

TARHANADAN İZOLE EDİLEN LAKTOBASİLLER TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNLERİN KARAKTERİZASYONU

Halil İbrahim Kaya^{1*}, Ömer Şimşek²

¹Bayburt Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bayburt, Türkiye

²Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli, Türkiye

Geliş / Received: 10.02.2020; Kabul / Accepted: 20.07.2020; Online baskı / Published online: 08.08.2020

Kaya, H. İ., Şimşek, Ö. (2020). Tarhanadan izole edilen laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin karakterizasyonu. GIDA (2020) 45(4)786-799 doi: 10.15237/gida.GD20027

Kaya, H. I., Şimşek, O. (2020). Characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from tarhana. GIDA (2020) 45(4)786-799 doi: 10.15237/gida.GD20027

ÖZ

Tarhana Anadolu'da kış için hazırlanan ve sık tüketilen fermente bir gıdadır. Fermente tarhana hamuru laktik asit bakterileri (LAB) ve maya türlerinden oluşan mikrofloraya sahiptir. Bu florada bazı LAB'de bakteriyosin üretimiyle antimikrobiyal aktivite gösterirler. Çalışmamızın amacı tarhanadan izole edilmiş *L. namurensis* PFC70, *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının bakteriyosinlerinin belirlenmesi ve karakterizasyonudur. PFC70, PFC74 ve PFC97 suşlarının *Micrococcus luteus* DSM1790 suşuna karşı 400, 1600, 1600 AU/mL antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Suşların kültür üst sıvılarındaki metabolitlerin yüksek sıcaklığa ve proteaz enzimlerine karşı hassas, düşük pH koşullarında stabil, bakteriyosin tabiatında olduğu anlaşılmıştır. Üretici hücrelerin genomunda yapılan PZR taramasında, PFC74 bakteriyosininin plantarisin benzeri olduğu belirlenmiştir. Bakteriyosinler, amonyum sülfat çöktürmesi, katı faz ekstraksiyonu ve ters faz sıvı kromatografisi ile saflaştırılmış ve trisin-SDS PAGE ile moleküler büyüklükleri 5 kDa altında olduğu tespit edilmiştir. PFC70 ve PFC74 bakteriyosini bakteriyosidal, PFC97 ise bakteriyostatik etkili bulunmuştur. Bu sonuçlar PFC70 suşunun yeni bir bakteriyosin üreticisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Tarhana, laktik asit bakterisi, bakteriyosin, antimikrobiyal

CHARACTERIZATION OF BACTERIOCINS PRODUCED BY LACTOBACILLI ISOLATED FROM TARHANA

ABSTRACT

Tarhana is a fermented food that has been consumed often, produced for winter in Anatolia. Fermented tarhana dough microflora includes lactic acid bacteria (LAB), yeast species and some LAB exhibit antimicrobial activity due to bacteriocin production. The purpose of study was determination and characterization of bacteriocins of *L. namurensis* PFC70, *L. plantarum* PFC74, *L. paralimentarius* PFC97 strains which were isolated from tarhana. Strains had 400, 1600, 1600 AU/mL antimicrobial activity against *Micrococcus luteus* DSM1790 respectively. The relevant methabolites of strains at the culture supernatant was to be bacteriocin nature with low pH stability, high temperature and protease enzymes sensitivity. Producer cell genome showed that PFC74 bacteriocin was similiar with plantaricin. Bacteriocins were purified by ASP, SPE, RPLC and thereby molecular weights were determined under 5 kDa with Tricine-SDS-PAGE. PFC70 and PFC74 bacteriocin were found to be bacteriocidal, while PFC97 was bacteriostatic. Results indicated that PFC70 was novel bacteriocin producer.

Keywords: Tarhana, Lactic acid bacteria, bacteriocin, antimicrobial

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author;

✉ drhikaya@gmail.com

☎ (+90) 458 211 1152 / 1688

☎ (+90) 485 211 1178

Halil İbrahim Kaya; ORCID no: 0000-0002-1837-5682

Ömer Şimşek; ORCID no: 0000-0003-0624-9352

GİRİŞ

Gıdaları mikrobiyal bozulmalara karşı korumak, insan sağlığının korunması ve ekonomik kayıpların önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bunun sağlanabilmesi de ancak mükemmel sıhhi şartların sağlanması veya gıda üretiminde çeşitli koruyucuların kullanılması ile mümkündür. Gıda üretiminde en yüksek seviyede sağlıklı koşullar sağlansa da gıda sistemlerinde mikrobiyal risk olasıdır. Diğer taraftan, gıdaların üretim süreçlerinde çeşitli koruyucu kimyasalların kullanılması ise sağlık riskleri taşıması sebebiyle tüketicilerin tepkisine neden olmakta ve tercih edilmemektedir. Bu durumda gıdaların üretiminde doğal antimikrobiyal bileşiklerin kullanılması ve bunlara dair araştırmaların gerçekleştirilmesi kaçınılmazdır (Delves-Broughton vd., 1996).

Laktik asit bakterileri (LAB) fermente gıdaların temel florasını oluşturan mikroorganizmalardır. Bu bakteriler fermente gıdaların yapısal ve aromatik özelliklerinin oluşumunda rol alsın da bu familyaya ait bazı üyeler çeşitli antimikrobiyal metabolitler üreterek gıda ürünlerinin korunmasına da katkıda bulunur (de Vuyst ve Leroy, 2007).

LAB'in bazı üyelerinde antimikrobiyal özelliğin ortaya çıkmasını sağlayan en temel metabolit bakteriyosinlerdir (Klaenhammer, 1993). Bakteriyosinlerin veya üretici LAB'in fermente gıdaların üretiminde kullanılması, gıda güvenliğinin ve raf ömrünün uzatılması yönünde önemli bir katkı sağlamaktadır (O'Shea ve diğ. 2013).

Tarhana buğday unu, yoğurt, maya ve çeşitli sebzeler ile baharatların (domates, kırmızı biber, soğan, nane ve tuz) karışımıyla hazırlanan hamurun, fermente edilmesi ve ardından kurutma ve toz haline getirme aşamalarından geçirilmesi neticesinde elde edilen geleneksel fermente bir gıda maddesidir (Dağlıoğlu, 2000). Tarhana hamuru fermentasyonunda LAB ve mayaların yer aldığı kompleks bir mikroflora yer almaktadır. Bu florada mayalar CO₂ ve alkol üretimi ile aromanın gelişimine katkı sağlarken, LAB organik asit üretimiyle asitliğin artmasına neden olmaktadır (Şengün vd. 2009, Settanni vd. 2011, Şimşek vd.

2017). LAB organik asit üretimiyle asitliği artırmasının yanısıra laktik asit, H₂O₂, diasetil ve özellikle bakteriyosin üretimi neticesinde antibakteriyel etkiye sahiptir (Gálvez vd. 2007).

