

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2016-YL-060

***Geobacillus toebii* HBB-218 TARAFINDAN
ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN BOZULMAYI
ENGELLEMEK AMACIYLA KONSERVE
GIDALARA UYGULANMASI**

Ayşe ALKIŞ

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ayşe ALKIŞ tarafından hazırlanan “*Geobacillus toebii* HBB-218 Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Bozulmayı Engellemek Amacıyla Konserve Gıdalara Uygulanması” başlıklı tez, 25.11.2016 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN	ADÜ	
Üye	: Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ	MSKÜ	
Üye	: Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../.../2016

Ayşe ALKIŞ

ÖZET

***Geobacillus toebii* HBB-218 TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN BOZULMAYI ENGELLEMELER AMACIYLA KONSERVE GIDALARA UYGULANMASI**

Ayşe ALKIŞ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL
2016, 37 sayfa

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen ve üreticiye yakın akraba türlerin gelişmesinde engelleyici bir etki gösteren protein yapıli bileşiklerdir. Günümüzde pek çok bakteriyosin tanımlanmış ve etki ettiğı türler araştırılmıştır. Bu bakteriyosinler içerisinde bulunan nisin ve pediosin ise ticari olarak üretilip gıdalarda biyokoruma amaçlı kullanılmaktadır.

Bu çalışmada *Geobacillus toebii* HBB-218 suşundan elde edilen bakteriyosinin (toebisin) çeşitli konserve gıdalarda *Geobacillus stearothermophilus* DSMZ-22 ve *Bacillus coagulans* DSMZ-1'in gelişimine karşı etkisi çalışılmıştır. İndikatör bakterilerin vejetatif hücreleri ve endosporları üzerine *Geobacillus toebii* HBB-218 suşundan elde edilen bakteriyosin nisin ve laktik asit ilaveleriyle birlikte farklı kombinasyonları da denenmiştir. *G. stearothermophilus* DSMZ-22 ve *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücreleriyle yapılan deney düzeneklerinde liyofilize bakteriyosinin üreme sayısında düşüşe neden olduğı görülmüştür. 24 saat sonunda ise canlı bakteri hücresine rastlanmamıştır. Aynı işlem, söz konusu bakterilerin endosporları ile de denenmiştir. Endospor ile kurulan deney düzeneklerinde ise sayım sonuçlarına bakıldığında üremenin 2-7 ya da 7-15 günler arasında sonlandığı görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Bakteriyosin, Konserve Gıda, *Geobacillus toebii*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*

ABSTRACT

APPLICATION OF THE BACTERIOCIN FROM *Geobacillus toebii* HBB-218 TO INHIBIT SPOILAGE IN CANNED FOODS

Ayşe ALKIS

M.Sc. Thesis, Department of Biology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gamze BASBULBUL
2016, 37 pages

Bacteriocins are protein compounds produced by bacteria and have an inhibitory effect on the development of closely related species. Nowadays many bacteriocins have been identified and studied. Among these bacteriocins Nisin and pediocin are commercially produced and used in foods as preservatives.

In this study, bacteriocin produced by *Geobacillus toebii* HBB-218 strain (toebicin) was used against the development of *Geobacillus stearothermophilus* DSMZ-22 and *Bacillus coagulans* DSMZ-1 in canned foods. With lactic acid and nisin combinations, bacteriocin obtained from *Geobacillus toebii* HBB-218 strain was tested on the vegetative cells and endospores of indicator bacteria. In the experimental setup with lyophilised bacteriocin and vegetative cells of *G. stearothermophilus* DSMZ-22 and *B. coagulans* DSMZ-1 there was a decrease in growth of bacteria. At the end of 24 hours, no viable cell count was observed. The same procedure was also tested with endospores of the mentioned bacteria. In the experimental setups established with endospore, when the count results were examined it was seen that within 2-7 or 7-15 days growth was terminated.

Key Words: Bacteriocin, Canned Food, *Geobacillus toebi*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*.

ÖNSÖZ

Yaptığım çalışmada geçen süre boyunca emeğini ve fedakârlığını esirgemeyen, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmamda yol gösteren, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, öğrencisi olduğum için büyük bir onur ve gurur duyduğum, ayrıca bu çalışmayı gerçekleştirmeme imkân vererek kendimi geliştirmeye yönelik sağlam adımlar atmamı sağlayan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL’e içtenlikle sonsuz teşekkür ederim.

Değerli Hocalarım Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN ve Prof. Dr. H. Halil BIYIK’a lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca verdikleri her türlü destek ve moral için teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanması sırasında beni cesaretlendiren, yardımlarını ve zamanını esirgemeyen, her zaman destek olan değerli arkadaşlarım K. Şahin KARASÜLEYMANOĞLU, Zeynep ÜN ve Bahadır TÖRÜN’e çok teşekkür ederim. Tezimin en zorlu zamanında benden desteğini ve sabrını esirgemeyen Dr.Erman ORYAŞIN, Zeynep ERDEM AYNUR ve Kübra GÜNEY’e çok teşekkür ederim.

Ayrıca tüm çalışma sürecinde bilgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, sabrını ve sevgisini kaybetmeyen Süleyman CEYLAN ‘a, gerek manevi olarak gerekse istatistik çalışmalarım sırasında bana yol gösteren Habibe GÜLER’e sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için maddi kaynak sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü’ne (Proje no: ADÜ-BAP-FEF- 15012) teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük önem arz eden, sevgisini ve maddi manevi hiçbir yardımını benden esirgemeyen saygıdeğer babam A. Rıza ALKIŞ, çok kıymetli annem Duriye ALKIŞ’a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca bana güç veren ve desteklerini hiç eksik etmeyen ablalarım Neslihan ALKIŞ, Aslıhan TOPAL’a ve abim Oğuzhan ALKIŞ’a çok teşekkür ederim.

Ayşe ALKIS

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM	9
3.1. Materyal	9
3.1.1. Bakteriyosin Eldesi İçin Kullanılan Suş.....	9
3.1.2. İndikatör Bakteriler	9
3.1.3. Kullanılan Besi Yerleri Ve Çözeltiler	9
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Bakteriyosin Hazırlığı	11
3.2.2. Bakteriyosin Aktivitesinin Tayini	11
3.2.3 İnokulum Ve Endospor Süspansiyonlarının Hazırlanması	12
3.2.3.1. Endospor boyama.....	12
3.2.3.2. Endospor yıkama.....	13
3.2.4. Deney Düzeneklerinin Kurulması	13
3.2.4.1. Vejetatif hücreler ile deney düzeneğinin kurulması.....	13
3.2.4.2. Endosporlar ile deney düzeneğinin kurulması	14
4. BULGULAR	16

4.1. Aktivite Sonuçları.....	16
4.2. Endospor Boyama Sonuçları	18
4.3. Vejetatif Hücre İnokülümü.....	19
4.3.1. <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin Vejetatif Hücre Sayım Sonuçları	19
4.3.1.1. Mısır konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları.....	19
4.3.1.2. Bezelye konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları.....	20
4.3.1.3. Salça konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları.....	21
4.3.2. <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in Vejetatif Hücre Sayım Sonuçları	21
4.3.2.1. Mısır konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları	21
4.3.2.2. Bezelye konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları	22
4.3.2.3. Salça konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları	23
4.4. Endospor İnokülümü	23
4.4.1. <i>G. Stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin Sayım Sonuçları	23
4.4.1.1. Mısır konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin sayım sonuçları	23
4.4.1.2. Bezelye konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin sayım sonuçları	24
4.4.1.3. Salça konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin sayım sonuçları	25
4.4.2. <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in Sayım Sonuçları.....	25
4.4.2.1. Mısır konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in sayım sonuçları	25
4.4.2.2. Bezelye konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in sayım sonuçları.....	26
4.4.2.3. Salça konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in sayım sonuçları	26

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	28
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	37



SİMGELER DİZİNİ

AU	: Aktivite Ünitesi
BHI	: Brain Heart Infusion
CFS	: Cell Free-supernatant
CFU	: Coloni Forming Unit
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
Lan	: Lantionin
Log	: Logaritma
MeLan	: Metillantionin
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
NA	: Nutrient Agar
NaCl	: Sodyum Klorür
rpm	: Revolution per minute
rRNA	: Ribozomal Ribonükleikasit
SH	: Monosülfid
TSA	: ryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
SS	: Standart Sapma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Toebicinin <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'ye karşı aktivitesi	16
Şekil 4.2. Toebicinin <i>M. luteus</i> 'a karşı aktivitesi	17
Şekil 4.3. Toebicinin <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'e karşı aktivitesi.....	17
Şekil 4.4. 20 kat seyreltilmiş nisinin <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'e karşı aktivitesi.....	18
Şekil 4.5. <i>B.coagulans</i> DSMZ-1 'in endospor boyaması	18
Şekil 4.6. <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22 'nin endospor boyaması.....	19

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması.....	4
Çizelge 1.2. Gram pozitif bakterilerin ürettikleri bakteriyosinler	5
Çizelge 4.1. Mısır konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları	20
Çizelge 4.2. Bezelye konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları	20
Çizelge 4.3. Salça konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları	21
Çizelge 4.4. Mısır konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları.....	22
Çizelge 4.5. Bezelye konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları.....	22
Çizelge 4.6. Salça konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları.....	23
Çizelge 4.7. Mısır konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin sayım sonuçları.....	24
Çizelge 4.8. Bezelye konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin sayım sonuçları.....	24
Çizelge 4.9. Salça konservesinde <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ-22'nin sayım sonuçları.....	25
Çizelge 4.10.Mısır konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in sayım sonuçları	26
Çizelge 4.11.Bezelye konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in sayım sonuçları	26
Çizelge 4.12.Salça konservesinde <i>B.coagulans</i> DSMZ-1'in sayım sonuçları	27
Çizelge 5.1.Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri (Kurt ve Zorba, 2005).	29

1. GİRİŞ

İnsanların sağlıklı büyüme ve gelişmelerinde tükettikleri gıdaların güvenilir olması büyük bir önem taşımaktadır. Tüketicilerin isteği üzerine yeni gıda kaynakları geliştirilmekte ve bu gıdalar fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi, muhafaza sürelerinin uzatılması amacı ile çeşitli katkı maddelerine maruz bırakılmaktadır. Fakat katkı maddelerinden bazılarının sağlıksız olması ve bunun yanı sıra kullanım oranına bağlı olarak kanserojenik ve toksik etki yapabilmeleri nedeniyle doğal ve güvenilir katkıların üretilip kullanılması oldukça büyük bir önem arz etmektedir (Kurt ve Zorba, 2005).

