ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lactobacillus pentosus OZ-1C SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU

Tülay Pehlivan

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2007

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Lactobacillus pentosus OZ-1 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU

Tülay PEHLİVAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Bu çalışmada *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin biyokimyasal testlerin kullanımı ile karakterize edilmiştir. pH 7 ile nötralizasyon, katalaz ve DNaz ile muamele ve otoklavlanma işlemi neticesinde aktivitesini kaybetmediği için her bir suş tarafından üretilen ve burada rapor ettiğimiz antimikrobiyal aktivitenin organik asit, hidrojen peroksit veya bakteriyofajdan kaynaklanma olasılığı ortadan kaldırılmıştır. Proteolitik enzimlerle muamele neticesinde antimikrobiyal etkinin yok olması hücre dışına sentezlenen bu aktif maddenin yapısal olarak protein olduğunu göstermiştir. Her bir izolat tarafından üretilen antimikrobiyal madde gıda bozulmaları ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan geniş bir spektrumdaki Gram-pozitif bakterilere karşı etki göstermektedir. Bununla beraber; test edilen Gram-negatif bakterilere karşı her hangi bir inhibisyon aktivitesi gözlenmemiştir. Peptit yüksek sıcaklıkta (121°C /15 dk) ve geniş bir pH aralığında (pH 3-9/ 37°C de 2 saat) aktivitesini sürdürmektedir. Bu çalışmada izole edilen LAB tarafından üretilen bakteriyosin, geniş bir aktivite spektrumuna sahip olduğu ve protein yapısında olduğu için gıdalarda bozulmalara sebep olan bakterilerin ve gıda kökenli fırsatçı patojenlerin gelişimlerini kontrol edebilmek için biyolojik bariyer görevi görebilecek potansiyele sahiptir.

2007, 31 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterisi, *Lactobacillus pentosus*, bakteriyosin, karakterizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN PRODUCED BY *Lactobacillus pentosus* OZ-1C

Tülay PEHLİVAN

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

In this study, the bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* OZ-1C was characterized by use of biochemical tests.The antimicrobial activities of each strain reported here was not due to organic acids, hydrogen peroxide or bacteriophage as the heated cell-free media remained active following neutralization to pH 7.0, treatment with catalase and DNase or autoclaving. The loss of antimicrobial activity following treatment with proteolytic enzymes indicated that in each strain, active component secreted extracellulary was proteinaceous in nature. The inhibitory substance of each isolate was shown to be active over a wide range of Gram-positive bacteria, many of which are associated with food spoilage and food related health hazards. However, no activity was noticed against any of Gram-negative bacteria tested. The peptide of each strain was found to be remain stable after high temperature treatment (121°C /15 minutes) and at a relatively low pH. Bacteriocins retained their biological activity after exposure to pH values of 3-9 when kept at 37°C for 2 h. The antimicrobial activity of the bacteriocins produced by the LAB isolated in this work could act as a potential biological barrier to inhibit the growth of spoilage bacteria and foodborne pathogens associated with foods since they have a wide range of activity spectrum and are protein in nature.

2007, 31 pages

Key Words: Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus pentosus*, bacteriocin, characterization

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Sn. Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU, laboratuar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. Fadime KIRAN'a ve laboratuarda çalışan tüm arkadaşlarıma, yüksek lisans tezim süresince maddi ve manevi destekleri için annem Fatma CİHAN ve ablam Tülin Pınar BAYATLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tülay PEHLİVAN
Ankara, Aralık 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET .. …….…….....i

ABSTRACT……..……..ii

TEŞEKKÜR……...……...……iii

SİMGELER DİZİNİ……...……..…….……...vi

ŞEKİLLER DİZİNİ……...……..……....vii

ÇİZELGELER DİZİNİ……....…….....viii

1. GİRİŞ…...……..…...1

2. KAYNAK ÖZETLERİ……..……..……3

2.1 Laktik Asit Bakterileri .....…….....……...……3

2.1.1 *Lactobacillus*.....…….……..……..……4

2.2 Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyosin Üretimi…....…….....……5

2.2.1 LAB tarafından üretilen Bakteriyosinlerin genel özellikleri.……8

2.2.2 LAB tarafından üretilen Bakteriyosinlerin etki mekanizması.….……9

3. MATERYAL ve YÖNTEM….….…….…….....11

3.1 Materyal…..….……...…11

3.1.1 Bakteri Kültürleri.……...…….…….…….....11

3.1.2 Besiyerleri……...…….…...…11

3.1.3 Kimyasallar…….……...…….…….....11

3.1.4 Kullanılan solüsyon ve malzemelerin sterilizasyonu ……....…….....11

3.1.5 Bakteri kültürlerinin saklanması…...……..…….…….....11

3.2 Yöntem…….……...…12

3.2.1 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin hazırlanması ……...12

3.2.2 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite ünitesi ...……...…..…….……..12

3.2.3 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu... ……...……...12

3.2.4 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin sıcaklık direnci ……...……..……13

3.2.5 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerine bazı organik çözücülerin etkisi ……..…….13
3.2.6 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerine bazı enzimlerin etkisi…….……...…….13
3.2.7 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin pH stabilitesi …….....……14
4. BULGU…….…….....15
4.1 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite ünitesi…….…….15
4.2 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu.....……..……..15
4.3 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin sıcaklık direnci …….……..……15
4.4 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerine bazı organik çözücülerin etkisi……....….15
4.5 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerine bazı enzimlerin etkisi……...……..18
4.6 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin pH stabilitesi ….....……...……...……..18
5. TARTIŞMA ve SONUÇ……..…20
KAYNAKLAR……...… ……...……...22
EKLER……..…… ……..…….....27
EK 1 Bakteri izolasyonunda ve gelişimlerinde kullanılan kültür ortamları.28
EK 2 Kimyasal maddeler ...……...……..….30
ÖZGEÇMİŞ.....31

SİMGELER DİZİNİ

Ala	Alanin
ATP	Adenozin trifosfat
AU	Aktivite ünite
C	Sitozin
CFS	Cell free supernatant
dk	Dakika
G	Guanin
gr	Gram
HCI	Hidroklorik asit
LAB	Laktik asit bakterisi
lt	Litre
M	Molarite
ml	Mililitre
MRS	de Man Rogosa and Sharpe Broth
µ	Mikro
µl	Mikro litre
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TGE	Tripton Glukoz Yeast Ekstrakt

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 4.1 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriosinin indikatörlere karşı direnci…….....17

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bakteriyosin üreten Laktik asit bakterileri, ürettikleri bakteriyosinler ve etki spektrumları.....6
Çizelge 4.1 İndikatör bakteriler ve gelişme koşulları.....16
Çizelge 4.2 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu.....17
Çizelge 4.3 Enzimlerin, organik asitlerin ve sıcaklık muamelesinin *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu'nun antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkileri.....19

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), karbohidrat metabolizmaları sırasında şekeri parçalayarak başlıca laktik asit oluşturan bakteri grubunu temsil etmektedir (Tekinşen ve Atasaran 1994).

