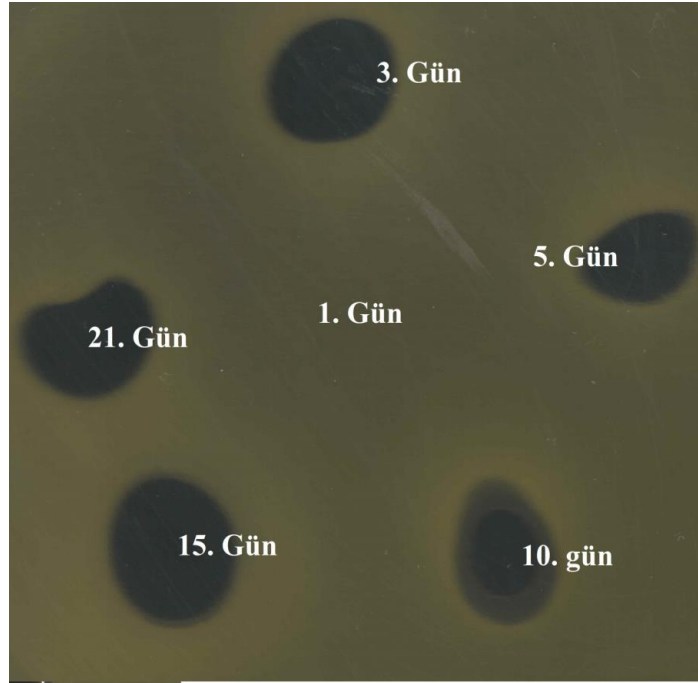
Şekil 3.18 :SP tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili. 69 ve 77: *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarını temsil etmektedir.



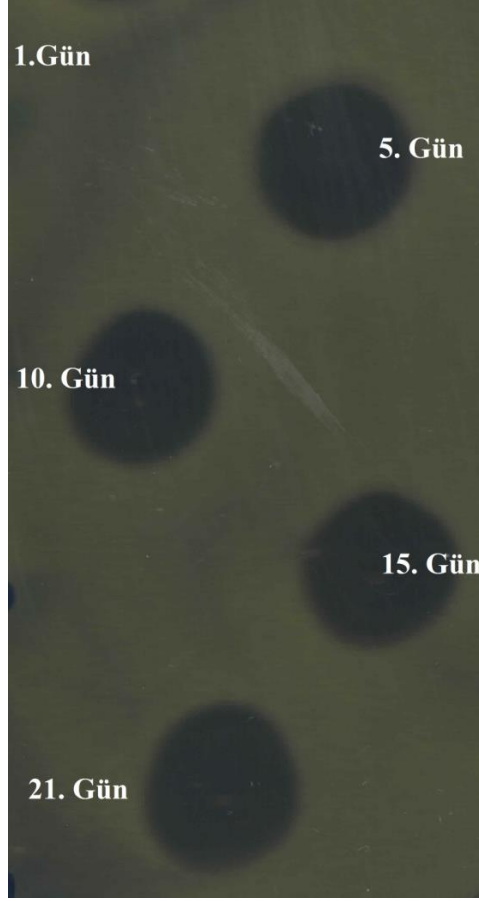
Şekil 3.19 :SL tarhana hamuru örneğinin 0, 1, 5, 10, 15 ve 21. günlerdeki DGGE profili. 69 ve 77: *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarını temsil etmektedir.

### 3.8 Tarhana hamur örneklerinde bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesi

Tarhana hamuru örneklerinin farklı fermantasyon günlerinde alınan numunelerin 10 gr'dan ekstrakte edilen bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesi *M. luteus* NCIMB suşuna karşı agar üzerinde denenmiş ve antimikrobiyal aktiviteye ait zonlar Şekil 3.20'de gösterilmiştir. BL hamurundan alınan örneklerde 1. gün aktivite zonu alınmazken 3. günden itibaren 5., 10., 15. ve 21. günlerde aktivite zonu tespit edilmiştir. SP hamurunda ise 5. günden itibaren aktivite zonu elde edilmiş ve 10., 15. ve 21. günlerde antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir (Şekil 3.21). Bu sonuçlar mikrobiyoloji ve DGGE analizlerinden elde edilen sonuçları desteklemektedir. Her iki suşun 5. günden sonra hamur ortamında tespit edilebilir düzeyde bakteriyosin üretebildikleri anlaşılmıştır.



