



T.C.

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***BACILLUS* SP. SUŞUNDAN BAKTERİYOSİN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

SULTAN KAYA ŞEN

KASIM 2016

GİRESUN

T.C.

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***BACİLLUS* SP. SUŞUNDAN BAKTERİYOSİN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

SULTAN KAYA ŞEN

KASIM 2016

GİRESUN

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

.... / / 2016

Prof. Dr. M. Serkan SOYLU

Müdür

Bu tezin yüksek lisans tezi olarak Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İhsan AKYURT

Anabilim Dalı

Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve yüksek lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirildiğini onaylarız.

Doç. Dr. Hatice KATI

Danışman

JÜRİ ÜYELERİ

Doç. Dr. Hatice KATI

Doç. Dr. Cengiz MUTLU

Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

ÖZET

BACILLUS SP. SUŞUNDAN BAKTERİYOSİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KAYA ŞEN, Sultan

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Hatice KATI

Kasım 2016, 72 Sayfa

Günümüzde kimyasal koruyucuların besinin doğallığını, kalitesini ve değerini düşürdüğü bilinmektedir. Bu nedenle antimikrobiyal maddelerin gıda korunmasında kullanımı artmıştır. Dolayısıyla da yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılması ve keşfi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada *Bacillus* sp. T69 izolatından bakteriyosin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın, pH'nın, enzimlerin, bazı organik çözücülerin, deterjanların ve kimyasalların etkisi araştırılmıştır. Molekül ağırlığı ise SDS-PAGE ile belirlenmiştir.

Bacillus sp. T69 izolatının luria bertani besiyerinde, 30 °C'de 24. saatte maksimum düzeyde bakteriyosin ürettiği belirlenmiştir. Bakteriyosin düşük sıcaklıklarda (10-40 °C) aktivitesi yüksek iken yüksek sıcaklıklarda (>60°C) aktivite kaybetmektedir. *Bacillus* sp. T69'un sentezlediği bakteriyosinin pH 5-10 arasında aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bakteriyosinin proteinaz K, tripsin, iki-merkaptotanol, SDS ve Triton X-100'e karşı duyarlı ancak, bazı organik çözücülere (kloroform, metanol, etanol, hekzan, aseton, izopropanol, asetonitril, butan-1-ol) ve EDTA'ya karşı ise dayanıklı olduğu belirlenmiştir. SDS-PAGE çalışması sonucunda bakteriyosinin molekül ağırlığının yaklaşık 15 kDa olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, bakteriyosin, antibakteriyal

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN FROM *BACILLUS* SP. STRAIN

KAYA ŞEN, Sultan

Giresun University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Hatice KATI

November 2016, 72 Pages

Nowadays, it is known that chemical preservatives reduce the naturalness, nutritional quality and value of the food. Therefore, it increased to use in food protecting of antimicrobial substances. Thus, investigation and discovery of new antimicrobial substances is of great importance.

In this study, isolation and characterization of bacteriocin from *Bacillus* sp. T69 isolate was done. The effects of temperature, pH, enzymes, some organic solvents, detergents and chemicals on bacteriocin activity were investigated. Its molecular weight was determined by tricine-SDS-PAGE.

It was determined to produce bacteriocin in maximum level at 30 °C 24 th hour in luria bertani medium of *Bacillus* sp. T69 isolate. While bacteriocin activity is high at low temperatures (10-40 °C), activity is lost at high temperatures (> 60). It was found to show activity between at pH 5 and 10 of bacteriocin from *Bacillus* sp. T69. It was determined that bacteriocin was sensitive to protease K, trypsin, two-mercaptoethanol, SDS and Triton X-100, but resistant to against some organic solvents (chloroform, methanol, ethanol, hexane, acetone, isopropanol, acetonitrile, butan-1-ol) and EDTA. As a result of SDS-PAGE analysis, it was found that molecular weight of bacteriocin was about 15 kDa.

Key Words: *Bacillus*, bacteriocin, antibacterial

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince benden ilgi ve desteğini hiç esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hatice KATI'ya minnet ve saygılarımı sunar, sonsuz teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sabır, güven ve sevgiyle desteklerini hiç esirgemeyen annem Seveli KAYA, babam Hasan KAYA, kardeşim Kardelen KAYA ve kuzenim Arzu ATEŐOęLU'na en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
TABLolar DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakteriler ve Özellikleri.....	2
1.2. Antimikrobiyal Bileşikler.....	2
1.3. Bazı <i>Bacillus</i> Suşlarının Ürettiği Antimikrobiyal Maddeler.....	3
1.4. Antibiyotikler.....	4
1.5. Bakteriyosinler.....	4
1.5.1. Bazı Bakteriyosinler ve Üretici Mikroorganizmalar.....	7
1.5.2. Bazı <i>Bacilluslar</i> ve Ürettikleri Bakteriyosinler.....	9
1.5.3. Bakteriyosinlerin Biyosentezi.....	9
1.5.4. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizmaları.....	11
1.5.5. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması.....	13
1.5.6. Bakteriyosinleri Etkileyen Faktörler.....	14
1.5.7. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları.....	15
1.5.7.1. Gıdalara Bakteriyosin İlave Edilmesinin Yararları.....	16
1.5.7.2. Bakteriyosinlerin Diğer Koruyucu Maddeler ve Proseslerle Birlikte Kullanılması.....	16
1.5.7.3. Bakteriyosin Kullanımını Sınırlayan Faktörler.....	17
1.6. Tezin Amacı.....	18
2. MATERYAL VE METOT.....	19
2.1. Farklı İnkübasyon Süresi ve Besiyerlerinin Bakteriyosin Üretimine Etkisi.....	19
2.2. Bakteriyosinin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	19
2.3. Bakteriyosinin Karakterizasyonu.....	20

2.3.1. Bakteriyosin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	20
2.3.2. Bakteriyosin Aktivitesine pH Etkisinin Saptanması.....	20
2.3.3. Bazı Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisinin Saptanması ...	21
2.3.4. Bazı Deterjanların ve Kimyasalların Bakteriyosin Aktivitesine	21
Etkisinin saptanması	21
2.3.5. Enzimlerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	22
2.4. Ultrafiltrasyon	22
2.5. Bakteriyosinin Kısmi Saflaştırılması	22
2.5.1. Etanol Çöktürmesi.....	22
2.5.2. Aseton çöktürmesi.....	23
2.5.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	23
2.6. SDS-PAGE ve Zymogram Analizi.....	24
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	25
3.1. Farklı İnkübasyon Süresi ve Besiyerlerin Aktiviteye Etkisi.....	25
3.2. Bakteriyosinin Aktivitesinin Belirlenmesi	25
3.3. Sıcaklığın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	27
3.4. Bakteriyosin Aktivitesine pH'ın Etkisi.....	28
3.5. Bazı Organik Çözücülerin Aktimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkisi.....	32
3.6. Bazı Kimyasal ve Deterjanların Bakteriyosin Üzerinde Etkisi	35
3.7. Proteolitik Enzimlerin Bakteriyosin Üzerine Etkisi.....	40
3.8. Ultrafiltrasyon	42
3.9. Bakteriyosinin Saflaştırılması	42
3.10. SDS-PAGE ve Aktivite	43
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ	72

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO

Tablo 1.2 Bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar7

Tablo 3.1 *Bacillus* sp. T69 izole edilen bakteriyosin aktivitesinin hesaplanması26



ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

Şekil 1.1 Bakteriyosinlerin biyosentezleri	11
Şekil 3.1 <i>Bacillus</i> sp. T69'un A: 24, B: 48, C: 72, D: 96 ve E: 120. saatlerde ve LB, TSB ve NB besiyerilerinde indikatör bakteriye karşı antibakteriyal aktivitesinin petrideki görüntüsü	25
Şekil 3.2 Bakteriyosin aktivitesinin petrideki görüntüsü	26
Şekil 3.3 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların petrideki görüntüsü	27
Şekil 3.4 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	28
Şekil 3.5 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'ın etkisi	29
Şekil 3.6 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'ın etkisi	30
Şekil 3.7 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'ın etkisi	30
Şekil 3.8 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'ın etkisi	31
Şekil 3.9 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'ın etkisi	31
Şekil 3.10 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'ın etkisi	32
Şekil 3.11 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin petrideki görüntüsü	33
Şekil 3.12 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin petrideki görüntüsü	33

Şekil 3.13 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine organik çözücülerin etkisi	34
Şekil 3.14 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine organik çözücülerin etkisi	34
Şekil 3.15 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine deterjanların etkisinin petrideki görüntüsü	35
Şekil 3.16 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine deterjanların etkisinin petrideki görüntüsü	36
Şekil 3.17 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine bazı deterjanların etkisi	36
Şekil 3.18 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine bazı deterjanların etkisi	37
Şekil 3.19 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine bazı deterjanların etkisi	37
Şekil 3.20 <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine bazı deterjanların etkisi	38
Şekil 3.21 EDTA'nın <i>Bacillus</i> sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine etkisi	39
Şekil 3.22 İki-merkaptolanın bakteriyosin aktivitesine etkisinin petrideki görüntüsü	40
Şekil 3.23 Proteinaz K enziminin bakteriyosin aktivitesine etkisinin görüntüsü	41
Şekil 3.24 Tripsin enziminin bakteriyosin aktivitesine etkisinin görüntüsü	41
Şekil 3.25 Bakteriyosinin ultrafiltrasyon sonucu petrideki görüntüsü	42

Şekil 3.26 Etanol, aseton ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucu

aktivitenin petri görüntüsü 42

Şekil 3.27 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosinin SDS-PAGE

görüntüsü. M: Marker, 1: %40 amonyum sülfat çöktürmesi, 2: %60

amonyum sülfat çöktürmesi, 3: %80 amonyum sülfat çöktürmesi 43

Şekil 3.28 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosinin zymogram

görüntüsü. M: Marker, 1: %40 amonyum sülfat çöktürmesi 44



1. GİRİŞ

Bacillus bakterilerinin besinlerde ve özellikle unlu gıdalarda, inhibisyonunu engellemek nedeniyle; kalsiyum propiyonat, asetik asit, propiyonik asit gibi kimyasallar kullanılmaktadır (Rosenquist ve Hansen, 1998; Olimpia ve ark., 2002; Demir, 2006). Kimyasal koruyucu kullanımına alternatif olarak; mikroorganizmaların ortak yaşam tarzlarından biri olan antagonizmadan; gıdaların muhafazasında yararlanılması üzerine çalışmalar mevcuttur (Temiz, 1998; Ünlütürk, 1998). Besin kaynaklı hastalıkların artması; halkın gıda endüstrisinde, mevcut gıda muhafaza tekniklerinin etkinliğinden şüphe etmesine yol açmıştır. Gıda kalitesi ve güvenliği için; yüksek ısı işlem, asidifikasyon, tuzlama, kimyasal koruyucu, kurutma, dondurma, soğutma, fermentasyon gibi saklama teknikleri yerine; yüksek hidrostatik basınç, vurgulu elektrik alanları, doğal antimikrobiyal bileşikler, modifiye atmosferde paketlenme ve biyokorumalar gibi yeni muhafaza tekniklerinin uygulanmasında artış gözlenmektedir (Soomro ve ark., 2002; Steffen, 2005; De Vuyst ve Leroy, 2007). Ayrıca tüketicilerin; kimyasal koruyucularla, gıdaların muhafazası konusunda endişelerinin artması ve tüketiciler ile yetkili kişilerin " %100 doğal" ve "az işlem görmüş" gıdalara olan ilgilerinin artması, doğal antimikrobiyal ajanlara eğilimi giderek arttırmıştır (Cleveland ve ark., 2001; De Vuyst, 2000).

Klaenhammer'e göre bütün bakterilerin %99'u en azından bir bakteriyosin sentezlemektedir ve bunların çoğu henüz tanımlanmamıştır (Klaenhammer, 1988). Bakteriyosinlerin; veteriner tıpta, biyomücadelede bitki patojenlerine karşı, sağlık alanında antitümör ajanlar olarak ve gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanım olanaklarına dair birçok araştırma yapılmaktadır. Bu polipeptidler gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimini ve gıda bozulmasını engellemekte ve bu özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadır (Başbülbul ve Bıyık, 2009).

Bakteriyosinler gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimini ve gıda bozulmasını engellemektedir. Bakteriyosinlerin daha çok Gram (+) bakteriler tarafından üretildiği bilinmektedir. Laktik asit bakterileri, *Staphylococcus*'lar ve *Bacillus*'lar gibi Gram (+) bakterilerin yanı sıra *E. coli* ve *Pseudomonas* gibi Gram

(-) bakteriler tarafından sentezlenirler. Ayrıca son araştırmalar bazı Arkea'lerinde bakteriyosin ürettiğini göstermiştir (Riley, 2002).

1.1. *Bacillus* Cinsi Bakteriler ve Özellikleri

“*Bacillaceae*” familyasında yer alan *Bacillus*'lar, aerop veya fakültatif anaerop, gram (+) çubuk şeklinde bakterilerdir. Yaşlı *Bacillus* kültürlerinde bakterinin gram ile boyanma özelliği değişken olabilir ve bazen de gram (-) olabilir. Bakterilerin çevresinde peritriş flagellalar bulunması nedeni ile birçok tür hareketlidir (Topçal, 2010).

Bacillus türleri neredeyse tüm doğal habitatlardan ve diğer pek çok kaynaktan izole edilebilirler. Yaygın olarak toprakta ve bitki döküntülerinin olduğu yerlerde bulunurlar. Tatlı ve tuzlu sular, sıcak su kaynakları, kaplıcalar, kutup bölgeleri, çöl toprakları, derin deniz suyu sedimentleri, peynir, süt gibi yiyecekler *Bacillus*'ların yaşayabildiği alanlardır. Patojen olanlar için ise insan vücudu yaşam alanları olarak verilebilir. Toprak ve bitkiler üzerinde yaygın olarak bulunan *Bacillus*'lar besin maddeleriyle intoksikasyona neden olabilmektedirler (Anonymus, 1998). Karbon ve azot döngülerinde de önemli rol oynarlar (Earl ve ark., 2008). *Bacillus*'lar bir veya daha fazla sayıda hücreden oluşan zincirler meydana getirebilirler. *Bacillus* cinsi bakteriler ekstrem koşullarda spor oluşturma yeteneğine sahiptirler. Oluşturdukları endosporlar oval, yuvarlak, silindirik, ya da böbrek şeklinde olabilir. Sporlar hücre içerisinde subterminal veya sentral olarak yerleşebilir (Bonwart, 1989). Ana hücrede bulunan sporogoniumun yeri ve sporun şekli *Bacillus* sp. türlerinde karakteristik bir özelliktir. *Bacillus* kolonileri çoğunlukla parlak ya da şeffaf renkli; bazen de krem renkli olabilirler (Lennete ve ark., 1985). *Bacillus* cinsi içinde çoğunlukla mezofilik (30–40°C) olmakla birlikte psikrofilik (<15°C) ve termofilik (>65°C) türler de vardır (Ayhan, 2000).

1.2. Antimikrobiyal Bileşikler

Mikroorganizmalar tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler çok az derişimde bile mikroorganizma gelişimini engelleyen veya mikroorganizmaların ölümüne neden olan biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir (Schlegel, 1992; Demain, 1999). Bakteriler antibiyotik, bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddelerin

yanı sıra antimikrobiyal aktivite gösteren hidrojen peroksit (H₂O₂), karbonhidrat ve lipid gibi organik maddeleride üretebilirler (Zhennai, 2000).

1.3. Bazı *Bacillus* Suşlarının Ürettiği Antimikrobiyal Maddeler

Bazı *Bacillus* suşları sekonder metabolit olarak çeşitli maddeler üretirler ve bu maddelerinde farklı mikroorganizmalar üzerinde inhibitör aktivitesi vardır. *Bacillus* suşlarının bacitrasin, brebistin, tyrotrisin, polimiksin gibi antibakteriyal antibiyotikleri ürettikleri bildirilmiştir (Miyamoto ve ark., 1986). *B. megaterium*'dan elde edilen megacinler bu mikroorganizma ile ilişkide olan diğer mikroorganizmaları inhibe eder. *B. subtilis*'ten izole edilen alirin B-1 ve botrycidin AJ 1316 antifungal aktiviteye sahiptir. Yine *B. subtilis*'ten elde edilen subtilosin A ve subtilin, birçok gram (+) bakteri üzerinde etkilidir. *B. licheniformis* M-4'den elde edilen M-4 amoebicidal maddesinin bakteri ve fungiye karşı aktif olduğu tespit edilmiştir (Zheng ve Slavik, 1999). *B. polymyxa*'dan polymyxin antibiyotiği ve *B. brevis*'den gramisidin antibiyotiği elde edilir (Logan, 1988). *B. thuringiensis* HD-2 suşu tarafından üretilen bakteriyosin thuricin olarak isimlendirilmiş ve bu maddenin gram (+) bakterilere karşı inhibitör aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Montgomery ve ark., 1989). *B. subtilis* ve *B. licheniformis* suşları tarafından üretilen antibiyotiğe bacitrosin adı verilmiştir (Azevedo ve ark., 1993). Yapılan bir çalışmada *B. aurantinus*'un gram (+) bakteri ve anaeroplara karşı antimikrobiyal aktivite gösteren aurentinin A ve B'yi kapsayan bir yeni poliketit antibiyotik kompleksi meydana getirdiği açıklanmıştır (Nakagawa ve ark., 1988). *B. subtilis* ATCC 39374 ve ATCC 39320 suşları ile yapılan bir çalışmada, suşların polyenlaktan fostat esterleri olan diffisidin ve oksidiffisidin olarak adlandırılan antibiyotikler ürettiği bildirilmiş ve bu iki suşdan bacillin antibiyotiği de izole edilmiştir (Zimmerman ve ark., 1987).

Bacillus polymyxa KT-8 suşu ile yapılan diğer bir çalışmada da, bu suşun ürettiği fusarisidin B, C ve D elde edilmiştir (Kajimura ve Kaneda, 1997). *B. subtilis* ATCC 6633 suşu antifungal peptit antibiyotik potansiyeli içeren mycosubtilin üreticisi olarak teşhis edilmiştir (Duitman ve ark., 1999). *B. subtilis* siklik peptit antibiyotik mycobacillin, iturin A, bacillomysin, mycosubtilin, fungustatin, subsporin, bacillisin ve fengimisin ürettiği bulunmuştur (Schreiber ve ark., 1988). *B. brevis*'in durgun faz kültür hücreleri siklik dekapeptitler gramisidin S ve tirosidin

ürettiği tespit edilmiştir (Marahiel ve ark., 1993). *B. cereus* UW85'in iki yeni antibiyotik Zwittermisin A ve antibiyotik B ürettiği bulunmuştur. Bakteri filtratlarının hastalığa neden olan *Phytophthora medicaginis* bakterisini baskıladığı belirtilmiştir (Silo-Suh ve ark., 1994). Zwittermisin A'nın *Phytophthora medicaginis*'in sebep olduğu bitkisel hastalığı engellediği bildirilmiştir. Bu maddeyi üreten başka *Bacillus* suşları üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda *B. thuringiensis*'inde bu maddeyi ürettiği bulunmuştur (Stabb ve ark., 1994).

1.4. Antibiyotikler

Antibiyotikler bazı bakterilerden ve genellikle mantarlardan elde edilen, çok düşük dozlarda dahi diğer mikroorganizmalar üzerinde üremelerini engelleyici veya öldürücü etki gösteren, ancak insan hücrelerine olumsuz etkileri olmayan ya da seçici toksik etki gösteren antimikrobiyal maddelerdir (Kayser ve ark., 1997). Antibiyotik direnç genleri taşıyan bakteriler, plazmitlerini çevresindeki bakterilere aktararak antibiyotiğe dirençli bakterilerin oluşmasını sağlarlar. Antibiyotiklerin dünyada yaygın kullanımı, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde büyük bir sorun olan, antibiyotiklere dirençli mikroorganizma enfeksiyonlarını ortaya çıkarmaktadır. Son on yılda daha önceki antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı, birçok ikili antibiyotik dirençli mikroorganizma klinik olarak izole edilmiş ve bunlarla tek yönlü etkili antibiyotiklerin mücadelesinin zor olacağı sonucuna varılmıştır. Bundan dolayı etki alanı geniş ve güçlü antibiyotikler üreten yeni mikroorganizmaların araştırılması önem kazanmıştır (Demain, 1999).

Günümüzdeki kayıtlarda, bilinen 8000 antibiyotiğin var olduğu açıklanmış ve bunlara her yıl yüzlercesinin eklendiği gösterilmiştir. Buna karşın yeni antibiyotiklerin keşfinin beklenildiği belirtilmiştir. Bunun sonucunda *Bacillus* cinsi bakteriler antibiyotik üretici kaynak olarak gösterilmiştir (Eltem ve Uçar, 1988).

1.5. Bakteriyosinler

Bakteriler besin maddelerinde bozulma etkeni mikroorganizmaların veya patojenlerin büyümesini, gelişmesini önleyebilen veya onları öldüren birçok inhibe edici bileşik üretmektedir (Bennik ve ark., 1997; Hill ve ark., 1995). Bunlardan biri

olan bakteriyosin ilk olarak 1925 yılında Andre Gratia tarafından saptanmıştır. Gratia, *E. coli* tarafından üretilen bu inhibitör maddeyi kolisin olarak isimlendirmiştir (Gratia, 1925).

Jakob ve arkadaşları 1953 yılında ilk kez bakteriyosinin tanımını yapmışlardır. Jacob ve arkadaşlarının yaptığı tanım daha çok farklı türler arası antagonistik ilişkileri ve kolisin proteinini kapsamaktaydı. Fakat daha sonra bunlara benzer çok fazla madde tespit edilince tanımın kapsamı genişletilmiştir (Eckner, 1992).

Tagg ve arkadaşları ise 1976 yılında bakteriyosini; protein yapıda antagonistik maddeler olup, belli sayıda bakteriye, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye benzer türlere karşı bakteriyostatik (bakterilerin çoğalmasını, üremesini ve büyümesini önleyen) ya da bakterisidal (bakterileri öldüren) etki gösteren genellikle dar spektrumlu antimikrobiyal bileşikler olarak tanımlamışlardır (Jack ve ark., 1995; Tagg ve ark., 1976; Klaenhammer, 1998).

Pasteur ve asistanı Joubert üründen 1877'de izole ettikleri bir bakteriyle (muhtemelen *E. coli*), şarbon basilini (*B. anthracis*) aynı ortama ektikten sonra in vitro ve in vivo olarak şarbon bakterisine karşı inhibitör etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Böylece Pasteur ve Joubert bakteriler arasındaki ilk antagonistik etkiyi gözlemlemişlerdir (Riley ve Chavan, 2007).

Günümüzde tüketicilerin, besin değeri yüksek, doğal, kaliteli, minimum miktarda işlenmiş gıdalara yönelik tercihlerinin artması, kimyasal koruyucuların besin maddelerindeki kullanımlarını kısıtlamaya başlamıştır. Bundan dolayı gıdalarda antimikrobiyal maddelerin sayısı ve kullanımı her geçen gün artmaktadır (Kelly ve ark., 1996). Doğal koruyuculardan bilhassa bakteriyosinler, insan ve hayvan barsak sisteminde kolay parçalanmaları ve korunacak besinlerin fizikokimyasal yapılarında bir farklılık olmadan, bozulma ve hastalık sebebi bakterileri inhibe etmeleri sebebiyle çok çalışılan bir konu haline gelmişlerdir (Yıldırım ve Yıldırım, 2000). Antimikrobiyal maddelerin kullanılması gıdaların raf ömrünün uzatılmasında ve gıda güvenilirliğinin artmasında önemli rol oynamaktadır (Steffen, 2005; De Vuyst ve Leroy, 2007).