Laktik asit bakterileri; çeşitli gıdaların üretiminde starter olarak kullanılmaları, bakteriyosin gibi antimikrobiyal madde üretmeleri ve özellikle probiyotik ürünlerin bileşiminde yer almaları nedeniyle endüstriyel açıdan büyük öneme sahiptir. Geleneksel yöntemlerle doğal olarak üretilen veya starter kültür olarak kullanılarak marketlerde tüketiciye sunulan fermente ürünler, laktik asit bakteri suşları için iyi bir kaynak teşkil etmektedir. İzole edilen laktik asit bakteri suşları; tat, koku, bakteriyosin üretimi gibi özellikleri bakımından farklı fermente ürün eldesi aşamalarında büyük potansiyele sahiptirler.

Günümüzde gıdaların raf ömrünü uzatabilmek için gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak yapılan son araştırmalar gıda katkı maddelerinin (antioksidanlar, tatlandırıcılar, renklendiriciler vs.) tüketici sağlığında çeşitli problemlere sebep olduğunu göstermiştir. Çoğu kimyasal madde kökenli olan gıda katkı maddeleri insanlarda özellikle allerji, astım, damar problemleri ve hatta kansere sebep olmaktadır. Bu nedenle tüketiciler katkısız ya da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen standartlardaki gıdaları tercih etmektedirler. Bazı gıda katkı maddelerinin kanserojen özelliklerinin ortaya çıkmasından dolayı birçok ülke ekolojik tarıma yönelmiş ve katkısız doğal ürünler elde etmeye başlamıştır. Bu ürünlerin maliyetinin çok yüksek olması tüketici talebini azaltmaktadır. Bunu takiben son yıllarda kimyasal formülasyona sahip gıda katkı maddelerine alternatif olarak doğal koruyucular ya da antimikrobiyal koruyucular kullanılmaya başlanmıştır. Doğal koruyucuların memeliler üzerinde herhangi bir yan etkisinin olmaması bunların güvenilir bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır.

Antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılan maddelerden biri de Laktik Asit Bakterileri (LAB) tarafından üretilen **bakteriyosin**dir (Tagg *et al.* 1976). LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinin protein yapısında olması ve bakteriyosin üreten LAB'lerinin

fermente edilmiş gıda ürünlerinde doğal olarak bulunması bu bakterilerin **''bioprezervatif''** olarak potansiyel kullanımlarına olan ilgiyi arttırmıştır ve kimyasal koruyucuların yerini alabilecek aday durumuna gelmişlerdir (Savagado *et al.* 2004)). Bakteriyosin üreten gıda kökenli LAB'leri gıda fermentasyonunda insan sağlığı üzerinde hiç bir yan etkiye sebep olmaksızın yıllardır kullanılmaktadır. Bakteriyosinler protein yapısında oldukları için insanların mide ve bağırsak sistemlerinde bulunan ve proteini hidrolize eden enzimler tarafından hidrolize edilmektedirler. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sınırlı olmakla beraber, bakteriyosinin güvenilir olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla uygun olan bakteriyosinin veya bakteriyosin üreten LAB'sinin gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir. Bu amacın gerçekleştirilebilmesi için kullanılacak olan bakteriyosin molekülünün iyi bir şekilde tanımlanması gerekmektedir.

Bu çalışmada *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin molekülünün biyokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, fermente et, süt, sebze, meyve ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır.

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, tabiatta çok yaygın olduğu bilinen laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalarda başlamıştır. İlk kez 19. yy'ın sonlarında sütte fermentasyona neden olan bakteriler laktik asit bakterisi olarak tanımlanmış ve daha sonraki yıllarda Lactobacillaceae familyası içinde sınıflandırılmışlardır.

Morfolojik olarak farklı özellikler gösterselerde tüm laktik asit bakterileri Gram pozitif olup katalaz negatiftirler. *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor oluşturmazlar. Genellikler fakültatif anaerobiktrler. *Pediococcus* cinsi hariç yalnız tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk veya kok şeklindeki bakteriler olarak tanımlanmaktadırlar. Laktik asit bakterileri fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler (Shape *et al.* 1966, Şain 1990).

Laktik asit bakterileri, glukozu fermente etme özelliklerine göre iki ana gruba ayrılmaktadır: Homofermentatif ve Heterofermentatif Laktik asit bakterileri. Bu ayrım şekerlerin temel katabolik yollarındaki farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Homofermentatif laktik asit bakterileri; şekerleri fruktozdifosfat yolu ile fermente ederek %90'dan fazla laktik asit üretmektedir. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise fruktozdifosfat yolunun önemli enzimlerinden olan aldolaz ve triozfosfat izomeraza sahip olmadıklarından dolayı glukozun yıkımı için pentozfosfat yolunu kullanmakta olup, laktik asit yanında farklı ürünlerde oluşturabilmektedirler (Schlegen 1986).

Laktik asit bakterileri, tabiatta yaygın oluşları, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanılan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadırlar. Çiğ materyalin laktik asit bakterileri ile fermente edilerek yeni gıdaların üretilmesi ve

gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda muhafaza yöntemlerinden birisi olarak kabul edilmektedir.

2.1.1 *Lactobacillus*

Mikroskop altında çubuk (basil) şeklinde gözlenirler. Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaerob olup %5 CO_2'li ortamda gelişme gösterebilirler. Genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinirler (Hammes and Vogel 1995). Fermentasyon sonunda oluşan ürünlere göre homofermantatif ve heterofermantatif türleri bulunmaktadır. Kromozomlarındaki nükleik asit kompozisyonunun % 33–55' ini G+C oluşturmaktadır (Stiles and Holzapfel 1997).

Lactobacillus cinsi bakteriler ise düz ya da hafif kıvrık çubuk şekilli bir morfolojiye sahiptir. Hücreleri tek tek ya da zincir şeklinde bulunur. Gram pozitif, katalaz negatif, anaerobik, mikroaerofilik ya da fakültatif anaerobiktirler (Krieg *et al.* 1984). *Lactobacillus* biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından oldukça fazla çeşitlilik içeren üyelere sahip bir cinstir. Beslenme istekleri de oldukça komplekstir. *Lactobacillus* cinsinin önemli bir üyesi olan *Lactobacillus bulgaricus*, Weiss ve ark. nın önerisiyle *Lactobacillus delbrueckii* subp. *bulgaricus* ismiyle anılmaya başlanmıştır (Wood and Holzapfel 1995, Krieg and Holt 1984).

Lactobacillus türlerine farklı ortamlarda sıklıkla rastlanmaktadır. Genellikle zengin karbohidrat bulunan ortamlarda yaşarlar. Karbohidrat metabolizması sonucunda oluşan ürünler ortamın asiditesini arttırır. Böylece bu tip ortamlarda gelişemeyen bakteriler için antimikrobiyal etki yaratır (Hammes and Vogel 1995).