Gıdaların korunması, onları bozan ya da güvenilmez hale getiren mikroorganizmalara karşı sürekli devam etmekte olan mücadeledir. Gıdalarda tat, besleyicilik özelliği, doğallık ve kolay hazırlanabilirlik tüketiciler tarafından aranan özellikler arasındadır (Cutter ve Suragusa, 1994). Gıdaların korunması ve raf ömürlerinin uzatılmasında, düşük sıcaklık veya ısı işlem uygulaması, paketlenme yöntemleri gibi belirli bir takım işlemler uygulanmaktadır. Ayrıca tuz, şeker ve antimikrobiyal katkı maddeleri gibi katkıların da kullanıldığı görülmektedir (Riley, 1998).

Gıda endüstrisi, artan istekler karşısında yeni koruma teknikleri geliştirmektedir. Geliştirilen bu teknikler ise geleneksel gıda koruma tekniklerini (yoğun ısı işlemler, tuzlama, asitleştirme, kurutma ve kimyasal koruma) değiştirme eğilimindedir. Gıdaların güvenliğinin sağlanmasında olabildiğince işlem uygulamalarından kaçınılmakta ve doğal katkı maddelerinin kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle doğal ve güvenilir katkıların elde edilmesi ve kullanılması oldukça önemli hale gelmektedir. Doğal antimikrobiyal bileşikler arasında bulunan ve gıdalarda çeşitli patojen ve/veya bozulma etkeni olan mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen bakteriyosinler ise bahsedilen nedenlerden dolayı sürekli araştırılmaktadır (Kurt ve Zorba, 2005).

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, protein özelliğinde antagonistik etki gösteren bileşiklerdir. Özellikle üretici türe yakın akraba türlere karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki gösterirler (James, vd 1996). Enterik bakterilerin ürettiği bakteriyosinler hedefi bulma ve bağlanmada özel hücre yüzey reseptörlerinden yararlanmaktadır. Hedefe tutunma işlemi

gerçekleştikten sonra, spesifik translokasyon mekanizmaları ile hücre içine taşınırlar (James vd.,1996). Bakteriyosinlerin en çok Gram-pozitif bakteriler tarafından üretildiği bilinmektedir. Ancak son araştırmalar neticesinde bazı Arke üyelerinin de bakteriyosin ürettiği saptanmıştır (Riley, 2002).

Gram negatif bakterilerden üretilen bakteriyosinler genel olarak mikrosinler olarak isimlendirilmektedir. Mikrosinler; protein büyüklükleri, mikrobiyel hedefleri, etki mekanizmaları ve direnç sistemleri açısından çeşitlilik göstermektedir (Silverstein, 2005).

Bütün bu özelliklerin yanı sıra yapılan araştırmalar neticesinde bakteriyosinlerin populasyon ve komünite düzeyinde mikrobiyal çeşitliliğin sağlanmasında görev aldığı anlaşılmıştır. Hatta bakteriyosinler diğer türlerin de bulunduğu bir nişte, yarışmacı floranın yayılmasını engelleme yeteneği de taşımaktadır (Riley ve Wertz, 2002).

Bakteriyosinler, benzer aktivite özellikleri nedeniyle birçok kaynaktan antibiyotiklerle karıştırılmaktadır. Bu maddeleri antibiyotiklerden ayıran çok fazla fark olmasına rağmen temel farkı, antibiyotiklere nazaran dar bir etki spektrumlarına sahip olmalarıdır (Margaret vd., 2002). Peptid veya protein yapılarında olmaları ile pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden bunun yanı sıra mide salgılarından da etkilenebilme özelliği ise insan vücudunda sindirilebileceklerini göstermektedir (Kurt ve Zorba, 2005). Bakteriyosinlerin (Grup II) ısı stabilitelerinin olması ise yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabileceğini göstermektedir (Delves-Broughton vd., 1996, De Martinis vd., 2002).

Bakteriyosinlerin sınıflandırılması günümüze kadar çeşitli farklılıklar göstermiştir. Yapılan ilk sınıflandırma ise kolisinler grubunda yer almaktadır.

Fredericq (1957), tarafından tavsiye edilen şemaya göre, ilk olarak reseptöre tutunma özellikleri ele alınmış, daha sonra ise spesifik immunitelerine göre ayırma tabii tutulmaktadır (Daw ve Falkiner, 1996).

Reeves, bakteriyosin üreten türleri 16 ayrı sınıfa ayırmıştır. Bakteriyosinler oldukça özgül moleküler yapıya sahip oldukları için adlandırmaları tür isimleri kullanılarak yapılmaktadır (Reeves, 1965).

Bradley, bakteriyosinlerin doğal yapılarını temel alan taksonomik kriter oluşturarak sınıflandırmıştır. Bakteriyosinleri iki alt sınıf içerisinde düşük ve yüksek molekül ağırlıklı olarak ayırmıştır. İlk grup, küçük ısıya dayanıklı ultrasantrifigasyon ile çökelmeyen ve elektron mikroskopla saptanamayan bakteriyosinlerden ikinci grup ise daha büyük molekülleri içeren, kolayca çökelebilen, ısıya dayanıksız, trypsine dirençli ve elektron mikroskoplarıyla saptanamayan bakteriyosinlerden oluşmaktadır (Bradley, 1967).

Klaenhammer (1993), bakteriyosinleri Gram pozitif olmak üzere bakteriyosin üretebilen dört grup altında sınıflandırmıştır. Birinci sınıf lantibiyotiklerden oluşan translasyondan sonra değişikliğe uğrayarak aktif hale geçen ve dehidre kısımlardan lantionin ve β -metillantionin içeren küçük peptidlerden oluşmaktadır. İkinci sınıfta bakteriyosinler ısıya dayanıklı, düşük molekül ağırlığına sahip membran-aktif peptitlerdir. Üçüncü sınıf bakteriyosinler molekül ağırlıkları büyük, ısıya dayanıklı olmayan grubu oluştururken, dördüncü grupta yer alanlar, aktiviteleri için protein olmayan bir kısma gereksinim duyan kompleks bakteriyosinlerdir (Deraz vd., 2005).

Jack vd., (1995), bakteriyosinleri sınıflandırırken disülfid ve monosülfid bağların temel oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu özelliklerine göre bakteriyosinler dört grup altında sınıflandırılmışdır. İlk sınıf, modifiye olmuş aminoasit bulunduran antibiyotikler yani lantibiyotiklerden oluşturulmuştur. İkinci sınıf, aktive gösterebilmek için en az bir disülfid köprüsüne ihtiyaç duyan cystibiyotiklerdir. Üçüncü sınıf, antibiyotigin aktivitesi için indirgenmiş formda tek bir -SH rezidüsü içeren thiolbiotiklerdir. Dördüncü grup da sistein kısım içermeyen antibiyotikler bulunmaktadır (Jack vd., 1995).

Çizelge 1.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması (Jack et al., 1995)

ANTİMİKROBİYA L PEPTİD	MOLEKÜLER AĞIRLIK (kDa)	AMİNOASİTLER	ÜRETİCİ MİKROORGANİZMA
Lantibiyotikler			
Actagardine	1.9	19	<i>Actinoplanes spp.</i>
Ancovenin	2.0	19	<i>Streptomyces spp.</i>
Cinnamycin	2.0	19	<i>S. cinnamoneus</i>
Duramycin	2.0	19	<i>S. cinnamoneus</i>
Epidermin	2.2	22	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Gallidermin	2.2	22	<i>S. gallinarum</i>
Lanthiopeptin	2.0	19	<i>Streptovercillum cinnamoneum</i>
Mersacidin	1.8	19	<i>Bacillus sp.</i>
Nisin	3.4	34	<i>Lactococcus lactis</i>
Pep 5	3.5	34	<i>S. epidermidis</i>
Subtilin	3.3	32	<i>B. subtilis</i>
Cystibiotikler			
Pediocin AcH/PA-1	4.6	44	<i>P. acidilacti H/PAC 1.0</i>
Leucocin A/UAL 187	3.9	37	<i>Leuconostoc gelidum UAL 187</i>
Mezentericin Y 105	3.8	37	<i>L.mesenteroides Y 105</i>
Sakacin A	4.3	41	<i>L. sake LB 706</i>
Sakacin P	4.4	43	<i>L. sake LTH 674</i>
Lactacin F	5.6	57	<i>L.acidophilus 11088</i>
Carnobacteriocin A	5.1	53	<i>Carnobacterium piscicola LV 17 A</i>
Carnobacteriocin BM1	4.5	43	<i>C. piscicola LV 17 B</i>
Carnobacteriocin B2	4.9	48	<i>C. piscicola LV 17 B</i>
Cerein 7/8	4.9	56	<i>B. cereus Bc 7</i>
Thiolbiotikler			
Lactococcin B	5.3	47	<i>L. lactis subsp. cremoris 9 B4</i>
Sisteinsizler			
Lactococcin A	5.8	54	<i>L. lactis subsp. lactis bv. diacetylactis WM4</i>
Lactococcin M	4.3	48	<i>L. lactis subsp. cremoris 9B4</i>
Lactococcin N	4.4	47	<i>L. lactis subsp. cremoris 9B4</i>
Lactococcin Ga	4.3	39	<i>L. lactis subsp. lactis LMG 2081</i>
Lactococcin Gβ	4.1	35	<i>L. lactis subsp. lactis LMG 2081</i>

Son olarak **Cotter vd., (2005)**, bakteriyosinleri başlıca iki farklı kategori altında sınıflandırılmışlardır. Yapılarında bilinen aminoasitlerden farklı olarak lantionine (Lan) ve methyllanthionine (MeLan) amino asit türevlerini içerenler yani Lantibiyotikler diğer grup ise lantionin içermeyen, büyük, ısıya dayanıksız, mürein hidrolazlar, (hücre duvarını hidroliz edenler) yani ‘Bakteriyolizinler’ olarak tanımlanmıştır (Cotter vd., 2005).