Yapılan alışmalar *Bacillus* sp.'nin bazı türlerinin besin maddelerinde çok ciddi bozulmalara sebep olduğunu göstermiştir. Toprakta çok görülen bir saprofit olan *B. cereus* patojen özelliği sebebiyle artan bir öneme sahiptir. Gıdayla taşınan bir patojen olan *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu gıda zehirlenmeleri olabilmektedir. Zehirlenme tehlikesini ortadan kaldırmak amacıyla kontamine olan besinlere sıcaklık uygulaması genellikle etkili bir çözüm olamamaktadır. Bunun nedeni sıcaklık uygulaması sonrasında canlılığını koruyan sporların; somatik hücreler ve toksinler oluşturmak üzere imlenebilmesidir. Et ve süt ürünleri, nişastalı besin maddeleri, işlenmemiş tahıllar, kuru gıda ve baharatlar gibi besin grupları *B. cereus* kontaminasyonu açısından büyük risk taşımaktadır. Süt ve süt ürünlerinin soğukta saklanması esnasında, *B. cereus*'un psikotrof serotiplerinin üreyerek toksin oluşturdukları, süt ve ürünlerinin psikotrof serotipler ile kontamine olmasının insan sağlığı bakımından risk taşıdığı belirtilmiştir (zdemir, 2003).

Literatürde yapılan çalışmalar bakteriyosin üretiminin, daha çok plazmid kökenli olduğunu ortaya koymuştur. Bazı bakteriyosinler bakteri plazmidinin yok edilmesine rağmen sentezlenmeye devam etmiştir. Bu durum; bakterinin bakteriyosin sentez mekanizmasının bakterinin kromozomlarında var olduğu düşüncesini doğurmuştur (Kuleaşan ve akmaki 2003). Besiyerinin bileşimi, pH, inkübasyon normu, gelişme fazı gibi faktörler bakteriyosin üretimi ve aktivitesini etkilemektedir (Krier ve ark., 1998; Aasen ve ark., 2000; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

Gram (+) bakterilerin sentezlediği bakteriyosinler daha fazla ilgi görmektedir. Bunun nedenleri; insan kullanımı için güvenli kabul edilmesi, ökaryotik hücrelere karşı toksik etki göstermemeleri, antimikrobiyal spektrumlarının gram (-) bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinlere göre daha geniş olması ve bazı bakteriyosinlerin tek bir hedef patojene karşı aktivite göstermeleridir (FAO/WHO. 2002; Parvez ve ark., 2006; Diez-Gonzalez, 2007).

Bakteriyosinler doğal antibiyotik olarak nitelendirilsede, klasik antibiyotiklerden farklı olarak mide ve ince barsaktan geçerken proteazlar tarafından aminoasitlere kadar paralanmaktadırlar. Bu yüzden vücutta emilemezler ve kalın barsak florasına ulaşamazlar (Bonwart, 1981; Geinsen ve ark., 1992; Howard ve ark., 1993).

Antibiyotik ve bakteriyosinler çoğunlukla birbirlerine karıştırılmaktadır. Ancak günümüz sınıflandırmasında ikisi tamamen farklı moleküller olarak kabul edilir. Bakteriyosinler gelişim fazında ribozomal olarak üretilen birincil metabolitler iken antibiyotiklerin çoğu durgun fazda enzim kompleksleriyle üretilen ikincil metabolitlerdir (De Vuyst ve Vandamme 1991, 1992; Nes ve ark., 2002, 2007). Bakteriyosin üreten hücrenin immünitesi bakteriyosini antibiyotikten ayıran en önemli özelliktir. İmmünite bakterilerin kendi ürettikleri bakteriyosinlerden kendilerini koruması olarak tanımlanmaktadır (Koponen, 2004).

Üretici bakteriler kendi bakteriyosinine karşı genetik bağışıklığa sahiptir. Bu bağışıklık proteinini kodlayan genler, bakteriyosinin yapısal genleriyle bağlantılı iken, antibiyotik bağışıklığını yöneten genetik belirleyiciler yapısal antibiyotik genleriyle bağlantılı değildir. Antibiyotiklerin gıdalarda kullanımı sağlık açısından mümkün olmamaktadır. Bu sebeple bakteriyosin tanımının yalnızca bakteriler tarafından sentezlenen antimikrobiyal maddeler olması kanısına varılmıştır (Rammelsberg ve Radler, 1990; Riley, 1998).

1.5.1. Bazı Bakteriyosinler ve Üretici Mikroorganizmalar

Bakteriyosinlerin ve üretici mikroorganizmaların önemi her geçen gün artmakta ve daha fazla araştırma konusu olmaktadır. Birçok bakteri antimikrobiyal bir bileşik olan bakteriyosin sentezler. Bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1 Bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar (Chen ve Hoover, 2003)

Bakteriyosin	Üretici Mikroorganizma
Sınıf I	
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactosin S	<i>Lactobacillus sake</i>
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Gallidermin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
Laktisin 481	<i>Lactococcus lactis</i>
Mersasidin	<i>Bacillus subtilis</i>
Sinamisin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Ankovenin	<i>Streptomyces spp.</i>
Duramisin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Aktagardin	<i>Actinoplanes spp.</i>
Sınıf II	
Pediosin PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Sakasin A	<i>Lactobacillus sake</i>
Leukosin A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i>
Mesenterisin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Enterosin A	<i>Enterococcus faecium</i>
Diversin V41	<i>Carnobacterium divergens</i>
Laktokoksin MMFII	<i>Lactococcus lactis</i>
Laktokoksin G	<i>Lactococcus lactis</i>
Laktokoksin M	<i>Lactococcus lactis</i>
Laktasin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Plantarisin A	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Plantarisin S	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Asidosin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Karnobakteriosin	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Divergisin A	<i>Carnobacterium divergens</i>
Enterosin P	<i>Enterococcus faecium</i>
Enterosin B	<i>Enterococcus faecium</i>
Sınıf III	
Helvetisin V-1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Helvetisin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>

1.5.2. Bazı *Bacillus*lar ve Ürettikleri Bakteriyosinler

Bacillus cinsi bakterilerin birçoğu iyi birer bakteriyosin üreticisidir. *Bacillus licheniformis*'in ürettiği Lichenin (Pattnaik ve ark., 2001), *Bacillus cereus* tarafından üretilen Cerein GN105 (Naclerio ve ark., 1993), Cerein 7A (Oscariz ve Pisabarro, 2000), Cerein 7B (Oscariz ve ark., 2006), Cerein 8A (Bizani ve Brandelli, 2002), *Bacillus thuringiensis* tarafından üretilen Thuricin 439 (Ahern ve ark., 2003), Thuricin HD-2 (Favret ve Yousten, 1989), Thuricin 7 (Cherif ve ark., 2001), Thuricin 17 (Gray ve ark., 2006), Thurincin H (Lee ve ark., 2009), Thuricin S (Chehimi ve ark., 2007), Bacthuricin F4 (Kamoun ve ark., 2005), Entomocin 110 (Cherif ve ark., 2008), Entomocin 9 (Cherif ve ark., 2003) ve Tochicin (Paik ve ark., 1997) bunlara örnek olarak verilebilir. Yine *Bacillus subtilis* tarafından üretilen Subtilosin A (Zheng ve ark., 1999), Subtilin (Banerjee ve Hansen, 1988), *Bacillus anthracis* tarafından üretilen Heterocycloanthracins (Haft, 2009) ve *Bacillus polyfermenticus* tarafından üretilen Polyfermenticin SCD (Lee ve ark., 2001) *Bacillus* 'lar tarafından üretilen bakteriyosinlerdendir.

1.5.3. Bakteriyosinlerin Biyosentezi

Bakteriyosin üretimini ve bağıışıklığı kodlayan genler; kromozom, plazmid, her ikisi veya transpozon üzerinde olabilmektedir. Her operon tüm genleri içermediği gibi her operonda genlerin organizasyonunda farklıdır (Montville ve Winkowski, 1997).

Bakteriyosin sentezi için; pre-peptidi kodlayan yapısal gen, immünite geni, ABC-taşıyıcısını kodlayan gen ve bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan aksesuar proteini kodlayan genler olmak üzere 4 farklı gene ihtiyaç vardır (Garneau ve ark., 2002; Deegan ve ark., 2006).

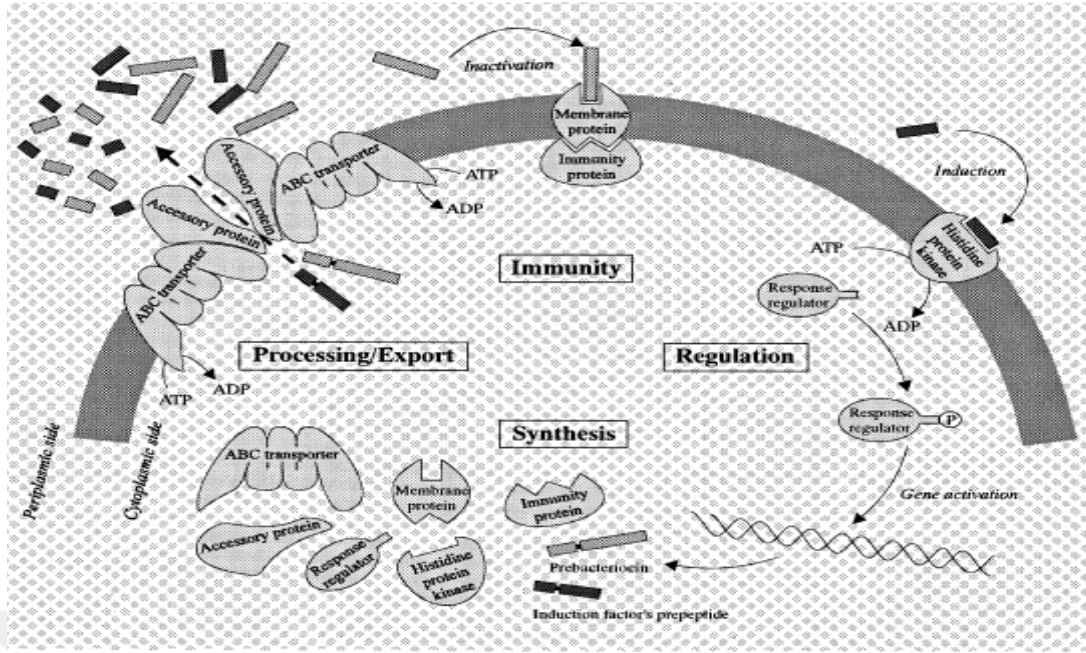
Bakteriyosin sentezinde histidin protein kinaz enzimi, respons regülatörü ve indüksiyon faktörü rol oynamaktadır. İndüksiyon faktörü membranda bulunan histidin protein kinaz enzimini uyarır daha sonra bu enzim sitoplazmada bulunan respons regülatörünü fosforilize ederek bu uyarıyı hücreye iletir. Böylece biyosentez başlamış olur. Sınıf I bakteriyosinlerin biyosentezi sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin biyosentezine benzemektedir. Sentezleri arasındaki tek fark; sınıf II

ve sınıf III bakteriyosinleri kimyasal modifikasyona uğramamakta ve bunun sonucunda anormal aminoasitler içermemektedirler. Şekil 1.1'de sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin biyosentezi gösterilmektedir (Montville ve Winskolvski, 1997; Ennahar ve ark., 1999,2000; İşleroğlu ve ark., 2005).

Üretilen bakteriyosinin hücre dışına taşınması membranda bulunan ABC-transporter ve aksesuar proteini tarafından gerçekleştirilir. ABC-transporterlar pre-bakteriyosinin taşınmasında görev alır. Aynı zamanda proteolitik aktiviteye sahip olduğundan pre-peptidin lider dizisini parçalama işlemini gerçekleştirir. Sonuç olarak lider peptid uzaklaştırılmış ve olgun bakteriyosin sitoplazmik membrandan dışarı taşınmış olur.

ABC-taşıyıcısının C-terminal kısmı ATP bağlanma bölgesini ve N-terminal kısmı hidrofobik olup proteaz aktivitesine sahip bir peptid bölgesi içermektedir. ABC-transporter proteininin taşınması için ATP hidrolizini kullanır. Aksesuar proteinleride yine hidrofilik C-terminal ve hidrofobik N-terminal kısımdan oluşur. Aksesuar proteinlerin membran translokasyonunu teşvik ettiği ve lider peptidin prosesinde rol oynadığı belirtilmektedir (Havarstein ve ark., 1995; Ennahar ve ark., 1999, 2000; Rodriquez ve ark., 2003; Klaenhammer, 1993; İşleroğlu ve ark., 2005).

Bazı bakteriyosinler ise genel salgılanma yoluyla salgılanırlar. Bu bakteriyosinler sinyal peptid denilen N-terminal lider dizini içermektedir. Bu lider dizi; pozitif yüklü N-terminal ucu, hidrofobik bir merkez ve bir parçalanma bölgesinden oluşmaktadır. Parçalanma bölgesi bakteriyosinin membrandan taşınması sırasında sinyal peptid tarafından parçalanır ve sitoplazmik membrandan çıkmasını sağlar (Pugsley, 1993; Tomita ve ark., 1996; Cintas ve ark., 1997).



Şekil 1.1 Bakteriyosinlerin biyosentezleri (Asutay, 2007)

1.5.4. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizmaları

Bakteriyosinler sentez sonrasında katlanarak son şeklini alırlar. Katlanma ile oluşan molekülün üç boyutlu yapısı, aminoasit dizisi içerisinde bulunan aminoasitlerin cinsi, sayısı ve ortam pH'sından etkilenmektedir. Bu yapı hücre membranında spesifik bölgelere tutunarak etki gösteren bakteriyosinler için oldukça önemlidir. Ortam pH'sı, katlanmada olduğu gibi bakteriyosinlerin etki mekanizmasında da önemli rol oynar ve farklı asitlik dereceleri bakteriyosinlerin inhibitör etkilerinin azalması ya da artmasını sağlar (Jack ve ark., 1995).

Bakteriyosinlerin çoğu hücre membranı üzerine etki ederek inhibisyona neden olur. Özellikle geniş etki spektrumuna sahip bakteriyosinler bu yolla etki göstermektedirler. Elektrolitik yük durumuna bağlı olarak hücre membranında bulunan, fosfolipitlerin negatif yüklü fosfat grupları ile bakteriyosinlerin pozitif yüklü hidrofobik kısımları arasında elektrostatik bir etkileşim olmakta ve bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır. Böylece hidrofobik kısım zar yapısı içine girerek por oluşumuna yol açmaktadır. Oluşan bu porlar K^+ ve Mg^{+2} gibi iyonların hücre dışına sızmasına ve hücre ölümüne neden olurlar. Bu durum spesifik bir bağlanma noktası gerektirmemektedir (Nes ve Holo, 2000; Twomey ve ark., 2002).

Antilisterial özellik gösteren bakteriyosinlerde ise spesifik bağlanma bölgesine bağlı inhibisyon gerçekleşmektedir. Bu tip bakteriyosinlerin sahip olduğu (YGNGV) aminoasit dizisi sadece bu diziyi tanıyan spesifik bir membran reseptörüne bağlanmakta ve bakteri membranı üzerinde iyon kanalları oluşturmaktadır. Bu iyon kanalları potasyum ve magnezyum gibi önemli iyonların hücre dışına sızmasına ve membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır (Jack ve ark., 1995; Montville ve Chen, 1988).

Bakteriyosinlerin diğer bir etki mekanizmasında; doğrudan proton itici kuvvet (PMF) üzerine etkili olan inhibisyon şeklindedir. Yapılan çalışmalar bu inhibisyonun, elektrolitik dengenin bozulmasıyla oluşan inhibisyon şeklinden farklı olmadığını göstermesine rağmen bazı bilim adamları bu inhibisyon mekanizmasının yalnızca PMF bölgelerinde etkili olduğunu ve değişik bir mekanizma gerektirdiğini desteklemektedir (Jack ve ark., 1995; Cuesta ve ark., 2000). Sitoplazmik membrandaki; ATP sentezi ve hücre içinde iyonların birikmesi gibi enerjiye bağlı hayati işlemleri yürüten PMF'nin aniden yok olması ya da bozulması sonucu hücrede ATP seviyesi düşer, K^+ ve Mg^{+2} gibi iyonlar hücre dışına sızar ve besin maddeleri aktif transportla taşınamazlar. Bu durum DNA ve RNA gibi makro moleküllerin yıkımına neden olmakta ve bununla birlikte protein ve peptidoglikan sentezini inhibisyona uğratarak hücre ölümüne sebep olmaktadır (Bruno ve Montville 1993; Ennahar ve ark., 2000; Oscariz ve ark., 2001).

Birçok araştırmacı Gram (+) bakterilerin oluşturduğu bakteriyosinlerin niçin yalnızca Gram (+) bakterilere etki edip Gram (-) bakterilere etki etmediği konusuna yoğunlaşmışlardır. Bhunia ve Arkadaşları 1988'de Gram (-) bakterilerin pediocin AcH'ı absorbe etmediğini göstermişlerdir (Bhunias ve ark., 1988). Gram (+) bakterilerde bulunan lipoteikoik asidin; pediocin AcH için reseptör olduğu gösterilmiştir (Bhunias ve ark., 1991). Gram (-) bakterilerde bu asidin olmayışı pediocin AcH'ı absorbe edememelerinin sebebi olarak gösterilmiştir. Gram (-) bakterilerinde bulunan lipopolisakkarit tabakanın, çoğu molekülün girişine bariyer olduğu ispatlanmıştır. Gram (-) bakterinin hücre duvarı öldürücü olmadan zedelendiğinde pediocin AcH molekülünün bozulmuş hücre duvarını geçtiği ve hücre ölümüne neden olduğu görülmektedir (Jack ve ark., 1995; Cuesta ve ark., 2000).

Bakteriyosinlerin yapısal ve proses genleri, immünite proteinlerini kodlayan genler ile genetik yakınlık gösterir (Siegers ve Entian, 1995). İmmünite geni ile yapısal bakteriyosin geni aynı operonda birbirlerini takip edecek şekilde lolakize olurlar (Klein ve Entian, 1994). İmmünite proteinleri bakteriyosinlerin por oluşturmalarını önleyerek ya da bakteriyosinleri hücre içine taşıyıp proteaz enzimleri ile parçalanmasını sağlayarak işlev göstermektedirler (Duan ve ark.,1996).

1.5.5. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Bakteriyosin sınıflandırmasında etkin çalışmaları olan Todd R. Klaenhammer'in yaptığı sınıflandırma günümüzde de esas olarak kabul edilmekte ve Klaenhammer sınıflandırması olarakta isimlendirilmektedir (Jack ve ark., 1995; Oscariz ve Pisabarro, 2001).

Bu sınıflandırmada bakteriyosinler molekül ağırlıkları, etki mekanizmaları, modifiye aminoasit içerikleri, enzim hassasiyetleri ve ısı stabiliteyi esas alınarak 4 gruba ayrılmışlardır (Klaenhammer, 1993).

Grup I: Bu bakteriyosinler lantibiyotikler olarak da adlandırılmaktadırlar. Lantionin ve F-metillantionin gibi modifiye olmuş tioether (küçük) aminoasitleri ile karakterize edilirler. Molekül ağırlıkları 1.9-4.9 kDa arasında değişmektedir. Kimyasal yapı ve antimikrobiyal aktivitelerine göre IA ve IB olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Oscariz ve Pisabarro 2001; O' Sullivan ve ark., 2002).

Grup IA: Pozitif yüke sahip, hidrofobik polipeptit yapıdadırlar. Gözenek oluşturarak aktivite gösterirler (Chen ve Hoover 2003).

Grup IB: Yüksüz ya da negatif yüke sahip globüler peptid yapıdadırlar. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Twomey ve ark., 2002).

Grup II: Lantiorin içermeyen, 10 kDa'dan küçük, ısıya dayanıklı ve translasyon sonrasında modifiye olmayan bakteriyosinleri içermektedir (Ennahar ve ark., 2000). Grup II üç gruba ayrılmaktadır;

Grup IIA: En büyük gruptur ve özellikle *Listeria'* ya karşı aktiftirler. Yapılarındaki peptid'in N-terminal sonunda (Try - Gly - Asn - Gly - Val - Xaa -

Cys) sabit aminoasit dizisi ile diğerlerinden ayrılırlar ve hücre zarında por oluşturarak aktivite gösterirler (Chen ve Hoover, 2003).

Grup IIB: Primer yapıları ayrı iki polipeptid içerirler. Bir arada etkin aktivite gösteren peptidler tek başına daha düşük aktivite gösterebilmektedirler. İki peptid aktif iken hücre membranında gözenek oluşturarak aktivite gösterirler (Hechard ve Sahl, 2002).

Grup IIC: Grup II bakteriyosinlerin özelliklerini gösteren Grup IIA ve Grup IIB dışındaki bakteriyosinlerdir. Tiyol ile aktif bakteriyosinler olup yapılarındaki sistein kalıntılarının indirgenmiş olması gerekmektedir (De Martinis ve ark., 2002).

Grup III: Büyük molekül ağırlığına sahip (>30kDa) ve ısıya dayanıksız proteinlerden oluşmaktadır.

Grup IV: Polipeptit yapısında glikoprotein ve lipoprotein gibi ilave yapılar içermeleri ile karakterize edilirler (Kleanhammer 1993; Nes ve ark., 1996; Ennahar ve ark., 2000; Nes ve Holo 2002).

Gram (-) bakterilerin ürettiği bakteriyosinler Kleanhammer'ın yaptığı bu sınıflandırmada yer almamaktadır. Bunlar ayrı bir sınıf olarak kabul edilmektedirler (Kleanhammer 1993; Nes ve ark., 1996; Ennahar ve ark., 2000). Gram (-) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler genel olarak mikosin adını almaktadır. Mikosinler; mikrobiyal hedefleri, etki mekanizmaları, protein büyüklükleri ve direnç sistemleri bakımından değişiklik göstermektedirler (Gouaux ve ark., 2005).