Lactobacilli kendi içinde 3 gruba ayrılır (Orla-Jensen 1919):

Thermobacterium: Homofermantatif *Lactobacillus* grubuna dahil olup; 15ºC'den düşük sıcaklıkta gelişim gösterememesine rağmen 45ºC'de gelişebilirler. Işık mikroskobu altında zincir şeklinde koklar olarak gözlenebilirler. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lb. delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. helveticus, Lb. acidophilus* bu gruba dahil olup yüksek sıcaklıkta peynir üretiminde starter olarak kullanılmaktadırlar. *Lb*

acidophilus probiyotik yoğurt ve diyetlik ürün eldesinde kullanılmaktadır (Yaygın ve Kılıç 1993).

Streptobacterium: Homofermantatif grup olup 15ºC'den düşük sıcaklıkta gelişim gösterebilirler. *Lb. casei, Lb. plantarum, Lb. buchneri* gibi (Yaygın ve Kılıç 1993).

Betabacterium: Heterofermantatif grup olup fermentasyon neticesinde laktik asit yanında asetat, etil alkol ve CO_2 üretirler. Süt ürünlerinde bulunan türler; *Lb.fermenti* ve *Lb. brevis* olup starter kültür olarak kullanılmamaktadırlar (Yaygın ve Kılıç 1993).

Bu sınıflandırma sistemi hem hücresel morfolojiler hem de gelişim sıcaklıkları dikkate alınarak yapılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar bu bakterileri fermentasyon özelliklerine göre 3 gruba yerleştirmiştir (Hammes and Vogel 1995).

1. Zorunlu homofermantatif: Gıda fermantasyonu
2. Fakültatif heterofermantatif: Gıda fermantasyonu
3. Zorunlu heterofermantatif: Gıda bozulması

2.2 Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyosin Üretimi

Gıda kaynaklı pek çok laktik asit bakterisi gıda fermentasyonunda kullanılan antimikrobiyal özellikleri ile bilinmektedir. LAB özellikle gıda bozulmalarına ve gıda kökenli enfeksiyolara karşı antimikrobiyal etki gösteren ve ‘’bakeriyosin’’ olarak isimlendirilen protein yapısında ekstrasellüler maddeler sentezlemektedirler (Kleanhammer 1998, Vuyst and Vandamme 1994). Bakteriyosinler, çeşitli laktik asit bakerileri tarafından üretilen, yakın akraba türler üzerinde etkili, pilazmid DNA tarafından kodlanan protein yada peptid yapıdaki antimikrobiyal metabolitler olarak tanımlanabilir. LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinler gıda bozulmalarına ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok gram pozitif bakteriye karşı bakteriyosidal etki göstermekte ve ‘’biyokoruyucu’’ olarak isimlendirilmektedir (Keanhammer 1998).

En iyi bilinen bakteriyosin; Nisin olup; *Lc. lactis* tarafından üretilmektedir ve gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. 1928'den beri *Lactococcus lactis* suşları tarafından üretildiği bilinmekte ve 1971'de de lanthionin-peptit içeren olarak tanımlanmıştır. *L.*

lactis suşları tarafından üretilebilen nisin, tabii olarak bazı besin işlemlerinde bulunur. Pediocin'de yine gıdalarda kullanılan biyolojik bir koruyucudur (Teuber 1995).

LAB'e ait bakteriyosinler normalde sadece gram pozitif bakterileri inhibe ederler ve onların yaşam aralığı birbirinden oldukça farklıdır. Nisin ve Pediocin AcH geniş inhibisyon spektrumunda etkin iken; sakacin ve leuconocin gibi diğerleri ise diğerlerine nazaran daha dar inhibisyon spektrumunda etkilidir (Çizelge 2.1). Gıdalarda bozulmaya ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan pek çok Gram pozitif bakteriye karşı etki gösterirler (Ray 1992).

Çizelge 2.1. Bakteriyosin üreten Laktik asit bakterileri, ürettikleri bakteriyosinler ve etki spektrumları

Bakteriyosin Üreticisi	**Üretilen Bakteriyosin**	**Etki Spektrumu**
Lactobacillus acidophilus	Lactocin B-Lactocin F	Laktobasiller ve Enterokoklar
Lactobacillus helveticus	Helveticin J	Laktobasiller
Lactobacillus plantarum	Plantaricin A	Laktik asit bakterileri
Lactobacillus sake	Sakacin A	Laktobasiller, Enterokoklar ve *Listeria monocytogenes*
Lactococcus lactis ssp. *Lactis*	Nisin	Gram Pozitif Bakteriler
Lactococcus lactis ssp. *Cremoris*	Diplococcin	Laktokoklar
Pediococcus acidilactici	Pediocin PA1	Laktobasiller, Lökonostoklar, Pediococcuslar ve *Listeria monocytogenes*
Pediococcus acidilactici	Pediocin ACH	*Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, L. monocytogenes* ve LAB
Pediococus pentosacceus	Pediocin ACH	*Clostridium perfringens, Clostridiu boulinum, Staphylococcus aures* ve LAB

Bakteriyosin üretimi besiyeri bileşimi, pH değeri ve üretici suşun elişme fazı gibi fakörlere bağlı olabilir. Geis ve ark. (1983) bakteriyosin üretimi amacıyla 5 farklı besiyeri denemişlerdir. Farklı ortamlarda bakteriyosin aktvitesinde değişimler tespit edilmiştir. Aynı çalışmaya paralel olarak Pucci ve ark. (1988) pediosin PA-1'in maksimıum aktivitesinin MRS besiyerine % 2 oranında maya ekstrakı ilavesi ile mümkün olduğunu göstermişlerdir. Bakteriyosin üretiminde besiyerinin yanında pH'nın da etkili olduğu bu çalışmalarda belirtilmiştir.