Çizelge 1.2. Gram pozitif bakterilerin ürettikleri bakteriyosinler (Cotter 2005)

SINIF I Lantionin içeren bakteriyosinler/ Lantibiyotikler	SINIF II Lantionin içermeyen bakteriyosinler	BAKTERİYOLİZİNLER Bakteriyosin olmayan litik proteinler**
Hem tek hem de iki peptidli lantibiyotikler; 11 alt sınıf önerilmiştir. Tek peptidli: Nisin, mersacidin, Laktisin 481 İki peptidli: Laktisin 3147, sitolizin	Heterojen küçük peptid grubu: Pediosin benzeri (altsınıf a bakteriyosinler), İki-peptidli (altsınıf b bakteriyosinler), Halkasal (altsınıf c bakteriyosinler, Önceden Sınıf V olarak bilinenler), Pediosin olmayan tek, linear peptidler (altsınıf d) Sınıf IIa: Pediosin PA1, Leukosin A; Sınıf IIb: Laktasin F; Sınıf IIc: Enterosin AS48, Reuterin 6; Sınıf IId: Laktokokkin A, Divergisin A	Büyük, ısıya dayanıksız proteinler, genellikle mürein hidrolazlar Lizostafin, enterolislin A **Bu gruba dahil olan üyeler artık bakteriyosin olarak düşünülmemektedir.

16 Ekim 2016 itibariyle toplam 489 adet bakteriyosinin tanımlanması yapılmıştır. Bunlardan 160’i küçük modifiye bakteriyosinler, 236’i küçük modifiye olmamış bakteriyosinler ve 93 tanesi 10 kDa’dan daha büyük bakteriyosinler olarak gruplandırılmıştır (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php/bacteriocin-database>, son erişim tarihi 16/10/2016).

Bilim alanındaki gelişmelerin gıda endüstrisine de yansımalarına karşın gıdaların bozulması önlenememiş ve gıda kaynaklı hastalıklara tam anlamıyla bir çözüm üretilenmemiştir. Gıda bilimindeki araştırmalar gün geçtikçe koruma teknolojileri üzerine daha fazla yoğunlaşsa da üretilen çözümlerin pek azı endüstriyel anlamda

kullanılabilir haldedir. Hızla gelişen gıda bilimi doğrultusunda yapılan son çalışmalar bakteriyosinlerin gün geçtikçe gıdaların korunmasında daha çok ön plana çıktığını ortaya koymaktadır (Cleveland vd., 2001).

Literatürde bakteriyosinlerin kullanım yılı 1951 olarak belirtilmiş olsada insanlar yaklaşık 8000 yıldır (peynir ve diğer fermente gıdaları üretmeye başladığından beri) farkında olmadan bakteriyosinlerden yararlanmaktadır. Laktik asit bakterileri (LAB) üzerinde laktokok türlerinin inhibitör etkisi 1928 yılında belirlenmiştir. 1933 yılında protein yapısına sahip bir madde Yeni Zelanda' da tanımlanmış ve 1947 yılında ise bu madde "Nisin " olarak isimlendirilmiştir. Nisin 1953 yılında İngiltere'de ilk kez satışa sunulmuş tür ve şu anda yaklaşık 50 ülke tarafından hala kullanılmaktadır (Cotter vd., 2005).

Gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımına dair çok fazla araştırma bulunmaktadır. Bakteriyosinler gıdalara *ex situ* (dışarıdan) veya *in situ* koşullarda inokule edilebilir. Gıdalarda koruyucu olarak kullanılabilmesi için yasal açıdan onaylanması gerekmektedir. Bugünkü koşullar göz önüne alındığında nisin ve pediosin PA-1 lisanslı olarak kullanımına izin verilen bakteriyosinlerdir (Balciunas vd., 2013).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bakteriyosinlerin gıdalar üzerinde kullanılabilirliğine dair yapılan bir çalışmada enterosin AS-48, 3 farklı sebze konservesinde *B. coagulans*'a karşı denenmiştir: domates salçası (pH 4.64), konserve şeftali suyu (pH 3.97) ve konserve ananas suyu (pH 3.65). *B. coagulans* CECT 12'nin vejetatif hücreleri içerisinde 6µg/ml AS-48 bulunan ve farklı sıcaklıklarda saklanan domates salçalarına eklendiğinde canlı bakteri hücre sayıları 24 saatte yaklaşık olarak 2.37 (4⁰ C), 4.3 (22⁰ C) ve 3.0 (37⁰ C) log birim azalmıştır. 15 günlük depolamadan sonra hiçbir örnekte canlı bakteri hücresi görülmemiştir. *B. coagulans* CECT 561 suşu domates salçasında zayıf canlılık göstermiş ancak hayatta kalan hücreler de AS- 48 tarafından öldürülmüştür. Bakteriyosin 22⁰ C'de saklanan konserve ananas suyundaki CECT 12 vejetatif hücrelerine karşı da oldukça aktif, konserve şeftali sularında daha az etki göstermiştir. %1.5'lik laktik asit ile desteklenen gıda örneklerinde AS-48 (6 µg/ml) 24 saatlik saklamada vejetatif hücrelerin canlı bakteri hücre sayımını hızlı bir şekilde saptama limitlerinin altına düşürmüştür. Glukoz ve sükroz ilavesi (%10 ve %20) CECT 12 nin vejetatif hücrelerine karşı bakteriyosin aktivitesini oldukça arttırmıştır. Enterocin AS 48 CECT12 sporları üzerinde önemli bir etkiye sahip değildir. Bunun yanında AS-48 'in ısıyla kombinasyonu (80-90⁰C) bakteriyosinin sporlara karşı aktivitesini önemli ölçüde arttırmıştır (Lucas vd., 2006).

Nisinle işlenmiş film ile yapılan bir paketlemede ise *Micrococcus luteus* ATCC 10240 hücre sayısı hem sıvı ortam da, hem de çiğ süt ve pastörize sütte düşüş göstermiştir (Mauriello vd., 2005). Et ürünleri üzerindeki etkisini araştırmak adına Alabalık filetolarında yapılan çalışmada *Lactobacillus pentosus* 39 suşu ve bu suşun ürettiği bakteriyosin *Listeria monocytogenes* ve *Aeromonas hydrophila* bakterilerine karşı denenmiştir. Hem üretici suş, hem de bakteriyosin, buzdolabı sıcaklığında her iki zararlı bakterinin canlı bakteri hücre sayılarını oldukça düşürmüştür, (üretici suş, *A. hydrophila* sayısında 2.1; *L. monocytogenes*'de 3.6 log, bakteriyosin *A. hydrophila* sayısında 1.4; *L. monocytogenes*'de 1.3 log azalmaya neden olmuştur).Gıda patojenlerine karşı bakteriyosinlerin diğer bileşiklerle birlikte kullanımı da araştırılmıştır (Solomakos vd., 2008).

Konserve gıda ve hindistan cevizi sütü örneklerine enterocin AS-48 eklenerek *G. stearothermophilus*'in inaktivasyonu test edilmiştir. 45 ⁰C'de 30 gün boyunca bezelye ve konserve mısırların örneklerinde tanımlama seviyelerinin altında canlı bakteri hücre sayılarında azalma görülmüştür. Hindistan cevizi sütünde AS-48

tarafından (1.75 µg/mL) gerçekleştirilen bakteriyel inaktivasyon daha hızlı bulunmuştur. *G. stearothermophilus* endosporları inoküle edilmiştir. Tüm konserve gıda ve içecek örneklerine AS-48 (gıda örneği başına 1.75 µg/g veya ml) ilave edilmiş ve canlı bakteri hücre sayımları saptanabilir düzeylerin altında bulunmuştur. Ayrıca saklama süresince sporların yeniden gelişimi önlenmiştir. Endosporların kısa süreli bakteriyosinle muamelesinden sonra tripsin eklenmiş ve *G. stearothermophilus* sayıları oldukça artmıştır. Bunun nedeni, tripsinin bakteriyosin aktivitesini gidermesidir (Viedma vd., 2009).

Bakteriyosinin ısıl işlemlerle birlikte kullanımına dair örnek oluşturan bir çalışmada *G. stearothermophilus* CECT 48 ve CECT 49 'un *E. faecalis* EJ 97 tarafından üretilen enterosin EJ 97 ile vegetatif hücreleri ve sporlarının kontrolü çalışılmıştır. Kültür ortamında iki suş da bakteriyosine yüksek hassasiyet göstermiştir. İki suşun vegetatif hücreleri veya endosporlarıyla inoküle edilmiş ve 45 °C 'de 30 gün boyunca saklanmış konserve gıda örneklerinde canlı bakteri hücre sayıları belirlenebilecek miktarın altına düşmüştür. Mikrobiyal inaktivasyonun zaman aralığı gıda örneklerine ve bakteriyosin konsantrasyonuna bağlıdır. Dormant endosporların Enterosin EJ 97 ye kısa süreli muamelelerinde (5dk) dirençli iken ısı ile çimlendirilen endosporlar bakteriyosine karşı hassas hale gelirler. Enterosin EJ 97 ve ısıl işlemin (90-95 °C) aynı anda uygulanması durumunda antimikrobiyal aktivite hızlanmıştır. Çalışma sonucunda enterosin EJ 97'nin konserve gıda ve içeceklerde kullanılma potansiyeli güçlendirilmiştir (Viedma vd., 2010).

Bakteriyosinlerin ambalaj ve paketleme sistemlerinde uygulandığı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; *Enterococcus faecalis* EJ97'nin ürettiği enterocin EJ97, EDTA ile birlikte ve tek başına polietilen ambalajlarda *B. coagulans* bakterisine karşı (+4 ve 20°C) denenmiştir. Konserve mısır ve bezelye suları bakteriyosin/EDTA içeren ambalajlara konarak içlerine *B. coagulans* bakterisi eklenmiştir. EJ97 uygulanan ambalajlarda, 24 saat sonunda mikroskopik gözlem yapılmış ve ölü hücre yüzdesi %97 olarak saptanmıştır. Her iki antimikrobiyalin kombinasyonu ile hazırlanan filmlerde maksimum antibakteriyel aktivite +4 C'de gözlenmiştir (Anacarso vd., 2014).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriyosin Eldesi İçin Kullanılan Suş

G. toebii HBB-218 suşu Doç. Dr. Gamze Başbülbul tarafından izole edilmiş ve 16S rRNA analizi ile tanımlanmıştır. (Başbülbul ve Bıyık, 2012)

3.1.2. İndikatör Bakteriler

G. stearothermophilus DSMZ-22

Patojen olmamasına rağmen endospor oluşturmaları ve yüksek ısıya dayanıklı olması açısından önemli bir bakteridir. Vejetatif hücreleri 55-60 °C de üremektedir. Endosporları ise 121°C’de 15 dakikaya kadar canlılığını koruyabilmektedir (Nazina vd., 2001).