1.5.6. Bakteriyosinleri Etkileyen Faktörler

Bakteriyosin sentezi, stabilitesi ve aktivitesi; besiyerinin bileşimi, üretici bakterinin gelişim fazı, besiyesinin ilk pH değeri, fermantasyon şekli, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, ısıl işlem, proteolitik enzimler ve depolama koşullarından etkilenmektedir. Sıradan bir besiyerindeki bakteriyosin sentezi bakteri için spesifik besin öğelerinin ilavesi ve optimum pH ile arttırılabilir. Besiyerindeki bazı bileşenlerin (örneğin; triptofan, maya ekstraktı vb.) bakteriyosin stabilitesini azalttığı bazılarının ise bakteriyosini koruduğu belirtilmektedir. Bakterilerin optimum gelişim

sıcaklığı, bakteriyosin sentezi için en uygun sıcaklıktır. Çoğunlukla yüksek hücre yoğunluğunu sağlayan koşullar yüksek bakteriyosin üretimini de sağlamaktadır (Aasen ve ark., 2000; Kaiser ve ark., 1998; Yang ve Ray, 1994; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

1.5.7. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları

Yapılan çalışmalar gıdaların korunmasında bakteriyosin kullanımının yararlarını göstermektedir (Cleveland, 2001). Bakteriyosinler besinlerde bozulmaya ve hastalıklara sebep olan organizmaları öldürmek için direkt gıdalara eklenebilir ya da üretici suşlar kullanılarak da bu etki sağlanabilir. Bakteriyosinler ambalaj materyallerine de ilave edilebilmektedir. Bakteriyosinler ve bakteriyosin üreten suşlar fermente edilmiş düşük pH'lı gıdaların kalitesini arttırmak için de kullanılmaktadır. Fermente et ve sebzelerde, bakteriyosin üreten starter kültürler mikroorganizmaların inhibe edilmesinde kullanılmaktadır (Daeschel 1990; Muriana ve Luchansky, 1993; O'sullivan ve ark., 2002; Montville ve Winskowski, 1997).

Bakteriyosinlerin gıdalardaki antimikrobiyal aktivitesinin yanında, doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları da ürün sağlığı açısından oldukça önemlidir. Peptit ve protein yapıda olmaları mide salgıları ve pankreastan salgılanan proteolitik enzimlerden etkilenebildiklerini dolayısıyla insan vücudunda sindirilebileceklerini göstermektedir. Bazı bakteriyosinlerin ısı stabiliteilerinin olması yüksek ısıda işlem gören gıda maddelerinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır (De Martinis ve ark., 2002; Delves- Broughton ve ark., 1996).

Bakteriyosinler gıda güvenliği dışında, tıp ve klinik uygulamalarında geleneksel antibiyotiklere karşı alternatif antimikrobiyaller olarak, veterinerlikte ise hastalık etmeni patojenlere karşı kullanılmaktadır. Ayrıca anti tümör araştırmalarında ve tarımda bitki hastalıkları kontrolünde kullanılmaktadırlar (Dinçer ve ark., 2009). Bazı bakteriyosinlerin; toksik etki göstermeme ve Gram (+), insan ve hayvan patojenlerini inhibe etme gibi özellikleri vardır. Bundan dolayı bakteriyosinlerin klinik etkilerinin de araştırılmasında öncü olmuştur. Bakteriyosinlerin yıllardır gıda koruyucusu olarak kullanılması, oral ve gastrointestinal antibiyotikler olarak kullanılmalarını olası kılmaktadır (De Vuyst ve Leroy 2007; Sit ve Venderas, 2008). Yine kimi bakteriyosinlerin etki mekanizmalarının net olarak bilinmesi ve yeni

tanımlanan bir mekanizma ile çoklu ilaç dirençliliğine sahip patojenlere karşı aktivitelerinin olması tedavide kullanılmalarına imkan sağlamaktadır.

1.5.7.1. Gıdalara Bakteriyosin İlave Edilmesinin Yararları

Gıdalara bakteriyosin ilave edilmesi ile besin maddelerinin raf ömrü uzatılabilmekte, muhafaza koşulları altındaki ısılarda ekstra koruma sağlanmakta ve gıda kökenli patojen bakterilerin besin zinciri ile taşınım riski azaltılabilmektedir. Gıdalarda bozulmayı engellediğinden, yaşanan ekonomik kayıplar en aza indirilmektedir. Kimyasal kullanımı azaltılabilmekte ayrıca koruma için daha az işlem uygulanması sebebiyle ürünün doğallığı ve besin kalitesi daha iyi korunabilmektedir (Thomas ve Wimpenny, 1996).

Nadirde olsa mikroorganizmaların bakteriyosinlere karşı direnç kazanması mümkündür. Bu nedenle, yeni bakteriyosinlerin ve etki mekanizmalarının araştırılması büyük önem taşımaktadır (Galvin ve ark., 1999).

Gıdalarda kullanılacak bakteriyosin üretici suş seçiminde uyulması gereken bazı kriterler vardır. Bunlar;

- Tüketici endişelerinin giderilmesi için üretici suş tercihen GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir kabul edilen özelliklere sahip) olmalıdır.

-Bakteriyosin *Clostridium botulinum* ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenlerin de içinde bulunduğu geniş bir etki spektrumuna sahip olmalıdır.

-Bakteriyosinin tüketici sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olmamalıdır.

-Bakteriyosin ısı stabil (dayanıklı) olmalıdır.

-Aroma ve kaliteyi artırıcı özellikte olmalıdır (Holzapfel ve ark., 1995; Horn ve ark., 2004).

1.5.7.2. Bakteriyosinlerin Diğer Koruyucu Maddeler ve Proseslerle Birlikte Kullanılması

Bakteriyosinler Gram (+) bakteriler üzerinde etkili iken, Gram (-) bakteriler üzerinde fazla aktivite gösteremezler. Bu durumda Gram (-) patojenlerinde

bulunduğu düşünülürken yalnızca bakteriyosin kullanımıyla gıda güvenliğinin sağlanamayacağı ortadadır. Bundan dolayı bakteriyosinlerle birlikte koruyucu katkıların ve proseslerin kullanılması gerekmektedir. Gram (-) bakterilerin dış zarlarının stabilitesi bozulduğunda bakteriyosinlere karşı hassaslaşmaktadırlar. Bakteriyosinle birlikte hücre zarının yapısını bozacak trisodyum fosfat ve EDTA gibi şelatlayıcı ajanların kullanılmasının inhibisyon etkisi gösterebileceği belirtilmiştir. EDTA Gram (-) bakterilerin lipopolisakkarit bölgesinde magnezyum iyonlarına bağlanarak dış zarın yapısını bozmakta ve bakteriyosinin sitoplazmik zara ulaşmasını sağlamaktadır. Böylece bakteriyosin inhibisyon etkisi gösterebilmektedir (Vignolo ve ark., 2000).

1.5.7.3. Bakteriyosin Kullanımını Sınırlayan Faktörler

Bakteriyosinlerin kullanımı; dar etki spektrumları, proteolitik enzimlerle inaktive olmaları, gıda alanlarına kültürün düşük adaptasyonu, kendiliğinden bakteriyojenikliğin kaybı, düşük üretim potansiyeli nedeniyle bakteriyosin kullanımı sınırlanmaktadır. Yine bakteriyosine dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması, gıda bozulmalarına ve zehirlenmelerine yol açan maya, küf ve Gram (-) patojenlere karşı etkisiz ya da çok az etkili olmaları da kullanımlarını sınırlamaktadır. Ayrıca bazı bakteriyosinlerin genetik determinantları yönünden stabil olması, gıdada kararsızlık göstermeleri, gıdanın her tarafında homojen dağılımlarının sağlanmasındaki güçlük ve tüketici endişelerinin giderilmesi amacıyla, bakteriyosin kullanımının güvenli olduğunun ispatlanması gibi zorluklar nedeniyle kullanımları kısıtlanmaktadır. Bu faktörlere rağmen zamanla yapılan araştırmalar bu engellerin ortadan kaldırılabilirliğini göstermiştir (Gorris, 1996; Seçkin ve Baladura, 2010).

Bakteriyosinler; ribozomal olarak sentezlenen protein yapıda ve genellikle gelişme fazında üretilen birincil metabolitlerdir. Bütün bakteriyosinlerin kendi dirençlilik proteini vardır. Bakteriyosinler molekül ağırlıkları, etki mekanizmaları, etki spektrumları, biyokimyasal özellikleri ve genetik dayanıklılıkları yönünden heterojen büyük bir sınıf oluştururlar (Chen ve Hoover, 2003; Gillor ve ark., 2008; Asutay, 2007). Bu durum bakteriyosin saflaştırılması ve karakterizasyonunu güçleştirmekte ve dolayısıyla kullanımını da sınırlamaktadır. Son birkaç yıl içinde *Bacillus* cinsi bakteriler metabolik son ürünleri, antibiyotik benzeri bileşikleri ve

bakteriyosinleri kapsayan çeşitli antogonistik faktörler nedeniyle gıda katkı maddesi olarak kullanım potansiyellerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Fakat bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanılabilmesi için; kimyasal açıdan tanımlanıp karakterize edilmiş olması, kantitatif analizi ve standardizasyonuna ilişkin testler yapılması, etki şekillerinin ve üretim sürecinin açıklanması, toksikolojik verilerinin ve vücuda alındıktan sonraki akıbetinin bilinmesi gerekmektedir.

1.6. Tezin Amacı

Bu çalışmada *Bacillus* sp. T69 bakterisinden izole edilen bakteriyosinin karakterizasyonu yapılmıştır. Bu bakteriyosinin *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* HD521 (4S2) bakterisi üzerindeki antibakteriyal aktivitesi araştırılıp, bakteriyosin aktivitesini etkileyen sıcaklık, pH, organik çözücüler, proteolitik enzimler ve bazı kimyasallar ile deterjanlar gibi faktörlerin aktivite üzerine etkisi incelenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki stoktan temin edilen *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* HD521 (4S2, Bacillus stok center) bakterisine karşı yüksek antibakteriyal aktivite gösteren *Bacillus cereus* grubuna ait *Bacillus* sp. T69 kullanılmıştır (Katı ve ark., 2016).

2.1. Farklı İnkübasyon Süresi ve Besiyerlerinin Bakteriyosin Üretimine Etkisi

Bacillus sp. T69 bakterisinden hazırlanan gece kültüründen 30 mL'lik LB (Luria Bertani), TSB (Tryptic Soy Broth) ve NB (Nutrient Broth) sıvı besiyerine yoğunluğu 0,1 olacak şekilde inoküle edilerek 30 °C'de yaklaşık 1 saat sallayıcıya bırakıldı. Bakteri yoğunluğu 0,3-0,5 arası oluncaya kadar (erken logaritmik faz) sallayıcıda inkübasyona devam edildi. İstenilen yoğunluğa ulaşıncaya farklı besiyerlerinin bakteriyosin üretimine etkisini belirlemek amacıyla *Bacillus* sp. T69 bakterisi 100 mL'lik LB, TSB ve NB besiyerlerine 1 ml inoküle edilerek 30 C'de 5 gün inkübe edildi. 24 saatte bir kültürlerden örnek alınarak spektrofotometrede 600 nm'de ölçümleri yapıldı. Ayrıca alınan örnekler 10.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek süpernatantları alındı ve 30 ml NA besiyerine 40 µL indikatör bakteri eklenerek hazırlanan besiyeri, petrilere dökülerek katılaşması beklendi. Katılaştıran besiyeri üzerinde steril agar delici ile kuyucuklar açılarak süpernatanttan 100 µL inoküle edildi ve çalışmada en iyi sonuç veren besiyeri ile inkübasyon süresi belirlendi.

2.2. Bakteriyosinin Aktivitesinin Belirlenmesi

Bakteriyosin aktivitesini belirlemek için, süpernatant, ultrafiltrasyon ve amonyum sülfat çöktürmeleri iki kat seyreltilip (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) dilüsyonları hazırlandı ve her dilüsyondan 100 µl alınarak, indikatör bakteri içeren NA besiyerinde açılan kuyucuklara inoküle edildi. Difüze olması için +4 °C'de 1 gece bekletildikten sonra 30 °C'de yaklaşık 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda oluşan 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları pozitif olarak

değerlendirildi. Bakteriyosin aktivitesi (AU/ml) aşağıda verilen formül ile hesaplandı (Köseoğlu, 2007).

$$\text{Bakteriyosin aktivitesi (AU/ml)} = 1000 * V^{-1} * D^{-1}$$

D: inkübasyon süresi sonunda indikatör bakterinin gelişiminin engellendiği en yüksek dilüsyon oranı.

V: petrillerdeki kuyucuklara koyulan süpernatant miktarı.

2.3. Bakteriyosinin Karakterizasyonu

Sıcaklık, pH, organik çözücüler, proteolitik enzimler ve bazı kimyasallar ile deterjanlar gibi bakteriyosin aktivitesini etkileyen unsurların *Bacillus* sp. T69 bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyosinin aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bütün çalışmalar iki tekrarlı yapıldı ve sonuçlar % olarak hesaplanmıştır.

$$\% = A * 100/K$$

$$\text{Kontrol zon çapı} = K$$

$$\text{İşlem görmüş zon çapı} = A$$

2.3.1. Bakteriyosin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Bacillus sp. T69 bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyosinin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için 200 µL süpernatant alınarak mikrosantrifüj tüplerine koyuldu. Her bir sıcaklık derecesi için iki tekrarlı çalışıldı. 10-90 °C'de 30 dk, 90, 100 °C'de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 dk termoblokda inkübe edildi. 120 °C için ise 15 dk otoklavlama işlemi uygulandı. İndikatör bakteri (40 µL), 30 mL NA ile karıştırılarak petrilere dökülüp katılaşması beklenildi. Daha sonra steril agar delici ile kuyucuklar açılarak 100 µL inoküle edildi. Difüze olması için +4 °C'de bir gece bekletilen örneklerin 30 °C'de inkübasyonu sonrası aktivitelere bakıldı.

2.3.2. Bakteriyosin Aktivitesine pH Etkisinin Saptanması

Bacillus sp. T69 bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyosinin en iyi aktivite gösterdiği pH aralıklarının belirlenmesi için, 10 mM'lık pH tamponları hazırlanıp

otoklavlanarak steril edildi. pH 3-4-5 için sodyum asetat, pH 6-7 için potasyum fosfat, pH 8 için Tris, pH 9-10 için glisin-NaOH tamponu kullanıldı. 100 µL süpernatant + 100 µL pH tamponu mikrosantrifüj tüplerine koyularak + 4 °C'de 24 saat ve 10 ile 30 °C'de 1 saat bekletildi. Negatif kontrol için ilgili pH tamponu + dH₂O kullanıldı. 30 ml NA içine 40 µL indikatör bakteri eklenerek petrilere döküldü ve katılaşması beklenildi. Daha sonra üzerine kuyucuklar açılarak 100 µL inoküle edildi ve uygun sıcaklıkta 16-18 saat inkübasyona bırakılıp aktivitelerine bakıldı.

2.3.3. Bazı Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisinin Saptanması

Organik çözücülerin *Bacillus* sp. T69 bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyosine etkisini belirlemek için kloroform (% 10), asetonitril (%10), aseton (%10), izopropanol (% 10), metanol (% 10), bütan-1-ol (% 10), etil alkol (% 25) ve hekzan (% 25) çözeltileri kullanıldı. Süpernatant içermeyen organik çözücüler negatif, organik çözücü içermeyen süpernatant örnekleri ise pozitif kontrol olarak kullanıldı (Bhunia ve ark., 1988). Süpernatant üzerine organik çözücüler eklenerek 10 ile 30 °C'de bir saat bekletildi. İndikatör eklenmiş besiyeri üzerine kuyucuklar açılarak 100 µL inoküle edildi ve aktivitenin nasıl etkilendiği belirlendi.

2.3.4. Bazı Deterjanların ve Kimyasalların Bakteriyosin Aktivitesine Etkisinin Saptanması

Süpernatantlara sodyum dodesil sülfat (SDS), tween 80, tween 20 ve triton X-100 deterjanları son konsantrasyon %1 olacak şekilde ilave edilip 1 ve 5 saat 10 ile 30 °C'de inkübe edildi.

Etilen diamin tetra-asetik asit (EDTA) son konsantrasyon 0,1, 0,2 ve 0,5 mM olacak şekilde süpernatanta ilave edildikten sonra 10 ve 30°C'de 1 ve 5 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda örneklerden, indikatör bakterili besiyeri üzerinde açılan kuyucuklara 100 µL inoküle edilip, inkübasyon sonrasında aktiviteye etkilerine bakıldı. Negatif kontrol olarak süpernatant içermeyen kimyasal ve deterjan çözeltileri, pozitif kontrol olarak da kimyasal ve deterjan içermeyen süpernatant kullanıldı.

İki-merkaptolanın aktiviteye etkisini belirlemek için süpernatanta son konsantrasyon % 10 olacak şekilde iki-merkaptolan ilave edilerek iki tekrarlı

örnek hazırlandı. Biri ısıtma işlemine tabi tutulmazken, diğeri 90°C'de 5 dk ısıtma işlemine tabi tutuldu ve oda sıcaklığında soğutulduktan sonra aktiviteye etkisini belirlemek amacıyla indikatör eklenmiş NA besiyeri üzerine açılan kuyucuklara 100 µL inoküle edildi. Negatif kontrol için ısıtma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış dH₂O + iki-merkaptolanol, pozitif kontrol için ise ısıtma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış süpernatant+ dH₂O kullanıldı.

2.3.5. Enzimlerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisinin Saptanması

Süpernatant üzerine 1 mg/ml ve 10 mg/ml olacak şekilde proteinaz K ve tripsin enzimleri eklendi. Pozitif kontrol için süpernatant+dH₂O, negatif kontrol için dH₂O+enzim kullanıldı. Bir ve iki saat 37 °C'de bekletildikten sonra kuyucuklara 100 µL inoküle edilerek 30 °C'de 16-18 saat inkübasyon sonrasında enzimlerin aktivite üzerindeki etkileri belirlendi.

2.4. Ultrafiltrasyon

Bacillus sp. T69 suşundan elde edilen süpernatant ultrafiltrasyon ile konsantre edildi. Bu amaçla 10 kDa büyüklüğündeki molekülleri tutabilme kapasitesine sahip membran içerikli falkon tüpleri kullanıldı. Tüplere süpernatant yüklendi ve 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen üst ve alt fazın aktiviteye etkisini tespit etmek için indikatör bakteri eklenmiş NA besiyeri üzerine açılan kuyucuklar içerisine 100 µL inoküle edildi ve inkübasyona bırakıldı.

2.5. Bakteriyosinin Kısmi Saflaştırılması

2.5.1. Etanol Çöktürmesi

Test bakterisinden (*Bacillus* sp. T69) 3 mL LB besiyerine gece kültürü hazırlandı. Daha sonra gece kültürü 600 nm spektrofotometre'de ölçüldü. Bakteri yoğunluğu 0,1 olacak şekilde 30 mL LB içerisine inoküle edildi ve 30 °C'de sallayıcıya bırakıldı. Yoğunluk 0,3-0,5 olunca 1000 mL'lik erlenlerde 200 mL LB'ye %1 olacak şekilde inoküle edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Örnek 24 saat sonunda 10.000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Örneklerin süpernatantları alındı ve -20 °C'de 1 gün bekletilen 1800 mL soğuk alkol ile karıştırılarak tekrar -20 °C'de 1

gün daha bekletildi. 2 L etanol süpernatant karışımı aynı falcon tüpünde 10.000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Her seferinde süpernatant atılarak pellet tüpün dibinde biriktirildi ve pellet 1 gece kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletler 10 mL steril saf suda çözündürüldü. Daha sonra aktivitelere bakılmak üzere, 15 mL'lik falcon tüpünde -20 °C'de muhafaza edildi.

2.5.2. Aseton Çöktürmesi

Yukarıdaki şekilde hazırlanan 200 mL süpernatant 1 gün önceden -20 °C'ye bırakılan 800 mL soğuk aseton ile karıştırılarak yine -20 °C'de 1 gece bekletildi. Aseton süpernatant karışımı aynı falcon tüpünde 10.000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Her seferinde süpernatant atılarak pellet tüpün alt kısmında biriktirildi ve 1 gece kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletler 10 mL steril saf suda çözündürüldü. Daha sonra aktivitesine bakılmak üzere, 15 mL'lik falcon tüpünde -20 °C'ye bırakıldı.

2.5.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Yukarıdaki şekilde hazırlanan örnekten elde edilen 100 ml süpernatant sırasıyla son konsantrasyonu %40, 60, 80 olacak şekilde amonyum sülfat tartılarak + 4 °C'de azar azar eklendi. Her konsantrasyon sonrasında örnekler 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Yine her konsantrasyon sonrası elde edilen süpernatantlardan yaklaşık 1 ml alınarak -20 °C'ye bırakıldı. Elde edilen pelletler ise 3 ml dH₂O'da çözüldü ve yine aktivitesine bakılmak üzere -20 °C'ye bırakıldı.

Etanol, aseton ve amonyum sülfat çöktürmeleri sonucunda elde edilen örneklerin aktivitelere bakıldı. Bunun için 30 mL NA besiyeriye 40 µL indikatör bakteri ilave edilerek iyice karıştırıldı, petrilere dökülerek katılaşması beklendi. Daha sonra üzerlerine kuyucuklar açılarak, kuyucukların içerisine süpernatant, aseton, etanol, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen örneklerden 100 µL inoküle edildi ve bir gece + 4 °C'de difüze olması beklendi. Bir gece sonunda yaklaşık 16-18 saat 30 °C'de inkübasyona bırakıldı ve aktivitelere bakıldı.

2.6. SDS-PAGE ve Zymogram Analizi

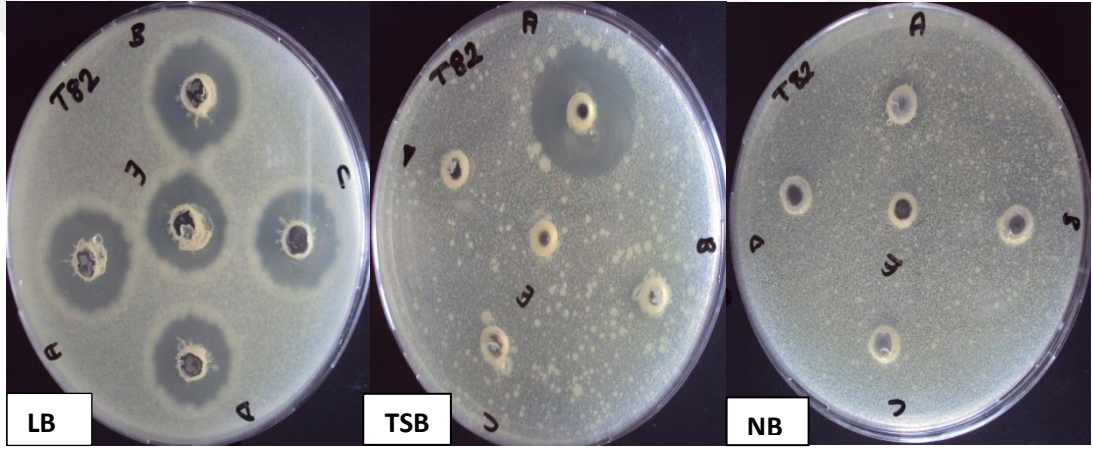
Bacillus sp. T69 bakterisinin süpernatantından amonyum sülfat çöktürmeleri sonucu elde edilen örnekler, bakteriyosinin molekül ağırlığını belirlemek ve aktivitelerine bakılması amacıyla Laemmli (1970) göre %15'lik SDS-PAGE'i yapıldı. Örneklerden 60 µl yüklendi. Marker ve iki tekrarlı olmak üzere hazırlanan örnekler kullanıldı. Aktivite bakılacak örnekler için hazırlanan yürütme boyasında SDS ve iki-merkaptolanol koyulmadı ve ayrıca kaynatma basamağı da iptal edildi. Yürütme işlemi 100 V yapıldı. Yürütme tamamlandıktan sonra marker ve örnekler Comassie Brilliant Blue R-250 (CBB-R250) ile hazırlanmış boyama çözeltisine alındı yaklaşık 2,5 saat boyandıktan sonra renk giderme solüsyonuna alındı. Aktivite bakılacak jelin diğer kısmı bir gece boyunca belli aralıklarla değiştirilen steril dH₂O'da +4 C'de bekletildi. İnkübasyon sonucu jel indikatör bakteri ilave edilmiş NA besiyeri ile kaplandı ve 30 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada *Bacillus* sp. T69 (Katı ve ark., 2016) bakterisinden elde edilen bakteriyosinin karakterizasyonu yapılmıştır.