Lactobacillus türlerinin ürettiği bakteriyosin ile yapılan ilk çalışmalarda; Wheater ve arkadaşları (1951), *Lb. delbrueckii* supsp. *lactis* tarafından ısıya dayanıklı lactobacillin adını verdikleri bakteriyosin üzerine çalışmışlardır. Bu madde *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium butyricum*'a karşı etkiliydi. Engelleyici etkisi katalaz tarafından bozulduğu için, bu çalışanlar hidrojen peroksidin engelleyici mekanizmayla ilgili olduğu sonucuna varmışlardır. Vincent ve arkadaşları (1959) memeli bağırsağından izole ettikleri *Lb. acidophilus* kültürlerinden lactocidin adı verilen bakteri yok edici bir madde elde etmişlerdir. Ham lactocidin; diyalize müsait olmayan, katalaza duyarsız ve düşük bir pH aralığında aktiftir. Diğer Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde olduğu gibi, yakın ilişkili *Lb. acidophilus* türlerini de içeren geniş bir antibakteriyal spektruma sahiptir. Silva ve arkadaşları (1987), insan dışkısından izole edilmiş *Lb. casei* GG suşu tarafından üretilen, diğer laktobasiller üzerinde etkili olmayan fakat laktik asit bakterilerini de içeren, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin geniş bir spektrumuna karşı aktif olan düşük moleküler ağırlıklı bir engelleyici madde bulmuşlardır. Bu madde proteinaz K, α-kemotripsin, bromelin, tripsin ve karboksipeptidaz gibi çeşitli proteazlara ve aynı zamanda ısıya karşı dirençliydi. Silva ve arkadaşları, 1987 yılında bu antimikrobiyal maddenin, 1000Da'dan düşük moleküler ağırlığı, aseton/suda çözünebilirliği ve 3.0-5.0 gibi dar bir pH aralığı tercihi olmasından dolayı kısa zincirli bir yağ asidi olduğunu öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, engelleyici madde laktik ve asetik asitten farklı bulunmuş ve *Lb. casei* GG suşunun diyarenin değişik şekillerinin tedavisi ve önlenmesinde potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. McGroarty ve Reid 1988 yılında bakteri öldürücü, diyaliz yapılamayan, ısıya dayanıklı olmayan, %80 amonyum sülfata kadar çökeltilemeyen ama koloroformda ekstrakte edilebilen, lipofilik bir yapı gösteren bir madde belirlemişlerdir. Bu madde üropatojenik *E. coli* türlerini engellemiştir ve insan kaynaklı *Lactobacillus rhamnosus* GR-1'in bir suşu tarafından üretilmektedir.

Literatürde *Lactobacillus* türlerinin ürettiği bakteriyosin ile yapılan son çalışmalar genellikle bakteriyosin üretimini artırıcı parametreler ve bakteriyosinin genetik yapısının belirlenmesi üzerine kurulmuştur. Ogunbanwo ve ark. ları 2003 yılında yaptıkları çalışmada besiyeri bileşiminin *Lactobacillus brevis* OG1'in üretmiş olduğu bakteriyosine etkisi üzerine çalışmışlardır. 2002 yılında Tantillo ve arkadaşları izole ettikleri 152 *Lactobacillus* spp. türlerinden sadece iki tanesinde bakteriyosin üretimini tesbit etmişler ve antimikrobiyel aktivite spektrumu üzerine çalışmışlardır. Özellikle *Listeria monocytogenes* üzerinde *Lactobacillus sake* 1'in üretmiş olduğu bakteriyosinin oldukça etkili olduğu kanıtlanmıştır (Martinez *et al.* 2005). Çalışmada *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 suşu kontrol olarak kullanılmıştır. Lactobacillus amylovorus DCE 471 suşunun üretmiş olduğu bakteriyosin ise karakterize edildikten sonra üretici suş starter kültür olarak kullanılmıştır (Frederic *et al.* 2007). Nijeryada ise fermente ürünlerden izole edilen 50 adet *Lactobacillus* türünün üretmiş oldukları bakteriyosinler karakterize edilmiş ve farklı pH aralıklarında aktiviteleri test edilmiştir. En yüksek aktiviteye pH: 5.5-7.5 arasında ulaşılmıştır (Ogunshe *et al.* 2007).

Gram-pozitif bakterilerin ürettikleri bakteriyosin benzeri ürünler, oldukça geniş antibakteriyel spektrumu olanlar, uygulamalı araştırmaların en gözde olanı olmaya devam etmektedir (Osmanağaoğlu *et al.* 2000a, Osmanağaoğlu *et al.* 2000b, Osmanağaoğlu 2003, Osmanağaoğlu 2005). Ticari olarak arzu edilen antibakteriyel fonksiyonlarıyla yeni peptidlerin genetik mühendisliği veya keşiflerin potansiyeli karşı konulmaz bir cazibe oluşturmaktadır.

2.2.1 LAB tarafından üretilen Bakteriyosinlerin genel özellikleri

Farklı Gam pozitif bakterilere ait bakteryosidal proteinler, yapılarında mevcut olan modifiye aminoasitlere göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar farklı aminoasitlerle tasarlanan ''lantibiotikler'' ve ''nonlantibiotikler'' olarak isimlendirilmektedir. Lantibiotiklere örnek oalrak Nisin verilebilir. Yapısında translasyon sonrasındaki modifikasyon ile meydana gelmiş olan lanhionine (Ala-S-Ala), ß-methyllanthionine (Abu-S-Ala) (Sülfür grubu içeren aminoasit) le dehidroalanin (Dha) ve dehydrobutryic acid (Dhb) gibi dehidra formdaki sıra dışı aminoaitler yer almaktadır. Nonlanthionine

bakteriyosinler ise küçük, ısıya dayanıklı bakteriosinler olup yapısında bu sıradışı aminoasitleri bulundurmaz. Bu gruba örnek olarak pediocin AcH/PA-1, lactococcin A, lactococcin B ve sakacin A verilebilir. Bununla beraber molekülün yapısında lanthioninlerin varlığı veya yokluğu ile bakteriyosinlerin antimikrobiyal spektrumları arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır (Jack *et al*. 1995, Sahl *et al.* 1995).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler; Gram pozitif bakterilere karşı duyarlı, bakteriyosidal etki gösterirler. 34'den 57'ye kadar aminoasitten oluşan katyonik peptid içerirler. Zar fonksiyonların stabilizasyonunu bozarak hücre ölümüne neden olurlar. Bakterisidal hareket genel olarak yüksek sıcaklık, geniş pH aralığına karşı dirençlidir. Bakteriyosidal hareket proteolitik enzimler tarafından kaybediebilir. Bakterisida spektrum azdan çoğa doğrudur. Bakteriyosine duyarlı Gram pozitif bakteriler, kendi üretmiş olduğu bakteriyosine karşı dirençlidir. Gram pozitif suşa ait hücreler bir bakteriyosine duyarlı iken bir başkasına dirençli olabilirler. Üretici hücreler genetik olarak, kendi üetmiş oldukları bakteriyosinlere karşı bağışıklık kazanmıştır. Duyarlı bir suş bakteriyosin varlığında gelişirken geçici dirençlilik gösterebilir. Bakteriyosin molekülü, üretici hücreleri içeren Gram pozitif hücre yüzeyinden absorbe edilmektedir.

2.2.2 LAB tarafından üretilen Bakteriyosinlerin etki mekanizması

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriosinlerin etki mekanizması üzerine ilk yapılan çalışmalar kolisin ile ilgilidir. Kolisinin letal etkisinin iki aşamada gerçekleştiği ileri sürülmüştür. İlk aşamada bakteriyosin hücre duvarındaki özel reseptörlere bağlanmakta, daha sonra ise hücre zarına zarar vererek geçirgenliğin bozulmasına neden olmaktadır. Sonuçta ise hücre ölmektedir. Bakteriyostatik etkiye sahip olan lactocin 27 ayrı tutulursa bakteriyosinler hassas hücrelere karşı bakteriyosidal etkili olarak rol oynamaktadırlar.