B coagulans DSMZ-1

Düşük pH değerlerinde bile canlılığını koruyabilen ve özellikle bağırsak bozukluklarında kullanılabilen yararlı sayılabilecek bakteri türleri arasındadır (De Clerck vd., 2004).

3.1.3. Kullanılan Besi Yerleri Ve Çözeltiler

Tryptic Soy Agar (TSA)

18.5 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilen besiyeri steril petrilere dökülerek gıdalardaki bakteri sayısının ölçüldüğü sayım yöntemi için kullanılmıştır.

Tryptic Soy Broth (TSB)

12 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilen besiyeri steril tüplere dökülerek bakterilerin 48 saatlik vejetatif hücre kültürü için kullanılmıştır.

Brain Heart Infusion (BHI) Agar

24.5 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilen besiyeri steril petrilere dökülerek HBB-218 suşunun 24 saatlik kültürleri için kullanılmıştır.

Brain Heart Infusion (BHI) Broth

18.5 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilen besiyeri steril erlenlere dökülerek HBB-218 suşundan bakteriyosin elde etmek için 24 saatlik inkübasyonları için kullanılmıştır.

Nutrient Agar (NA)

14 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilen besiyeri steril petrilere dökülerek *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin 24 saatlik kültürleri, endospor geliştirmede ve HBB-218 suşunun ürettiği bakteriyosin aktivitelere bakılırken kullanılmıştır.

Nisin (E234)

Lactococcus lactis den elde edilen bakteriyosin olan nisin ticari olarak temin edilmiştir. 0,2 g tartılıp 30 ml HCl de çözülerek nisin stoğu olarak 0.20 µl por çaplı steril membran filtreden süzülerek saklanmıştır. Deneylerde kullanılmadan önce 20 kat seyreltilerek gıda örneklerine eklenmiştir (Aouadhi vd., 2014).

Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltisi (FTS)

Gıdalardaki bakteri miktarının saptanması sırasında seyreltme sıvısı olarak kullanılmıştır. 1000 ml de 85g NaCl tartılıp içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilmiş ve 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Safranin

0.25g safranin 10 ml etanolde çözülmüş ve 100 ml ye distile su ile tamamlanmıştır.

Malaşit Yeşili

5g malaşit yeşili 100 ml suda çözülmüş ve endospor boyamada kullanılmıştır.

Metilen Mavisi

5 g hazır toz haldeki metilen mavisi 100 ml distile su ile karıştırılıp iyice çözüldükten sonra filtre kağıdından geçirilerek koyu renkli cam şişelerde ışık görmeyen yerde saklanılmıştır. Endospor boyama da kullanılmıştır.

Laktik Asit

%30'luk Laktik asit çözeltisinden %1.5 'luk solusyon hazırlanıp gıda örneklerinde kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteriyosin Hazırlığı

G. toebii HBB-218 suşları stok kültürden alınarak Brain Heart Infusion agara swab yardımı ile yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. Ekimi tamamlanan petriler 24 saat 55 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde petrilere öze ile alınan bakteriler BHI broth'a ekilmiştir. 24 saat boyunca 55 C de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 8000 rpm de 10 dk santrifüj edilen 218 suşlarının üst fazı (süpernatant) steril şırıngalarla çekilerek 0.20 µl por çaplı steril membran filtreden süzölmüş ve süzöntüler (CFS, cell-free supernatant) steril tüplere toplanmıştır. Elde edilen CFS'ler liyofilizasyon cihazında 48 saat liyofilize edilerek bakteriyosin (toebicin) preparatları hazırlanmıştır (Abriouel vd., 2003).

3.2.2. Bakteriyosin Aktivitesinin Tayini

Gıdalara eklenecek toebicinin aktivitesinin belirlenmesi için indikatör bakteri olarak *G. stearothermophilus* DSMZ-22 'un agar ortamındaki 24 saatlik kültürlerinden steril distile suda 0.5 MacFarland bulanıklığına eşdeğer olacak şekilde süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar steril swab ile nutrient agara yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. Bu işlemten sonra 8 eşit parça oluşturacak şekilde petri cam kalemi ile bölmelere ayrılmıştır. Ayrılan her bölmenin orta kısmına 6 mm çaplı steril agar delici ile kuyucuk oluşturulmuştur. Daha önceden hazırlanan TSB besi ortamından steril ependorflara 300 µl ilave edilmiştir. Önceden hazırlanan CFS'lerden 300 µl alınarak ardışık olarak ikişer kat seyreltme yapılmıştır. Yapılan her seyreltmeden ve CFS örneğinden 50 µl alınarak seyreltme sayısına göre daha önceden belirlenmiş kuyucuklara ilave edilmiştir.

Petriler +4 °C’de 2 saat bekletilmiştir. Petriler daha sonra 55 °C’de inkübe edilmiş ve oluşan zorların çapları ölçülmüştür. Aktivite tayini aynı zamanda liyofilize bakteriyosin preparatları ile de yapılmıştır. Bu amaçla (% 0.1 lik) bakteriyosin preparatlarından aynı miktarda alınıp aktivite tayini için bütün işlemler tekrarlanmıştır. İnkübasyondan sonra zon görülen en son seyreltme baz alınarak hesaplama yapılmıştır.

Aktivite Hesaplanmasında $AU/mL = d \times (1000 / 50)$ (d En son zon görülen seyreltme) formülü kullanılmıştır.

3.2.3. İnokülüm ve Endospor Süspansiyonlarının Hazırlanması

G. stearothermophilus DSMZ-22’nin üssel fazındaki vejetatif hücreleri yiyecek ve içeceklere inoküle edilmeden önce Tryptic Soy Broth’da 45 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. *B. coagulans* DSMZ-1’ in üssel fazındaki vejetatif hücreleri yiyecek ve içeceklere inoküle edilmeden önce Tryptic Soy Broth’da 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Endospor preparatları için ise TSA besiyerlerine *G. stearothermophilus* DSMZ-22 ve *B. coagulans* DSMZ-1 stok kültürlerinden swab yardımıyla ekim yapılmıştır. *G. stearothermophilus* DSMZ-22 yaklaşık 20-25 gün 45 °C’de, *B. coagulans* DSMZ-1 37 °C’de 4-5 gün inkübe edilmiştir. Üreyen bakterilerden öze ile bir miktar alınıp endospor boyama yapılmıştır. Boyama yapılan preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmiş ve %95 endospor yoğunluğuna ulaşmış olmadığı saptanmıştır (Viedma vd., 2009).

3.2.3.1. Endospor boyama

Petrilere ekilen bakterilerin endospor oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla Tryptic Soy agardaki yaşlı kültürler (*G. stearothermophilus* DSMZ-22 için 20 gün, *B. coagulans* DSMZ-1 için 4-5 gün) kullanılmıştır. Lam üzerine bir damla su konulmuştur. Yaşlı kültürlerden öze ile bir miktar alınarak lam üzerindeki su içerisinde dağıtılmıştır. Açık havada kurumaya bırakılan preparatlar ateşte fikse edildikten sonra üzeri metilen mavisi ile kaplanacak şekilde boyanıp 9-10 dk bekletilmiştir. Daha sonra su ile yıkanan preparatlar açık havada kurumaya bırakılmış ve mikroskop altında immersiyon damlatılarak 100x’lik objektifte incelenmiştir (Tamer vd., 1989).

3.2.3.2. Endospor yıkama

Yaşlandırılmış hücreler her bir petriden öze yardımıyla toplanıp 1000 µl distile su bulunan endosporların içerisine toplanmıştır. Vortekslelendikten sonra endosporlar 13000 rpm de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılıp üzerine yeniden 1000 µl distile su ilave edilerek bu işlem üç kez tekrarlanır. Son santrifüjden sonra süpernatant atılır ve distile su ilavesi yapıp vortekslenir ve stok endospor kültürü olarak -20 de saklanır (Garde vd.,2011).

3.2.4. Deney Düzeneklerinin Kurulması

Gıda örnekleri ikili tekrar halinde vejetatif hücre ve endospor süspansiyonları ile inoküle edilmiştir. Kontroller ve toebicin uygulanan örnekler 45 °C ve 37 °C' de kontrollü inkübasyona bırakılmıştır. Belirli aralıklarda konserve gıda örnekleri tuz çözeltisi ile seri olarak seyreltilerek Triptic soy agar petrilere üç paralelde ekilip 45 °C ve 37 °C 'de inkübasyona bırakılmıştır. Koloniler sayılarak canlı bakteri hücre sayısı CFU/g veya CFU/mL olarak ifade edilmiştir. Saptama limiti 10 CFU'dur (Viedma vd.,2009). Yaptığımız çalışmada vejetatif hücre sayımları için belirli saatlerde, endospor sayımları için ise belirli günlerde ekim yapılmıştır. Ayrıca çalışmada toebicine laktik asit ve ticari nisin ilavesi yapılarak da farklı kombinasyonlar halinde denenmiştir. Petri üzerindeki bölmelerde en son üreme görülen bölümdaki koloni sayısı sayılıp bulunduğu seyreltme faktörü ile çarpılmıştır. Daha sonra 10 tabanında Logaritması alınarak CFU sayısı saptanmıştır.

3.2.4.1. Vejetatif hücreler ile deney düzeneginin kurulması

İndikatör bakterilerin vejetatif hücreleri TSB besiyerlerinde 48 saat boyunca (*G. stearothermophilus* DSMZ-22 45°C, *B. coagulans* DSMZ-1 37°C) geliştirilmiş ve bu kültürler inokülüm kaynağı olarak kullanılmıştır. Mısır ve bezelye konservelerinin sıvı kısmından, salça konservesinin ise (%50 lik) sıvı çözeltisinden steril falkonlara konulmuştur. 4 tip düzenek hazırlanmıştır.