3.1. Farklı İnkübasyon Süresi ve Besiyerlerin Aktiviteye Etkisi

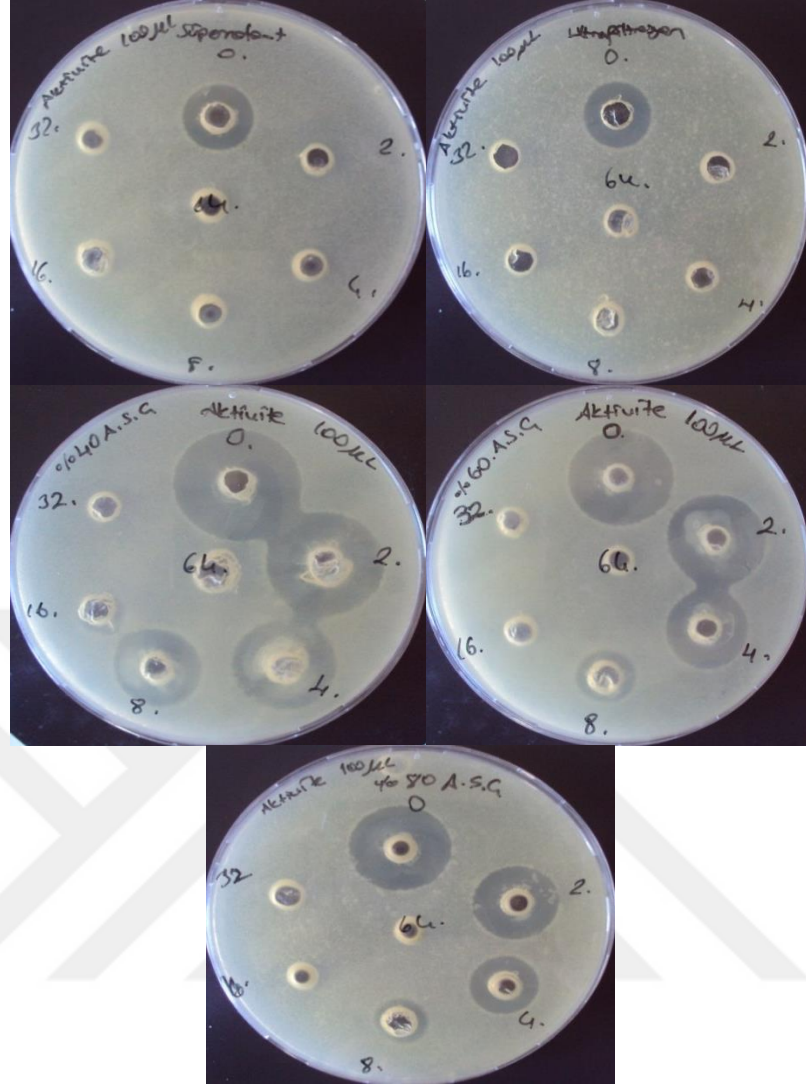
Bu çalışmada farklı inhibisyon sürelerinde (24, 48, 72, 96, 120s) ve besiyerlerde (LB, NB, TSB) *Bacillus* sp. T69'un bakteriyosin aktivitesi araştırıldı. En iyi aktivite LB besiyerinde ve 24. saatte gözlemlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *Bacillus* sp. T69'un A: 24, B: 48, C: 72, D: 96 ve E: 120. saatlerde ve LB, TSB ve NB besiyerlerinde indikatör bakteriye karşı antibakteriyal aktivitesinin petrideki görüntüsü

3.2. Bakteriyosinin Aktivitesinin Belirlenmesi

Bakteriyosin aktivitesini belirlemek için, süpernatant, ultrafiltrasyon ve amonyum sülfat çöktürmeleri iki kat seyreltilip dilüsyonları hazırlandı ve her dilüsyondan 100 µl alınarak, indikatör bakteri içeren NA besiyerinde açılan kuyucuklara ekimleri yapıldı (Şekil 3.2). % 40 doygunluktaki süpernatantta 1/16 seyreltmeye kadar, % 60 ve % 80 doygunluktaki süpernatantta 1/8 seyreltmeye kadar aktivite gözlemlendi. Bakteriyosin aktivitesi arbitrary unit (AU/ml) cinsinden hesaplandı (Tablo 3.1).



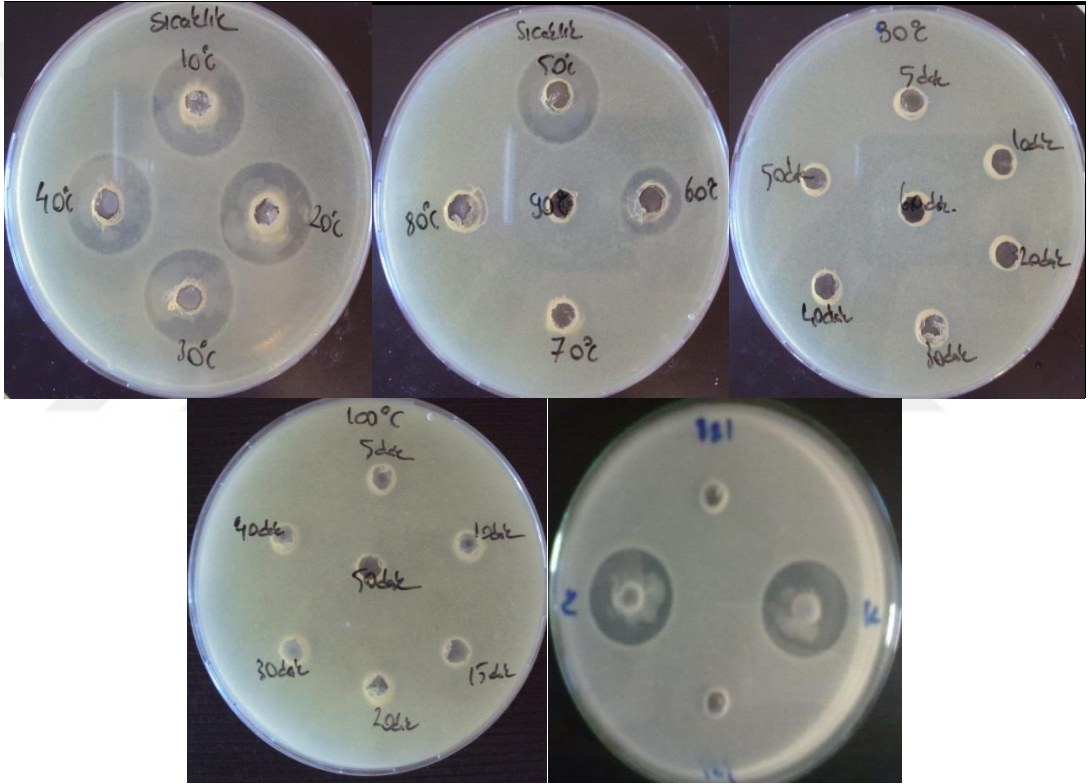
Şekil 3.2 Bakteriyosin aktivitesinin petrideki görüntüsü

Tablo 3.1 *Bacillus* sp. T69 izole edilen bakteriyosin aktivitesinin hesaplanması

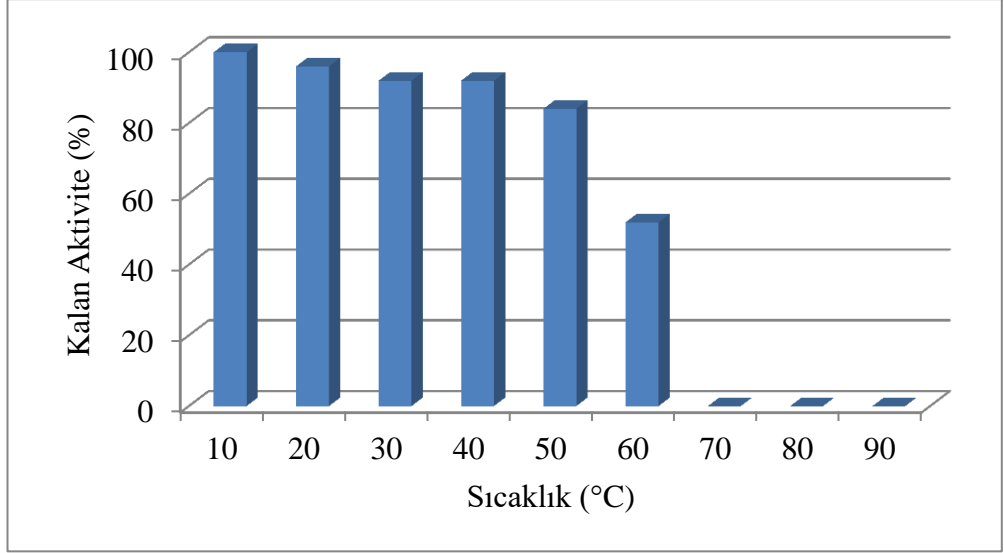
Örnekler	Aktivite (AU/ml)
Süpernatant	10
Ultrafiltrasyon	10
%40 Amonyum sülfat çöktürmesi	160
%60 Amonyum sülfat çöktürmesi	80
%80 Amonyum sülfat çöktürmesi	80

3.3. Sıcaklığın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bacillus sp. T69 tarafından üretilen bakteriyosin 10-90 °C'de 30 dk, 121 °C'de 15 dk, 90 ve 100 °C'de ise 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 dk inkübe edildikten sonra kuyucuklara 100 µL inoküle edilip, sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerindeki etkisine bakılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde süpernatantın 10-40 °C'de iyi aktivite gösterdiği, 50-60 °C arasında aktivite kaybına uğradığı ve 60 °C üzerindeki sıcaklıklarda %100 aktivite kaybettiği gözlemlenmiştir. En iyi bakteriyosin aktivitesinin ise 10 °C'de olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). 20 °C'de % 96, 30 ve 40 °C'de % 91, 50 °C'de % 84 ve 60 °C'de % 51,8 aktivite gözlenmiştir (Şekil 3.4).



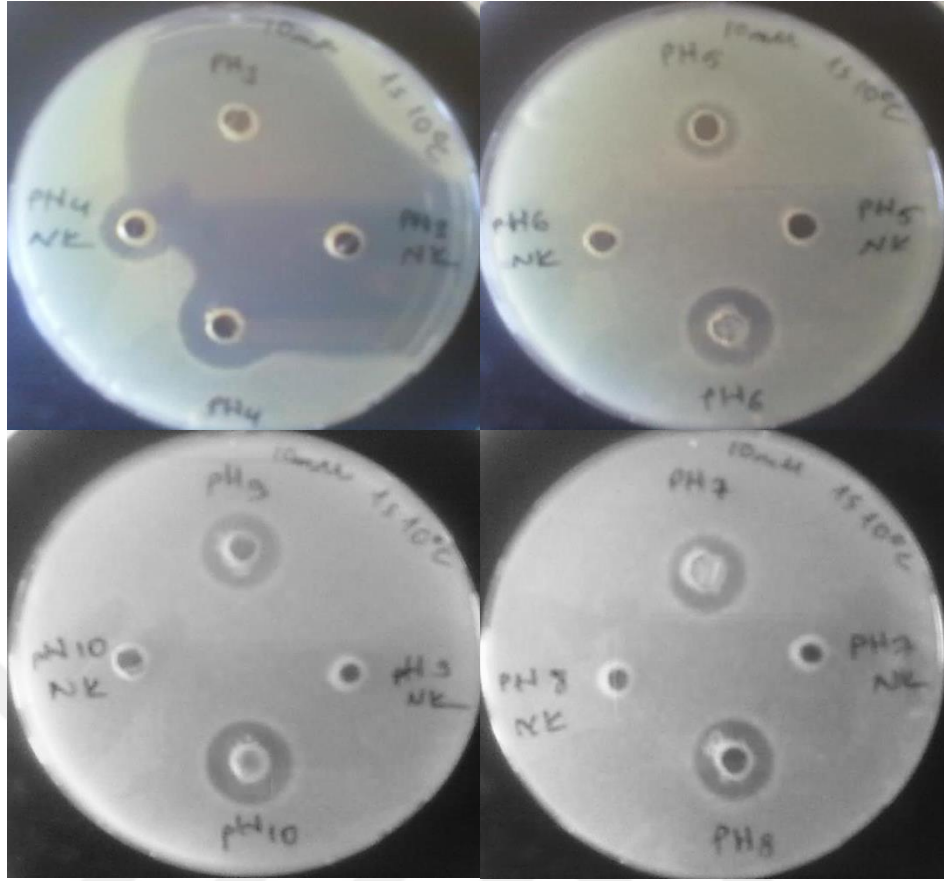
Şekil 3.3 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların petrideki görüntüsü



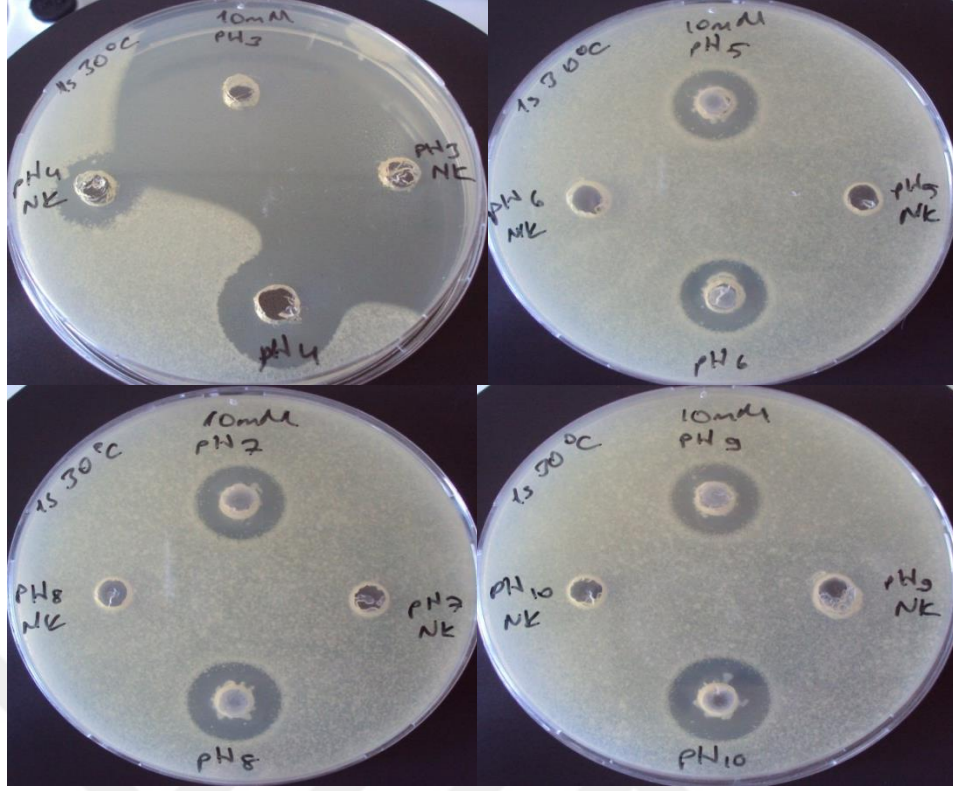
Şekil 3.4 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

3.4. Bakteriyosin Aktivitesine pH'ın Etkisi

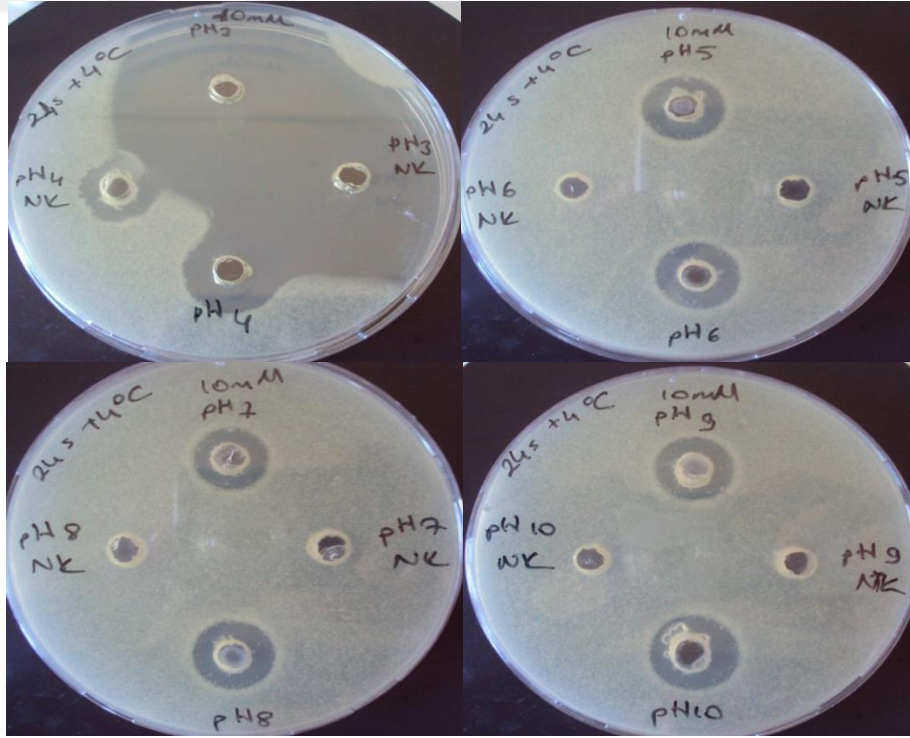
Aktivite üzerine pH'ın etkisini araştırmak üzere; 24 saat büyütülen kültür süpernatantları, 3-10 arasında ayarlanan pH tamponları (10 mM) 1:1 oranında karıştırılarak 10 ve 30 °C'de 1 s, 4 °C'de 24 s inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklara inoküle edilerek aktivite bakıldı. Aktivitelerin 1s 10 °C (Şekil 3.5), 1s 30 °C (Şekil 3.6) ve 24s +4 °C'deki (Şekil 3.7) petri görüntüleri aşağıda gösterilmiştir. Sonuç olarak 10 °C'de en iyi pH 6'da (Şekil 3.8) aktivite gösterirken, 30 °C'de en iyi pH 10'da (Şekil 3.9), +4 °C'de ise en iyi pH 6, pH 9 ve pH 10'da aktivite göstermiştir (Şekil 3.10).



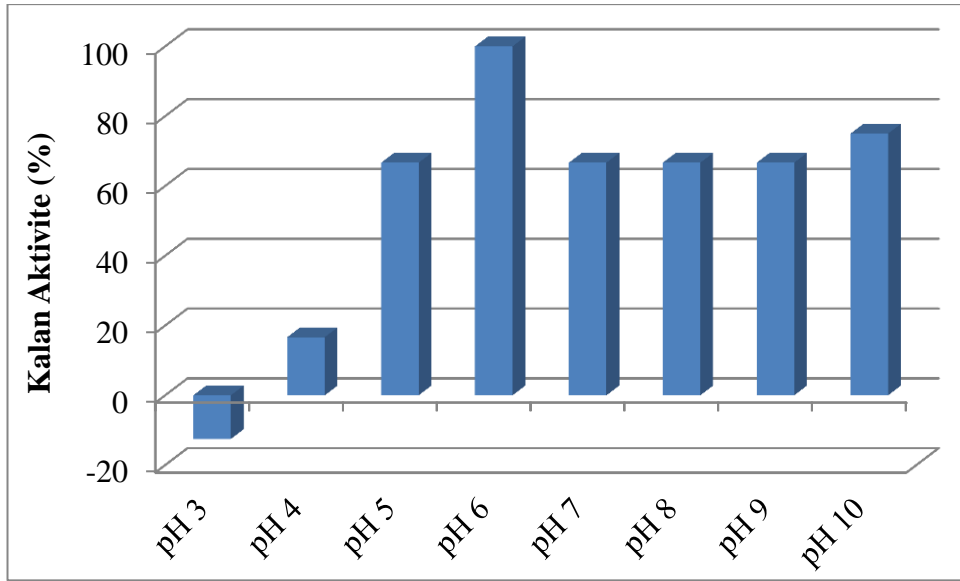
Şekil 3.5 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'nın etkisi (1s 10 °C)



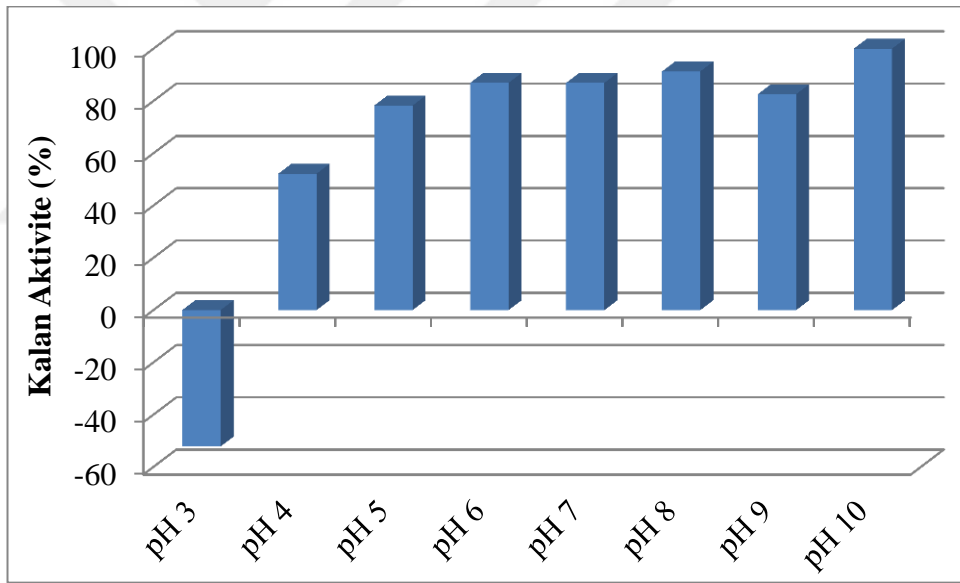
Şekil 3.6 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'nin etkisi (1s 30 °C)