Şekil 3.20 : Farklı fermantasyon günlerinde BL Tarhana hamurundan ekstrakte edilen bakteriyosinlerin *M. luteus* NCIMB suşuna karşı antimikrobiyal etkisi



Şekil 3.21 : Farklı fermantasyon günlerinde SP Tarhana hamurundan ekstrakte edilen bakteriyosinlerin *M. luteus* NCIMB suşuna karşı antimikrobiyal etkisi



#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada tarhana hamuru fermentasyonundan izole edilmiş ve moleküler düzeyde tanımlanmış (Özel, 2012) iki farklı suşta (*P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77) bakteriyosin üretimi ve karakteristikleri belirlenmiş, ardından bu suşların tarhana üretiminde kullanılması ile bazı patojen bakteriler (*S. aureus* ATCC29213 ve *B. cereus* ATCC11778) üzerindeki antimikrobiyal etkinliği in vivo koşullarda araştırılmıştır.

Bu çalışmayla birlikte tarhana fermantasyonundan bakteriyosin üreticisi laktik asit bakterilerin karakterizasyonu ilk defa başarılmıştır. Son yıllarda bakteriyosinler veya bakteriyosin üreticilerinin gıdalarda kullanımı tüketici ve ürün güvenliğinin sağlanması için alternatif doğal muhafaza yollarından birisi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışma ile bakteriyosin üreticileri olarak belirlenen *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşları yüksek üretim yetenekleri ve özgül antimikrobiyal etkinlikleri dolayısıyla başta tarhana olmak üzere bir çok fermente gıda için biyokoruyucu starter kültür niteliği taşımaktadır. Özellikle söz konusu suşların, tarhana hamuru ortamından izole edilmesinden dolayı, beslenme için oldukça önemli olan çeşitli fermente tahıl ürünlerin hazırlanmasında kullanılabilecek öneme sahiptir. Önerilebilecek kullanım alanlarından birisi taze tarhana üretimidir. Böylece özellikle son zamanlarda giderek yaygınlaşan taze tarhana tüketimi esnasında oluşabilecek olumsuz mikrobiyolojik vakaların önüne geçilebilecektir. Diğer taraftan aynı suşlar ekşihamur ekmeğinin üretiminde de kullanılarak, güvenli ekmek üretimine katkı sağlanabilecektir.

Bakteriyosinler ve bakteriyosin üreticileri gıda alanında olduğu kadar medikal alanda terapötik ajanlar olarak da önem kazanmaya başlamıştır. Çalışma kapsamında karakterize edilen pediosin üreticisi *P. acidilactici* PFC69 suşunun VRE'ler üzerinde yüksek seviyede antimikrobiyal aktiviteye sahip bulunması bu yönde oldukça önemli bir bulgudur. Bu bakterinin gelişme ortamından saflaştırılacak pediosin kullanılarak medikal alanda yüksek ilaç dirençliliğe sahip enterokokların engellenmesi mümkün hale gelebilir. Böylece yüksek dozda antibiyotik kullanımının engellenmesi yönünde katkı sağlanacaktır..

Çalışmada belirlenen nisin üreticisi *L. lactis* PFC77 suşunun başka bir bakteriyosine ait genetik determinatı da içermesi ancak bunun aktif olmaması ilginç bir sonuçtur.

Nitekim bu suşta genetik düzenleme ile bu determinatlarda tespit edilen/edilecek mutasyonların onarılması durumunda, söz konusu bakteriyosin üretimi aktif hale getirilebilecektir. Dolayısıyla iki farklı türde bakteriyosin üretebilen yeni bir varyant elde edilebilecektir. Böylece *L. lactis* PFC77 suşunun antimikrobiyal etkinliği daha fazla geliştirilecektir. Bu durum özellikle gerek nisine direnç kazanmış gerekse de nisinin antimikrobiyal aktivitesi bulunmayan bakterilerin engellenmesi açısından avantaj sağlayacaktır.