- 1) Gıda örneği + Vejetatif hücreler (Kontrol)
- 2) Gıda örneği + Vejetatif hücreler + Toebicin
- 3) Gıda örneği + Vejetatif hücreler + Toebicin + Laktik asit

4) Gıda örneği + Vejetatif hücreler + Toebicin + Nisin

Mısır ve bezelye konserveleri ile deney düzeneğinin kurulması

Gıda örnekleri son hacim 10 ml olacak şekilde falkon tüpleri içerisine steril pipet yardımıyla ölçülerek aktarılmıştır. Düzenekler dört farklı kombinasyonla ve iki tekrarlı olarak kurulmuştur. Her bir düzenek ise üç tekrarlı olarak TSA besi ortamı içeren steril petrilere ekilmiştir. Ekim işlemi; alınan örneklerden seri seyreltme yapılarak petrilere damlatma yöntemiyle inokule edilmesi esasına dayanır. Ekimi yapılan örnekler indikatör bakteriye uygun sıcaklıkta (*G. stearothermophilus* DSMZ-22 45 °C', *B. coagulans* DSMZ-1 37 °C) inkübasyona bırakılmıştır. İndikatör bakterilerin vejetatif hücreleriyle yapılan deney düzeneklerinin ekimi (0/2/4/24) saatlik periyotlarda gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan petrilere 48 saat sonra sayımı yapılmıştır.

Salça ile deney düzeneğinin kurulması

Son hacim 10 ml olacak şekilde falkon tüpleri içerisine steril pipet yardımıyla ölçülerek aktarılmıştır. Düzenekler dört farklı kombinasyonla ve iki tekrarlı olarak kurulmuştur. Her bir düzenek ise üç tekrarlı olarak TSA besi ortamı içeren steril petrilere ekilmiştir. Ekim işlemi; alınan örneklerden seri seyreltme yapılarak petrilere damlatma yöntemiyle inokule edilmesi esasına dayanır. Ekimi yapılan örnekler indikatör bakteriye uygun sıcaklıkta (*G. stearothermophilus* DSMZ-22 45 °C', *B. coagulans* DSMZ-1 37 °C) inkübasyona bırakılmıştır. İndikatör bakterilerin vejetatif hücreleriyle yapılan deney düzeneklerinin ekimi (0/2/4/24) saatlik periyotlarda gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan petrilere 48 saat sonra sayımı yapılmıştır.

3.2.4.2. Endosporlar ile deney düzeneğinin kurulması

Daha önceden hazırlanan endospor stoklarından inokulum saptama limitini tespit etmek için seri seyreltmeler yapılarak TSA ortamına yayma ekim yöntemiyle ekim yapılır. 24 saat sonra ekim yapılan seyreltmelerden koloni sayımı yapılarak inokulum miktarı belirlenir. (CFU 3×10^6) Mısır ve bezelye konservelerinin sıvı kısmından, salça konservesinin ise (%50 lik) sıvı çözeltisinden steril falkonlara konulmuştur. 4 tip düzenek hazırlanmıştır.

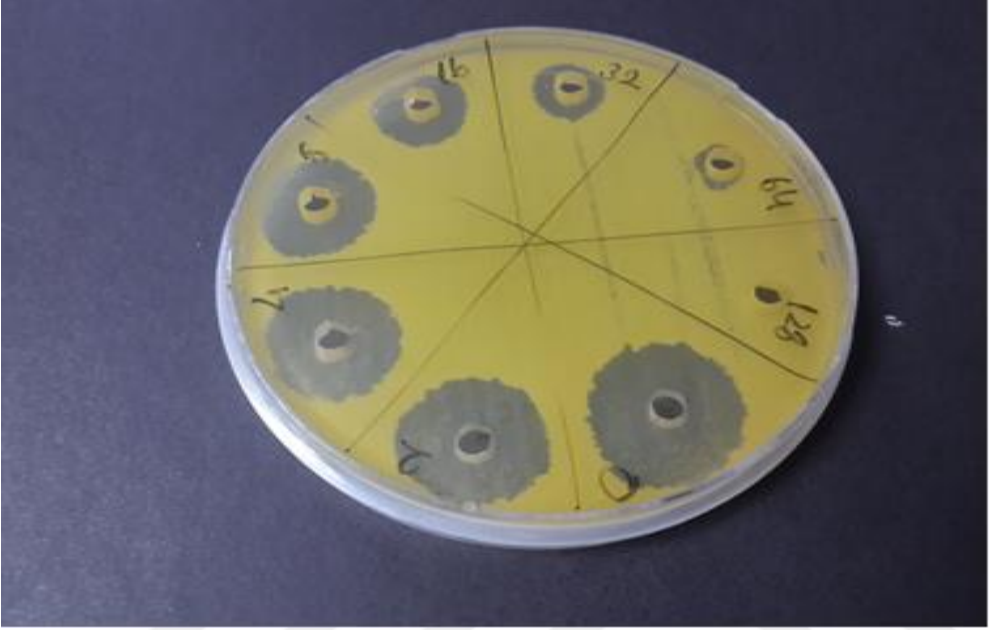
- 1) Gıda örneği + Endospor (Kontrol)
- 2) Gıda örneği + Endospor + Toebicin
- 3) Gıda örneği + Endospor + Toebicin + Laktik asit
- 4) Gıda örneği + Endospor + Toebicin + Nisin

Mısır ve bezelye konserveleri ile deney düzeneğinin kurulması

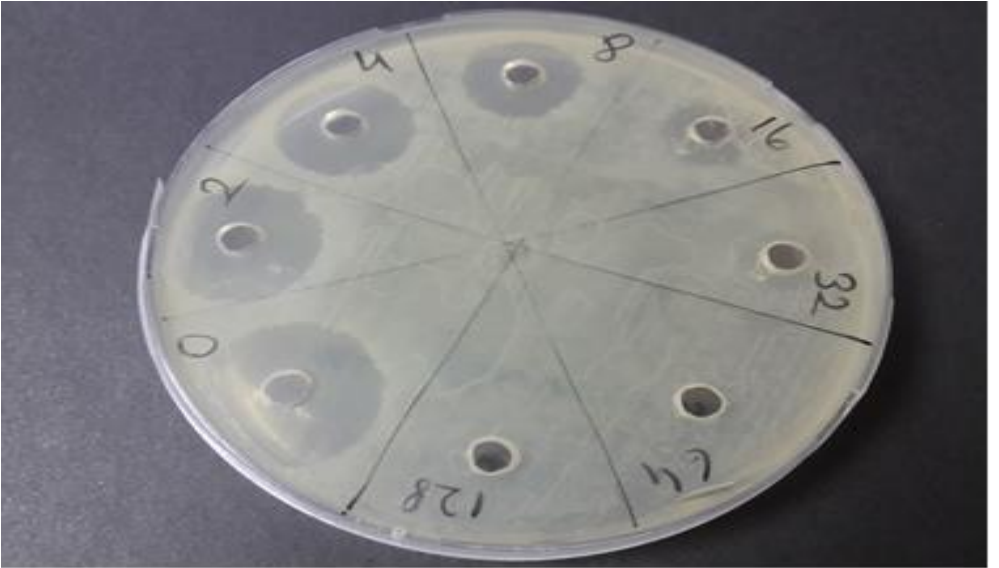
Gıda örnekleri son hacim 10 ml olacak şekilde falkon tüpleri içerisine steril pipet yardımıyla ölçülerek aktarılmıştır. Düzenekler dört farklı kombinasyon ve iki tekrarlı olarak kurulmuştur. Her bir düzenek ise üç tekrarlı olarak TSA besi ortamı içeren steril petrilere ekilmiştir. Ekim işlemi; alınan örneklerden seri seyreltme yapılarak petrilere damlatma yöntemiyle inoküle edilmesi esasına dayanır. Ekimi yapılan örnekler indikatör bakteriye uygun sıcaklıkta (*G. stearothermophilus* DSMZ-22 45 °C, *B. coagulans* DSMZ-1 37 °C) inkübasyona bırakılmıştır. İndikatör bakterilerin endosporlarıyla yapılan deney düzeneklerinin ekimi (0/1/2/7) günlük periyotlarda gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan petrilere 48 saat sonra sayımı yapılmıştır.

Salça ile deney düzeneğinin kurulması

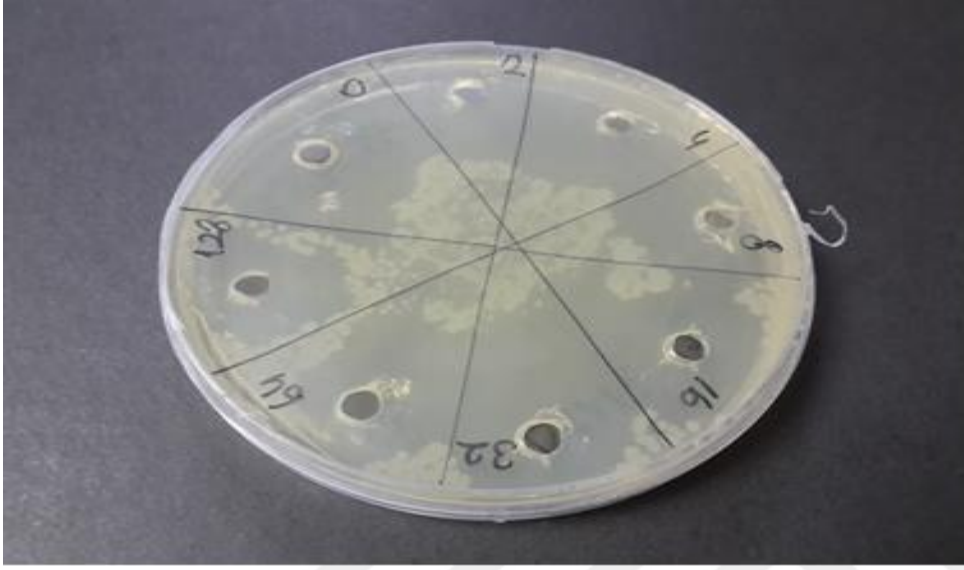
Son hacim 10 ml olacak şekilde falkon tüpleri içerisine steril pipet yardımıyla ölçülerek aktarılmıştır. Düzenekler dört farklı kombinasyon ve iki tekrarlı olarak kurulmuştur. Her bir düzenek ise üç tekrarlı olarak TSA besi ortamı içeren steril petrilere ekilmiştir. Ekim işlemi; alınan örneklerden seri seyreltme yapılarak petrilere damlatma yöntemiyle inoküle edilmesi esasına dayanır. Ekimi yapılan örnekler indikatör bakteriye uygun sıcaklıkta (*G. stearothermophilus* DSMZ-22 45 °C, *B. coagulans* DSMZ-1 37 °C) inkübasyona bırakılmıştır. İndikatör bakterilerin endosporlarıyla yapılan deney düzeneklerinin ekimi (0/1/2/7/15) günlük periyotlarda gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan petrilere 48 saat sonra sayımı yapılmıştır.