Bakteriyosinler, bazı bakteri türleri tarafından ribozomal olarak sentezlenen peptit tabiatında moleküllerdir (Delves-Broughton vd., 1996, Zou vd., 2018). Bu yapılar üretici bakterilerin yakın akraba türleri üzerinde hücre duvarında por oluşturarak, hücre duvar sentezini durdurarak ve daha birçok farklı mekanizmayla etki gösterirler ve hedef hücrenin ölümüne neden olurlar (Ahmad vd., 2017). LAB familyası içerisinde birçok tür önemli bakteriyosin üreticisi olarak bilinmektedir. Örneğin, bazı laktokokların nisin ve laktisin, bunun dışında pediokokların pediosin, laktobasillerin plantarisin gibi bakteriyosinler ürettikleri detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. Ancak bunlar arasından sadece nisin Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanımına izin verilmiş ve nisin günümüzde birçok gıdanın üretiminde kullanılmaktadır (Juturu ve Wu. 2018, Zou vd., 2018). Bakteriyosinlerin önemli karakteristiklerinden birisi ise üretici çeşitliliğine göre yapısal değişkenlikler göstermesi ve buna bağlı olarak da farklı antimikrobiyal etki spektrumununa sahip olmasıdır (Hill vd., 2011). Dolayısıyla halen yeni bakteriyosinlerin araştırılması ve karakterize edilmesine gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışmada tarhana fermentasyonundan daha önce izole edilerek 16S rRNA analizi ile tanımlanmış (Özel, 2012) *Lactobacillus* spp. suşlarının antimikrobiyal özelliği araştırılmış, ürettiği bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiş, ardından enzim, pH ve sıcaklık uygulamalarının antimikrobiyal aktiviteye etkisi tespit edilmiştir. Ayrıca söz konusu bakteriyosinlerin moleküler büyüklükleri ve konakçı ilişkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan bakteriler, besiyerleri ve çalışma koşulları

Çalışmada kullanılan tarhana izolatı LAB ve referans suşları Çizelge 1'de verilmiştir. Söz konusu tüm suşlar Pamukkale Üniversitesi, Gıda

Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonundan (PUFECC) sağlanmıştır. LAB'ın geliştirilmesinde MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, Merck, Almanya), referans suşların geliştirilmesi için ise BHI (Brain Heart Infusion, Merck, Almanya) ve LB (Luria-Bertani, Merck, Almanya) sıvı ve katı besiyerleri kullanılmıştır. Tüm suşlar son konsantrasyonu % 30 olan Gliserol (Bioshop,

Kanada) içerisinde -20°C'de muhafaza edilmiştir. Tarhana izolatları, tarhana hamurundan fermentasyonun sonunda izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatların seçimi antimikrobiyal aktivite testleri neticesinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan laktik asit ve referans bakterileri
Table 1. Lactic acid and reference bacteria used in the study

Suş Kodu Strain Code	Mikroorganizma Adı Micoorganism	Özelliği Characteristic
PFC70	<i>Lactobacillus namurensis</i>	Antimikrobiyal aktiviteye sahip tarhana izolatu
PFC74	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Antimikrobiyal aktiviteye sahip tarhana izolatu
PFC97	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	Antimikrobiyal aktiviteye sahip tarhana izolatu
PSC1	<i>Micrococcus luteus</i> DSM1790	İndikatör bakterisi
PSC16	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	İndikatör bakterisi
PSC18	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	İndikatör bakterisi
PSC19	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	İndikatör bakterisi
PSC22	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	İndikatör bakterisi
PSC23	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC14028	İndikatör bakterisi
PSC26	<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	İndikatör bakterisi
PSC31	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	İndikatör bakterisi

LAB'ın antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesi

Antimikrobiyal aktiviteye sahip suşların bakteriyosin üretim özelliğinin tanımlanması amacı ile agar noktalama ve kuyu difüzyon testleri kullanılmıştır. Agar noktalama testinde LAB suşları 30 °C'de 18 saat geliştirildikten sonra, MRS agar plaklarına sürme ekim yapılmıştır. Gelişen kolonilerden MRS agar ortamına, bir petride 3 farklı suş olacak şekilde nokta ekim yapılmış ve 30 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besiyerlerinde geliştirilen indikatör bakteriler, % 0.7 oranında agar (Agar agar, Merck, Almanya) içeren 5 mL yumuşak agar besiyerlerine inoküle edilerek, nokta ekim yapılan MRS agar plaklarının üzerine ikinci tabaka halinde dökülmüş ve homojen bir şekilde yayılmıştır. Uygun sıcaklıkta 18-24 saat inkübasyon sonunda, suşların indikatör bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları kaydedilmiştir (van Belkum vd., 1989).

Kuyu difüzyon testinde ise 30 °C'de 18 saat geliştirilen kültürler, 6000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj (Hettich, Universal 30 RF, Almanya) işlemine tabi tutulmuştur. Üst sıvı, çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek 6N NaOH (Sigma, Almanya) kullanılarak pH 6'ya ayarlanmış ve 0,45 µm por çaplı membran filtreden (Millex-Millipore, ABD) geçirilerek sterilize edilmiştir. İndikatör bakteriler, % 0.7 oranında agar içeren 7 mL yumuşak agar besiyerlerine inoküle edilerek MRS agar plaklarının üzerine ikinci bir tabaka halinde, homojen şekilde yayılmıştır. MRS agar plakları üzerinde steril bir şekilde 5 mm çapında kuyucuklar açılarak bakteri üst sıvıları kuyucuklara 100 µL aktarılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda kuyucukların etrafında inhibisyon zonu oluşumu incelenerek sonuçlar kaydedilmiştir (Tagg ve McGiven, 1971).

Antimikrobiyal metabolitin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi
Antimikrobiyal aktiviteye sahip LAB suşlarında kültür üst sıvılarında bakteriyosin varlığının tespiti için, 30 °C'de 18 saat geliştirilen bakteri kültürleri, 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve kültür üst sıvılarının pH'ları 6 N NaOH veya 6N HCl (Merck, Almanya) kullanılarak 2.0-11.0 değerleri arasına ayarlanmıştır. pH'ları ayarlanan kültür üst sıvıları 0.45 µm por çaplı membran filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri +4 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Kontrol olarak hiçbir işleme tabi tutulmayan kültür üst sıvıları kullanılmıştır. Antimikrobiyal metabolit aktivitesi kritik dilüsyon yöntemine göre, inhibisyon zonu alınan en yüksek dilüsyon oranının, 1000/aktarılan hacim ile çarpımından elde edilen arbitrary ünite (AU) cinsinden hesaplanmıştır (Franz vd., 1997).

Sıcaklığın etkisi, kültür üst sıvılarının 80, 90, 100 °C'de 5, 10, 15 dakika ve 121 °C'de 15 dakika süreyle ısıtılmasına tabi tutulmasından sonra belirlenmiştir. Kontrol olarak ısıtılmamış kültür üst sıvıları kullanılmıştır. Sıcaklığın antimikrobiyal metabolitin aktivitesi üzerine etkisi, kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Franz vd., 1997).