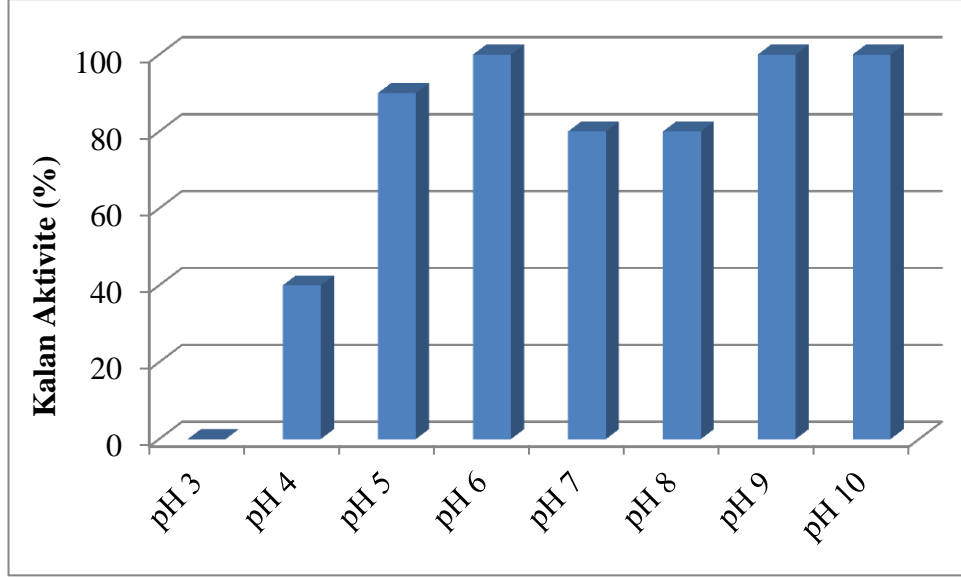
Şekil 3.7 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'nin etkisi (24 s +4 °C)



Şekil 3.8 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'nin etkisi (1s 10 °C)



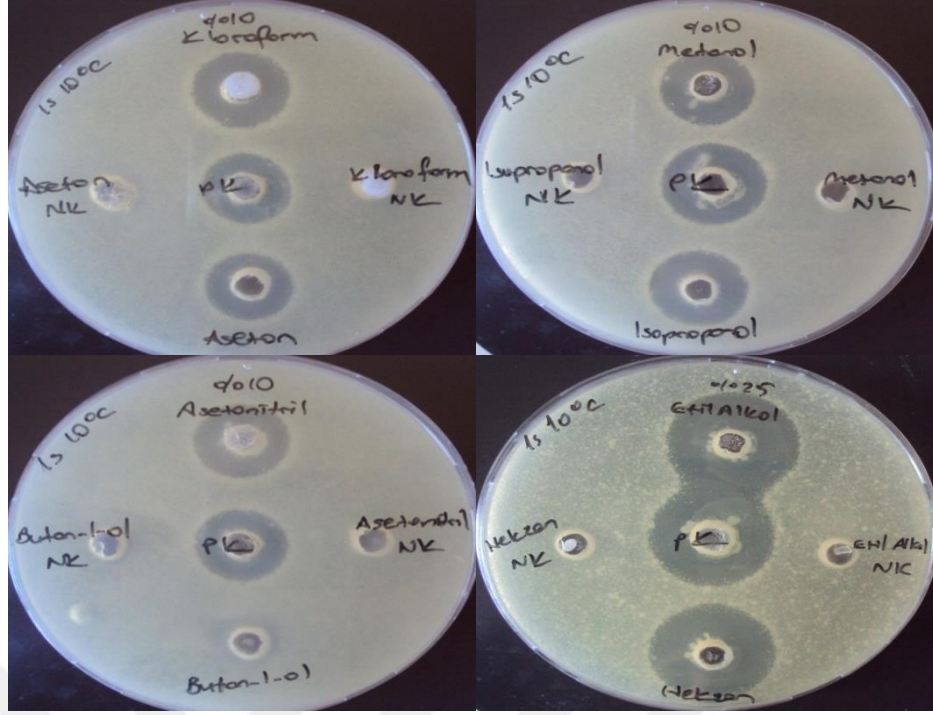
Şekil 3.9 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'nin etkisi (1s 30 °C)



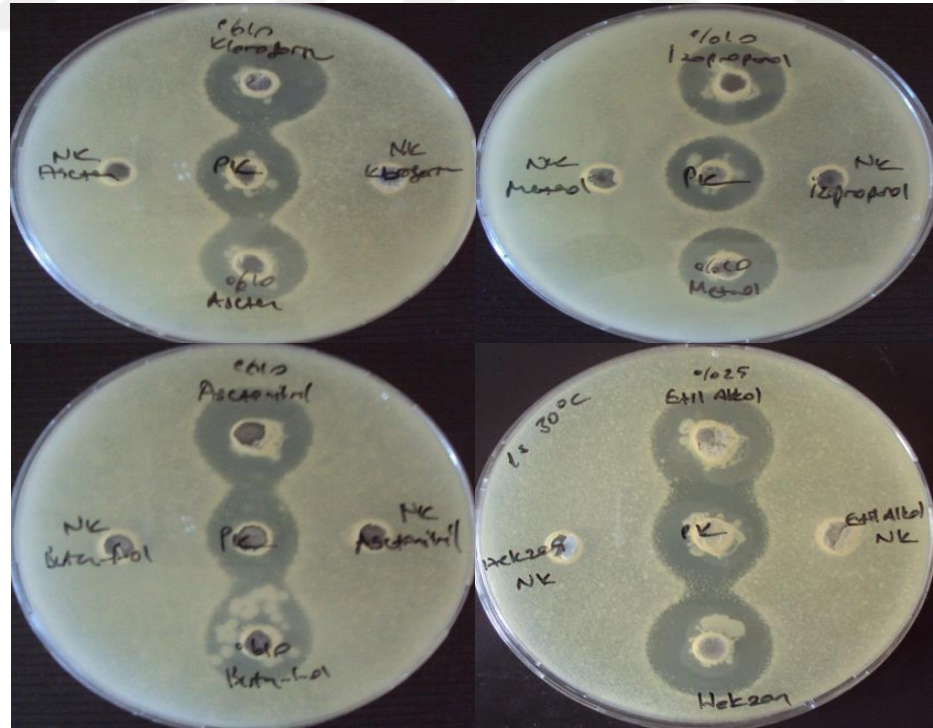
Şekil 3.10 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosine pH'nın etkisi (24 s +4 °C)

3.5. Bazı Organik Çözücülerin Aktimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkisi

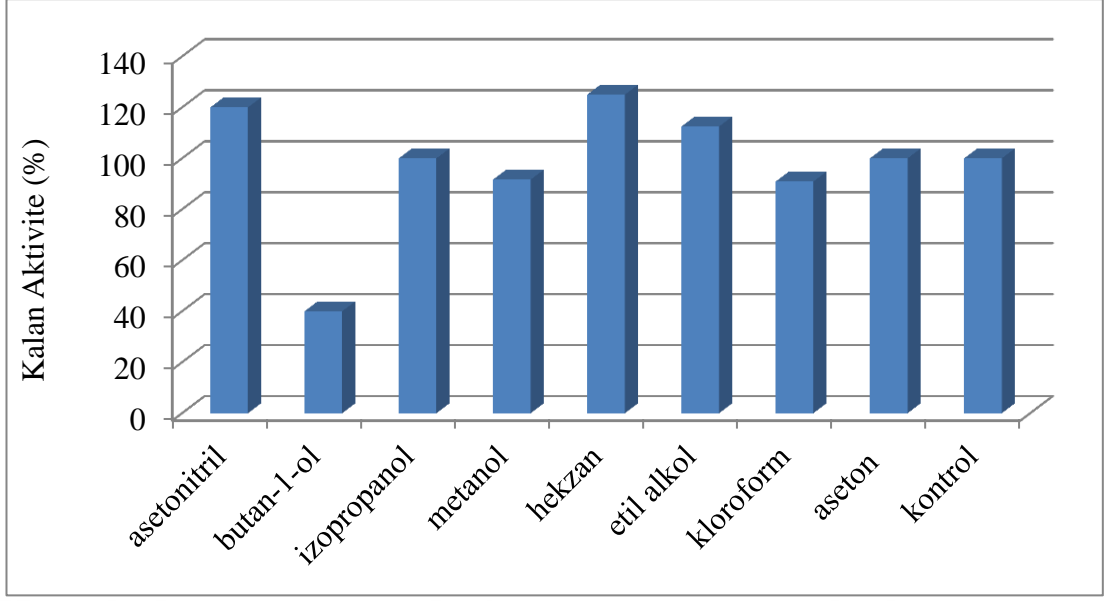
Bu çalışmada süpernatant, % 10 oranında asetonitril, izopropanol, kloroform, aseton, butan-1-ol, metanol, % 25 oranında etil alkol ve % 25 oranında hekzan ile 10 °C (Şekil 3.11) ile 30 °C'de (Şekil 3.12) 1 s muamele edilmiş ve bu organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesini genel olarak olumlu etkilediği gözlenmiştir. 1s 10 °C'de, asetonitril aktiviteyi % 20, etil alkol % 12,5, Hekzan % 25 arttırırken, metanol aktiviteyi % 8,3, butan-1-ol % 60, kloroform % 10 azaltmıştır. İzopropanol ve aseton ise aktiviteyi etkilememiştir (Şekil 3.13). 1s 30 °C'de asetonitril ve metanol aktiviteyi % 13, butan-1-ol % 21, izopropanol % 31, kloroform % 33 ve etil alkol % 16 arttırmıştır. Hekzan ve aseton ise aktiviteyi etkilememiştir (Şekil 3.14).



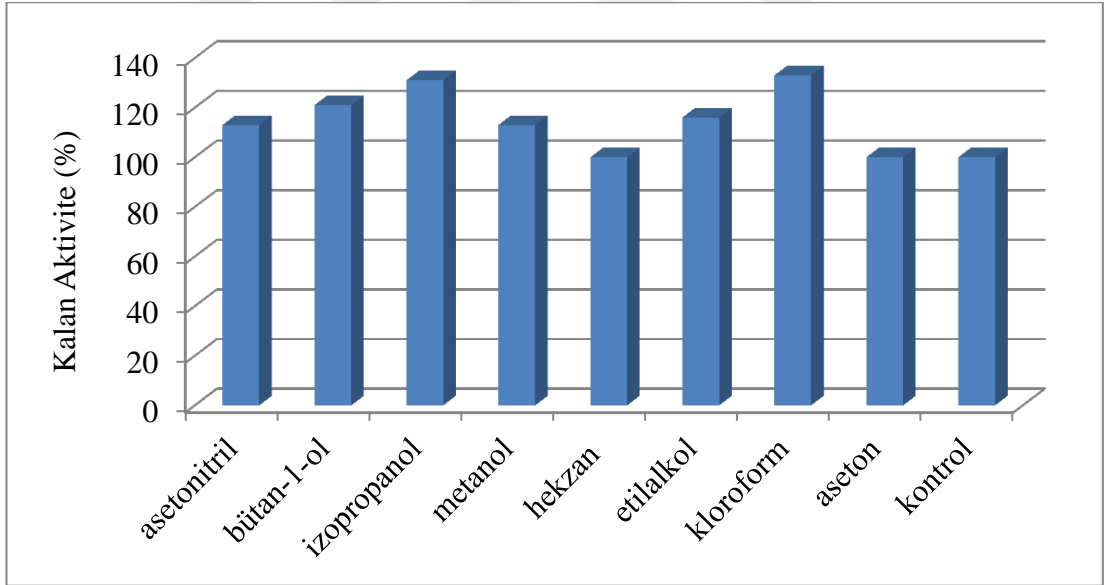
Şekil 3.11 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin petrideki görüntüsü (1s 10°C)



Şekil 3.12 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin petrideki görüntüsü (1s 30 °C)



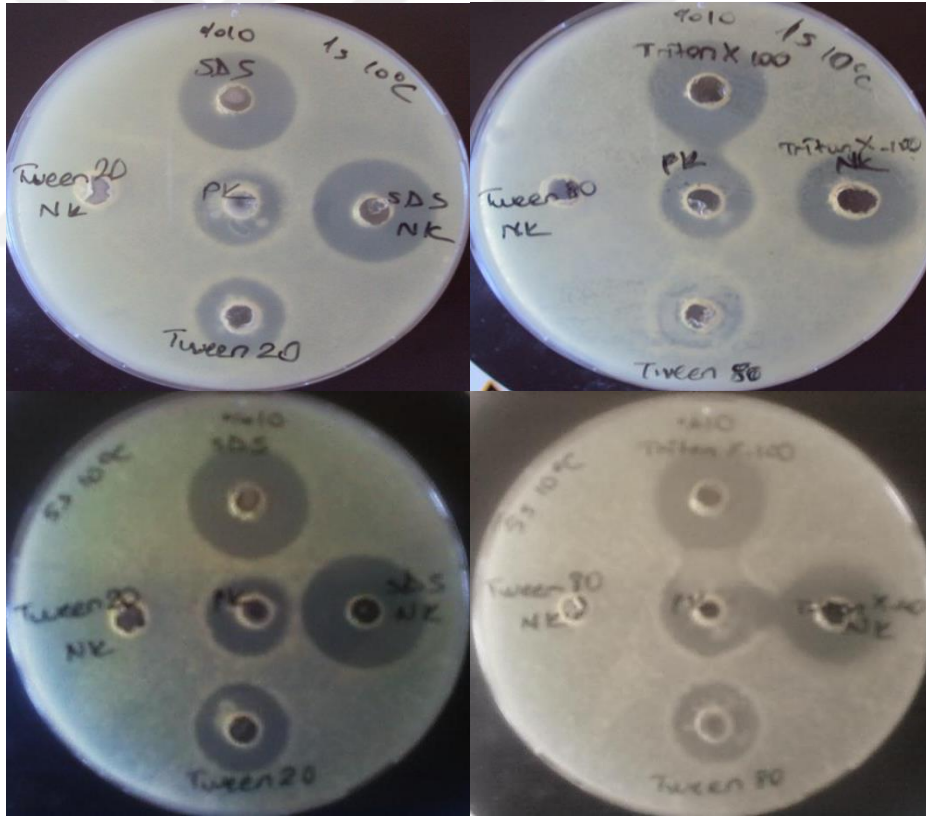
Şekil 3.13 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine organik çözücülerin etkisi (1s 10 °C)



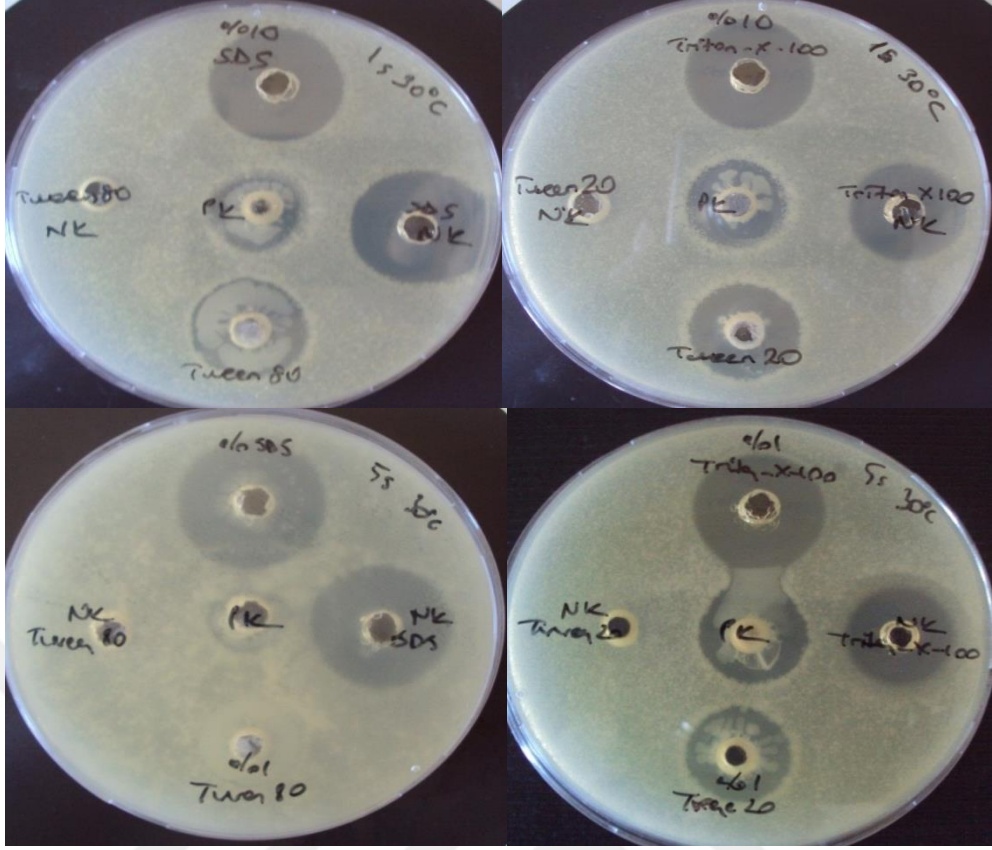
Şekil 3.14 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine organik çözücülerin etkisi (1s 30 °C)

3.6. Bazı Kimyasal ve Deterjanların Bakteriyosin Üzerinde Etkisi

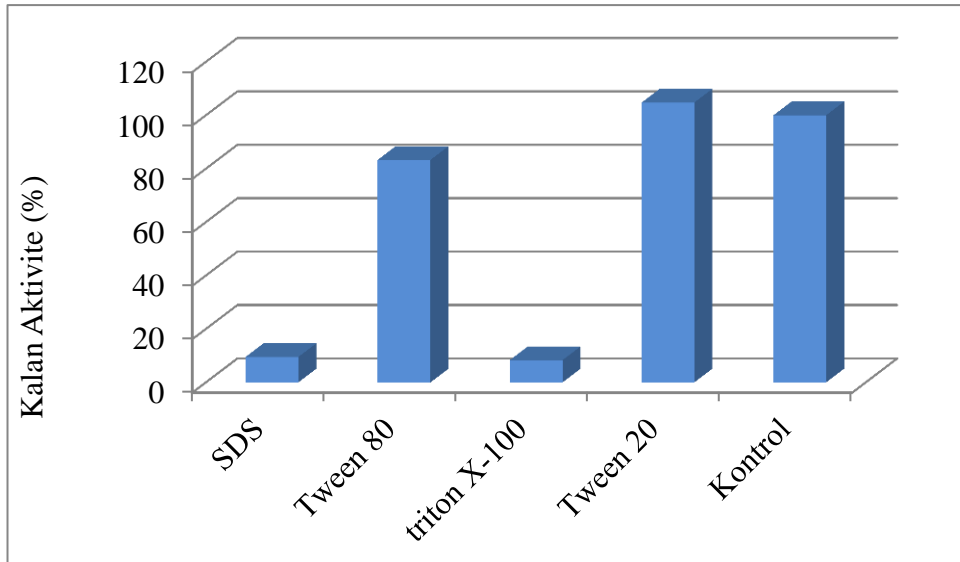
Çalışmada kullanılan Triton X-100, Tween 20, Tween 80, SDS gibi deterjanlarla 1 ve 5s 10 °C'de (Şekil 3.15) ve 1 ve 5s 30 °C'de (Şekil 3.16) yapılan uygulama sonucunda SDS ve Triton X-100'ün aktiviteyi daha fazla etkilediği belirlenmiştir. 1s 10 °C'de Triton X-100 aktiviteyi % 91,7, SDS % 90,4 ve Tween 80 % 16,7 azaltmıştır. Tween 20 ise aktiviteyi % 4,7 artmıştır (Şekil 3.17). 5s 10 °C'de Triton X-100 aktiviteyi % 83,3 ve Tween 80 % 16,6 azaltmıştır. SDS ise % 100 yok etmiştir. Tween 20 ise aktiviteyi etkilememiştir (Şekil 3.18). 1s 30 °C'de Triton X-100 aktiviteyi % 75 azaltırken, SDS % 100 yok etmiştir. Tween 20 ve Tween 80'de ise aktivite % 16 artmıştır (Şekil 3.19). 5s 30 °C'de Triton X-100 aktiviteyi % 80 azaltırken, SDS % 100 yok etmiştir. Tween 20'de aktivite % 40, Tween 80'de ise % 25 artmıştır (Şekil 3.20).



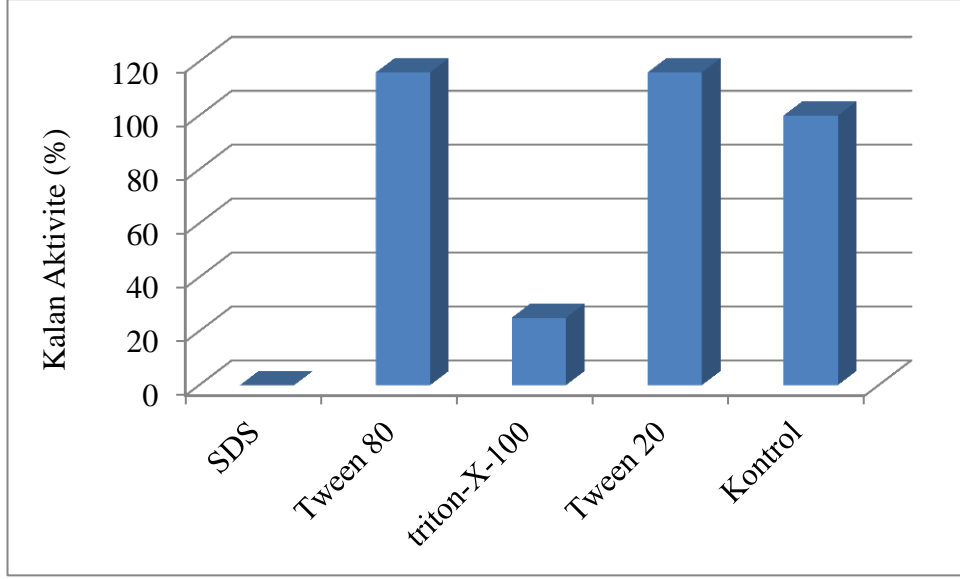
Şekil 3.15 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine bazı deterjanların etkisinin petrideki görüntüsü (1s ve 5s 10 °C)



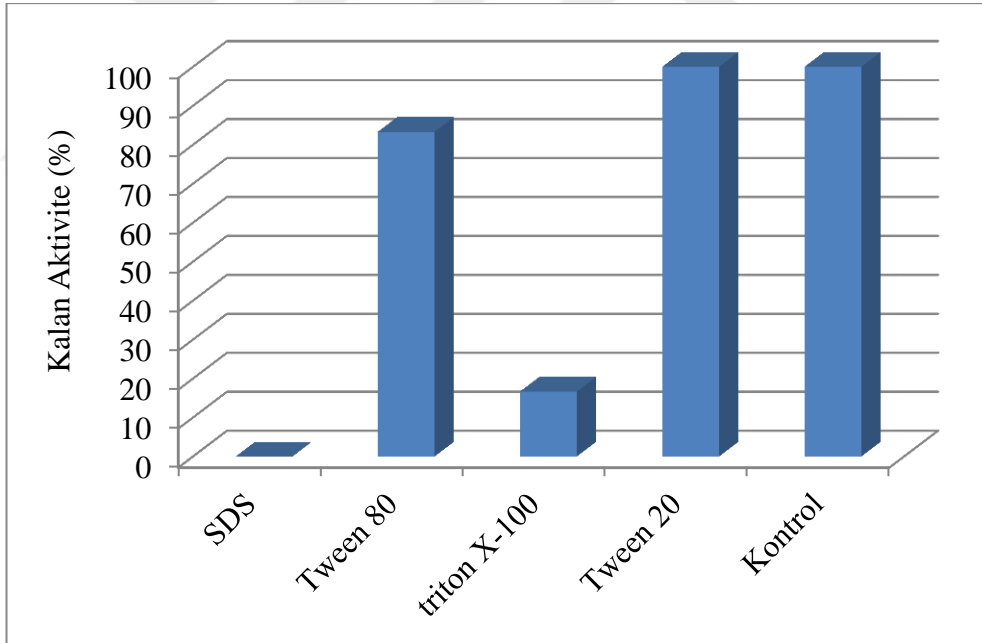
Şekil 3.16 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine bazı deterjanların etkisinin petrideki görüntüsü (1s ve 5s 30 °C)