Bakteriyosinler duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Hücrenin zarına bağlanarak, hücre içerisine girip, zarda gözenekler oluştururlar. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açarlar. Bununla birlikte, iyonların, özellikle de ATP kaybı ve hücre içi pH dengesinin korunmasında etkili olan K^+ iyonunun hücre dışına sızması, hücrede

enerji tüketimine neden olmaktadır (Twomey *et al.* 2002). Hücrede meydana gelen bu değişimler, DNA ve RNA gibi hücre için yaşamsal önemi olan makro moleküllerin degredasyonuna, bu moleküllerle birlikte protein ve peptidoglikan gibi biyolojik olayların inhibisyonuna yol açmaktadır (Héchard and Sahl 2002, De Martinis *et al*. 2002). Bakteriyosinler katyonik bir molekül olduğu için sitoplazmik zar üzerinde etkili olmalarında sahip oldukları hidrofobik kısımlar önemli rol oynamaktadır. Duyarlı hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının etkisiyle ortaya çıkan elektrostatik etkileşim sonucu bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır (Twomey *et al.* 2002). Böylece hidrofobik kısım zar yapısının içine girerek gözenek oluşumuna yol açmaktadır. Gram-pozitif bakterilerde nisin, enerji yüklü zar keseleri üzerine etki ederek Proton İtici Gücü (Proton Motive Force, PMF) bozar, amino asit alımını engeller ve birikmiş amino asitlerin bırakılmasına neden olur. Genel olarak lanthionin içermeyen bakteriyosinler, duyarlı hücrelerin hücre zarının dayanıklığını bozarak onların bakterisidal fonksiyonun etkilerler. Pediocin PA-1 hücre zarına girmeden ve por oluşturmadan önce fosfolipit tabakaya bağlanır ve muhtemelen bu por oluşumu, duyarlı hücrelerin hücre zarlarındaki protein alıcılarıyla çakışma oluşturur (Vuyst *et al.* 1994).

Osmanağaoğlu vd. (2005) yapmış oldukları çalışmada, Pediocin DT10'un *Leuconostoc mesenteroides* OZ-N3 hücreleri üzerine etki mekanizması incelenmiş ve hücrelerin pediocin DT10 ile muamelesinin ardından ilk etkinin sitoplazmik zarda olduğu elektron mikroskop altında plazma zarındaki porların varlığı ile belirlenmiştir. Daha sonra önemli hücre içi bileşenlerinin dışarı sızması sonucu hücre zarı geçirgenliği ve zar potansiyeli bozulmuş ve son olarak da makromolekül sentezinin durması ile hücre ölümü gerçekleşmiştir. Elektron mikroskobu ile gözlenen bu aşamalar sonucunda pediocin DT10'un duyarlı *Leuconostoc mesenteroides* OZ-N3 hücreleri üzerinde litik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Bakteriyosinler için de önemli bir paya sahip olan nisin, en çok stoplazmik zar üzerinde etkili olmaktadır. Hücrede ATP kaybına neden olabildiği gibi lizize de yol açabilmektedir. Son çalışmalar nisinin sitoplazmik zarda sülfidril gruplarına etki ettiğini bulmuştur (Delves-Broughton 1990).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri

Bu çalışmadan kullanılan bakteriler; Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2 Besiyerleri

LAB'lerinin gelişimleri için kullanılan besiyerlerinin içerikleri **EK 1**'de verilmiştir.

3.1.3 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları **EK 2'**de verilmiştir.

3.1.4 Kullanılan solüsyon ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan cam malzemelerin sterilizasyonu için 185ºC'de 1 saat pastör fırını kullanılmıştır. Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar için ise 121 ºC'de 15 dakika otoklav kullanılarak sterilizasyon sağlanmıştır.

3.1.5 Bakteri kültürlerinin saklanması

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz bakteri kültürleri %50'lik gliserol içinde çözünmüş olarak -20 ºC'de saklı tutulmaktadır (Biswas *et al.* 1991).

3.2 Yöntem

3.2.1 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin hazırlanması

Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu MRS besiyerinde aktifleştirilerek (5ml/5µl) 18 saat 37ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen kültür, bakteriyosin elde etmek amacıyla 13.000 rpm'de 12 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant, 0.22µm (Milipore) çaplı membrandan geçirilerek cell free supernatatın (CFS; hücre bulundurmayan süpernantant) olarak adlandırılmıştır. Daha sonra pH değeri 7.0 ye ayarlanmış ve 95ºC'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra karakterizasyon testlerinde kullanılmıştır (Savagado *et al.* 2004) .

3.2.2 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite ünitesi (AU)

Elde edilen bakteriyosin eppendorf tüplerde seri seyreltmelere (1:10-1:250) tabi tutularak aktivite ünitesi hesaplanmıştır. Petrilerde hazırlanan MRS katı agarın yüzeyine, 5ml MRS yarı katı agara 5 µl. olacak şekilde indikatör bakteri olan *Lb. plantarum* NCDO 955 ekilmiştir. Farklı dilusyon faktörlerine sahip bakteriyosin örnekleri nokta uygulama metoduyla indikatörle yayılmış MRS agar yüzeyine ekilmiştir. Bir gece 37ºC'de inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar inhibisyon zonu veren en yüksek seyreltme AU/ml değerinin elde edilmesi için 200 (1ml/5µl) ile çarpılmıştır (Biswas *et al*. 1991).

3.2.3 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu

İndikatörler TGE Broth besiyerinde aktifleştirilip (5ml/5µl) 37ºC' de 18 saat inkube edilmişlerdir. Patojen bakteriler ise Nutrient Broth besiyerinde aktifleştirilip (5ml/5µl) 18 saat 37ºC de inkube edilmiştir.

Petri yüzeyine çizgi ekim yöntemi ile indikatör-patojen bakteriler ekilmiştir. Bakteriyosin örneği nokta uygulama metoduyla indikatör-patojen yayılmış olan yüzeye ekilmiştir. Bir gece 37ºC'de inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar gözlenmiştir (Vaughan *et al.* 1994).

3.2.4 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin sıcaklık direnci

Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu MRS besiyerinde aktifleştirilerek (5ml/5µl) 18 saat 37ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. Kültür, bakteriyosin elde etmek amacıyla 13.000 rpm'de 12 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant, mikropipet yardımıyla alınmış ve 95ºC'de 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika ve 121ºC'de 15 dakika olmak üzere farklı sıcaklık uygulamalarına tabi tutulmuştur. Daha sonra, önceden petri plakalarda hazırlanan TGE katı agarın yüzeyine, 5ml. TGE yarı katı agara 5 µl. olacak şekilde indikatör bakteri olan *L*b. *plantarum* NCDO 955 ekilmiştir. Farklı sıcaklıklara maruz bırakılan bakteriyosin örneği nokta uygulamayla overlay yapılmış MRS agar yüzeyine ekilmiştir. Bir gece 37ºC'de inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar gözlenmiştir (Bromberg *et al.* 2004).