Antimikrobiyal metabolitin aktivitesi üzerine değişik enzimlerin etkisinin belirlenmesi amacıyla, nötralize edilmiş kültür üst sıvılarına, son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde tripsin (pH 7.0, Merck, Almanya), α-kemotripsin (pH 7.0, Sigma, ABD), proteinaz K (pH 7.0, Sigma, ABD), pepsin (pH 3.0, Sigma, ABD), α-amilaz (pH 7.0, Sigma, ABD), lipaz (pH 7.0, Sigma, ABD), katalaz (pH 7.0, Sigma, ABD) ve lizozim (pH 7.0, Sigma, ABD) enzimleri ilave edilerek, 30 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktiviteleri, 100 °C'de 5 dakika ısıtılma ile sonlandırılmıştır. Antimikrobiyal metabolitin aktivitesi, kritik dilüsyon yöntemi esas alınarak belirlenmiştir (Franz vd., 1997).

Bakteriyosinlerin saflaştırılması

Bakteriyosin üreticisi kültürlerden, 500 mL MRS sıvı besiyerine % 1 oranında ekim yapılmış ve 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kültürler 9000

rpm'de 30 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek kültür üst sıvısının küçük bir hacmine son konsantrasyonu % 40-80 olacak şekilde amonyum sülfat (Merck, Almanya) ilavesi yapılmış ve bakteriyosinin çökmesini sağlayan optimum amonyum sülfat konsantrasyonu belirlenmiştir. Takiben en verimli amonyum sülfat konsantrasyonu kültür üst sıvısına ilave edilerek +4°C'de 24 saat karıştırılmıştır (WiseShake, SHO-1D, BK). Bu sürenin sonunda örnekler +4°C'de 14000 rpm'de bir saat süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitiminde üst faz dökülmüş ve çökeltili 0,005 M sodyum fosfat (pH 6,0, Sigma, Almanya) tamponu içerisinde çözülmüştür. (Moreno vd., 2003). Bu çözelti daha sonra Strata (5g, 20 ml, Phenomenex, ABD), C18-E SPE kolondan geçirilmiştir. Öncelikle söz konusu kolonlar % 30 etanol (Sigma, Almanya) ile iyice yıkanmış ardından bakteriyosin içeren çözelti kolona yüklenmiştir. Bakteriyosinler kolondan % 70 izopropanol (Sigma, Almanya) ve % 0,1 TFA (Merck, Almanya) ile geri kazanılmıştır (Mills vd., 2011). İzopropanol rotari evaporatör (Buchi, Rotavapor R-114, İsviçre) ile uzaklaştırılmış ve geri kazanılan bakteriyosin ters faz HPLC sisteminde (Shimadzu, LC-20AD, Japonya) ileri düzeyde saflaştırılmıştır. Bu sistemde bakteriyosin çözeltisi HPLC üzerinde takılı olan C18 (Nükleosil, Supelco, ABD) kolondan gradient koşullarda geçirilmiştir. Sistemde mobil faz olarak % 0.1 TFA içeren ultra saf su (A) ve % 0.1 TFA içeren % 60 asetonitril (B), (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. HPLC sisteminde 1 ml akış hızı ve 0-5. dakika % 70 A, % 30 B, 5-40. dakika % 30 A, % 70 B, 40-50. dakika % 100 B, 50-60. dakika % 100 A programı uygulanmıştır. Dedektörde (SPD-M20A, Shimadzu, Japonya) okuma 220 nm dalgaboyunda gerçekleştirilmiştir (Simha vd., 2012).

Bakteriyosinlerin moleküler büyüklüğünün tespit edilmesi

LAB'in kültür üst sıvısından kısmen saflaştırılan bakteriyosinlerin moleküler büyüklükleri, trisin-sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (Trisin-SDS-PAGE) sistemi kullanılarak belirlenmiştir.

Trisin-SDS-PAGE uygulamasında, Schagger ve von Jagow (1987), tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Jel sistemine; yağma jelde (% 4) göç için 75 V, ayırıcı jelde (% 12) göç için ise 100 V akım uygulanmıştır. Yaklaşık 2 saat ayırıcı jelde yürütülen örnekler jelin son kısmına ulaştığında sistem durdurulmuştur. Sistemden çıkarılan jel, boyama çözeltisinde 45 dakika, ardından boya giderme çözeltisinde 45 dakika tutulmuştur. Beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek alınan jel fotoğraflarında proteinlerin moleküler büyüklükleri, marker proteinlerin (Thermo, Spectra Multi Color Low Range, ABD) bağlı hareketlilik (Rf) değerleri ve moleküler büyüklüklerinin logaritmalardan yararlanılarak çizilen standart eğri kullanılmak suretiyle belirlenmiştir.

Bakteriyosin üretimiyle ilişkili temel genlerin belirlenmesi

LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanımlanması; üretimle ilişkili temel genlerin varlığı araştırılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle DNA izolasyon kiti (Invitrogen, PureLink Genomic DNA Purification, ABD) kullanılarak bakteriyosin üretici hücrelerin genomik DNA'sı izole edilmiştir. Takiben referans genler üzerinden hazırlanan primerler (Macwana ve Muriana, 2012., Çizelge 2) kullanılarak PZR (Polimerize zincir reaksiyonu) aracılığıyla bakteriyosin üretimiyle ilişkili genlere ait kısa bölgeler çoğaltılmıştır. PZR, toplam 40 µL hacimde, 4 µL master mix (5*FIREPol[®] Master mix, SOLIS/Bio Dyne, ABD), 1 µL primer (Macrogen, Hollanda) ve 2 µL genomik DNA'dan kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR'de 95° C'de 5 dakika ön denaturasyon, 30 çevrim 95° C 30 saniye, 55° C 30 saniye, 72° C 1 dakika ve 72° C'de 10 dakika son uzama süre ve sıcaklık kombinasyonundan oluşan program kullanılmıştır (Techne, BK). Bağlanma sıcaklığı her bir primere uygun sıcaklıklar (45-60° C aralığında) belirlenerek uygulanmıştır. PZR ile çoğaltılan fragmentler agaroz jel elektroforez sisteminde (Thermo, ABD) % 1 agaroz (Sigma, Almanya) ve 100 baz marker (Fermentas, ABD) kullanılarak 100 V'da 30 dakika yürütülmüştür. Jel üzerinde DNA fragmentleri jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak izlenmiştir.