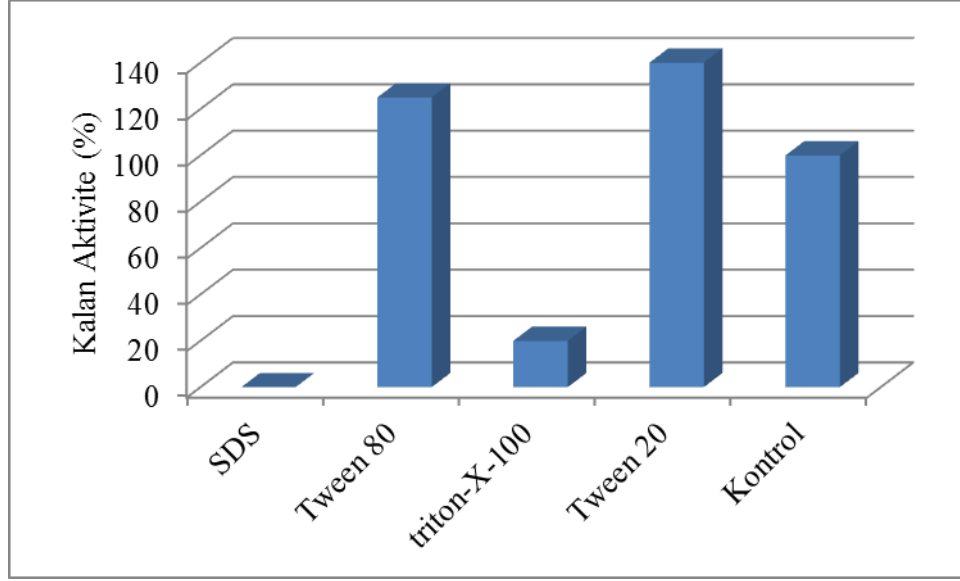
Şekil 3.17 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine bazı deterjanların etkisi (1s 10 °C)



Şekil 3.18 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine bazı deterjanların etkisi (1s 30 °C)

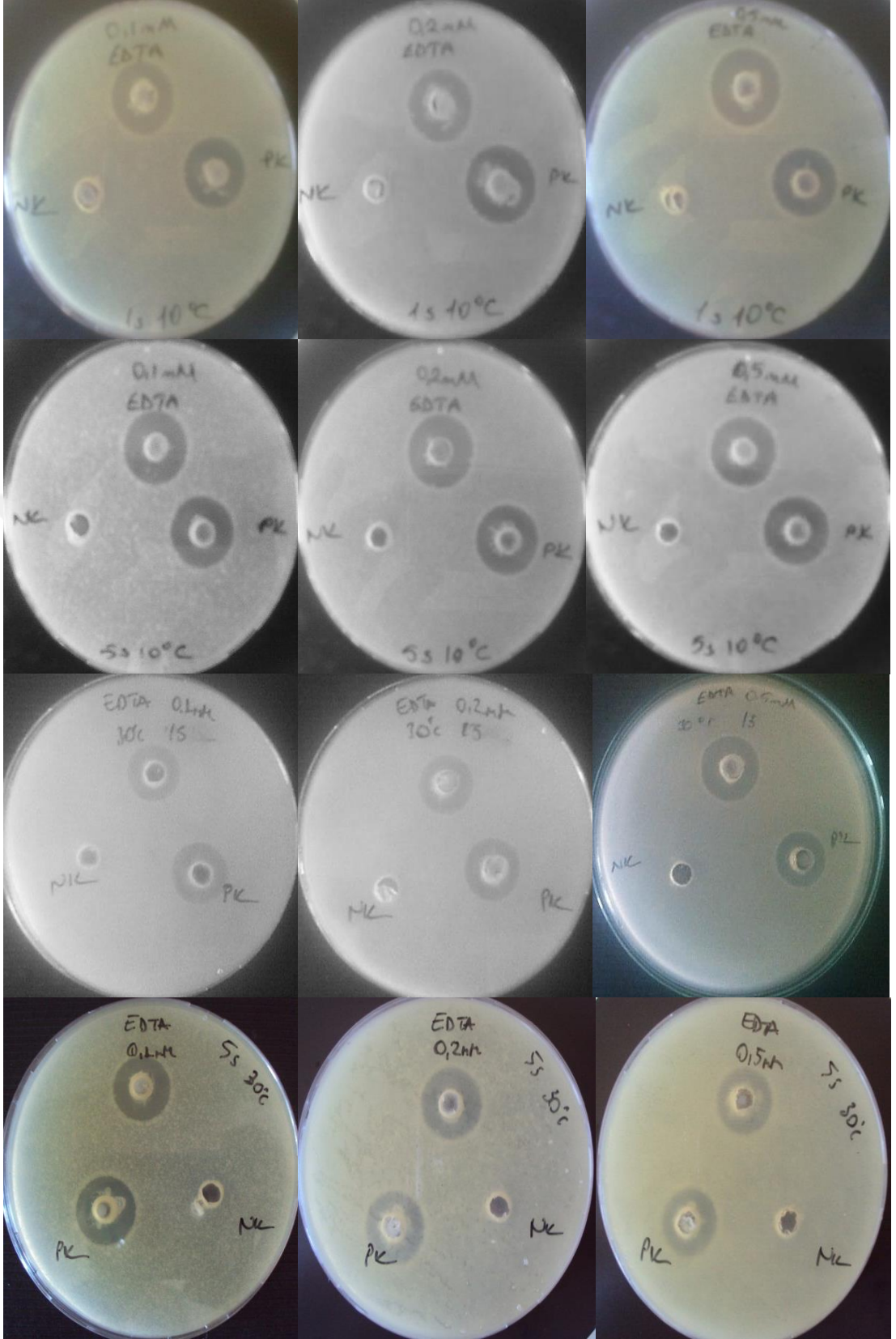


Şekil 3.19 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine deterjanların etkisi (5s 10 °C)



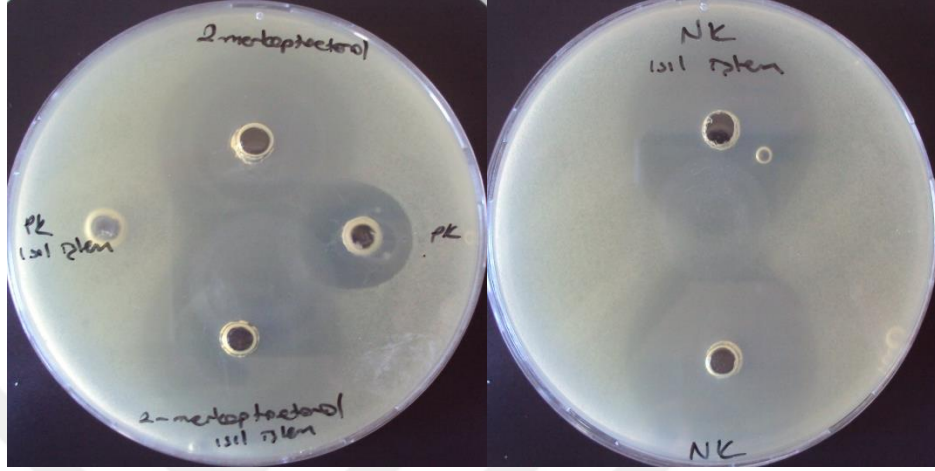
Şekil 3.20 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine deterjanların etkisi (5s 30 °C)

EDTA son konsantrasyon 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, olacak şekilde süpernatanta eklenerek 1s ile 5s, 10°C ve 30°C'de (Şekil 3.21) inkübe edilerek aktiviteye bakıldı. EDTA'nın süpernatant aktivitesini çok fazla etkilemediği belirlenmiştir. 1s 10 °C'de son konsantrasyonu 0,1 mM olan kültürde aktiviteyi % 4, 0,2 mM kültürde % 8, 0,5 mM kültürde % 16 arttırmıştır. 5s 10 °C'de 0,1 mM olan kültürde aktiviteyi % 8 azaltmış, 0,2 mM kültürde % 12 arttırmış, 0,5 mM kültürde ise etkilememiştir. 1s 30 °C'de 0,1 mM olan kültürde aktiviteyi % 10, 0,2 mM kültürde % 22, 0,5 mM kültürde % 27 arttırmıştır. 5s 30 °C'de 0,1 ve 0,5 mM olan kültürde aktiviteyi etkilemezken, 0,2 mM kültürde % 9 arttırmıştır.



Şekil 3.21 EDTA'nın *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosin üzerine etkisi

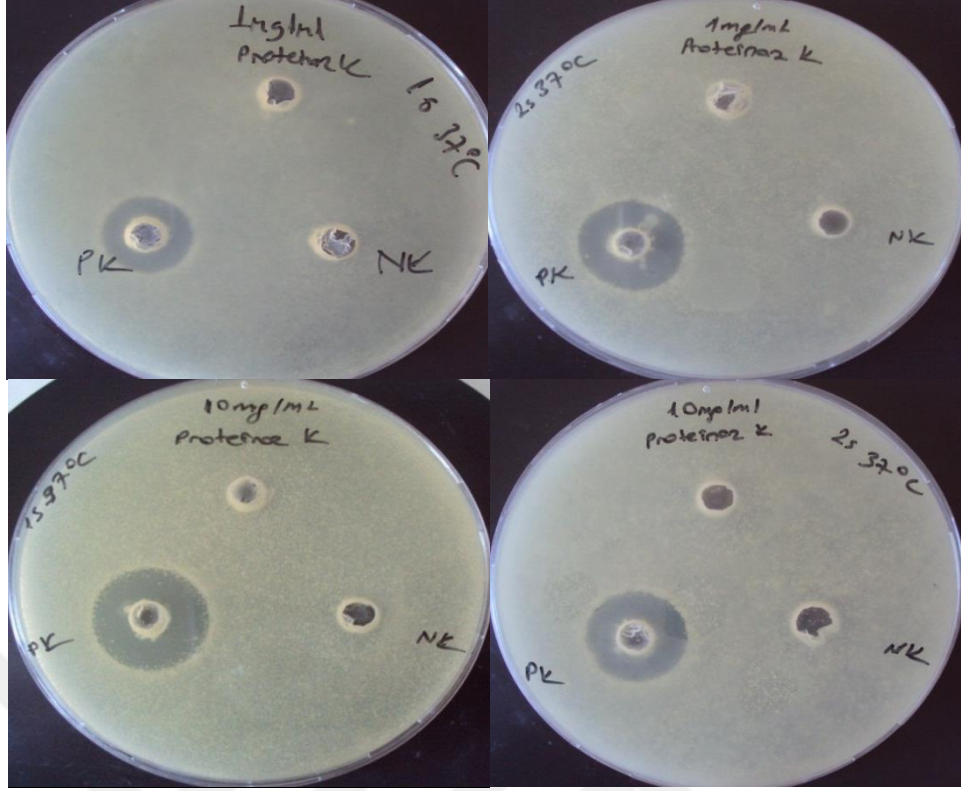
İki-merkaptoetanol %10 olacak şekilde süpernatant ile karıştırıldıktan sonra 90 °C'de 5 dk inkübe edildi. Kuyucuklara 100 µL inoküle edilerek antibakteriyal aktiviteye bakıldı ve iki-merkaptoetanolün aktiviteyi %100 yok ettiği gözlemlendi (Şekil 3.22).



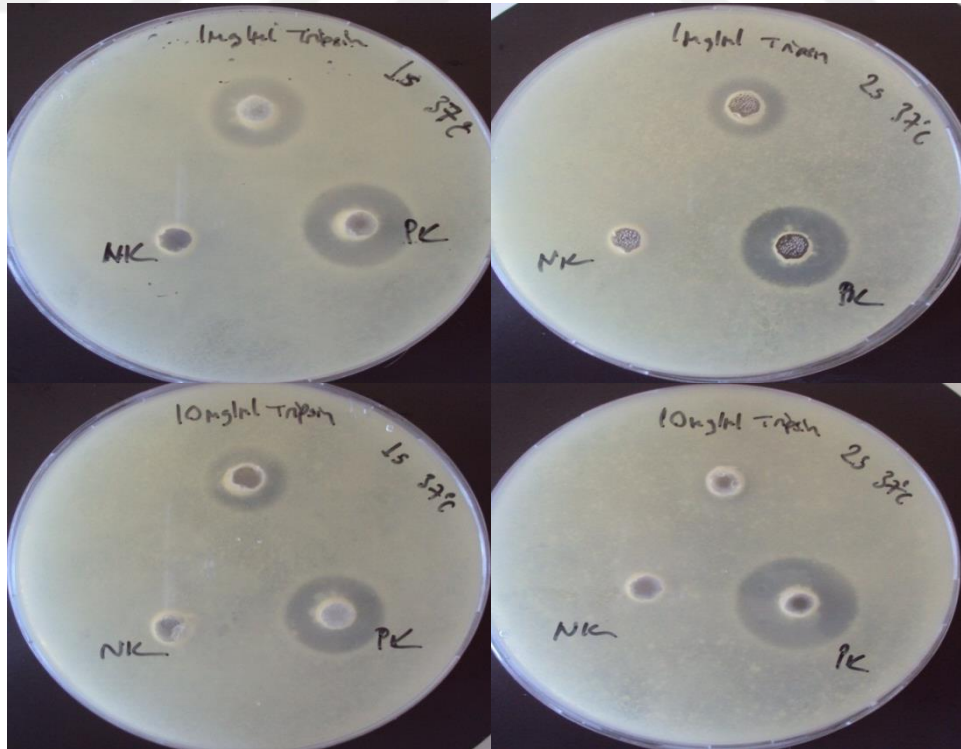
Şekil 3.22 İki-merkaptoetanolün bakteriyosin aktivitesine etkisinin petrideki görüntüsü

3.7. Proteolitik Enzimlerin Bakteriyosin Üzerine Etkisi

Çalışmada proteinaz K ve tripsin enzimleri son konsantrasyon 1 mg/ml ile 10 mg/ml olacak şekilde süpernatant üzerine eklenerek 1s ve 2s, 37 °C'de inkübe edildi. Kuyucuklara 100 µL inoküle edilerek aktiviteye bakıldı. Proteinaz K muamelesi sonucunda aktivitenin % 100 kaybolduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.23). 1s 37 °C'de, 1 mg/ml tripsin muamelesi sonucunda aktivite % 23, 10 mg/ml'de ise % 25 azalmıştır. 2s 37 °C'de 1 mg/ml tripsin muamelesi sonrasında aktivite % 53,5, 10 mg/ml'de ise % 76,4 azalmıştır (Şekil 3.24).



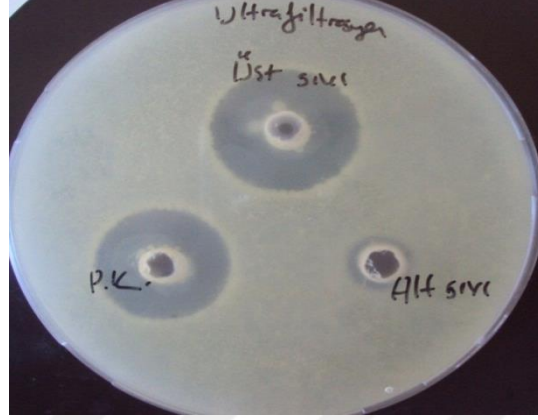
Şekil 3.23 Proteinaz K enziminin bakteriyosin aktivitesine etkisinin görüntüsü



Şekil 3.24 Tripsin enziminin bakteriyosin aktivitesine etkisinin görüntüsü

3.8. Ultrafiltrasyon

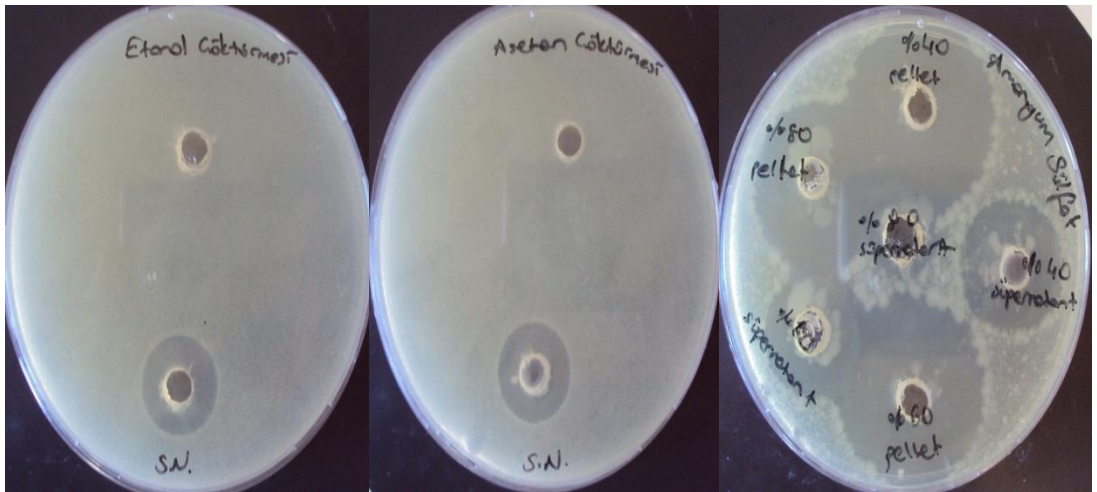
Bacillus sp. T69'dan elde edilen süpernatantın ultrafiltrasyon sonucu elde edilen üst ve alt faz kuyucuklara 100 µL inoküle edilerek aktivitesine bakıldı. Üst fazda aktivite % 12 artarken alt fazda % 75 kayba uğramıştır (Şekil 3.25).



Şekil 3.25 Bakteriyosinin ultrafiltrasyon sonucu petrideki görüntüsü

3.9. Bakteriyosinin Saflaştırılması

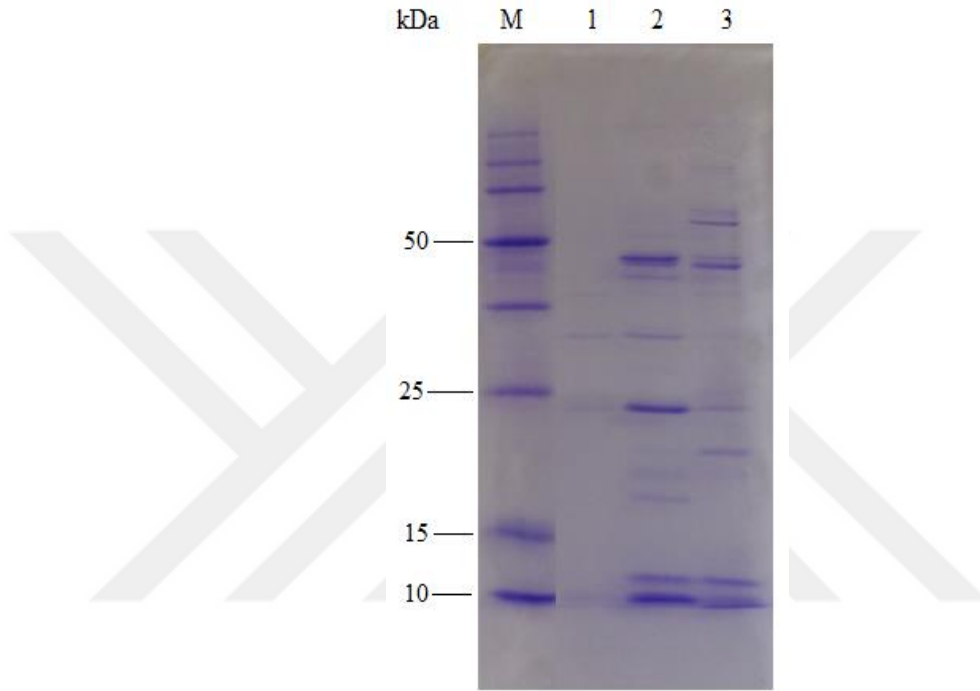
Bacillus sp. T69'dan elde edilen süpernatantın etanol, aseton ve amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Etanol ve aseton çöktürmesinde aktivite gözlenmezken amonyum sülfat çöktürmesinde aktivite gözlemlenmiştir (Şekil 3.26).



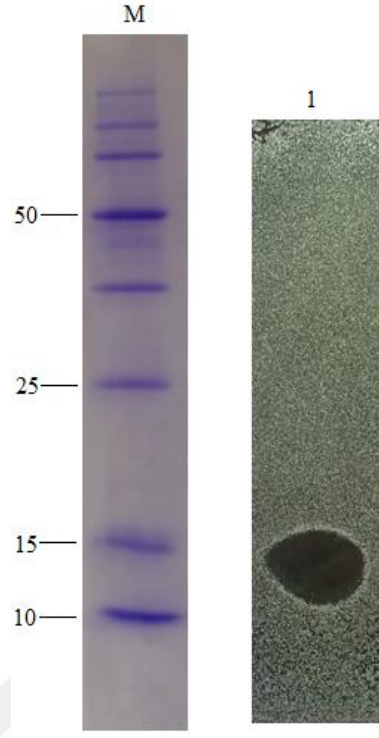
Şekil 3.26 Etanol, aseton ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucu aktivitenin petri görüntüsü

3.10. SDS-PAGE ve Aktivite

Amonyum sülfat çöktürmelerinin SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 3.27). Aktivite çalışmasında en iyi aktivite gösteren %40'lık amonyum sülfat çöktürmesi kullanılmıştır. Şekil 3.28'de görüldüğü gibi aktivite bandı yaklaşık 15 kDa olarak bulunmuştur.



Şekil 3.27 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosinin SDS-PAGE görüntüsü. M: Marker, 1: %40 amonyum sülfat çöktürmesi, 2: %60 amonyum sülfat çöktürmesi, 3: %80 amonyum sülfat çöktürmesi



Şekil 3.28 *Bacillus* sp. T69'dan elde edilen bakteriyosinin zymogram görüntüsü. M: Marker, 1: %40 amonyum sülfat çöktürmesi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen protein yapılı moleküllerdir. Birçok probleme neden olan patojenler üzerindeki inhibisyon etkisi ve gün geçtikçe artan çoklu antibiyotik dirençli patojenlerle yapılacak mücadelede bakteriyosin çalışmaları büyük önem kazanmıştır.

Bu çalışmada da *Bacillus* sp. T69 bakterisinden izole edilen bakteriyosinin, sentezi üzerine bazı koşulların etkisi ve *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* HD521 üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı.