3.2.5 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerine bazı organik çözücülerin etkisi

Bu amaçla, 10µl bakteriyosin 10µl organik çözücüyle eppendorf tüpte karıştırılmış ve eppendorf tüpler 1 saat kapakları açık olarak etüvde bekletilmiştir. Daha sonra, farklı organik çözücülere maruz bırakılan bakteriyosin örneği nokta uygulamayla yüzeyi indikatörle yayılmış olan MRS agar yüzeyine ekilmiştir. Bir gece 37ºC'de inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar gözlenmiştir.

3.2.6 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerine bazı enzimlerin etkisi

Bu amaçla, 10µl bakteriyosin 10µl enzimle (10mg/ml) eppendorf tüpte karıştırılmış ve eppendorf tüpler enzim aktivitesi amacıyla 1 saat etüvde bekletilmiştir. Daha sonra, farklı enzimlere maruz bırakılan bakteriyosin örneği nokta uygulamayla yüzeyi indikatörle yayılmış olan MRS agar yüzeyine ekilmiştir. Bir gece 37ºC' de inkübasyona bırakılmış ve bakteriyosin aktivitesinin varlığı test edilmiştir (Bhunia *et al.* 1991).

3.2.7 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin pH stabilitesi

Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu MRS besiyerine (5ml/5µl) aktifleştirilerek 18 saat 37ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilmiş kültür bakteriyosin elde etmek amacıyla 13.000 rpm'de 12 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant mikropipet yardımıyla alınmış ve elde edilen bakteriyosin 14 farklı pH değerine karşı test edilmiştir. Bu amaçla elde edilen bakteriyosinlerin her birinin pH'sı 1 ile 14 arasında ayarlanmış, 0.22lik membran filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, önceden hazırlanan MRS katı agarın yüzeyine, 5ml. MRS yarı katı agara 5 µl. olacak şekilde indikatör bakteri olan *L*b. *plantarum* NCDO 955 ekilmiştir. Bakteriyosin örnekleri 3 paralel çalışılmıştır. Birinci kısım otoklavlandıktan sonra, ikinci kısım 2 saat 37ºC'de inkübasyondan sonra, 3. kısım ise yine 37ºC'de 24 saat inkübasyondan sonra 'nokta uygulamayla yüzeyi indikatörle yayılmış olan MRS agar yüzeyine ekilmiştir. Bir gece 37ºC'de inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar gözlenmiştir (Bhunia *et al.*1991).

4. BULGULAR

4.1 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite ünitesi

Akivite ünitesinin belirlenmesi için gerçekleştirilen seyreltmelerden 5µl alınarak, *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 in yüzeye yayıldığı petri üzerine nokta ekim ile ekilmiştir. 35°C'de 1 gece inkübasyonun ardından inhibisyon zonu veren en yüksek seyreltme, AU/ml değerinin elde edilmesi için 200 (1ml/5µl) ile çarpılmış ve sonuç Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

4.2 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu

Yüzeye nokta ekim yöntemi; *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşunun *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Enterococcus* ve *Listeria* gibi Gram-pozitif bakteriler ile et ve günlük ürünlerde bozulmalara neden olan bakterilere ve *L. monocytogenes* gibi gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisinin gözlemlenebilmesi için kullanılmıştır. İnkübasyon süresi kullanılan indikatörün gelişim sıcaklığına göre belirlenmiş (Çizelge 4.1) ve sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

4.3 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin sıcaklık direnci

Lactobacillus pentosus OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin farklı sıcaklıklara karşı dirençleri; 95°C'de 5 ve 15 dakika ve 121°C 'de 15 dakika sıcaklık uygulamalarına tabi tutulmuş ve bu sıcaklıklarda bakteriyosinin aktivitesini kaybetmediği gösterilmiştir (Çizelge 4.3).

4.4 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerine bazı organik çözücülerin etkisi

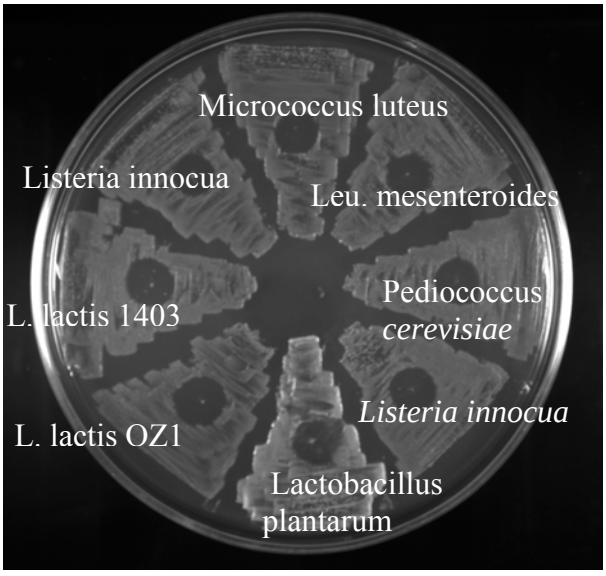
10µl organik çözücüyle muamele edilen bakteriyosinler indikatör bakteri üzerinde denenmiş ve akivite kaybının olup olmadığı gözlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir. Çizelge 4.3'de belirtilen 10 farklı organik çözücüye karşı zon oluşumu gözlenmiştir (Bhunia *et al.* 1991).

Çizelge 4.1 İndikatör bakteriler ve gelişme koşulları

İndikatör bakteriler	**Gelişme koşulları**
Lactobacillus plantarum	MRS, 30°C
Lactobacillus casei	MRS, 30°C
Pediococcus acidilactici	TGE, 35°C
Pediococcus cereviciae	TGE, 35°C
Lactococcus lactis	M17, 30°C
Lactococcus lactis 1403	M17, 30°C
Enteroccus feacalis	TGE, 30°C
Leuc. Mesenteroides	TGE, 27°C
Listeria innocua	TGE, 30°C
Listeria monocytogenes NCTC 5105	TSB+5%yeast extract,35°C
Micrococcus luteus	TGE , 35°C
Staphylacoccus aureus	TSB+5%yeast extract,35°C
Clostridium botulinum	Nutrient broth , 35°C

Çizelge 4.2 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu

Test edilen mikroorganizma	**Zon oluşumu**
Lactococcus lactis	+
Lactococcus lactis 1403	+
Leuconostoc mesenteroides	+
Enterococcus feacalis	+
Lactobacillus casei	-
Lactobacillus plantarum	+
Pediococcus acidilactici	+
Pediococcus cereviciae	+
Listeria innocua	+
Listeria monocytogenes	+
Staphylacoccus carnasum	-
Staphylacoccus aureus	-
Micrococcus luteus	+
Escherichia coli	-
Salmonella typhii	-
Bacillus subtilis	-
Candida albicans	-



Şekil 4.1 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriosinin indikatörlere karşı direnci

4.5 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerine bazı enzimlerin etkisi

Çalışmada kullanılan enzimler (100µg/ml) bakteriyosin ile muamele edilmiş ve indikatör bakterilere karşı test edilmiştir. İnkübasyon neticesinde zon oluşumu gözlenen bakteriyosinler Çizelge 4.3'de pozitif, zon oluşumu gözlenmeyenler ise negatif olarak gösterilmiştir.