Bakteriyosinlerin antimikrobiyal etki şeklinin belirlenmesi:

Çalışmada saflaştırılan bakteriyosinlerin indikatör mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal etki şekli Multiscan FC (Thermo, ABD) spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için *M. luteus* DSM1790 indikatör suşu LB sıvı besiyerinde 30 °C'de iki kez aktifleştirilmiş, ardından 5 mL LB sıvı besiyerine % 1 oranında tekrar aşılacaktır. Daha sonra indikatör mikroorganizma aşılacaktır besiyerinden 250 µL alınarak 96 kuyuluk plakalara doldurulmuş ve üzerine, bakteriyosinin etkisini incelemek üzere son konsantrasyonu 200 AU/mL olacak şekilde, 50 µL LB sıvı besiyeri içinde bulunan bakteriyosin ilavesi yapılmıştır. Antimikrobiyal etkinin anlaşılması için, 50 µL bakteriyosin içermeyen LB sıvı besiyeri ilave edilen kontrol kuyuları da hazırlanmıştır. 30 °C'de inkübe edilen 96 kuyucuklu plakalarda indikatör mikroorganizma gelişimi için 2 saatte bir 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır (Barbosa vd., 2016).

SONUÇ VE TARTIŞMA

LAB'in antimikrobiyal etki spektrumu

Tarhanadan izole edilen LAB suşlarının indikatör mikroorganizmalara karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal etki Çizelge 3'de gösterilmiştir. Agar noktalama testi sonuçlarına göre, çalışmada laktik suşların tümünün *M. luteus* DSM1790, *S. aureus* ATCC29213 ve *S. aureus* ATCC25923 suşlarına karşı orta ve yüksek seviyede antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Diğer taraftan, *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının benzer şekilde *L. monocytogenes* ATCC7644 ve *E. faecalis* ATCC19433 suşlarına karşı etkili oldukları belirlenmiştir. Gram negatif *E. coli* ATCC25922 ve *S. Typhimurium* ATCC14028 suşlarına karşı ise *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının orta ve yüksek seviyede etkili oldukları saptanmıştır (Çizelge 3).

Agar noktalama analizinde olduğu gibi, laktik suşların kültür üst sıvısı da kuyu difüzyon testiyle *M. luteus* DSM1790 suşuna karşı oldukça etkili bulunmuştur (Çizelge 3 ve Şekil 1). *L. paralimentarius* PFC97 suşunun kültür üst sıvısı *L.*

Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin karakterizasyonu

monocytogenes ATCC7644 ve *E. faecalis* ATCC19433 suşlarını inhibe edebilmiştir. *S. aureus* ATCC25923, *S. aureus* ATCC29213 ve *B. cereus* ATCC11178 suşlarına karşı ise *L. namurensis* PFC70 suşu antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Antimikrobiyal aktivite sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip suşların *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 olduğu görülmektedir (Çizelge 3). Farklı kaynaklardan izole edilen LAB'in ürettikleri çeşitli metabolitlerin arasında

bakteriyosinler, LAB'in antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasında en önemli bileşiklerden birisidir (Parente ve Ricciardi, 1999; Takala ve Saris, 2007). Çalışmada dikkati çeken önemli hususlardan birisi *L. namurensis* PFC70 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarının belirlenmesidir. Nitekim *L. namurensis* PFC70 suşunun antimikrobiyal özellikleri yönünde daha önce ifade edilmiş bir çalışma bulunmamaktadır.

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan bakteriyosin genlerine özgül primerler (Macwana ve Muriana, 2012)

Table 2. Primers specific to bacteriocin genes used in the study (Macwana and Muriana, 2012)

Organizma	Gen	İleri Yönlü Primer	Geri Yönlü Primer	Büyükük kb
Microorganism	Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Size kb
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	lclA	aaaccaagtctctcgattggc	ggcacgttggtatccttacct	200
<i>Lactococcus lactis</i>	Ltn A	ccagttacatgggtggaagaag	tttacaccaagccatacattca	150
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	lcnB	agttaatggaggaagcttgacag	tagtggaaatgttttccccatc	156
<i>Lactococcus lactis</i>	LtnB	caattgggaaaataccttgaaga	caagcacgtgtacattttgtgt	152
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LacA	agtgctattcaaaattctggcg	taatccaacctccggaataaga	217
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	IcpJ	tggacctatttttaggtgcaaaa	gagcagcaagtaatacaaaagtcc	100
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	papA	ttacttgggcaaacattcctg	tgattaccttgatgccaccag	106
<i>Pediococcus acidilactici</i>	ped A	ctgccgaagaaacaagattct	ctattggctaggccacgtattg	110
<i>Lactobacillus plantarum</i>	plnc8A	ctagaaaagatctctggcggtg	catatgggtgctttaaatcca	100
<i>Lactobacillus plantarum</i>	plnc8B	ggcaagagtagctgtctcaaa	caatcgtttgcgatgcttat	106
<i>Lactobacillus curvatus</i>	cur A	acagaattacaaacaattaccggc	cattccagctaaaccactagcc	150
<i>Lactobacillus plantarum</i>	plaA	aaaaattaactgaaaagaatggc	actttccatgaccgaagttagc	150
<i>Lactobacillus sakei</i>	sakA	acagaattacaaacaattaccggc	cattccagctaaaccactagcc	150
<i>Lactobacillus salivarius</i>	abp118 α	agtttagcaaaggtgatgggtg	aacaagtaagtctccgcctac	156
<i>Lactobacillus salivarius</i>	abp118 β	aatggtggtaaaaatggttatgg	ttacggcaactgtgaaaacca	150
<i>Lactobacillus plantarum</i> C11	pln A	agcaacttagtaataaggaatgcaaa	acagttctttacctgttaattgcag	102
<i>Lactobacillus plantarum</i> TMW1.25	pln B	tagcattgattgatggaggaaa	gcatgccgtgtaagttgtaga	176
<i>Lactococcus lactis</i>	NisZ	atgagtacaaaagatttaactgg	ttatttgcttacgtgaatactaca	174
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC33323	helveticin	atgattggaaaagaactcaatac	aataaaggcaatcaccagttactt	919
<i>Lactobacillus brevis</i>	breB	atggagaaattccagtgattatc	tgttatttaggcagctaattgca	217
<i>Lactobacillus brevis</i>	breC	atgtataagaattaacagttgatgaatt	gtgcatgccgtgtaagttgt	207
<i>Lactobacillus curvatus</i> K12-3	curvacin A	atgaataatgtaaaagaattaagtatgaca	tccagctaaaccactagccc	174

Çizelge 3. LAB'in antimikrobiyal etki spektrumu
Table 3. Antimicrobial spectrum of LAB