Bu çalışmada elde edilen diğer önemli sonuçlardan birisi, bakteriyosin üreticilerinin tarhana model sisteminde çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin belirlenebilmesidir. Çünkü gıda sistemleri oldukça komplekstir. Ayrıca çalışmada kullanılan DGGE sistemi ile *P. acidilactici* PFC69 ve *L. lactis* PFC77 suşlarının fermentasyon ortamında stabilitelerini sağlayabildikleri izlenebilmiştir. Hatta eşzamanlı olarak tarhanadan yapılan bakteriyosin ekstraksiyonları ile bakteriyosin üretimi de takip edilebilmiştir. Bu sonuçlar tarhana üretiminde risk oluşturabilen *B. cereus* ATCC11778 ve *S. aureus* ATCC29213 gibi patojen bakterilerin engellenmesinde bakteriyosinlerin ve bakteriyosin üreticilerinin iyi birer silah olduğunun ispatıdır.

## KAYNAKLAR

- Albano, H., Todorov, S.D., van Reenen, C.I.A., Hogg, T., Dicks, L.M.T. and Teixeira, P.** 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*. 116:239–247
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filioussis, G., Ambrosiadis, I. and Koidis, P.** 2008. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technology*. 99:5384–5390.
- Andersson, R.**, 1989. Food Processing, Lactic Acid Bacteria in the Production of Food, SIK- Publication. *Food Laboratory Newsletter*. 14: 17-21.
- Anonim**, 1981. TS 2282 Tarhana Standardı, *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara
- Anonim**, 2000, *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Anonim**,  
*Sigma&Aldrich*, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/SpecificationSheetPage/SIGMA/B2176>. 2007.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I.F.**, 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1676-1682.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R.**, 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1808-1815.
- Bauer, R., Chikindas, M.L. and Dicks, L.M.T.** 2005. Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *International Journal of Food Microbiology*. 101:17– 27.
- Beasley, S. S. and Saris, P. E. J.** 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5051-5053.
- Beukes, M., Bierbaum, G., Sahl, H.G. and Hastings, J.W.**, 2000. Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:23-28.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B.** 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal Of Appl. Bacteriol.* 65(4):261-8.
- Bierbaum, G. and Sahl, H.G.**, 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol.* 10(1):2-18.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S.S., Cantero, D. and Webb, C.**, 2003. Cereal-based fermented foods and beverages, *Food Research Int.* 36(6): 527-543.

- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. and van der Donk, W. A.** 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.* 105; 633-683.
- Chen, H. and Hoover, D.G.** 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comp. Review in Food Sci. And Food Safe.* Vol.2:82-100.
- Chen, Y., Ludescher, R.D. and Montville, T.J.** 1997. Electrostatic Interactions, but Not the YGNGV Consensus Motif, Govern the Binding of Pediocin PA-1 and Its Fragments to Phospholipid Vesicles. *Applied and environmental microbiology.* 4770–4777
- Choi, H.J., Cheigh, C.I., Kim, S.B. and Pyun, Y.R.** 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis subsp. lactis* A164 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology.* 88; 563-571.
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. and Hernández, P.E.** 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International.* 7: 281.
- Cintas, L.M., Rodriguaz, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernandez, P.E. and Holo, H.** 1995. Isolation and characterization of Pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Applied and Environmental Microbiol.* 2643-2648.
- Coşkun, F.** 1996. *Trakya' nın değişik yörelerinde üretilen ev tarhanalarının kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal özellikleri üzerine bir araştırma*, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews of Microbiology.* 3: 777-788.
- Cuesta, M.C.M., Kok, J., Herranz, E., Pelaez, C., Requena, T. and Buist, G.** 2000. Requirement of Autolytic activity for bacteriocin induced lysis. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69; 3174-3179.
- Çelik, İ., Işık, F., Şimşek, Ö. and Gürsoy, O.** 2005. The Effects of the Addition of Baker's Yeast on the Functional Properties and Quality of Tarhana, a Traditional Fermented Food, *Czech. J. Food Sci.* 23:5, 190–195.
- Çon, A. H.** 1995. *Sucuktan Bakteriosin- Benzeri Antimikrobiyal Metabolit Üreten Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu ve Çeşitli Gıda Zararlısı ve/veya Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilere Karşı Antagonistik Aktivite Araştırılması.* Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum. 78s.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P.D. and Hill, C.** 2012. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology.* 153:58–65.
- Davey, G.P.** 1984. Plasmid associated with diplococin production in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 48; 895-896.
- Davies, E. A., Bevis, H. E., Potter, R., Haris, J., Williams, G. C. and Delves-Broughton, J.** 1998. The effect of pH on the stability of the nisin solution during autoclaving. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 186-187.
- De Vuyst and L. Leroy, F.** 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 13:194–199.

- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J.** 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* properties, biosynthesis, fermentation and applications. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. London: Chapman and Hall. pp. 165-167.
- Delgado, S. and Mayo, B.** 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 90:309-319.
- Delves-Broughton, J. Blackburn, P., Evans, R.J. and Hugenholtz, J.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 69(2):193-202.
- Desriac, F., Defer, D., Bourguignon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P. and Fleury, Y.** 2010. Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria Warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Mar. Drugs.* 8:1153-1177
- Devi, S.M. and Halami, P.M.** 2011. Detection and Characterization of Pediocin PA-1/AcH like Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria. *Curr Microbiol.* 63:181-185.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C.** 2012. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Applied and Environmental Microbiology.* 78(1):1-6.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M. and Prevost, H.,** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 564-582.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B. and Nes, I.F.** 1998. Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Applied and environmental microbiology.* 3275-3281.
- Elegado, F.B., Kim, W.J. and Kwon, D.Y.** 1997. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin ACM, from *Pediococcus acidilactici* M. *International Journal of Food Microbiology.* 37:1-11.
- Elicevik, S. Ucar, F. and Yalcın, H.T.,** 2008. Gıda Kökenli *Bacillus cereus* Strainlerinin Bakteriyosin Üretme Kapasitelerinin Araştırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi.* 06(3):25-38.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A.,** 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 705-716.
- Erbaş, M., Certel, M. and Uslu, M. K.,** 2005. Microbiological and chemical properties of tarhana during fermentation and storage as wet sensorial properties of tarhana soup. *Swiss Society of Food Science and Technology,* 38, 409-416.
- Foschino, R., Arrigani, C., Picozzi, C., Mora, D. and Gali, A.** 2001. Phenotypic and genotypic aspects of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdough in Italy. *Food Microbiol.* 18; 277-285.
- Franz, C.M. A. P., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U. and Holzapfel, W. H.** 1997. Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J. Basic. Microbiol.,* 37; 197-196.
- Gálvez, A. Abriouel, H. López, R. L. and Omar, N. B.,** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International J of Food Microbiol.* 120:51-70.

- Gökalp, H. Y.**, 1982. Değişik Olgunlaşma Sıcaklıklarında Farklı Starter Kültürleri Uygulayarak Türk Tipi Sucuk Üretimi, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü, Erzurum, 178 s.
- Graeffe, T., Rintala, H., Paulin, L. and Saris, P.** 1991. A natural nisin variant. In Nisin and Novel Lantibiotics. G. Jung and H. –G. Sahl, ed. (Leiden: ESCOM Science Publishers B.V.), pp. 260-268.
- Gross, E. and Morell, J. L.** 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* 93; 4634-4635.
- Gülbandılar, A.** 2009. Kütahya yöresinde burun mukozasındaki *S. aureus* taşıyıcılığının ve antibiyotik duyarlılığının araştırılması. *DPÜ Fen Bilimleri Dergisi*.18:1-6.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B. and Lotfipour, F.** 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 113:723-736.
- Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E.**, 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology*. 173: 7491-7500.
- Hayta, M., Alpaslan, M. and Baysar, A.**, 2002. Effect of drying methods on functional properties of tarhana: a wheat flour-yogurt mixture, *J. Food Sci.* 67: 740–744
- Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y.**, 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology* 138: 2725-2731.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L. and Van Wasserman, P.D.**, 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 295: 5-12.
- Heng, N.C.K., Wescobre, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W. and Tang, J.R.**, 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In Bacteriocins: Ecology and Evolution, Edited by M.A. Riley, M.A. Chavan, Springer, Berlin, 39-63p.
- Hill, C., Nes, I.N. and Ross, R.P.** 2011. Bacteriocins. *The 10th LAB Symposium: Thirty years of Research on Lactic acid bacteria*, August 28-September, 2011, Netherlands, 37-56p.
- Hurst, A.** 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27; 85-123.
- Ishibashi, N., Himeno, K., Fujita, K., Masuda, Y., Perez, R.H., Zendo, T., Wilapun, P., Watcharamas, V.L., Nakayama, J. and Sonomoto, K.** 2012. Purification and characterization of multiple bacteriocins and a inducing peptide produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 from Thai Fermented Fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*76:947-953.
- İbanoglu, Ş., İbanoglu, E. and Ainsworth, P.** 1999. Effect of different ingredients on the fermentation activity in tarhana. *Food Chem.*64 (1), 103-106.
- İbanoğlu, Ş. and İbanoğlu, E.**, 1999. Rheological properties of cooked tarhana, a cereal-based soup. *Food Research International*. 32:29-33.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B.** 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59; 171-200.