4.6 *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu tarafından üretilen bakteriyosinin pH stabilitesi

Lactobacillus pentosus OZ-1C suşu tarafından üretilen bateriyosin 37ºC'de 2 saat tutulduğunda pH 3-12 arasındaki geniş bir skalada aktivite göstermektedir. Fakat 37ºC de 24 saat tutulduğunda pH 10 ve üzerinde aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3 Enzimlerin, organik asitlerin ve sıcaklık muamelesinin *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşu'nun antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkileri

MUAMELE	**AKTİVİTE (AU/ ml)[a]**
Kontrol	10000
Enzimler	
Katalaz	+
Lizozim	+
Lipaz	+
Ribonükleaz	+
Trypsin	-
Chymotrypsin	-
Ficin	-
Proteinaz K	-
Organik çözücüler	
Kloroform	+
Asetonitril	+
Aseton	+
Etanol	+
İzopropanol	+
Bütanol	+
Formaldehit	+
Metanol	+
SDS	+
Hekzanformaldehit	+
Sıcaklık	
95°C 'de 5 dakika	+
95°C 'de 15 dakika	+
121°C 'de 15 dakika	+

[a] pH testleri hariç bütün testler kültür süpernatantı 5.0' a ayarlanarak yapılmıştır.Aktivitenin gözlenmesi yüzeye nokta ekim yöntemi ile test edilmiştir., 30°C'de 18 saatlik inkübasyondan sonra gelişim inhibisyon zonlarının varlığı +, yokluğu ise – olarak belirtilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Laktik asit bakterilerinin farklı tür ve suşları tarafından üretilen bakteriyosinler biyolojik gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadırlar. Etkili bir şekilde kullanımları için bu peptitlerin saf konsantre formunu elde etmek, gıda kökenli ve gıda bozulmasında etkili bakterilere karşı inhibitör etkisini, fiziksel ve kimyasal karakteristiklerini belirlemek gerekmektedir.

Lactobacillus pentosus OZ-1C suşu gıdalarda mevcut *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Enteroccoccus, Pedioccoccus* ve *Listeia* gibi türlerin değişik suşlarına ve gıdalarda bozulmalara neden olan ve gıda patojenlerine karşı doğal ve inhibitör etki gösteren bir peptit üretmektedir.

Lactobacillus pentosus OZ-1C tarafından üretilen bu antimikrobiyal madde CFS nin pH 7.0'a nötralizasyonu, katalaz ve DNaz ile muamelesi ve otoklavlama işlemi neticesinde aktif kaldığı için bu maddenin organik asit, hidrojen peroksit veya bakteriyofaj etkisinden kaynaklanmasığı gösterilmiştir. *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşundan elde edilen bu maddenin bakteriyosinin olarak tanımlanabilmesi için suştan elde edilen CFS ile çeşitli testler yapılmış ve *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşunun antimikrobiyal aktivitesinin çeşitli fiziksel ve kimyasal testlere karşı sabit kaldığı ancak tiripsin, kimotiripsin ve proteinaz K gibi proteolitik enzimlerle muamelede ve bazı pH inkübasyon testlerinde aktivitesinin kaybolduğu görülmüştür. Bununla beraber muamele görmemiş numunede veya ısı ile inaktive olmuş enzimi içeren numune de her hangi bir aktivite kaybına rastlanmamıştır.

Proteolitik enzimlerle muamele neticesinde hücre dışına salgılanan bu aktif maddenin antimikrobiyal aktivitesindeki azalma bu maddenin protein yapısında olduğunun göstergesidir. 100ºC' de 15 dakika ve 121ºC' de 15 dakika sıcaklıkla muamelede bu aktivitenin kaybolmadığı görülmüştür. Lipaz ve organik çözücülerin etkisi ile bu aktivitenin azalmaması büyük bir olasılıkla molekülün yapısında lipit bulunmadığını göstermektedir. *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşutarafından üretilen pediocin AK 37ºC' de 2 saat tutulduğunda pH 3-12 arasındaki geniş bir skalada aktivite göstermektedir. Fakat 37ºC'de 24 saat tutulduğunda pH 10 ve üzerinde aktivite göstermediği gözlemlenmiştir. *Lactobacillus pentosus* OZ-1C suşunun ürettiği

bakteriyosin, bazik koşullara kıyasla asidik koşullarda daha stabildir. Yüksek pH da aktivitenin azalması muhtemelen molekülün ikincil yapısının bozulmasından kaynaklanmaktadır.

KAYNAKLAR

Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *P. acidilactici* H on sensitive bacterial strains. J Appl Bacteriol 70: 25-33.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl Environ Microb 57:1265-1267.

Bromberg, R., Moreno, I., Zaganigi, C.L., Delboni, R.R. and Oliveira, J. 2004. Isolation of bacteriocin producing Lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. Brazillian Journal of Microbiology, 35: 137-144.

De Martinis, E.C.P., Alves, V.F. and Franco, B.D.G.M. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. Food Reviews International, 18 (2-3); 191-208.

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its use as food preservative. Food Technol. 44: 100

Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. 1983. Potential of lactic Streptococci to produce bacteriocin. Appl. Environm. Microbiol. 45:203.

Hammes, W.P. and Vogel, R.F. 1995. ‘’The genus *Lactobacillus*’’, in the lactic acid bacteria. The genera of lactic acid bacteria, Blackie Academics and Professionals. 2; 19-55.

Héchard, Y. and Sahl, H.G. 2002**.** Mode of action of modified and unmodified bacteriosins from Gram-positive bacteria. Biochimie., 84; 545-557.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bcteriocin of gram positive bacteria. Microbiology Rewievs, 59; 171-200.

Kleanhammer, Y.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie., 70; 337-349.

Krieg, N.R. and Holt, J.G. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, 1043-1234, Baltimore.

Leroy, F., de Winter, T., Remedios, M., Moreno, F. and De Vuyst, L. 2007. The bacteriocin producer Lactobacillus amylovorus DCE 471 is a competitive starter culture for type II sourdough fermentations . Journal of the Science of Food and Agriculture. 87:9, 1726-1736.

Martinez, C.G. and De Martinis, C.P.E. 2005. Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* 1 against *Listeria monocytogenes* 1/2a growth and haemolytic activity. Braz. J. Microbiol. vol.36.

McGroarty, J.A. and Reid, G. 1988. Detection of a *Lactobacillus* substance that inhibis *Escherichia coli*. Can. J. Microbiaol. 34, 974-978.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A. A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (7), 179–184.

Ogunshe, A.A.O., Omotoso, M.A. and Adeyeye, J.A. 2007. *In vitro* antimicrobial characteristics of bacteriocin- producing *Lactobacillus* spp. strains from Nigerian indigenous fermented foods. African Journal of Biotechnology. 6:4,445-453.