Şekil 4.2. Toebicin'in *M. luteus*'a karşı aktivitesi (Aktivite 640 AU/ml'dir.)



Şekil 4.3. Toebicin'in *B. coagulans* DSMZ-1'e karşı aktivitesi. (Aktivite 320 AU/ml'dir.)



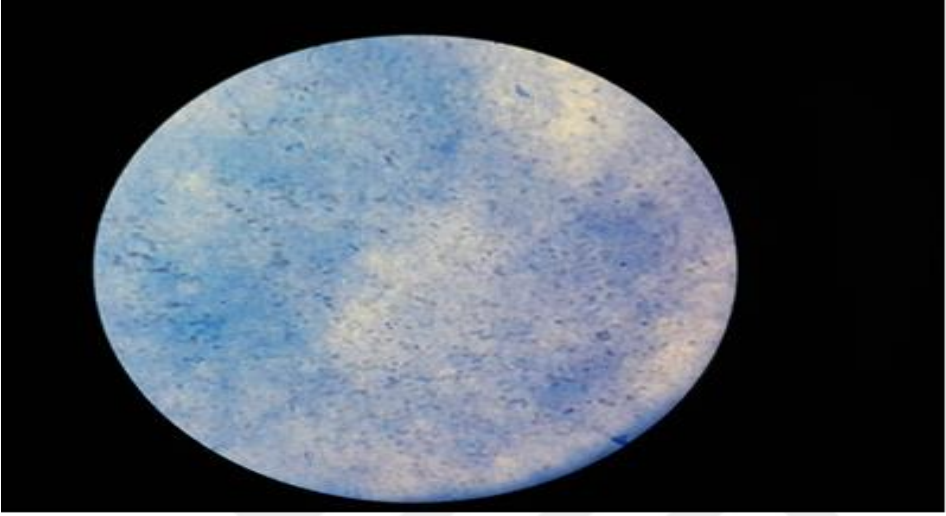
Şekil 4.4. 20 kat seyreltilmiş nisin'in *B. coagulans* DSMZ-1'e karşı aktivitesi. (Aktivite >2560 AU/ml)

4.2. Endospor Boyama Sonuçları

Metilen mavisi ile basit boyaması yapılan *B. coagulans* ve *G. stearothermophilus*'un 100X'lik büyütmede immersiyon yağı ile endosporları incelenmiştir. Vejetatif hücreler metilen mavisi ile boyanıp mavi renkte görünürken endosporlar boyanmayıp renksiz görünmektedir.



Şekil 4.5. *B. coagulans* DSMZ-1 'in endospor boyaması



Şekil 4.6. *G. stearothermophilus* DSMZ-22 'nin endospor boyaması

4.3. Vejetatif Hücre İnokülümü

4.3.1. *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin Vejetatif Hücre Sayım Sonuçları

4.3.1.1. Mısır konservesinde *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları

G. stearothermophilus DSMZ-22 bulaştırılan mısır konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (2,59 Log) ilave edilen düzenekte görülmüştür. Sırasıyla toebicin (1,78 Log) ve laktik asit (1,55 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 24. saatteki sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir.

Çizelge 4.1. Mısır konservesinde *G. stearotherophilus* DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

SAAT	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	5,03 $\pm$ 0.03	5,03 $\pm$ 0.03	5,03 $\pm$ 0.03	5,03 $\pm$ 0.03
2	5,03 $\pm$ 0.01	4,48 $\pm$ 0.12	4,79 $\pm$ 0.00	3,82 $\pm$ 0,01
4	4,98 $\pm$ 0.01	3,25 $\pm$ 0.00	3,48 $\pm$ 0.13	2,44 $\pm$ 0,08
24	5,56 $\pm$ 0.04	0	0	0

4.3.1.2. Bezelye konservesinde *G. stearotherophilus* DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları

G. stearotherophilus DSMZ-22 bulaştırılan bezelye konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (3,32 Log) ilave edilen düzenekte görülmüştür. Sırasıyla toebicin (2,07 Log) ve laktik asit (2,61 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 24. saatteki sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir.

Çizelge 4.2. Bezelye konservesinde *G. stearotherophilus* DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

SAAT	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	5,03 $\pm$ 0,06	5,03 $\pm$ 0,06	5,03 $\pm$ 0,06	5,03 $\pm$ 0,06
2	5,02 $\pm$ 0,03	3,56 $\pm$ 0,10	3,69 $\pm$ 0,02	2,32 $\pm$ 0,22
4	5,02 $\pm$ 0,02	2,96 $\pm$ 0,04	3,42 $\pm$ 0,10	1,71 $\pm$ 0,04
24	5,41 $\pm$ 0,29	0	0	0

4.3.1.3. Salça konservesinde *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları

G. stearothermophilus DSMZ-22 bulaştırılan salça konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (3,06 Log) ilave edilen düzenekte görülmüştür. Sırasıyla laktik asit (1,78 Log) ve toebisin (1,44 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 24. saatteki sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir. Bunun yanı sıra kontrol grubunda da bakteri sayısında azalma görülmüştür.

Çizelge 4.3. Salça konservesinde *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

SAAT	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	4,41 $\pm$ 0,06	4,41 $\pm$ 0,06	4,41 $\pm$ 0,06	4,41 $\pm$ 0,06
2	3,55 $\pm$ 0,15	3,24 $\pm$ 0,18	3,13 $\pm$ 0,06	2,56 $\pm$ 0,1
4	4,40 $\pm$ 0,02	2,70 $\pm$ 0,12	2,63 $\pm$ 0,11	1,35 $\pm$ 0,15
24	3,57 $\pm$ 0,29	0	0	0

4.3.2. *B. coagulans* DSMZ-1'in Vejetatif Hücre Sayım Sonuçları

4.3.2.1. Mısır konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları

B. coagulans DSMZ-1 bulaştırılan mısır konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (4,74 Log) ilave edilen düzenekte görülmüş ve 0. saat itibarıyla canlı bakteri hücrelerine rastlanmamıştır. Sırasıyla toebicin (2,11 Log) ve laktik asit (1,91 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 24. saatteki sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir.

Çizelge 4.4. Mısır konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

SAAT	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	4,74 $\pm$ 0,00	4,74 $\pm$ 0,00	4,74 $\pm$ 0,00	4,74 $\pm$ 0,00
2	4,86 $\pm$ 0,06	3,06 $\pm$ 0,03	3,17 $\pm$ 0,07	0
4	4,78 $\pm$ 0,02	2,63 $\pm$ 0,01	2,83 $\pm$ 0,17	0
24	4,87 $\pm$ 0,20	0	0	0

4.3.2.2. Bezelye konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları

B. coagulans DSMZ-1 bulaştırılan bezelye konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (5,17 Log) ilave edilen düzenekte görülmüş ve 0. saat itibariyle canlı bakteri hücresine rastlanmamıştır. Sırasıyla laktik asit (2,54 Log) ve toebicin (2,47 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 24. saatteki sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir.

Çizelge 4.5. Bezelye konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

SAAT	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	5,17 $\pm$ 0,07	5,17 $\pm$ 0,07	5,17 $\pm$ 0,07	5,17 $\pm$ 0,07
2	4,76 $\pm$ 0,14	3,24 $\pm$ 0,00	3,13 $\pm$ 0,1	0
4	4,72 $\pm$ 0,05	2,70 $\pm$ 0,06	2,63 $\pm$ 0,05	0
24	5,53 $\pm$ 0,00	0	0	0

4.3.2.3. Salça konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları

B. coagulans DSMZ-1 bulaştırılan salça konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (4,02 Log) ilave edilen düzenekte görülmüş ve 0. saat itibariyle canlı bakteri hücrelerine rastlanmamıştır. Sırasıyla toebicin (1,74 Log) ve laktik asit (1,67 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 24. saatteki sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir. Bunun yanı sıra kontrol grubunda da bakteri sayısında azalma görülmüştür.

Çizelge 4.6. Salça konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

SAAT	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	4,02 $\pm$ 0,18	4,02 $\pm$ 0,18	4,02 $\pm$ 0,18	4,02 $\pm$ 0,18
2	4,08 $\pm$ 0,08	3,23 $\pm$ 0,40	3,3 $\pm$ 0,20	0
4	4,4 $\pm$ 0,18	2,28 $\pm$ 0,16	2,35 $\pm$ 0,62	0
24	2,71 $\pm$ 0,27	0	0	0

4.4. Endospor İnokülümü

4.4.1. *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin Sayım Sonuçları

4.4.1.1. Mısır konservesinde *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin sayım sonuçları

G. stearothermophilus DSMZ-22 endosporlarının bulaştırıldığı mısır konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (3,5 Log) ilave edilen düzenekte görülmüştür. Sırasıyla laktik asit (3,16 Log) ve toebicin (2,91 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 7. gün yapılan sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir.

Çizelge 4.7. Mısır konservesinde *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

GÜN	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	4,70 $\pm$ 0,24	4,70 $\pm$ 0,24	4,70 $\pm$ 0,24	4,70 $\pm$ 0,24
1	4,54 $\pm$ 0,10	2,61 $\pm$ 0,05	2,46 $\pm$ 0,15	1,95 $\pm$ 0,00
2	4,56 $\pm$ 0,07	1,79 $\pm$ 0,04	1,54 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0
7	5,38 $\pm$ 0,12	0	0	0

4.4.1.2. Bezelye konservesinde *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin sayım sonuçları

G. stearothermophilus DSMZ-22 endosporlarının bulaştırıldığı bezelye konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (3,2 Log) ilave edilen düzenekte görülmüştür. Sırasıyla laktik asit (2,68 Log) ve toebicin (2,52 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0.05$). 7. gün yapılan sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir.

Çizelge 4.8. Bezelye konservesinde *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

GÜN	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	4,43 $\pm$ 0,57	4,43 $\pm$ 0,57	4,43 $\pm$ 0,57	4,43 $\pm$ 0,57
1	4,72 $\pm$ 0,07	2,40 $\pm$ 0,05	2,23 $\pm$ 0,05	1,81 $\pm$ 0,03
2	4,73 $\pm$ 0,01	1,91 $\pm$ 0,04	1,75 $\pm$ 0,06	1,23 $\pm$ 0,07
7	5,73 $\pm$ 0,03	0	0	0

4.4.1.3. Salça konservesinde *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin sayım sonuçları

G. stearothermophilus DSMZ-22 endosporlarının bulaştırıldığı salça konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (3,16 Log) ilave edilen düzenekte görülmüştür. Sırasıyla toebicin (2,77 Log) ve laktik asit (2,54 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 7. gün yapılan sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir. Bunun yanı sıra kontrol grubunda da bakteri sayısında azalma görülmüştür.