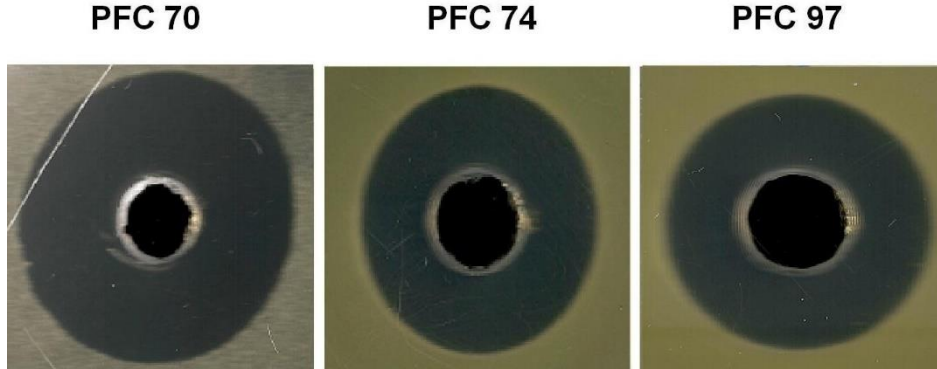
İndikatör Suşlar Indicator Strains	LAB İzolatları LAB Isolates					
	PFC70		PFC74		PFC97	
	Agar	Kuyu	Agar	Kuyu	Agar	Kuyu
	Agar	Well	Agar	Well	Agar	Well
<i>Micrococcus luteus</i> DSM1790	+++	+++	++	+	++	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	-	-	+++	-	+++	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	++	+	++	-	++	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	++	+	++	-	++	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	-	++	+	++	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC14028	-	-	++	-	+++	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11178	++	+	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	-	-	++	-	++	+

*İnhibisyon zon çapları: - = < 1mm (etkisiz) + = 1-5 mm (düşük etkili) ++ = 5-10 mm (orta etkili)

+++ = > 15 mm (yüksek etkili), Agar: Agar noktalama, Kuyu: Kuyu Difüzyon

*Inhibition zone diameter: - = < 1mm (no effect) + = 1-5 mm (low effect) ++ = 5-10 mm (medium effect)

+++ = > 15 mm (high effect), Agar: Agar plotWell: Well diffusion



Şekil 1. LAB suşlarının kültür üst sıvılarının *M. luteus* DSM1790'a karşı antimikrobiyal etkisi
Figure 1. Antimicrobial effect of culture supernatants of LAB strains against *M. luteus* DSM1790

Söz konusu çalışmada laktik suşların kültür üst sıvılarının antimikrobiyal etkiye sahip bulunması neticesinde, bu sıvılar içerisindeki antimikrobiyal bileşimin aktivitesi kritik dilüsyon yöntemiyle *M. luteus* DSM1790 bakterisine karşı belirlenmiştir. Buna göre antimikrobiyal aktivite testleri ile paralel bir şekilde en yüksek aktivite 1600 AU/mL ile *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarında saptanmıştır. *L. namurensis* PFC70 suşunda ise aktivite 400 AU/mL olarak tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında yer alan PFC 70 ve 97 suşlarının bakteriyosin üretim oranları ile alakalı herhangi bir literatür verisi yer almamaktadır. Bu sonuçlar *L. namurensis* PFC70

suşunun bakteriyosin üretimiyle alakalı rapor edilen ilk veri niteliğindedir.

Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi

Çalışma kapsamında kullanılan laktik suşların kültür üst sıvısındaki antimikrobiyal aktivitelerinin farklı pH koşullarındaki değişimi Çizelge 4'te verilmiştir. Buna göre tüm suşların kültür üst sıvısındaki antimikrobiyal etkinin pH'nın düşüşü ile birlikte arttığı gözlenmiştir. Aksine ortam pH'sının alkali değerlere ayarlanması durumunda ise söz konusu antimikrobiyal aktivite hızla azalmıştır. Bu sonuçlar kültür üst sıvısındaki antimikrobiyal metabolitin asidik koşullarda

Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin karakterizasyonu

çözünürlüğünün ve stabilitesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde nisin, pediyosin ve plantarisin gibi birçok LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerde de aktivitenin ve stabilitenin asidik pH koşullarında

yüksek olduğu çalışmalarda rapor edilmiştir (Parente ve Ricciardi, 1999; O'Sullivan vd., 2002; Twomey vd., 2002; Beasley ve Saris, 2004; Jozala vd., 2005)

Çizelge 4. LAB'den elde edilen kültür üst sıvılarının farklı pH, sıcaklık ve enzim uygulaması sonucunda antimikrobiyal aktivitesi (AU ml⁻¹).

Figure 4. Antimicrobial activity of LAB cultured supernatants as a result of different pH, temperature and enzyme treatment

		PFC70	PFC 74	PFC 97
Kontrol Control		400	1600	1600
pH Uygulaması pH treatment	2	800	3200	3200
	3	400	3200	3200
	4	400	3200	3200
	5	400	1600	1600
	6	200	1600	1600
	7	100	800	800
	8	0	800	400
	9	0	0	400
	10	0	0	0
	11	0	0	0
Sıcaklık Uygulaması Heat treatment	80°C, 5 dakika 80°C, 5 minute	400	1600	1600
	80°C, 10 dakika 80°C, 10 minute	400	1600	1600
	80°C, 15 dakika 80°C, 15 minute	400	1600	1600
	90°C, 5 dakika 90°C, 5 minute	400	1600	1600
	90°C, 10 dakika 90°C, 10 minute	400	1600	1600
	90°C, 15 dakika 90°C, 15 minute	400	1600	1600
	100°C, 5 dakika 100°C, 5 minute	400	1600	1600
	100°C, 10 dakika 100°C, 10 minute	0	0	0
	100°C, 15 dakika 100°C, 15 minute	0	0	0
	121°C, 15 dakika 121°C, 15 minute	0	0	0

Enzim Uygulaması	Enzyme treatment	Katalaz	400	1600	1600
		Catalase			
		Lizozim	400	1600	1600
		Lysozyme			
		α Amilaz	400	0	0
		α Amylase			
		Lipaz	400	0	0
		Lipase			
		Proteinaz-K	0	0	1600
		Proteinase-K			
		Tripsin	0	0	1600
		Trypsin			
		Pepsin	400	0	0
		Pepsin			
α Kemotripsin	400	0	0		
α Chymotripsin					

Tarhana izolatu laktik suşların kültür üst sıvısındaki metabolitin, 80, 90, 100 ve 121°C sıcaklıklarda ve farklı süre kombinasyonlarında antimikrobiyal aktivite değişimleri Çizelge 4'de verilmiştir. Buradan da izlenebildiği gibi *L. namurensis* PFC70, *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının kültür üst sıvısındaki antimikrobiyal metabolitler 100 °C altındaki tüm sıcaklık, süre kombinasyonlarına ve 100 °C'de ise sadece 5 dakikalık ısıl işleme karşı stabilken, 100 °C'de 10 dakika ısıl işlem ve üzerinde uygulanan tüm sıcaklık ve süre kombinasyonları sonunda aktivitesi kaybolmuştur.