- Jamuna, M. and Jeevaratnam, K.,** 2004. Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(4):433-9.
- Jimenez, M.A, Barrachi-Saccilotto, A.C., Valdivia, E., Maqueda, M. and Rico, M.,** 2005. Design, NMR characterization and activity of a 21-residue peptide fragment of bacteriocin AS-48 containing its putative membrane interacting region. *Journal of Peptide Science* 11: 29-36.
- Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R.,** 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology* 167: 439-446.
- Jozala, A. F., Novaes, L. C. L., Cholewa, O., Moraes, D. and Penna, T. C. V.** 2005. Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *African J. Biotechnol.* 4, 262-265.
- Jung, G.** 1991. Lantibiotics: a survey. In: Nisin and novel lantibiotics. Editors: Jung, G. and Sahl, H-G. Pages 1-34. ESCOM Science Publishers, Leiden, the Netherlands.
- Juven, B.J., Meinersmann, R.J. and Stern, N.J.,** 1991. Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 70(2):95-103.
- Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P. and Vederas, J.C.,** 2003. Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *Journal of the American Chemical Society* 125: 4726-4727.
- Klaenhammer, T.R.,** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:39-85.
- Koca, A.F., Yazici, F. and Anil, M.,** 2002. Utilization of soy yoghurt in tarhana production, *Eur Food Res Technol.* 215, 293-297.
- Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, W.T.** 1978. Lacto-streptocins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. *Journal of Dairy Research* 45: 247-257.
- Kwaadsteniet, M.D., Doeschate, K.T. and Dicks, L.M.T.,** 2008. Characterization of the Structural Gene Encoding Nisin F, a New Lantibiotic Produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolate from Freshwater Catfish (*Clarias gariepinus*). *Applied and environmental microbiology.* 547-549.
- Lacumin, L., Cecchini, F., Manzano, M., Osualdini, M., Boscolo, D., Orlic, S. and Comi, G.,** 2009. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods, *Food Microbiology* 26: 128-135.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Liu, W. and Hansen, J. N.** 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56; 2551-2558.

- Macwana, S.J. and Muriana, P.M.** 2012. A 'bacteriocin PCR array' for identification of bacteriocin-related structural genes in lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*.88:197–204.
- Malik, R.K., Kumar, N., Nageswara, R.K. and Mathur, D.K.** 1994. Bacteriocins-Antibacterial Proteins of LAB: A Review. *Microbiologie-Aliments Nutrition.*, Vol 12; 117-132.
- Mandal, V., Sen, S.K. and Mandal, N.C.** 2011. Isolation and Characterization of Pediocin NV 5 Producing *Pediococcus acidilactici* LAB 5 from Vacuum-Packed Fermented Meat Product. *Indian J. of Microbiol.*51(1):22–29.
- Margaret A., Wertz, R. and John, E.** 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:117-137.
- Martinez, B., Fernandez, M., Suarez, J.E. and Rodriguez, A.** 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid encoded bicistronic operon. *Microbiology* 145; 3155-3161.
- Martin-Visscher, L.A., Gong, X.D., Duszyk, M. and Vederas, J.C.,** 2009. The three-dimensional structure of Carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 28674-28688.
- Marx, R., Stein, T., Entian, K.D. and Glaser, S.J.,** 2001. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by 1H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry* 20: 501-506.
- Mayra- Makinen, A. and Bigret, M.,** 1993. Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. Lactic Acid Bacteria, ed. Salminen, S. and von Wright, A., Marcel Dekker Inc. , New York, 65-96 s.
- Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Guhring, H., Vertesy, L., Wink, J., Hoffmann, H., Bronstrup, M., Sheldrick, G.M. and Sussmuth, R.D.,** 2010. Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics. *Angewandte Chemie International Edition* 49: 1151-1154.
- Meroth, C.B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M.J. and Hammes, W.P.,** 2003. Monitoring the Bacterial Population Dynamics in Sourdough Fermentation Processes by Using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, *Appl. and Environ. Microbiol.* 475–482.
- Miambi, E., Guyot, J. P. and Ampe, F.,** 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture independent methods, *Int. J. Food Microbiol.* 82: 111–120.
- Miller, K.W., Chamber, R., Osmağaoğlu, O. and Ray, B.** 1998. Isolation and Characterization of Pediocin AcH Chimeric Protein Mutants with Altered Bactericidal Activity. *Applied and environmental microbiology.* 1997-2005.
- Millette, M., Dupont, C., Archambault, D. and Lacroix, M.** 2006. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology.*102:274–282.