Orla-Jensen S. 1919. In S. Orla-Jensen (Ed.), The lactic acid bacteria. P 1-196. Copenhagen: A.F. Host and Son.

Osmanağaoğlu, Ö. 2003. Behaviour and biological control of bacteriocin-producing *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum-packaged sucuk. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 27; 471-480.

Osmanağaoğlu, Ö. 2005. Sensitivity of sublethally injured Gram-negative bacteria to pediocin P. J Food Safety, 25; 266-275.

Osmanağaoğlu, Ö., Beyatlı, Y. and Gündüz, U. 2000a. Cloning and expression of a plasmid-linked pediocin determinant trait of *Pediococcus acidilactici* F. J. Basic Microbiol., 40(1); 41-49.

Osmanağaoğlu, Ö., Beyatlı, Y., Gündüz, U. and Saçılık, S.C. 2000b. Analysis of the genetic determinant for production of the pediocin P of *Pediococcus pentosaceus* Pep1. J. Basic Microbiol. 40(4); 233-241.

Osmanağaoğlu, Ö., Kıran, F. and Gül, N. 2005. Effect of pediocin DT10 on *Leuconostoc mesenteroides* OZ-N3 cells. J. Food Safety,. 25; 303-317.

Pucci, M.J., Vedamuthi, E.R., Kunka, B.S. and Vanderberg, P.A. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2349.

Ray, B. 1992. Bacteriocin of starter culture bacteria as food preservatives; an overwiev. pp 177-206. In food biopreservatives of microbial origin. Bibek Ray and Mark Daeschel (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Sahl, H.G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translation modifications. Eur. J. Biochem. 230; 827-853.

Savagado, A., Cheik, A.T.O., Bassole, H.N.I. and Traore, A.S. 2004. Antimicrobial activities of Lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. Pakistan Journal of Nutrition, 3: 174-179.

Schelegen, H.G. 1986. General Microbiology. Cambridge University Press, 587.

Silva, M., Jacobus, N.V., Deneke, C. and Gorbach, S.L. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. Antimicrob. Agents Chemother. 31, 1231-1233.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol., 36; 1-29.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rew, 40: 722-756.

Tantillo, M. G., Dipinto, A. and Novello, L. 2002. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sake* as starter culture in dry sausages. The New microbiologica (New microbiol.), 25:45-49.

Tekişken, O.C. ve Atasever, M. 1994. Süt ürünleri üretiminde starter kültür. Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Yayını. 150s.

Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*, in the Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academics and Professionals. 2; 173-235.

Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meany, B. and Hill, C. 2002**.** Lantibiotics produced by actic acid bacteria: structure, function and application. Antonie van Leeuwenhoek, 82; 165-185.

Vaughan, E.E., Caplice, E., Looney, R., O'Rourke, N., Coveney,H., Daly, C. and Fitzgerald, G.F. 1994. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. J.Appl.Bacteriol. 76,118-123.

Vincent, J.G., Veomett, R.C. and Riley, R.F. 1959. Antimicrobial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. J. Bacteiol., 78, 477-484.

Vuyst, L.D. and Vandamme, E.J. 1994. Lactic acid bacteria and bacteriocins: Their practical importance. Bacteriocins of lactic acid bacteria; Microbiology, Genetics and Applications, Chapter 1; 1-11.

Vuyst, L.D. and Vandamme, E.J. 1994. Nisin a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosyntesis, fermentation and application. Bacteriocins of lactic acid bacteria; Microbiology, Genetics and Applications, Chapter 5; 151-222.

Wheater, D.M., Hirsch, A. and Mattick, A.T.R. 1951. ''Lactobacillin'' an antibiotic from lactobacilli. Nature, 168, 659.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1995. The genera of lactic acid bacteria, Blackie Academic and Professional, 2; 398, London.

Yaygın, H. ve Kılıç, S. 1993. Süt endüstrisinde saf kültür. Altındağ Matbaacılık. İzmir.

EKLER

EK 1 BAKTERİ İZOLASYONUNDA VE GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI

EK 2 KİMYASAL MADDELER

EK1 BAKTERİ İZOLASYONUNDA VE GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI

(TGE) Sıvı ve Agar:	**%** **gr**
Tripton	1.0
Glukoz	1.0
Maya ekstraktı	1.0
Tween-80	0.1
$MnSO_4$	0.005
$MgSO_4$	0.005

Besiyeri içerikleri 100 ml distile su içerisinde çözülerek %1.5 agar ilavesinden önce pH: 6,8'e ayarlanmıştır. Sterilizasyon 121°C' de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

M17 Besi ortamı	**gr**
Polipepton	5.0
Fitopepton	5.0
Maya ekstraktı	2.5
Et ekstraktı	5.0
B disodyum gliserofosfat	19
$MgSO_4$. $7H_2O$	1ml
Laktoz (%10)	50ml
Askorbik asit	0.5

Besi yeri içerikleri 950 ml distile su içerisinde çözülerek %1.5 agar ilavesinden önce pH 7.15'e ayarlanmıştır. Sterilizasyon 121°C' de 15 dakika süre ile yapılmıştır. Ortam su banyosunda 45 ^{o}C' de soğutulduktan sonra 0.22 µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilen Laktoz çözeltisi ilave edilmiştir.

MRS Besi ortamı	**gr**
Polipepton	10.0
Maya ekstraktı	5.0
Et ekstraktı	10.0
Glukoz	20.0
Potasyumfosfat	2.0
Sodyum asetat	5.0
$MgSO_4$	0.2
$MnSO_4$	0.05
Tween 80	1.08
Amonyum sitrat	2.0
Laktoz (%10)	50ml
Askorbik asit	0.5

Besi yeri içerikleri 1lt distile su içerisinde çözülerek %1.5 pH 6.4'e ayarlanmıştır. Sterilizasyon 121°C' de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

Nutrient Sıvı ve Agar:	**gr**
Maya ekstraktı	10
Pepton	10
Sodyum klorür	5

Besiyeri içerikleri 1lt distile su içerisinde çözülerek %1.5 agar ilave edilir. Sterilizasyon 121°C' de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

EK 2 KİMYASAL MADDELER

Kimyasal Adı	Marka
RNaz A, Lizozim, Glukoz, Lipaz, Katalaz, Trypsin, Chymotrypsin, Ficin, Proteinaz K	**Sigma**
0.22 ve 0.45 -mikron por çaplı membran filtre	**Millipore**
Maya ekstraktı, Pepton, Yeast ekstaktı, Agar	**Oxoid**
M17 Besiyeri, MRS Besiyeri, Bactopepton, Et ekstraktı	**Lab M**
Tween 80, $MnSO_4$, $MgSO_4$, Kloroform, Asetonitril, Aseton, Etanol, İzopropanol, Bütanol, Formaldehit, Metanol, Sodyum dodesil sülfat, Hekzanformaldehit	**Merck**

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Tülay PEHLİVAN

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise **:** M. R. Uzel Kimya Anadolu Teknik Lisesi 1998

Lisans **:** Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 2003

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Şubat 2005-Ocak 2008)