Çalışma kapsamında, kullanılan laktik suşlar tarafından üretilen antimikrobiyal metabolitin, farklı enzimlerle muamelesi sonundaki aktivite değişimleri Çizelge 4'de gösterilmiştir. Buna göre tüm suşların kültür üst sıvısının antimikrobiyal aktivitesinin, proteolitik enzimlerin bir veya birkaçı ile muamele edildiğinde kaybolduğu görülmüştür. Bunun aksine, tüm suşların kültür üst sıvısındaki antimikrobiyal aktivite, katalaz ve lizozim enzimi uygulamasından sonra devam etmiştir. Diğer taraftan, *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının kültür üst sıvısının antimikrobiyal aktivitesi α -amilaz ve lipaz enzimlerinin muamelesinden sonra izlenmemiştir. α -amilaz ve lipaz enzimleriyle muamele sonucunda aktivite kaybının olmaması bu bakteriyosinlerin peptid ve proteinler dışında lipid yada karbonhidrat gruplarını ihtiva etmediğine

işaret etmektedir. Özellikle proteinaz K enziminin kültür üst sıvıdaki antimikrobiyal aktivitenin giderilmesi yönünde etkili olması, söz konusu antimikrobiyal metabolitin protein tabiatında olduğuna işaret etmiştir. Aynı şekilde, pepsin, tripsin ve α -kemotriptripsinin de bazı kültür üst sıvılardaki antimikrobiyal etkinliğin kaybolmasına neden olması da bu hipotezi desteklemiştir. Çeşitli çalışmalarda bakteriyosin karakterizasyon basamaklarında bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere karşı hassas oldukları ve özellikle proteolitik enzimlerle muamele edildiklerinde antimikrobiyal aktivitede azalmanın olduğu ve hatta aktivitenin kaybolduğu bildirilmiştir (Lü vd., 2014a, Lü vd., 2014b, Zhu vd., 2014, Woraprayote vd., 2015, Hu vd., 2017). Sonuçlar literatür verileriyle birlikte değerlendirildiğinde, elde edilen kültür üst sıvılarında yer alan metabolitlerin peptid yada protein tabiatında olan bakteriyosinler olduğunu desteklemektedir.

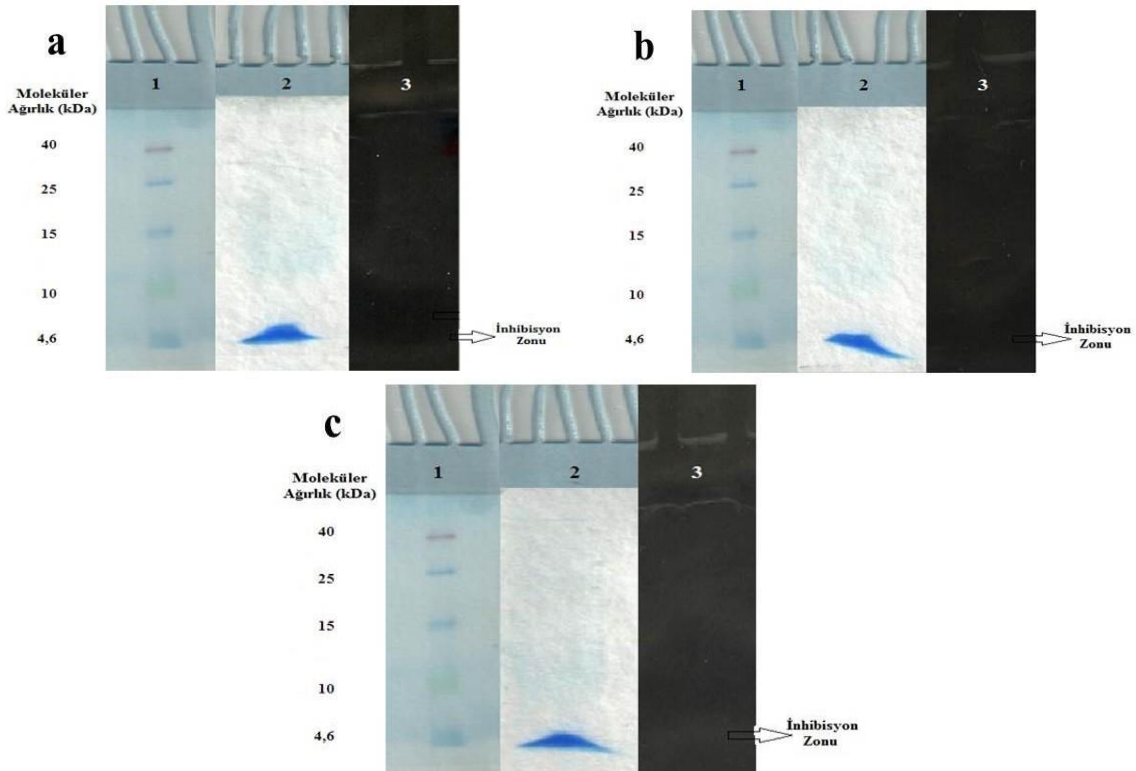
Bakteriyosinlerin saflaştırılması ve moleküler büyüklükleri

L. namurensis PFC70, *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının kültür üst sıvılarından ilişkili bakteriyosinlerin saflaştırılması iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Buna göre kültür üst sıvısındaki protein fraksiyonu % 60 oranında amonyum sülfat ile çöktürülerek toplanmıştır. Daha sonra protein çökeltisi katı faz ekstraksiyon kolonundan geçirilmiş ve safsızlıkların önemli bir kısmı uzaklaştırılmıştır. Amonyum sülfat ve katı faz ekstraksiyonu bakteriyosinlerin

saflaştırılmasında sıklıkla kullanılan ve verimli çalışan sistemlerdir. Söz konusu bu sistemlerin kullanılmasıyla birçok yeni bakteriyosin veri tabanına (BAGEL, <http://bagel.molgenrug.nl>) kazandırılmıştır (Saavedra ve Sesma, 2011).

Saflaştırılan *L. namurensis* PFC70, *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 bakteriyosinlerin Trisin-SDS-PAGE sistemi kullanılarak yapılan analizleri sonucu; moleküler büyüklükleri 5 kDa'dan küçük olduğu tespit

edilmiştir (Şekil 2). Bu sonuçlar *L. plantarum* suşları tarafından üretildiği rapor edilen 5 kDa'dan küçük bakteriyosinlerin moleküler büyüklüğü ile yakın sonuçlar olduğunu göstermektedir (Atrih vd., 2001, Chen vd., 2014). Lakin *L. namurensis* PFC70 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının ürettiği bakteriyosinler için karşılaştırma yapılamamakla birlikte, laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlere benzer sonuçlar olduğu ifade edilebilir (Wang vd., 2019).



Şekil 2. a) *L. namurensis* PFC70 bakteriyosininin moleküler büyüklüğü (1: Marker, 2: PFC70, 3: PFC70 İnhibisyon Zonu), b) *L. plantarum* PFC74 bakteriyosininin moleküler büyüklüğü (1: Marker, 2: PFC74, 3: PFC74 İnhibisyon Zonu), c) *L. paralimentarius* PFC97 bakteriyosininin moleküler büyüklüğü (1: Marker, 2: PFC97, 3: PFC97 İnhibisyon Zonu).