- Mills, S., Serrano, L.M., Griffin, C., O'Connor, M.P., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, R.P. and Meijer, W.C., 2011. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG p-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Microbial Cell Factories*.10(1):S7.
- Mitra, D., Pometto, A.L., Khanal, S.K., Karki, B., Brehm-Stecher, B.F. and van Leeuwen, J. 2010. Value-Added Production of Nisin from Soy Whey. *Appl Biochem Biotechnol*.162:1819–1833.
- Mitra, S., Chakrabarty, P.K. and Biswas, S.R. 2005. Production and Characterization of Nisin-Like Peptide Produced by a Strain of *Lactococcus lactis* Isolated from Fermented Milk. *Current Microbiology*. Vol. 51:183–187.
- Mogi, T. and Kita, K., 2009. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cellular and Molecular Life Science* 66: 3821-3826.
- Moreno, F.M.R., Callewaert, R., Devreese, B., van Beeumen, J. and de Vuyst, L. 2003. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 214-229.
- Motlagh, A. M., Johnson, M. C. and Ray, B. 1991. Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Prot.*, 54; 873-878.
- Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. and de Vos, W.M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201; 581-584.
- Nakamura, K., Arakawa, K., Kawai, Y., Yasuta, N., Chujo, T., Watanabe, M., Ioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitawaza, H., Tsurumi, K. and Saito, T. 2013. Food preservative potential of gassericin A-containing concentrate prepared from cheese whey culture supernatant of *Lactobacillus gasseri* LA39. *Animal Science Journal*. 84:144-149.
- Nes, I. F., Holo, H., Gunnar Fimland, Håvard Hildeng-Hauge, and Nissen-Meyer, J. 2001. Unmodified peptide-bacteriocins (Class II) produced by lactic acid bacteria. In: Peptide Antibiotics. Eds. Dutton, Haxell, McArthur & Wax. Marcel Decker, pp. 81-115, Inc. New York.
- Nes, I.F. and Tagg, J.R. 1996. Novel lantibiotics and their pre-peptides. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69; 89-97.
- Nes, I.F., Yoon, S. and Diep, D.B., 2007. Ribozomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology* 16 (5): 675-690.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.C., Sacristan-Perez-Minayo, G., Gutierrez-Fernandez, A.J. and De La Torre, A.H., 2010. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control* 21: 679-685.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H.S. and Kristiansen, P.E., 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10: 19-37.

- O'sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C.** 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593-604.
- Oguntoyinbo, F. A., and Dodd, C. E. R.,** 2010. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in gari production, *Food Control* 21: 306-312.
- Olasupoa, N.A., Schillingerb, U., Narbadc, A., Doddc, H. and Holzapfel, W.H.**1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from *wara*, a traditional Nigerian cheese product. *International Journal of Food Microbiology*. 53.141–152.
- Oscariz, J.C. and Pisabarro, A.G.,** 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram positive bacteria. *International Microbiology* 4: 13-19.
- Özel, S.,** 2012. Tarhana Hamuru Fermantasyonunun Mikrobiyal Yapısı ve Taksonamik Dinamiğinin Belirlenmesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Denizli.
- Pag, U. and Sahl, H.G.,** 2002. Multiple activities in lantibiotics—models for the design of novel antibiotics? *Current Pharmaceutical Design* 8: 815-833.
- Papagianni, M. and Anastasiadou, S.,** 2009. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories* 8 (3): 1-16.
- Papagianni, M.,** 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advance* 21: 465-499.
- Parente, E. and Ricciardi, A.** 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52; 628-638.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A. and Owen, R.J.,** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate, *Lett. Appl. Microbiol.* 8:151–156.
- Quadri, L.E.N., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., De vos, W.M., Roy, K., Vederas, J.C. and Stiles, M.E.**1997. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicolalv17b* involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *Journal of bacteriology*. 6163–6171.
- Rea, M.C., Ross, R.P., Cotter, P.D. and Hill, C.,** 2011. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In Prokaryotic antimicrobial peptides from genes to applications, Edited by D. Drider, S. Rebuffat, Springer, USA, 29-53p.
- Ross, P.R., Morgan, S. and Hill, C.,** 2002. Preservation and Fermentation: Past, Present and Future, *Int. J. of Food Microbiol.* 79:3-16.
- Saavedra, L. and Sesma, F.** 2011. Purification techniques of bacteriocins from lactic acid bacteria and other gram-positive bacteria. Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. Chapter 7:99-115.