Bacillus sp. T69 bakterisinden izole edilen bakteriyosin üretiminin 24'üncü saatte maksimum düzeye ulaştığı ve 120. saate kadar devam ettiği belirlenmiştir. Balıktan izole edilen LAB (laktik asit bakterileri) izolatlarıyla yapılan bir çalışmada bakteriyosin üretimi artışının 72. saate kadar devam ettiği bildirilmiştir (Campos ve ark., 2008). İnkübasyon süresinin uzamasıyla bakteriyosin aktivitesinin düştüğü belirlenmiş ve bunun bakterilerin ortama salgıladığı ekstrasellüler proteolitik enzimlerden kaynaklandığı tahmin edilmiştir (Bhunja ve ark., 1988). Cherif ve arkadaşları (2008)'nin yaptığı bir çalışmada *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* tarafından sentezlenen bakteriyosinin bakterinin logaritmik gelişme fazının başında sentezlenmeye başladığı, durağan fazın başlarında maksimum seviyeye ulaştığı ve 50 saat boyunca sabit kaldığı gösterilmiştir (Kamoun ve ark., 2005). Yine Tochicin (Paik ve ark., 1997), Thuricin (Favret ve Yousten, 1989), ve Cerein (Naclerio ve ark., 1993) gibi bakteriyosinlerinde logaritmik fazın başında üreilmeye başladıkları durağan faz esnasında ise azaldıkları belirlenmiştir. Cherif ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan bir diğer çalışmada da *Bacillus thuringiensis* BMG1.7 tarafından sentezlenen bakteriyosinin, logaritmik gelişim fazının başlarında sentezlenmediği fakat bu fazın ortalarında sentezin başladığı ve durağan fazın ortalarında maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Elde ettikleri bu sonuç ile *Bacillus cereus* (Bc7) tarafından üretilen Cerein 7 (Oscariz ve ark., 1999) bakteriyosininin üretilme kinetiği birebir uyuşmaktadır. Bakteriyosin üretimi için inkübasyon süresi bakterilerde farklılık göstermektedir.

Bacillus sp. T69 tarafından sentezlenen bakteriyosin aktivitesinin tespiti için *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* HD521 indikatör olarak kullanıldığında, 100 µL süpernatant eklenen besiyortamında 16 mm çapında aktivasyon zonu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, *Bacillus thuringiensis* NEB17 bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyosinin etki tarzının belirlenmesi amacıyla indikatör bakteri olarak *B. cereus* kullanıldığında, 100 µL bakteriyosin eklenmiş kültürde değişiklik gözlenmezken, 300 ve 600 µL bakteriyosin eklenen kültürde 24 saat sonunda aktivite gözlenmiştir (Gray ve ark., 2006). *Bacillus* sp. T69 bakterisinin sentezlediği bakteriyosinin üretildiği inokülüm miktarının bu çalışmanın aksine daha düşük olduğu bulunmuştur.

Bacillus sp. T69 bakterisinin sentezlediği bakteriyosinin, *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* HD521 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivite en iyi LB sıvı besiyerinde gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* tarafından sentezlenen bakteriyosin aktivitesinin Triptic Soy Broth (TSB), Luria Bertani Broth (LBB), Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Nutrient Broth (NB), T3 besiyortamları kıyaslandığında TSB ve LBB ortamlarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Cherif ve ark., 2008). Literatürdeki bu çalışma ile *Bacillus* sp. T69 bakterisinin en iyi aktivite gösterdiği besiyeri benzerlik göstermektedir.

Gram (+) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğu bir veya daha fazla proteolitik enzime karşı duyarlı, ısı işleme, geniş pH aralığına, özellikle asidik pH değerlerine, organik çözücülere ve deterjanlara karşı dayanıklıdır (Ray, 1992). Çalışmada süpernatantın sıcaklık uygulaması sonrasında 10 °C'de 30 dk inkübasyonda maksimum aktivite gösterdiği, 10-40 °C arasında 30 dk inkübasyonda aktivitenin devam ettiği belirlenmiştir. 50-60 °C arasında yine 30 dk inkübasyondan sonra aktivitede düşüş olduğu ve 60°C üzerindeki sıcaklıklarda aktivitenin tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir. *Bacillus* cinslerinin çoğu termofiliktir. *Bacillus coagulans* ve *Bacillus stearothermophilus* vb. bakteriler sıcağa dayanıklı sporlarından dolayı konserve endüstrisinde önemli bir yere sahiptirler (Özşahin, 2006). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BUPM4) tarafından üretilen Bacthuricin F4'ün 40, 50, 60 ve 70 °C'de 30 dk inkübasyonda aktivitesini koruduğu 90 °C'de 30 dk inkübasyondan sonra ise aktivitesinin % 80'ini kaybettiği bulunmuştur (Kamoun ve ark., 2005). *Bacillus thuringiensis* (NEB17)'nin

sentezlediği Thuricin 17'nin 45, 50 ve 80 °C'de 30 dk ve 100 °C'de 15 dk inkübasyon sonunda aktivitesini koruduğu, 121 °C'de ise aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir (Gray ve ark., 2006). *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* (HD198) tarafından sentezlenen Thuricin S'nin, 10 dk kaynatıldığında aktivitesini koruduğu 121 °C'de ise aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir (Chehimi ve ark., 2007). *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110 bakterisinin sentezlediği Entomocin 110, 20 dk otoklavlandığında dahi aktivitesinin %53'ünü korumuştur (Cherif ve ark., 2008). *Bacillus* sp. T69 bakterisinin sentezlediği bakteriyosinin, diğer literatür çalışmalarındaki bakteriyosinlerin aksine ısıya duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus sp. T69 bakterisinin sentezlediği bakteriyosinin 10 °C'de en iyi aktiviteyi pH 6'da, 30 °C'de pH 10'da , +4 °C'de ise pH 6, pH 9 ve pH 10'da gösterdiği belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesinin çoğunlukla, asidik ortamlar ile pH değeri 9 ve üzerine çıktığında büyük oranda düştüğü veya tamamen kaybolduğu görülmüştür (Lisboa ve ark., 2006; Naclerio ve ark., 1993; Bizani ve Bradelli, 2005). Nisin'le yapılan bir çalışmada pH 3'de aktivite gözlenmezken pH 6,5'da en yüksek seviyede aktivite görülmüştür. Aynı şekilde sakasin A'yla yapılan çalışmada pH 5,5'ta en yüksek seviyede aktivite gözlenirken pH 2'de %75'e kadar düşmüştür (Yang ve ark., 1994). Bakteriyosinlerin optimal pH koşulları dışında aktiviteleri düşmekle birlikte etkileri sürmektedir (Yang ve ark., 1992). Yapılan bir çalışmada *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BUPM4) tarafından sentezlenen Bacthuricin F4'ün, pH 3-7 aralığında kararlılığını koruduğu, pH 8 ve 9'da ise aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir (Kamoun ve ark., 2005). *Bacillus thuringiensis* (NEB17)'nin sentezlediği Thuricin 17, pH 1,5-8 aralığında kararlılığını korumuş, pH 1 ve 9,25'de aktivite kaybına uğramıştır (Gray ve ark., 2006). *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* (HD198) tarafından sentezlenen Thuricin S'nin, pH 3-10,5 arasında stabilitesini koruduğu belirtilmiştir (Chehimi ve ark., 2007). *Bacillus* sp. T69 bakterisinin sentezlediği bakteriyosinin en iyi aktivite gösterdiği pH aralıklarının literatürdeki diğer çalışmalar ile benzer sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir.

Bacillus sp. T69'un sentezlediği bakteriyosinin süpernatantı asetonitril, kloroform, etil alkol, aseton, hekzan, metanol, butan-1-ol, izopropanol gibi organik çözücülerle muamele edildiğinde aktiviteyi genellikle çok az etkiledikleri ya da hiç

etkilemedikleri görülmüştür. 1s 10°C’de organik çözücü uygulamasında asetonitril aktiviteyi % 20, etil alkol % 12,5, hekzan % 25 arttırmıştır. Kloroform aktiviteyi % 9,1 azaltırken, metanol % 8,3 ve butan-1-ol % 60 azaltmıştır. Aseton ve izopropanol ise aktiviteyi etkilememiştir. 1s 30 °C’de organik çözücü uygulamasında asetonitril ve metanol aktiviteyi % 13, butan-1-ol % 21, izopropanol % 31, kloroform % 33 ve etil alkol % 16 arttırmıştır. Aseton ve hekzan ise aktiviteyi etkilememiştir. Organik çözücü uygulamasında, aktivitenin yüksek oranda korunması inhibitör aktivitesinden sorumlu bölgede lipid veya karbonhidrat türevli bileşiklerin olmadığı anlamına gelmektedir (Dündar, 2006). Dolayısıyla bu çalışmada da aktiviteden sorumlu bölgede lipid veya karbonhidrat türevli bileşiklerin olmadığı düşünülmektedir. Birçok araştırmacı LAB’leri tarafından üretilen çoğu bakteriyosinin organik çözücülere karşı dayanıklı olduğu bulunmuştur (Ray, 1992; Yıldırım ve Johnson, 1998; Lee ve Paik, 2001; Pirzada ve ark., 2000, Asutay, 2007). Pirzada ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada bakteriyosinin, %1 konsantrasyona sahip organik çözücülerden propanola karşı aktivitesini koruduğu, aseton, metanol, heptan ve kloroformdan etkilenecek aktivitesini kaybettiği bulunmuştur. Organik çözücülerin *Bacillus* sp. T69’un sentezlediği bakteriyosin üzerindeki etkisi literatür çalışmaları ile benzer sonuçlar vermiştir.

Çalışmada kullanılan Triton X-100, Tween 20, Tween 80, SDS gibi deterjanlar ile *Bacillus* sp. T69’un sentezlediği bakteriyosin süpernatantı üzerine yapılan uygulama sonucunda SDS ve Triton X-100’ün aktiviteyi Tween 20 ve Tween 80’den daha fazla etkilediği belirlenmiştir. Triton X-100 aktiviteyi % 75-91,7 arasında azaltmıştır. Özellikle SDS uygulamasında %100 aktivite kaybının görülmesi bakteriyosinin protein yapısının bozulduğu düşüncesini akla getirmektedir. Bu çalışmada iki-merkaptolanolünde aktiviteyi % 100 yok ettirdiği görülmüştür. EDTA’nın ise aktiviteyi düşük oranlarda etkilediği tespit edilmiştir. EDTA aktiviteyi en fazla 1s 30°C’de etkileyip son konsantrasyonu 0,1 mM olan kültürde % 10, 0,2 mM kültürde % 22 ve 0,5 mM kültürde % 27 arttırmıştır. Bir literatür çalışmasında üretilen bakteriyosinin bazı deterjanlar ile muamelesi sonucu aktivitelerindeki değişiklikler belirlenmiştir. SDS, tween 80, triton X-100 uygulamasından sonra aktivitede kayıp olsa da etki devam etmiştir. Ancak EDTA ve üre ile inkübe edilen bakteriyosin aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Rajaram ve ark., 2010). Buna yakın

sonuçlar Ivanova ve arkadaşları (2000) tarafından da gözlenmiştir. Deterjanların bakteriyosin aktivitesine etkisi, aktif molekül yapısı hakkında bilgi vermektedir. Deterjanlar, proteinlerin doğal yapısındaki hidrofobik merkezle kompleks oluşturarak proteinin açılmasına ve üç boyutlu yapının bozulmasına sebep olmaktadır. Deterjan uygulamasından sonra aktivitede düşüş olması, bakteriyosinin kısmi denatürasyonu ya da aktiviteye stabilizasyon etkisi olan diğer moleküllerle birlikteliğinin bozulmasından kaynaklanmaktadır (Ivanova, 1998). EDTA, bakteriyosin aktivitesinde rol alan divalent katyonlarla kompleks oluşturarak aktiviteyi olumsuz etkileyebileceği gibi, hücre membranına zarar vererek bakteriyosinin antimikrobiyal etki göstermesini kolaylaştırabilmektedir (Ganzle ve ark., 1999). İki-merkaptolan bakteriyosinin yapısında bulunan ve aktivitede rol alan olası disülfid bağlarını kırarak, aktivitenin azalmasına ya da yok olmasına sebep olmaktadır (Hammes ve ark., 1999). *Bacillus* sp. T69'un sentezlediği bakteriyosin üzerine deterjan, EDTA ve iki-merkaptolan uygulaması yapılmış literatür çalışmaları ile benzer sonuçlar alınmıştır.

Bacillus sp. T69 bakterisinin ürettiği bakteriyosin üzerine tripsin ve proteinaz K uygulaması sonucunda aktivitedeki değişikliklere bakıldığında proteinaz K antimikrobiyal aktiviteyi tamamen yok etmiştir. Tripsin uygulaması sonrasında ise aktivitede % 23'lerden % 76'lara varan azalmalar olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçta bu çalışmada elde edilen antimikrobiyal maddenin protein yapıda olduğu kesinleşmiştir. Protein yapısındaki bakteriyosinlerin, proteolitik enzim muamelesi sonrasında, antimikrobiyal aktivitelerini stabil tutamadıkları ve kaybettikleri tespit edilmiştir (Ogunbanwo ve ark., 2003). Enterosinlerin proteolitik enzimlerden bir veya birden fazlasına duyarlı olduğu çoğu araştırmacı tarafından belirlenmiştir (Herranz ve ark., 2001). Tuncer ve arkadaşları (2008)'nın yaptığı çalışmada *L. lactis* suşu tarafından sentezlenen bakteriyosinin proteinaz K uygulaması ile tamamen, kimotripsin ve amilaz uygulaması ile kısmen aktivite kaybına uğradığı belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinde tanımlanan bütün bakteriyosinlerin, proteolitik enzim uygulamasından sonra aktivitelerini tamamen ya da büyük ölçüde kaybettikleri belirlenmiştir. Karbonhidrat veya lipit yan grupları içermelerine rağmen, bakteriyosinlerin hepsinde antimikrobiyal aktivite protein yapıdan kaynaklanmaktadır (Dobrzanski ve ark., 1982; Van Belkum ve ark., 1989; Jimenez-

Diaz ve ark., 1990; Piard ve ark., 1990; Dieye ve ark., 2001). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BUPM4) tarafından üretilen Bacthuricin F4, proteinaz K muamelesi sonrasında aktivitesini kaybetmiştir (Kamoun ve ark., 2005). *Bacillus thuringiensis* (NEB17)'nin sentezlediği Thuricin 17, proteinaz K uygulaması sonucu aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Gray ve ark., 2006). *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* (HD198) tarafından sentezlenen Thuricin S'nin, proteinaz K uygulaması sonucu tüm aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir (Chehimi ve ark., 2007). Aktivasyon zonu görülen bakterilerde oluşan inhibisyon, sentezlenen organik asitlerden, alkollerden ve hidrojen peroksitten de kaynaklanabilmektedir (Yıldırım, 2001). Bunlar arasında özellikle hidrojen peroksit mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkiye sahip olabilmekte; fakat agarlı besiyeri üzerinde, sıvı besiyeri süpernatantı kullanıldığında etkisi sınırlı kalmaktadır. Bakteriyosin benzeri inhibisyon etkisi gösterebilen bu tip organik bileşikler, pH değişimi ve proteaz uygulamasından etkilenmemektedir (Klaenhammer, 1988). Literatür çalışmaları ile karşılaştırıldığında *Bacillus* sp. T69'un sentezlediği bakteriyosinin proteolitik enzimlerden benzer şekilde etkilendiği belirlenmiştir.

Bacillus sp. T69 bakterisinin 24s inkübasyonu sonrasında elde edilen süpernatantın % 40, % 60 ve % 80 doyumlukta amonyum sülfat ile çöktürmesinde en iyi aktivite % 40 doyumlukta elde edilmiş ve 1/16 seyreltiğe kadar aktivite görülmüştür. Literatürdeki çalışmalarda saflaştırma aşamalarında farklılıklar görülmektedir. Thuricin 439 eldesi için yapılan amonyum sülfat çöktürmesinde, Thuricin 439, en iyi % 80 doyumlukta elde edilirken (Ahern ve ark., 2003), Thuricin H en iyi % 65 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilmiştir (Lee ve ark., 2009).

Yapılan çalışmada *Bacillus* sp. T69 tarafından sentezlenen bakteriyosinin moleküler ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE analiz sonucunda bakteriyosinin molekül ağırlığının yaklaşık 15 kDa olduğu tespit edilmiştir. Kısmi saflaştırılmış moleküllerin SDS-PAGE çalışması ve hemen sonrasında aktivite çalışması yapılarak aktif bandın yeri ve tahmini büyüklüğü marker kullanılarak belirlenmiştir. Sodyum dodesil sülfatın (SDS) bulunduğu poliakrilamid jeldeki elektroforez protein alt birimlerini ayırmada yararlı olan bir araçtır. Bakteriyosin üretiminden sorumlu bantların moleküler ağırlıklarının tespit edilmesi SDS-PAGE sonucunda

sağlanmaktadır. Entomocin 9 (Cherif ve ark., 2003), Thuricin 7 (Cherif ve ark., 2001) ve Tohicin (Paik ve ark., 1997) gibi bakteriyosinlerin molekül büyüklükleri yalnızca SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Gram (-), Gram (+) ve bazı funguslara karşı etkili olan *B. thuringiensis*'in sentezlediği entomocidus HD9'un moleküler ağırlığı 12,4 kDa olarak bulunmuştur (Cherif ve ark., 2003). *Bacillus subtilis* 14B suşundan izole edilen proteinin büyüklüğü ise 21 kDa olarak tespit edilmiştir (Hammami ve ark., 2009). Ticari bir probiyotik suş olan *Bacillus polyfermenticus*'dan elde edilen Polyfermenticin SCD'nin SDS-PAGE çalışması sonucu moleküler ağırlığı yaklaşık 14,3 kDa olduğu rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2001). Gıda ve topraktan izole edilebilen *Bacillus* suşlarının iyi birer bakteriyosin üreticisi oldukları bilinmektedir. *Bacillus cereus* tarafından üretilen Cerein 8A (26 kDa) (Bizani ve ark., 2002), Cerein GN105 (9 kDa) (Naclerio ve ark., 1993), *Bacillus anthracis* tarafından üretilen Heterocycloanthracins (9.62 kDa) (Haft, 2009), *Bacillus subtilis* tarafından üretilen Subtilin (3.34 kDa) (Banerjee ve Hansen, 1988), *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen Licheni (1.4 kDa) (Pattnaik ve ark., 2001), *Bacillus atrophaeus* tarafından üretilen Subtilosin A (3.39 kDa) (Stein ve ark., 2004) gibi bakteriyosin örneklerini arttırmak mümkündür.

Bu bakteriyosinin yapısı konusunda ancak tam saflaştırma ve aminoasit dizi analizleri sonucunda kesin bir bilgi verilebilir. Fakat daha önce yapılan çalışmalar ışığında bu antimikrobiyal maddenin protein yapılı bir bakteriyosin olduğu düşünülmektedir. Kesin bir sonuca varılması için ileri kimyasal tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. NMR (Nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi, X-ray kristalografisi ve elementel analiz gibi çözümlenmelerin yapılması gerekmektedir.

Bacillus cinsi bakterilerin peptit, lipopeptit, antibiyotik ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal maddelerin üretiminde çok iyi oldukları bilinmektedir (Stein, 2005). Özellikle laktik asik bakterilerinden sonra en iyi bakteriyosin ve BLIS üreticileri olduğu bilinen, *Bacillus* cinslerinin hemen her türü tarafından üretilen bakteriyosin ya da benzeri moleküllerin eldesi, karakterizasyonu fazlasıyla çalışılmış ve neticede birçok aktif molekül tanımlanmıştır (Abriouel, 2011). *Bacillus* türlerinin bu potansiyelleri 50 yıldan daha uzun bir süredir bilinmekte ve özellikle peptit antibiyotik üretiminin en önde gelen sınıfını temsil etmektedir (Ghanbari ve ark., 2009). *Bacillus* cinsi endüstri ve gıda alanında güvenli kullanım olanağı bulmuş bir

çok tür içermektedir (Paik ve ark., 1997). *Bacillus* cinsi içerisinde LAB gibi endüstri, tarım ve gıda alanında GRAS olarak tescilli önemli türler yer almaktadır. Örneğin Doğu Asya'da fermente besin maddelerinde *B. subtilis* suşları kullanılmaktadır (Hosoi ve Kiuchi, 2003). Yine non-toksinojenik *B. cereus* sp. *toyoi* probiyotik özelliği nedeniyle hayvan gıdalarına ek olarak kullanılmaktadır (Lodemann, 2008). Bunların yanı sıra, günümüzde *Bacillus* türlerinden elde edilen antibiyotikler, enzimler, aminoasitler ve insektisitler gibi birçok ticari ürün bulunmaktadır (Pedersen ve ark., 2002).

Gün geçtikçe antibiyotik direnci artan patojenlerle yaşanan mücadele zorluğu nedeniyle geleneksel kaynaklar dışında yeni antimikrobiyallere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında elde edilen bilgiler doğrultusunda, daha ayrıntılı bir çalışma ile literatüre yeni bir antimikrobiyal madde kazandırılabilir ve daha sonraki zamanlarda biyolojik mücadele, biyokoruma, sağlık vb. alanlarda kullanılması sağlanabilir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarla karşılaştırma yapıldığında bu çalışmada inhibisyon etkisi araştırılan maddenin; protein yapılı bir molekül olduğu, LB besi ortamında ve 24 saat inkübasyon sonunda elde edilen bakteriyosinin en yüksek aktiviteyi 10°C'de gösterdiği, bu aktivitenin 60°C'ye kadar devam ettiği belirlenmiştir. Aktivitenin 1s 10 °C'de en iyi pH 6'da, 1s 30 °C'de en iyi pH 10'da, 24s +4 °C'de ise pH 6, pH 9 ve pH 10'da aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Aktivitenin proteinaz K, tripsin, SDS ve triton X-100'e duyarlı olduğu, EDTA, iki-merkaptetanol ve organik çözücülerden genel olarak etkilenmediği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- AASEN, I., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L. ve Storro, I. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 265-271.
- ABRÍOUEL, H., Franz, C.M., Ben Omar, N. ve Gálvez, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Reviews* 35: 201-232.
- AHERN, M., Verschueren, S. ve Sinderen, D.V. 2003. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439, *FEMS Microbiology Letters* 220: 127-131.
- ANONYMOUS, 1998. Merck Gıda Mikrobiyolojisi 98, Armoni Matbaacılık Ltd. Sti., Ankara, P.68.
- ASUTAY, D. 2007. Yöresel bir gıdadan izole edilen bakteriyosin üreten bakterinin teşhisi ve bakteriyosinin karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 89 s.
- AYHAN, K. 2000. *Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, pp. 43-44, Sim Matbaacılık Ltd., Ankara.
- AZEVEDO, E.C., Rios, E. M., Fukushima, K. ve Campos-Takaki, G. M. 1993. Bacteriocin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 42: 1-7.
- BANERJEE, S. ve Hansen, J.N. 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 263: 9508-9514.

- BAŞBÜLBÜL, G. ve Bıyık H.H. 2009. Çeşitli Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması, Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Biy-Dr-2009-0001.
- BENNIK, M.M.J., Verheul, A., Abee, T., Naaktgeboren-Stoffels, G., Gorris, L.G.M. ve Smid, E.J. 1997. Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. *Applied and Environmental Microbiology* 63: I.9, 3628-3636.
- BHUNIA, A.K., Johnson, M.C. ve Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology* 65: 261-268.
- BHUNIA, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. ve Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacteria strains. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 25-33.
- BIZANI, D. ve Brandelli A. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 512-519.
- BIZANI D., Dominguez, A.P.M. ve Brandelli A. 2005. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology* 41: 269-273.
- BONWART, G. J. 1981. Basic Food Microbiology. AVI Publishing Company. Westport Connecticut 168-169.
- BONWART, G.J. Basic Food Microbiology, Van Nostrand Reinhold, 773p, New York, 1989.
- BRUNO, M.E.C. ve MONTVILLE, T.J. 1993. Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3003-3010.