Figure 2. a) Molecular size of *L. namurensis* PFC70 bacteriocin (1: Marker, 2: PFC70, 3: PFC70 Inhibition Zone), b) Molecular size of *L. plantarum* PFC74 bacteriocin (1: Marker, 2: PFC74, 3: PFC74 Inhibition Zone), c) Molecular size of *L. paralimentarius* PFC97 bacteriocin (1: Marker, 2: PFC97, 3: PFC97 Inhibition Zone).

Suşların genomunda bakteriyosin üretimiyle ilişkili temel genler

L. namurensis PFC70, *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin nihai tanımlaması içerdikleri

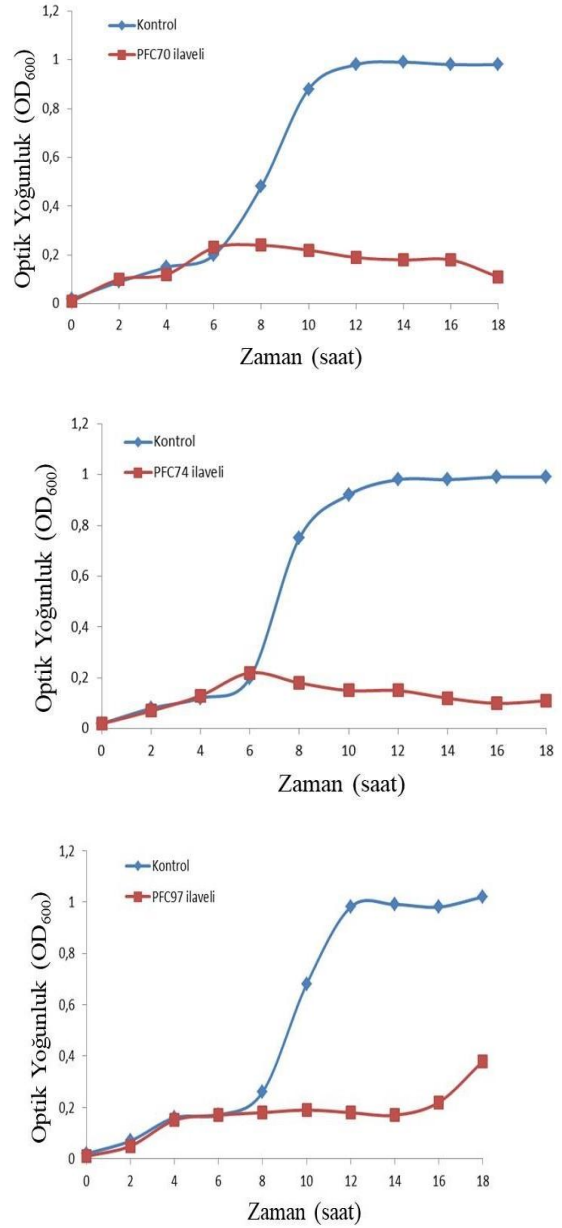
bakteriyosin üretiminden sorumlu genin araştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda genomlarında, LAB'lerde sıklıkla tespit edilen bakteriyosin temel genleri üzerinden hazırlanan 22 farklı primer çifti kullanılarak, geniş

çaplı tarama gerçekleştirilmiştir (Macwana ve Muriana, 2012., Çizelge 2). Yapılan PZR taraması sonucunda *L. plantarum* PFC74 suşunun genomunda *plnA* geninin varlığına işaret eden DNA fragmenti çoğaltılmıştır. Bu sonuçlar, PFC74 suşunun beklenildiği gibi plantarisin olduğunu göstermiştir. Çalışmada ulaşılan ilginç sonuç ise, *L. namurensis* PFC70 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının genomunda 22 farklı primer çiftinden herhangi birisi çoğaltılmamıştır. Dolayısıyla çalışmada elde edilen bu bulgu, bu bakteriyosinlerin yeni birer bakteriyosin olduğuna işaret etmektedir.

Bakteriyosinlerin antimikrobiyal etki şeklinin belirlenmesi

Çalışmada bakteriyosinlerin *M. luteus* DSM1790 üzerindeki etki şeklinin belirlenmesi amacı ile kısmi saflaştırılmış bakteriyosin preparatları, logaritmik fazın başlangıcına kadar geliştirilmiş söz konusu bu bakterinin gelişme ortamına ilave edilmiş ve ardından 18 saat boyunca, hücre gelişimi iki saatte bir optik yoğunluk ölçülerek izlenmiştir. Şekil 3'de görüldüğü gibi 200 AU/mL konsantrasyonda bakteriyosin ilavesi ile birlikte *M. luteus* DSM1790 gelişimi *L. namurensis* PFC70 ve *L. plantarum* PFC74 bakteriyosinleri ile 6. saat sonunda *L. paralimentarius* PFC97 bakteriyosini ile ise 4. saat sonunda durdurulmuştur. *M. luteus* DSM1790 suşunun, *L. paralimentarius* PFC97 dışındaki tüm bakteriyosinlerin gelişme ortamına ilave edilmesi durumunda fermentasyon sonuna kadar gelişimi durdurulmuştur. Söz konusu bu bakteriyosin fermentasyon başında *M. luteus* DSM1790 suşunun gelişimini yavaşlatmasına rağmen, 16. saatten sonra bu indikatör bakterinin gelişiminin tekrar artmaya başladığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar *L. namurensis* PFC70 ve *L. plantarum* PFC74 bakteriyosinlerinin bakteriyosidal etkide bulunduğunu *L. paralimentarius* PFC97 bakteriyosininin ise bakteriyostatik etkili olduğuna işaret etmiştir. Bunların dışında *L. plantarum* PFC74 bakteriyosini ilavesinden sonra, *M. luteus* DSM1790 suşlarının optik yoğunluğunun düşmesi, bakteriyolitik bir etkiyi de göstermiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda plantarisinlerin bakteriyostatik ve bakteriyosidal etkili olabildikleri bildirilmiş ve bakteriyostatik etkili olduğuna dair birçok çalışma yer almaktadır (Todorov 2009,

Arief vd., 2015, Milioni vd., 2015, Barbosa vd., 2016).



Şekil 3. *L. namurensis* PFC70, *L. plantarum* PFC74 ve *L. paralimentarius* PFC97 bakteriyosinlerinin *M. luteus* DSM1790 suşuna karşı antimikrobiyal etki şekli

Figure 3. Antimicrobial effect of *L. namurensis* PFC70, *L. plantarum* PFC74 and *L. paralimentarius* PFC97 bacteriocins against *M. luteus* DSM1790 strain

SONUÇ

Bu çalışmayla birlikte tarhana fermentasyonundan bakteriyosin üreticisi LAB'in karakterizasyonu ilk defa başlanmıştır. Özellikle *L. namurensis* PFC70 ve *L. paralimentarius* PFC97 suşlarının daha önce karakterize edilmemiş bakteriyosinleri ürettikleri gösterilmiştir. Tarhana fermentasyonundan izole edilmiş yeni bakteriyosin üreticileri kazanılmıştır. Çalışma kapsamında araştırılan bakteriyosin üreticisi laktobasiller başta gıda güvenliğinin sağlanması olmak üzere, patojenlerle mücadele de kullanılabilir önemli mikroorganizmalardır. Her ne kadar tarhana asidik ve kurutulmuş bir gıda olması nedeniyle fermentasyonunda ciddi patojen riski taşımaya da özellikle son yıllarda tüketicilerin aromatik özelliklerinden dolayı yaş tarhanaya yönelmesi nedeniyle de söz konusu suşlar starter kültür olarak geleneksel gıdamız tarhananın üretimi için önerilebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 2010 BSP 021 proje numarası ile destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

ÖŞ araştırmayı tasarladı. HİK analizleri gerçekleştirdi. HİK ve ÖŞ makaleyi yazdı. HİK ve ÖŞ makalenin son halini okudu ve onayladı.