Çizelge 4.9. Salça konservesinde *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

GÜN	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	4,20 $\pm$ 0,25	4,20 $\pm$ 0,25	4,20 $\pm$ 0,25	4,20 $\pm$ 0,25
1	3,74 $\pm$ 0,02	2,44 $\pm$ 0,08	2,42 $\pm$ 0,06	1,93 $\pm$ 0,01
2	3,54 $\pm$ 0,10	1,43 $\pm$ 0,43	1,66 $\pm$ 0,10	1,04 $\pm$ 0,04
7	2,92 $\pm$ 0,16	0	0	0

4.4.2. *B. coagulans* DSMZ-1'in Sayım Sonuçları.

4.4.2.1. Mısır konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in sayım sonuçları

B. coagulans DSMZ-1 endosporlarının bulaştırıldığı mısır konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (4,64 Log) ilave edilen düzenekte görülmüştür. Sırasıyla laktik asit (2,31 Log) ve toebicin (2,11 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 7. gün yapılan sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir.

Çizelge 4.10. Mısır konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

GÜN	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	5,76 $\pm$ 0,03	5,76 $\pm$ 0,03	5,76 $\pm$ 0,03	5,76 $\pm$ 0,03
1	5,76 $\pm$ 0,11	4,41 $\pm$ 0,25	4,5 $\pm$ 0,01	1,43 $\pm$ 0,07
2	4,68 $\pm$ 0,06	3,65 $\pm$ 0,01	3,45 $\pm$ 0,15	1,1 $\pm$ 0,10
7	4,57 $\pm$ 0,12	0	0	0

4.4.2.2. Bezelye konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in sayım sonuçları

B. coagulans DSMZ-1 endosporlarının bulaştırıldığı bezelye konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (4,15 Log) ilave edilen düzenekte görülmüştür. Sırasıyla laktik asit (2,67 Log) ve toebicin (2,55 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma görülmüştür. ($p < 0.05$) 7. gün yapılan sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir.

Çizelge 4.11. Bezelye konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

GÜN	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	5,3 $\pm$ 0,09	5,3 $\pm$ 0,09	5,3 $\pm$ 0,09	5,3 $\pm$ 0,09
1	5,71 $\pm$ 0,01	3,68 $\pm$ 0,22	3,39 $\pm$ 0,06	1,79 $\pm$ 0,03
2	5,17 $\pm$ 0,08	2,75 $\pm$ 0,01	2,63 $\pm$ 0,14	1,15 $\pm$ 0,05
7	4,52 $\pm$ 0,03	0	0	0

4.4.2.3. Salça konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in sayım sonuçları

B. coagulans DSMZ-1 endosporlarının bulaştırıldığı salça konservesinde yapılan deney neticesinde kontrol grubuna göre canlı bakteri hücre sayısındaki en çok düşüş nisin (3,85 Log) ilave edilen düzenekte görülmüştür. Sırasıyla toebicin (3,83 Log) ve laktik asit (3,7 Log) ilave edilen düzeneklerde de anlamlı bir azalma

görülmüştür. ($p<0.05$) 15. gün yapılan sayım sonucunda ise üç düzenekte de bakteri gelişimi ihbibe edilmiştir. Bunun yanı sıra kontrol grubunda da bakteri sayısında azalma görülmüştür.

Çizelge 4.12. Salça konservesinde *B. coagulans* DSMZ-1'in vejetatif hücre sayım sonuçları. (Canlı bakteri hücre sayım sonuçları $\log_{10}$ CFU /mL olarak ifade edilmektedir. $\pm$ standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.)

GÜN	KONTROL	TOEBİCİN	TOEBİCİN+ LAKTİK ASİT	TOEBİCİN+ NİSİN
0	5,56 $\pm$ 0,07	5,56 $\pm$ 0,07	5,56 $\pm$ 0,07	5,56 $\pm$ 0,07
1	5,19 $\pm$ 0,16	2,27 $\pm$ 0,01	2,23 $\pm$ 0,12	2,38 $\pm$ 0,07
2	2,71 $\pm$ 0,14	2,01 $\pm$ 0,15	2,21 $\pm$ 0,20	1,74 $\pm$ 0,08
7	2,21 $\pm$ 0,05	1,73 $\pm$ 0,04	1,86 $\pm$ 0,12	1,71 $\pm$ 0,12
15	2,5 $\pm$ 0,30	0	0	0

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakteriyosinlerin etki mekanizması ve gıdalarda kullanılması adına yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Fakat gıdalarda kullanım amacı ile yeterince karakterize edilememişlerdir. Dolayısıyla sınırlı miktarlarda da olsa nisin ve pediocin dışında başka bakteriyosinlerin kullanımına izin verilmemektedir. Bakteriyosinlerin en önemli özelliklerinden biri patojen mikroorganizmalara karşı etkili olmalarıdır (Kurt ve Zorba, 2005). Bu nedenle gıdalarda kullanılmaları durumunda faydalı ve etkili sonuçlar ortaya çıkarmaktadır.

Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanıldığı durumlar da;

- Gıdaların raf ömürlerini uzatmak,
- Sıcaklığın zararlı olacağı şartlar altında ekstra koruma sağlamak,
- Gıda zinciri boyunca, gıda kaynaklı patojenlerin bulaşma riskini azaltmak,
- Bakteriyosinler sayesinde, gıdaların bozulmasından kaynaklanan ekonomik kayıpları azaltmak ve kimyasal koruyucuları daha az kullanmak,
- Isıl işlem daha az kullanıldığı için, gıdalardaki besleyici maddeler ve vitaminlerin daha az zarar görmesi,
- Yeni (daha az asidik, daha düşük tuz konsantrasyonuna sahip, yüksek su içerikli) gıdaların pazarlanması gibi yararlar sağlamaktır.

Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanılabilmesi için antimikrobiyal etki spektrumları, biyokimyasal yapıları, gıdalarda kullanılabilirliği hakkında bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Bunun yanı sıra gıdalarda kullanılması durumunda ortaya çıkabilecek kar ve zarar maliyetinin hesaplanması öncelikli olarak dikkate alınması gereken belirteçlerdir.

Çizelge 5.1. Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri (Kurt ve Zorba, 2005).

Bakteriyosin	Uygulanan gıda	Etkileri
Nisin A	Şekillendirilmesi yeniden yapılan et ürünleri (formed meat products)	Bakteriyel inaktivasyonu sağlamıştır
Nisin A	Ricotta peyniri üzerinde <i>L. monocytogenes</i> 'in karşı kullanılmıştır	<i>L. monocytogenes</i> 'i 8 hafta etkili bir şekilde inhibe etmiştir
Pediocin AcH	Pediocin AcH sentezleyen <i>L. plantarum</i> WHE 92, olgunlaşmanın başlangıcında Munstar peynirinin yüzeyine spreyleneştir	<i>L. monocytogenes</i> ' gelişimini engellediği görülmüştür.
Enterocin 4	<i>E. faecalis</i> INIA4 tarafından sentezlenen Enterocin, Manchego peynir üretim safhasında kullanılmıştır	<i>L. monocytogenes</i> Ohio 'yu inhibe edebilmiş fakat Scott A'yı inhibe etmemiştir
Linocin M-18	<i>B. lines</i> kırmızı peynir üretimi esnasında starter suş olarak kullanılmıştır	<i>L. ivanovi</i> ve <i>L. monocytogenes</i> 'te 2 log düşüşe neden olmuştur
Piscicolin 126	Jambonda <i>L. monocytogenes</i> kontrolü nedeniyle uygulanmıştır	Ticari bakteriyosinlerden daha etkili olduğu görülmüştür
Leucocin A	<i>L. gelidium</i> UAL187 vakum paketlenmiş sığır etinde bozulma kontrolü için kullanılmıştır	<i>L. sake</i> 'nin de etkisiyle bozulma 8 haftaya kadar geciktirilmiştir.
Pediocin AcH	Tavuk eti sosisinde <i>L. monocytogenes</i> 'i inhibe etmek için pediosin üreten <i>P. acidilactici</i> (Ped+) kullanılmıştır	Etkili bir şekilde <i>L. monocytogenes</i> sayısını azaltmıştır.
Pediocin	Şarap ve fırıncılık ürünlerinde kullanım potansiyeli araştırılmıştır	Bu tür ürünlerde kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir
Pediocin AcH	Tavuk etine pediosin preparatı ilave edilmiştir	5°C'de 28 gün <i>L. monocytogenes</i> gelişimini kontrol etmiştir
Pediocin PA-1	Fermente sosiste starter olarak <i>P. acidilactici</i> (Ped+) kullanılmıştır	<i>L. monocytogenes</i> 'i etkili bir şekilde kontrol etmiştir.
Enterocin	Jambon, domuz eti, tavuk göğüs eti, pate ve sosis'te kullanılmıştır	Çeşitli şartlar altında <i>L. monocytogenes</i> gelişimini kontrol etmiştir

Konserve gıdaların korunmasında asidifikasyon ve termal işlem en çok kullanılan metotlardır. Bununla birlikte, pek çok bakteri türü, bu zor koşullarda gelişerek gıdalarda bozulmalara neden olur. Endospor oluşturan bakteriler, hem çiğ gıdalarda bol bulundukları için hem de bu bakterilerin endosporları, vejetatif hücrelere göre daha zor inaktive edildiği için gıda endüstrisinde en yaygın problem

oluşturan bakterilerdir. Bu işlemlerin maliyeti yüksektir ve ürün kalitesini azaltır. *B. coagulans* DSMZ-1 ve *G. stearothermophilus* DSMZ-22 konserve gıdalarda en çok bulunan bakterilerdir. *B. coagulans* zayıf asidofilik ve termotolerant bir bakteridir. Bu bakteri, gaz oluşturmada laktik asit ürettiği için ekşime tarzı bozulmaya neden olur. *B. coagulans* DSMZ-1 sporları çimlenme yeteneğindedir ve pH 4’de bile gelişir, sebzelerde ve meyve konservelerinde ve özellikle pH’sı 4,1-5,0 arası olan domates ürünlerinde önemlidir.