- Salminen, S., Von Wright, A. and Ouwehand, A.**, 2006. Lactic Acid Bacteria, *Int. Dairy J.* 16: 940-941.
- Sánchez, M. M., Delgado, T., Alonso, L. and Baltasar, M.**, 2000. Phenotypic and Genetic Characterization of a Selected Set of *Lactococcus lactis* Strains Isolated from a Starter-Free Farmhouse Cheese, *Food Microbiol.* 17: 449-460.
- Sarika, A. R., Lipton, A. P., Aishwarya, M. S. and Dhivya, R. S.** 2012. Isolation of a Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* and Application of Its Bacteriocin to Manage Spoilage Bacteria in High-Value Marine Fish Under Different Storage Temperatures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167:1280–1289.
- Sawa, N., Koga, S., Okamura, K., Ishibashi, N., Zendo, T. and Sonomoto, K.** 2013. Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98. *Journal of Applied Microbiology.* 115:61-69.
- Schagger, H and von Jagow, G.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry.*, 166; 368-379.
- Schlegel, H. G., 1986.** J. General Microbiol., Cambridge University Press, Cambridge, 587s.
- Schnell, N., Entian, K. –D., Schneider, U., Götz, F., Zahner, H., Kellner and Jung, G.** 1988. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide rings. *Nature*, 333; 276-278.
- Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y. and Juven, B.J.** 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by t.J. *Appl. Bacteriol.* 74(1):67-77.
- Settanni, L., Tanguler, H., Moschetti, G., Reale, S., Gargano, V. and Erten, H.,** 2011. Evolution of fermenting microbiota in tarhana produced under controlled technological conditions, *Food Microbiol.* 28: 1367-1373.
- Sharpe, M. E., Fryer, T. F. and Smith, D. G.,** 1966. Identification of the Lactic Acid Bacteria, ed. Gibbs, B.M. and Skinner, F.A., Academic Press, New York, 245s.
- Shin, M.S., Han, S.K., Ryu, J.S., Kim, K.S., Lee, W.K.** 2008. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology.* 105:331–339.
- Siegers, K., Heinzmann, S. and Entian, K.D.,** 1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modifications of its prepeptide occurs at a multimeric membrane associated lanthionine synthetase complex. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 12294-12301.
- Simha, B.V., Sood, S.K., Kumariya, R. and Garsa, A.K.,** 2012. Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiological Research.* 167:544-549.
- Simmonds, R.S., Simpson, W.J. and Tagg, J.R.,** 1997. Cloning and sequence analysis of zooA, a *Streptococcus zooepidemicus* gene encoding a

bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin. *Gene* 189: 255-261.