KAYNAKLAR

Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Karaawi, M.A.A., Siddiqui, M.U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *Int J Antimicrob Agents*, 49,1–11.

Arief, I., Budiman, C., Jenie, B., Andreas, E., Yuneni, A. (2015). Plantaricin IIA-1A5 from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 displays bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*. *Benef Microbes* 6:603-613.

Atrih, A.; Rekhif, N.; Moir, A.; Lebrihi, A.; Lefebvre, G. (2001) Mode of action, purification

and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int J Food Microbiol.* 660, 68, 93-104.

Barbosa, M.S., Todorov, S.D., Ivanova, I.V., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J.M., Haertlé, T., Franco, B.D.G.M. (2016). Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. *Food Control.* 60:103-112.

Beasley, S. S. ve Saris, P. E. J. (2004). Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from human milk. *Appl Environ Microbiol.* 70:5051-5053.

Chen, Y. S.; Wang, Y. S.; Chow, Y. S.; Yanagida, F.; Liao, C. C.; Chiu, C. M. (2014) Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510. *Arch Microbiol.* 196, 193-199.

Dağhoğlu, O. (2000). Tarhana as a traditional Turkish fermented cereal food. its recipe, production and composition. *Nahrung*, 44, 85-8.

de Vuyst, L. ve Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 13:194–199.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin". *Antonie Van Leeuwenhoek.* 69,(2),193-202.

Franz, C.M. A. P., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U., Holzapfel, W. H. (1997). Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J. Basic Microbiol.* 37:197-196.

Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L.; Omar, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*, 120, 51 –70.

Hill, C., Nes, I.N., Ross, R.P. (2011). Bacteriocins. The 10th LAB Symposium: Thirty years of Research on Lactic acid bacteria, August 28-September 1, 2011, Netherlands, 37-56p.

Hu, Y., Liu, X., Shan, C., Xia, X., Wang, Y., Dong, M., Zhou, J. (2017). Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM4 from a

- traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics. *Food Control*. 77:290-297.
- Jozala, A. F., Novaes, L. C. L., Cholewa, O., Moraes, D., Penna, T. C. V. (2005). Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *African J Biotechnol*. 4:262-265.
- Juturu, W. ve Wu, J.C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnol Adv*. 36,2187–2200.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 12,39-85.
- Lü, X., Hu, P., Dang, Y., Liu, B. (2014a). Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. *Food Control*. 43:276-283.
- Lü, X., Yi, L., Dang, J., Dang, Y., Liu, B. (2014b). Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms. *Food Control*. 46:264-271.
- Macwana, S.J. ve Muriana, P.M. (2012). A 'bacteriocin PCR array' for identification of bacteriocin-related structural genes in lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods*. 88:197–204.
- Milioni, C., Martínez, B., Degl'innocenti, S., Turchi, B., Fratini, F., Cerri, D., Fischetti, R. (2015). A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LpU4 as a valuable candidate for biopreservation in artisanal raw milk cheese. *Dairy Sci Technol*. 95 (4):479-494.
- Mills, S., Serrano, L.M., Griffin, C., O'Connor, M.P., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, R.P., Meijer, W.C. (2011). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG p-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Microb Cell Fac*.10(1):7.
- Moreno, F.M.R., Callewaert, R., Devreese, B., van Beeumen, J., de Vuyst, L. (2003). Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *J Appl Microbiol*. 94: 214-229.
- O'Shea, E.F., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013). Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol*. 24,130–134.
- O'sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria improvements in food safety and quality. *Biochimie*. 84:593-604.
- Özel, S. (2012). Tarhana hamuru fermantasyonunun mikrobiyal taksonomik yapısının ve populasyon dinamiğinin belirlenmesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Denizli, Türkiye, 153s.
- Parente, E. ve Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 52:628-638.
- Saavedra, L. ve Sesma, F. (2011). Purification techniques of bacteriocins from lactic acid bacteria and other gram-positive bacteria. In: Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. Djemal Drider, Sylvie Rebuffat (Editors). Springer, New York, Chapter 7:99-115.
- Schagger, H ve von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulphate-poly-acrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166:368-379.
- Settanni, L.; Tanguler, H.; Moschetti, G.; Reale, S.; Gargano, V.; Erten, H. (2011). Evolution of fermenting microbiota in tarhana produced under controlled technological conditions. *Food Microbiol*, 28, 1367-1373.
- Simha, B.V., Sood, S.K., Kumariya, R., Garsa, A.K. (2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiol Res*. 167:544-549.
- Şengün, İ.Y.; Nielsen, D.S.; Karapınar, M.; Jakobsen, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from tarhana, a traditional

- Turkish fermented food. *Int J Food Microbiol*, 135, 105–111.
- Şimşek, Ö.; Özel, S.; Çon, A.H. (2017). Comparison of lactic acid bacteria diversity during the fermentation of tarhana produced at home and on a commercial scale. *Food Sci Biotechnol*, 26, 181-187.
- Tagg, J.R. ve McGiven, A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. *Appl Microbiol.*, 21:943.
- Takala, T. M. ve Saris, P. E. J. (2007). Nisin: Past, present and future. In: Research and Applications of Bacteriocins, Margaret A. Riley, and Osnat Gillor, (Editors) Horizion Bioscience, Wymondham, 181-213.
- Todorov, S.D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*-production, genetic organization and mode of action. *Braz J Microbiol.* 40:209–221.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B., Hill, C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. In: Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, R.J. Sizezen, J. Kok, T. Abee, G. Schaafsma (Editors), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 165-185.
- Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J., Venema, G. (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl Environ Microbiol.* 55: 1187-1191.
- Wang, J., Zhang, S., Ouyang, Y., Li, R. (2019). Current developments of bacteriocins, screening methods and their application in aquaculture and aquatic products. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 22,101395.
- Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Roytrakul, S., Pres, R.H., Zendo, T., Kenji, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2015). Two putatively novel bacteriocins active against Gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. *Food Control.* 55: 176-184.
- Zhu, X., Zhao, Y., Sun, Y., Gu, Q. (2014). Purification and characterisation of lantarinin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chem.* 165:216-223.
- Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J., Huang, G. (2018). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Int J Biol Macromol.* 117,781–789.