G. stearothermophilus DSMZ-22 de *B. coagulans* DSMZ-1 gibi asidik konserve gıdalarda ekşime tarzı bozulmaya neden olan, endosporlu bir bakteridir. İşlem sırasında bozulmanın en önemli nedeni yetersiz soğutma ve ürünün kontamine olmasıdır. Günümüze kadar, bakteriyosinlerin doğal koruyucu olarak kullanılmasıyla ilgili çalışmalar daha çok hayvansal orjinli gıdalar ve gıda katkıları üzerine yoğunlaşmıştır. Bakteriyosinlerin sebze içeren gıdalarda kullanımı ile ilgili pek az çalışma bulunmaktadır.

Bakteriyosinlerin gıdalar üzerinde kullanılabilirliğine dair yapılan bir çalışmada enterosin AS-48 3 farklı sebze konservesinde (domates salçası, konserve şeftali suyu ve konserve ananas suyu) *B. coagulans* ‘a karşı denenmiştir. *B. coagulans* CECT 12’nin vejetatif hücreleri içerisinde AS-48 bulunan ve farklı sıcaklıklarda saklanan domates salçalarına eklendiğinde canlı hücre sayıları 24 saatte yaklaşık olarak 3 log birim azalmıştır. 15 günlük depolamadan sonra hiçbir örnekte canlı bakteri hücresi görülmemiştir (Lucas vd., 2006).

Yaptığımız çalışmada üç ayrı gıda (salça, mısır, bezelye konservesi) konservesine bakterilerin vejetatif hücreleri ve endosporları inoküle edilmiş ve periyodik olarak canlı bakteri hücre sayımları yapılmıştır. Vejetatif hücreler ile kurulan düzeneklerde tümüyle inhibisyon 24 saatte gerçekleşirken endosporların tamamının inaktivasyonu 2-7 veya 7 -15 günde gerçekleşmiştir.

Vejetatif hücreler ile kurulan düzeneklerde hem *G. stearothermophilus* DSMZ-22 hem de *B. coagulans* DSMZ-1 hücreleri üzerine en etkili kombinasyon toebicin ve nisin olarak belirlenmiştir. *G. stearothermophilus* DSMZ-22 için 24. saatte, *B. coagulans* DSMZ-1 için ise bu kombinasyon eklendiğinden itibaren gelişim tamamen inhibe olmuştur.

Endosporlar ile kurulan düzeneklerde ise yine en etkili kombinasyon toebicin ve

nisinin birlikte kullanıldığı kombinasyon olmuştur. Ancak bakteriyosinlerin etki etme süresi vejetatif hücreler için gereken süreden daha uzun olmuştur (2-7 gün arası veya 7-15 gün arası). Mikrobiyal inaktivasyonun zaman aralığı gıda örneklerine ve bakteriyosin konsantrasyonuna bağlıdır. Dormant endosporların enterosin EJ 97'ye kısa süreli muamelelerinde (5dk) dirençli iken ısı ile çimlendirilen endosporlar bakteriyosine karşı hassas hale gelirler (Viedma ve ark., 2010) . Ayrıca çalışmada kullandığımız bakteriyosinin etki mekanizmasını hücre zarında por oluşturarak gösterdiğini düşünmekteyiz (Başbülbul, G.2008). Bu sebeple dormant endosporlara vejetatif hücreler kadar erken etki etmeyip, çimlenmeden sonra inaktivasyon gösteriyor olabilir.

Reuterinin diğer bakteriyosinlerle kombinasyonları sütte bulunan gıda kaynaklı olan patojenlere karşı denenmiştir. Reuterinin nisin, laktisin ve enterosin ile *L. monocytogenes* üzerindeki etkisi gözlenmiştir. Sadece nisin bulunan düzeneklerde reuterinin etkisini *S. aureus* üzerindeki denemede arttırdığı görülmüştür (Arqués, J. vd 2011). Çalışmamızda nisin ve liyofilize bakteriyosinin beraber bulunduğu düzeneklerde her iki suşta da canlı bakteri hücre sayısını daha hızlı düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu da bazı bakteriyosinlerin birlikte kullanımı esnasında daha fazla inaktivasyona neden olduğunu kanıtlar niteliktedir. Fakat bu etki araştırılırken kullanılan bakteriyosinlerin ve bakterilerin özellikleri önemli bir unsur oluşturmaktadır. Kullanılan materyaller değiştikçe farklı sonuçlar elde etmek mümkündür.

Günümüzde insanların kansere yakalanma riskleri günden güne artış göstermektedir. Araştırmacılar ise sürekli olarak artan bu risklerin nedenlerini araştırmaktadırlar. Yapılan çalışmalar neticesinde bu etmenler arasında tükettiğimiz gıdalar büyük bir önem arz etmektedir.

Sonuç olarak; yakın gelecekte bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesinin daha derinlemesine araştırılmasıyla gıdalarda doğrudan kullanılarak daha güvenli gıdalar elde edilebilecektir. Böylece insanlar tükettikleri gıdaların katkı maddelerinden uzaklaştırılmış olmaları nedeniyle gönül rahatlığı ile kullanabileceklerdir. Ayrıca bozulmalardan kaynaklanan maddi kayıpların da önüne geçilebilecektir.

KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., Galvez, A. 2003. A simple method for semi-preperative-scale production and recovery of entrocin AS-48 derived from *Enterococcus fecalis* subsp.liquefaciens A-48-32. **Journal of Microbiology Methods**, 55:599-605
- Anacarso I., Messi P., Condò C., Iseppi R., Bondi M., Sabia C., Niederhäusern S.D. 2014. A bacteriocin-like substance produced from *Lactobacillus pentosus*39 is a natural antagonist for the control of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in fresh salmon fillets. **LWT- Food Science and Technology**, 55: 604-611.
- Aouadhi, C., Rouissi, Z., Mejri, S., Maaroufi, A. 2014. Inactivation of *Bacillus sporothermodurans* spores by nisin and temperature studied by design of experiments in water and milk. **Food Microbiology**, 38: 270-275.
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Nuñez, M., & Medina, M. 2011. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. **Food Control**, 22(3): 457-461.
- Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., de Souza Oliveira, R. P. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. **Food Control**, 32(1): 134-142.
- Başbülbul, G., Özmen, A., Biyik, H. H., & Şen, Ö. 2008. Antimitotic and antibacterial effects of the *Primula veris* L. flower extracts. **Caryologia**, 61(1): 88-91
- Biyik, H., Basbulbul, G., Kalyoncu, F., Kalmis, E., & Oryasin, E. 2012. Biological decolorization of textile dyes from isolated microfungi. **J. Environ. Biol.**, 33(3): 667-71.
- Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. **Bacteriological Reviews**, 31(4):230.
- Cleveland, J., Montville T J, Nes I F, Chikindas M L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 71: 1–20.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, 3(10): 777-788.

- Cutter, C.N., Siragusa, G.R. 1994. Decontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. **Food Microbiol**, 11: 481-489.
- Daw, M. A., Falkiner, F. R. 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. **Micron**, 27(6):467-479.
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N. A., & DeVos, P. 2004. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. **Systematic and Applied Microbiology**, 27(1): 50-60.
- De Martinis, E.C.P., Alves N.P, Fronco, B.D.G. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteria in produced by lactic acid bacteria in meat products. **Foodreview International**, 18(2-3):191-208.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. 1996. Applications of the Bacteriocin, Nisin. **Antonie van Leeuwenhoek**, 69: 193-202.
- Deraz, S.F., Karlssoni E.N., Hedst rm, M, Andersson, M.M., Mattiasson, B. 2005. Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Biotechnology**, 117: 343-354
- Fredericq, P. 1957. Colicins. **Annual Reviews in Microbiology**, 1(7): 22-479.
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P., Nuñez, M. 2011. Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. **International Dairy Journal**, 21(4):272-278.
- <http://bagel.molgenrug.nl/index.php/bacteriocin-database>, (12.10.2016)
- Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, 59(2): 171-200.
- James, R., Kleanthous, C., Moore, G. R. 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. **Microbiology**, 142(7):1569-1580.
- Kurt,  ., Zorba  ., 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. **YY  Vet. Fak, Derg.**, 16(1):77-83.

- Lucas, R., Grande, M. J., Abriouel, H., Maqueda, M., Omar, N. B., Valdivia, E., Gálvez, A. 2006. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. **Food and Chemical Toxicology**, 44(10): 1774-1781.
- Margaret, A., Wertz, R., John, E., 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. **Annual Reviews in Microbiology**, 56: 117-137.
- Mauriello, G., De Luca E., La Stora, A., Villani F., Ercolini, D. 2005. Antimicrobial activity of a nisin activated plastic film for food packaging. **Letters in Microbiology**, 41(6): 464-469.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Ivanov, M. V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51(2):433-446.
- Reeves, P. 1965. The Bacteriocins. **Bacteriology Reviews**, 29: 24-45.
- Riley, M. A., Wertz, J. E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Reviews in Microbiology**, 56(1): 117-137.
- Riley, M.A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review Genetics**, 32: 255-278.
- Silverstein, K. A., Graham, M. A., Paape, T. D., VandenBosch, K. A. 2005. Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 138(2): 600-610.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, 25(1):120-127.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R. 1989. Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, 3. Baskı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teksirler Serisi, No: 55, İzmir.

- Viedma, P. M., Abriouel, H., Omar N. B., Lopez, R. L., Valdivia, E., Galvez, A. 2009. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* in canned food and coconut milk samples by addition of enterocin AS-48. **Food Microbiology**, 26:289-293
- Viedma, P. M., Abriouel, H., Omar, N. B., López, R. L., Gálvez, A. 2010. Effect of enterocin EJ97 against *Geobacillus stearothermophilus* vegetative cells and endospores in canned foods and beverages. **European Food Research and Technology**, 230(3): 513-519.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşe ALKIŞ
Doğum Yeri ve Tarihi : Yalova / 04.07.1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

- Uluslararası

Giziroglu, E., Sarikurkcü, C., Aygün, M., Basbulbul, G., Soyleyici, H. C., Firinci, E., ... & Biyik, H. (2016). Barbiturate bearing aroylhydrazine derivatives: Synthesis, NMR investigations, single crystal X-ray studies and biological activity. Journal of Molecular Structure, 1108: 325-333.

b) Katıldığı Kurslar

Mikrobiyolojide pcr temelli yöntemler kursu

İLETİŞİM

E-posta Adresi : alkisayse77@gmail.com
Tarih : 25.10.2016