- Soomro, A.H., Masud, T. and Anwear, K.,** 2002. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health-AReview, *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1): 20-24.
- Soyyigit, H.**2004. Isparta ve Yöresinde Üretilen Ev Yapımı Tarhanaların Mikrobiyolojik ve Teknolojik Özellikleri, SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Strasser de Saad, A.M., Pasteris, S.E.and Manca de Nadra, M.C.** 1995. Production and stability of pediocin N5p in grape juice medium. *J. Appl. Bacteriol.* 78(5):473-6.
- Sullivan, A. and Nord, C.E.** 2005. Probiotics and gastrointestinal diseases. *J. of Int. Medicine*, 257; 78-92.
- Şahin, İ.,** 1990. Mikrobiyolojiye Giriş. Eser Matbaası, Samsun, 237s.
- Şengün, İ. Y., Nielsen, D. S., Karapınar, M. and Jakopsen, M.,** 2009. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Tarhana, A Traditional Turkish Fermented Food, *Int. J. Food Microbiol.* 135: 105–111.
- Tagg, J.R. and McGiven, A.R.** 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, 21; 943.
- Takala, T. M. and Saris, P. E. J.** 2007. Nisin: Past, present and future. In Research and Applications of Bacteriocins, M. A. Riley, and O. Gillor, ed. Horizon Bioscience pp. 181-213.
- Tarakçı, Z., Dogan, I. S. and Koca, A. F.,** 2004. A traditional fermented Turkish soup, Tarhana , formulated with corn flour and whey, *Int. J. Food Science & Tech.* 39: 455–458.
- Temiz, A. and Pirkul, T.,** 1991. Farklı Bileşimlerde Üretilen Tarhanaların Kimyasal ve Duyusal Özellikleri, *Gıda* 16: 1, 7-13.
- Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J.,** 2004. Identification of Lactic Acid Bacteria: Culture-Dependent and Culture-Independent Methods, *Trends in Food Science & Tech.* 15: 348-359.
- Tichaczek, P.S., Nissenmeyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F.and Hammes, W.P.,** 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin a from *Lactobacillus curvatus* Lth1174 and sakacin-P from *Lb. sake* Lth673. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 460-468.
- Tu, R. J., Wu, H. Y., Lock, Y. S. and Chen, M. J.,** 2010. Evaluation of microbial dynamics during the ripening of a traditional Taiwanese naturally fermented ham, *Food Microbiol.* 27: 460-467.
- Tunail, N. and Köşker, Ö.** (1989) Süt Mikrobiyolojisi, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 138 s.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B.and Hill, C.,** 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. In Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, Edited by R.J. Sizezen, J. Kok, T. Abee, G. Schaafsma, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 165-185p.

- Upreti, G.C. and Hinsdill, R. D.** 1975. Production and Mode of Action of Lactocin 27: Bacteriocin from a Homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 139-145.
- Uteng, M., Hauge, H.H., Markwick, P.R.L., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J. and Muhle-Goll, C.** 2003. Three-Dimensional Structure in Lipid Micelles of the Pediocin-like Antimicrobial Peptide Sakacin P and a Sakacin P Variant That Is Structurally Stabilized by an Inserted C-Terminal Disulfide Bridge. *Biochemistry*. 42:11417-11426.
- Valdes-Stauber, N. and Scherer, S.**, 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3809-3814.
- Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G.** 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55; 1187-1191.
- Van Belkum, M.J., Martin-Visscher, L.A. and Vederas, J.C.**, 2011. Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology* 19(8): 411-418.
- Van Der Meulen, R., Scheirlinck, I., Schoor, A. V., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P. and Vuyst, L. D.**, 2007. Population Dynamics and Metabolite Target Analysis of Lactic Acid Bacteria during Laboratory Fermentations of Wheat and Spelt Sourdoughs, *Appl. and Environ. Microbiol.* 73/15, P: 4741-4750.
- Wescombe, P.A., Upton, M., Dierksen, K.P., Ragland, N.L., Sivabalan, S., Wirawan, R.E., Inglis, M.A., Moore, C.J., Walker, G.V., Chilcott, C.N., Jenkinson, H.F. and Tagg, J.R.**, 2006. Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1459-1466.
- Wiley, J.M. and Van der , W.A.**, 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Reviews of Microbiology*, 61: 477-501.
- Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R. W. and Tagg, J. R.** 2006. Molecular and genetic characterisation of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72; 1148-1156.
- Wu, C., Yin, L. and Jiang, S.** 2004. Purification and Characterization of Bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *J. Agric. Food Chem.* 52:1146-1151.
- Yin, L., Wu, C. and Jiang, S.** 2003. Bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* L and S from Pork Meat. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1071-1076
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K.** 2003. Identification of the lantibiotic nisinQ, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67; 1616-1619.



## **ÖZGEÇMİŞ**

**Ad Soyad:** Halil İbrahim KAYA

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Demirci 11.06.1988

**Adres:** Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

**Lisans Üniversite:** Selçuk Üniversitesi

### **Yayın Listesi:**

Simsek, O., Kaya, H.I., Sabanoğlu, S., Con, A.H. 2011. International Congress on Food and Nutrition and International Congress on Food Safety. Poster Presentation. İstanbul, Turkey.