- CAMPOS, C.A., Rodriguez, O., Mata, P.C., Prado, M. ve Velazquez, J.B. 2008. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (Psetta Maxima). *Food Research International* 7: 432-441.
- CHEHIMI, S., Delalande, F., Sable, S., Hajlaoui, M.R., Van Dorsselaer, A., Limam, F. ve Pons, A.M. 2007. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, anew anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 284-90.
- CHEN, H. ve Hoover D.G. 2003. Bacteriocins and Their Food Application, Compre. Review Food Science Food Safety, 100 p.
- CHERIF, A., Ouzeri, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S. ve Boudabous, A. 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology* 32: 243-247.
- CHERIF, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., Daffonchio, D. ve Boudabous, A. 2003. Detection and characterization of the nevel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus HD9. *Journal of Applied Microbiology* 95: 990-1000.
- CHERIF, A., Rezgui, W., Raddadi, N., Daffonchio, D. ve Boudabous, A. 2008. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus HD110. *Microbiology Research* 163: 684-692.
- CINTAS, L.M., Casaus, P., Harvarstem, L.S., Hernandez, P.E. ve Nes, I.F. 1997. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel Sec-Dependent Bacteriocin From *Enterococcus faecium* P13 With a Broad Antimicrobial Spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4321-4330.

- CLEVELAND, J., Montville, T.J., Nes, L.F. ve Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1- 20.
- CUESTA, M.C.M., Kok, J., Herranz, E., Plaetz, C., Requena, T. ve Buist, G. 2000. Requirement of autolytic activity for bacteriocin induced lysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3174- 3179.
- DAESCHEL, M.A. 1990. Application of Bacteriocins in Food Systems., in Biotechnology and Food Safety, Shain-Doco, K (Ed), Butterworths, London.
- DEEGAN, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. ve Ross, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extention. *International Dairy Journal* 55: 1058-1071.
- DELVES-BROUGHTON, J., Blackburn, P., Evans, R. J. ve Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193-202.
- DEMAIN, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 455-63.
- DE MARTİNİS, E.C.P., Alves V.F. ve Franco B.D.G.M. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat product. *Food Reviews International* 18: 191-208.
- DEMİR, Y. 2006. Trakya bölgesinde üretilen ekmeklik buğday unlarında rop sporu varlığı ve bazı kalite kriterlerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Tekirdağ.
- DE VUYST, L. ve Vandamme, E.J. 1991. Microbial manipulation of nisin biosynthesis and fermentation. Nisin and novel lantibiotics. ed. Jung, G. and Sahl, H.G., ESCOM Science Publishers, 397-409, Leiden , The Netherland.

- DE VUYST, L. ve Vandamme, E.J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of general microbiology* 138: 571-578.
- DE VUYST, L. 2000. Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures. *Food Technology and Biotechnology* 38: 105-112.
- DE VUYST, L. ve Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13: 194–199.
- DIEYE, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A. ve Piard, J.C. 2001. Design of a protein targeting system for lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* 183: 4157- 4166.
- DIEZ-GONZALEZ, F. 2007. Applications of Bacteriocins in Livestock. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 8: 15-24.
- DİNÇER, E., Kıvanç, M. ve Karaca, H. 2009. Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. *Journal of Food* 35: 55-62.
- DOBRZANSKI, W.T., Bardowski, J., Kozak, W. ve Zajdel, J.K. 1982. Lactostrepcins: Bacteriocins of lactic streptococci. In D. Schlessingerin (ed.) *Microbiology*. American Society for Microbiology, 225-229, Washington DC, s. 420.
- DUAN, K., Harvey, M.L., LIU, C.Q. ve Dunn, N.V. 1996. Identification and characterization of mobilizing plasmid, pND300, in *Lactococcus lactis* M189 and its encoded nişin resistance determinant. *Journal of applied Bacteriology* 81: 493-500.
- DUITMAN, E. H., Hamoen, L., Rembold, M. ve Venema, G. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an aminotransferase and a fatty acid synthase. *Genetics*, 96 (23): 13294-13299.

- DÜNDAR, H. 2006. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu ve saflaştırılması, Doktora Tezi, Biyoteknoloji A.B.D., 195 s.
- EARL, A.M., Losick R. ve Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiology*, 16: 269-275.
- ECKNER, K. F. 1992. Bacteriocins and Food Applications. *Dairy Food Environmental Sanitation* 12: 204-209.
- ELTEM, R. ve Uçar, F. 1988. Bir soda gölü olan Denizli Acıgöl'den izole edilmiş 23 *Bacillus* suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması, KÜKEM Dergisi 21 (1): 57-64.
- ENNAHAR, S., Sonomoto, K. ve Ishizaki, A. 1999. Class Iia Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Antibacterial Activity and Food Preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 705-716.
- ENNAHAR, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. ve Ishizaki, A. 2000. Class Iia bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 85-106.
- FAO/WHO, 2002. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods, Report of a Joint FAO/ WHO Working Group, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1 2002.
- FAVRET, M.E. ve Yousten, A.A. 1989. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53: 206-216.
- GALVIN, M., Hill C. ve Ross R.P. 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Letters in Applied Microbiology* 28: 355–358.
- GANZLE, M.G., Weber, S. ve Hammes, W. P. 1999. Effect of Ecological Factors on the Inhibitory Spectrum And Activity of Bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology* 46: 207–217.

- GARNEAU, S., Martin N.I. ve Vederas, J.C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577-592.
- GEINSEN, R., Lucke, K.K. ve Krockel, L. 1992. Starter and Protective Cultures For Meat and Meat Products. *Fleischwirtsch* 72 (6): 894-898.
- GHANBARI, M., Rezaei, M., Soltani, M. ve Shah-Hosseini, G.H. 2009. Production of bacteriocin by a novel *Bacillus* sp. strain RF140, an intestinal bacterium of Caspian Frisian Roach (*Rutilus Frisii kutum*). *Iranian Journal of Veterinary Research* 10 (3): 267-272.
- GILLOR, O., Etzion, A. ve Riley, M. A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (4): 591-606.
- GORRIS, G.M.L. 1996. Bacteriocins: Potential Applications In Food Preservation. Food preservation by combined processes. Final Report Flair. Concerted Action No:7 Subgroup B.
- GOUAUX, E., Hill C. ve Ross R.P. 2005. Food microbiology: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3 (10): 777-88.
- GRATIA, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comptes rendus des seances de la societe de biologie et de ses filiales*, 93: 1040-1042.
- GRAY, E.J., Di Falco, M., Souleimanov, A. ve Smith, D.L. 2006. Proteomic analysis of the bacteriocin thuricin 17 produced by *Bacillus thuringiensis* NEB17. *FEMS Microbiology Letters* 255: 27-32.
- HAFT, D.H. 2009. A strain-variable bacteriocin in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* with repeated Cys-Xaa motifs. *Biology Direct* 4: 15.
- HAMMAMI I., Rhouma A, Jaouadi B, Rebai A. ve Nesme X. 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Letters in Applied Microbiology* 48: 253–260.

- HAMMES, W.P., Ganzle, M.G. ve Weber, S. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology* 46: 207-217.
- HAVARSTEIN, L.S., Dıep, B.D. ve Nes, I.F. 1995. A Family of Bacteriocin ABC Transporters Carry Out Proteolytic Processing of Their Substrates Concomitant With Export. *Molecular Microbiology* 16: 229-240.
- HECHARD, Y. ve Sahl, H.G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84: 545-557.
- HERRANZ, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martinez, J.M., Rodriguez, J.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. ve Cintas, L.M. 2001. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiology* 18 (2): 115-131.
- HILL, C. 1995. Bacteriocins: Natural Antimicrobials from Microorganisms: New methods for food preservation, Blackie Academic ve Professional, London, P. 457.
- HOLZAPFEL, W.H., Geisen, R. ve Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24: 343-362.
- HORN, N., Fernandez, A., Dodd, H.M., Gasson, M.J. ve Rodriguez, J. 2004. Nisin – controlled production of pediocin PA-1 and colisin V in nisin and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5030-5032.
- HOSOI, T. ve Kiuchi, K. 2003. Natto-a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto), Farnworth E.R., Eds, Handbook of Fermented Functional Foods, 227-245.
- HOWARD, B.J., Keiser, J.F., Smith, T.F., Weissfeld, A.S. ve Tilton, R.C. 1993. Clinical and Pathogenic Microbiology. 2nd Edition. A.C.V. Mosby. Imprint of Mosby Year Book Inc. St. Louis. 95.

- IVANOVA, I., Miteva V., Stefanova T., Pantev A. ve Budakov I. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *International Journal of Food Microbiology* 42:147-158.
- IVANOVA, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S. ve Dousset, X. 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza bulgarian traditional cereal beverage, *Vestnik Moskovskogo Unıversıteta, Khımıya*, 41, No. 6.
- İŞLEROĞLU, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. 2005. Sınıf Ila Bakteriyosinlerin Biyosentezi, Yapısı ve Antimikrobiyal Aktivitesi. Gıda Kongresi, Kongre Bildiri Kitapçığı. İzmir.
- JACK, R.W., Tagg, J.R. ve Ray B. 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiology Reviews* 59: 171-200.
- JACOB, F., Lwoff, A., Simonovitch, A. ve Wollman, E.L. 1953. Définition de quelques terms relatifs á la lysogénie. *Annales de l'Institut Pasteur*, 84: 222-224.
- JIMENEZ-DIAZ, R., Piard, J.C., Ruiz-Barba, J.L. ve Desmazeaud, M.J. 1990. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. Third symposium on lactic acid bacteria. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews* 87: 91.
- KAISER, D., Jack, R.W. ve Jung, G. 1998. Lantibiotics and microcins: novel post translational modifications of polypeptides. *Pure and Applied Chemistry* 70: 154-160.
- KAJIMURA, Y. ve Kaneda, M. 1997. Fusaricidin B, C and D, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: isolation, structure elucidation and biological activity. *The Journal of Antibiotics* 50 (3): 220-228.

- KAMOUN, F., Mejdoub, H., Aouissaoui, H., Reinbolt, J., Hammami, A. ve Jaoua, S. 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* 98: 881-888.
- KATI, H., Karaca B. ve Gülşen, Ş.H. 2016. Topraktan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması, SAÜ Fen Bil. Der. 20. Cilt, 2. Sayı, s. 281-290.
- KAYSER, F., Bienz, K., Eckert, J. ve Lindemann, J. 1997. Kemoterapinin temel ilkeleri. Tıbbi Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitapevleri, 117-133.
- KELLY, W.J., Asmındson, R.V. ve Huang, C.M. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat products. *International Journal of Microbiology* 33: 209-218.
- KLAENHAMMER, TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie* 70: 337-349.
- KLAENHAMMER, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS (Federation of European Microbiological Societies). *Microbiology Reviews* 12: 39-86.
- KLEIN, C. ve Entian, K.D. 1994. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2793-2801.
- KRIER, F., Revol-Junelles, A.M. ve German, P. 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR 52 during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 359-363.
- KOPONEN, O. 2004. Studies of producer self-protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*, Institute of Biotechnology and Department of Applied Chemistry and Microbiology, Doctoral Dissertation, Helsinki, 69 p.

- KÖSEOĞLU, V.K. 2007. Model sistemlerde laktik asit bakterilerinin bazı patojenler üzerine antibakteriyal etkilerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 59 s.
- KULEAŞAN, H. ve Çakmakçı M.L. 2003. Bakteriyosinlerin özellikleri, gıda mikrobiyolojisinde kullanım alanları ve ileri dönemlerdeki kullanım potansiyelleri. *Gıda*, 28: 123-129.
- LAEMMLI U.K. 1970. Cleavages of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680–685.
- LEE, H., Churey, J.J. ve Worobo R.W. 2009. Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiology Letters* 299: 205-213.
- LEE, N.K. ve Paik, H.D. 2001. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from jeot-gal. *Food Microbiology* 18: 17-24.
- LENNETE, E.H., Balows A, Hausler J. ve Shadomy J.H. 1985. *Manual of Clinical Microbiology* 4, Amerika s.1149.
- LISBOA, M.P., Bonatto D., Bizani D., Henriques J.A. ve Brandelli A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology* 9 (2): 111-8.
- LODEMANN, U., Lorenz, B.M., Weyrauch, K.D., ve Martens, H. 2008. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Archives of Animal Nutrition* 62: 87-106.
- LOGAN, N.A. 1988. *Bacillus* species of medical and veterinary importance. *Journal of Medical Microbiology* 25: 157-165.

- MARAHIEL, M.A., Nakano, M.M. ve Zuber, P. 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular Microbiology* 7 (5): 631-636.
- MIYAMOTO, T., Yoshimoto, M., Tsutsumi, M., Yamada, K. ve Hatano, S. 1986. Purification and some properties of an antibacterial factor derived from *Bacillus subtilis* FHC 402. *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (5): 1169-1176.
- MONTGOMERY, E., Favlet, M.E. ve Allan, A.Y. 1989. Thuricin: The bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53: 206-216.
- MONTVILLE, T.J. ve Winskowski, K. 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In Food microbiology: Fundamentals and Frontiers, M. P. Doyle, L.R. Beuchat & T. J. Montville (Eds.) ASM, Washington D.C., 557, 577 p.
- MONTVILLE, T.J. ve Chen, Y. 1998. Mechanistic Action of Pediocin and Nisin: Recent Progress and Unresolved Questions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 511-519.
- MURIANA, P.M. ve Luchansky, J.B. 1993. Biochemical Methods for the Purification of *Bacteriocins*. pp. 41-57. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, D.F Hoover And L.R. Steenson (Eds), Academic Press, San Diego, CA.
- NACLERIO, G., Ricca E., Sacco M. ve De Felice M. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4313-4316.
- NACLERIO, G., Ricca, E., Sacco, M., ve De Felice, M. 1993. Antimicrobial Activity of a Newly Identified Bacteriocin of *Bacillus cereus* with a Broad Spectrum of Activity. *FEMS Microbiology Letters* 178: 337-341.

- NAKAGAWA, A., Konda, Y., Hatano, A., Harigaya, Y., Onda, M. ve Omura, S. 1988. Structure and biosynthesis of novel antibiotics, Aurentinins A and B produced by *Bacillus aurentinus*. *Journal of Organic Chemistry* 53: 2660-2661.
- NES, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. ve Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113-128.
- NES, I.F. ve Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55: 50-61.
- NES, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H. ve Nissen-Meyer, J. 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (ClassII) produced by lactic acid bacteria. In: Peptide antibiotics; discovery, modes of action, and applications. eds. Dutton, C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.A. I. and Wax, R.G., Marcel Dekker Inc., 81-115, New York.
- NES, I.F., Yoon, S.S. ve Diep, D.B. 2007. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology* 16: 675-690.
- OGUNBANWO, S.T., Sanni, A.I. ve Onilude, A.A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *Journal of Biotechnology* 2 (8): 179-184.
- O'SULLIVAN, L., Ross, R.P. ve Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593-604.
- OSCARIZ, J.C., Lasa I. ve Pisabarro A.G. 1999. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiology Letters* 178: 337-341.
- OSCARIZ, J.C. ve Pisabarro A.G. 2000. Characterisation and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology* 89: 1 10.

- OSCARIZ, J.C. ve Pisabarro A.G. 2001. Classification and mode of action of membraneactive bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Review Article. Springer-Verlag and a system for enumerating models (SEM), 12: 123-127.
- OSCARIZ, J.C., Cintas L., Holo H., Lasa I., Nes I.F. ve Pisabarro A.G. 2006. Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *FEMS Microbiology Letters* 254: 108–115.
- OLIMPIA, P., Giuseppe, B., Giancarlo, M., Greco, T. ve Francesco, V. 2002. “Sünme-Producing Strains of *Bacillus* spp. from Wheat Bread and Strategy for Their Control by Lactic Acid Bacteria”, Dipartimento di Scienza delgi Alimenti, Universita` degli Studi di Napoli Federico II, 80055 Portici, Italy.
- ÖZDEMİR, H. 2003. Pastörize Sütlerde *Bacillus cereus* 'un Varlığı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları: 611–615. Ankara.
- ÖZŞAHİN, A.D. 2006. Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarından Elde Edilen Selülaz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş s.1-37.
- PAIK, H.D., Bae, S.S. ve Pan, J.G. 1997. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiology* 19: 294-298.
- PARVEZ, S., Malik, K.A., Ah Kang, S. ve Kim, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1171- 1185.
- PASTEUR, L. ve Joubert, J.F. 1877. Charbon et septicemie, Comptes Rendus of the Sessions and Memoirs of the *Society of Biology*, Paris, 85: 101- 115.

- PATTNAIK, P., Kaushik, J.K., Grover, S. ve Batish, V.K. 2001. Purification and characterization of bacteriocin-like compound (lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. *Journal of Applied Microbiology* 91: 636-645.
- PEDERSEN, P.B., Bjrnvad, M.E., Rasmussen, M.D. ve Petersen, J.N. 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp., *Regul Toxicol Pharmacol*, 36: 155-161.
- PIARD, J.C., Delorme, F., Giraffa, G., Commisaire, J. ve Desmazeaud, M. 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Netherland Milk and Dairy Journal* 44: 143-158.
- PIRZADA, Z.A., Syed, A.A., Khan, B.M. ve Rasool, S.A. 2000. Production and physico-chemical characterization of bacteriocin-like inhibitory substance from *Marine Bacterium* ZM81. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(12): 2026-2030.
- PIRZADA, Z.A., Syed, A.A., Khan, B.M. ve Rasool, S.A. 2004. Production and physico-chemical characterization of bacteriocin-like inhibitory substance from *Marine Bacterium* ZM81. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 (12): 2026-2030.
- PUGSLEY, A.P. 1993. The Complete General Secretory Pathway In Gram-Negative Bacteria. *Microbiology Reviews* 57: 50-108.
- RAJARAM, G., Manivasagan, P., Thilagavathi B. ve Saravanakumar, A. 2010. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2(2): 138-144.
- RAMMELSBERG, M. ve Radler, F. 1990. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology* 69: 177-184.
- RAY, B. 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* as food biopreservative. In "Food Biopreservatives of Microbial Origin", B. Ray and M.A. Daeschel, (Eds), CRC Press, p. 209- 257, Boca Raton, Florida.

- RILEY, M.A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual review of Genetics* 32: 255-278. ISSN: 0066-4197.
- RILEY, M.A. ve Wertz J.E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, 56: 117-137.
- RILEY, M.A. ve Chavan, 2007. Bacteriocins: Ecology and Evolution, Springer Verlag, Inc., 150 p.
- RODRIGUEZ, J.M, Martinez, M.I., Horn, N. ve Dodd, H.M. 2003. Heterologous Production of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80: 101-116.
- ROSENQUIST, H. ve Hansen, A. 1998. The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. Licheniformis* isolated from wheat bread. *Journal of Applied Microbiology* 85 (3): 621-631.
- SCHLEGEL, H. 1992. Produktion Sekundärer Metabolite, Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Thieme Verlag, s. 362-371.
- SCHREIBER, L. R., Gregory, G. F., Krause, C. R. ve Ichida, J. M. 1988. Production, partial purification and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana*. *Canadian Journal of Botany* 66: 2338-2346.
- SEÇKİN, A. K. ve Baladura, E. 2010. Gıdaların muhafazasında bakteriyosin ve bakteriyofaj uygulamaları, *Gıda*, 35 (6): 461-467.
- SIEGERS, K. ve Entian, K.D. 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1082-1089.
- SILU-SUH, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J. ve Handelsman, J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (6): 2023-2030.

- SIT, C.S. ve Vederas, J.C. 2008. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochemistry and Cell Biology* 86: 116-123.
- SOOMRO, A.H., Masud, T. ve Anwaar, K. 2002. Role of lactic acid bacteria (lab) in food preservation and human health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1: 20-24.
- STABB, E. V., Jacobson, L. M. ve Handelsmann, J. 1994. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (12): 4404-4412.
- STEFFEN, T. 2005. Natural Dairy Safety in Dairy World. Food Protection Symposium Sao Paulo, June 2005, Brazil.
- STEIN, T., Dusterhus, S., Stroh, A. ve Entian, K.D. 2004. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2349-2353.
- STEIN, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56: 845-857.
- TAGG, J.R., Dajani, A.S. ve Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Journal of Bacteriology Reviews* 40: 722-756.
- TEMİZ, A. 1998. Gıdalarda Mikrobiyal Gelişmeyi Etkileyen Faktörler: Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, İzmir, P.605.
- THOMAS, L.V. ve Wimpenny, J.W.T. 1996. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2006-2012.
- TOMITA, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. ve Ike, Y. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYII17. *Journal of Bacteriology* 178: 3585-3593.

- TOPÇAL, F. 2010. Bazı Yem Bitkilerinin Toprak Mikroflorasına Etkisi, Toprakтан İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2010.
- TUNCER, Y., Özden, B. ve Akçel, M. 2008. Tulum Peynirlerinden izole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBML9 ve YBML21 Suşları Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Kısmi Karakterizasyonları, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12: 141-148.
- TWOMEY, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B. ve Hill, C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. In: Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. (Sizezen, R. J., Kok, J., Abee, T. and Schaafsma, G. Eds.) 82: 165-185. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*.
- ÜNLÜTÜRK, A. 1998. Mikrobiyal Gelişmenin İnhibisyonu: Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, İzmir, P.605.
- VAN BELKUM, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. ve Venema, G. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1187-1191.
- VIGNOLO, G., Palacios, J., Farias, M.E., Sesma, F., Schillinger, U., Holzapfel, W. ve Oliver, G. 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology* 41: 410-416.
- YANG, R., Johnson, M.C. ve Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3355–3359.
- YANG, R. ve Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 11: 281–291.

- YILDIRIM, Z. ve Johnson, M.G. 1998. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. *Letters in Applied Microbiology* 26: 297-304.
- YILDIRIM, Z. ve Yıldırım M. 2000. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Tebliği Kitabı, 247-253.
- YILDIRIM, Z. ve Yıldırım M. 2001. Characterization of Buchnericin LB Produced by *Lactobacillus buchneri* LB. *Turkish Journal of Biology* 25: 73-82.
- ZHENNAI, Y. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- ZHENG, G. ve Slavik, M.F. 1999. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Letters in Applied Microbiology* 28: 363-367.
- ZIMMERMAN, S.B., Schwartz, C.D., Monaghan, R.L., Pelak, B.A., Weisberger, B., Gilfillan, E.C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S.A., Tejera, E. ve Stapley, E.O. 1987. Difficidin and oxididifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, Taxonomy and Antibacterial Activity. *The Journal of Antibiotics* XL, 40: 1677-1681.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Ovacık'da doğdu. İlköğrenimin ilk üç yılını İzmir Uzundere İlköğretim okulunda okudu. Kalan iki yılı ve orta öğrenimini İzmir Remzi Oğuz Arık İlköğretim okulunda tamamladı. 2001-2004 yılları arasında İzmir Naci Şensoy Lisesindeki öğrenimini bitirdikten sonra 2009 yılında Giresun Üniversitesi, Fen/Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı. 2013 yılında üniversite eğitimini tamamladıktan sonra 2013 güz döneminde Giresun Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Temel Ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Alanında yüksek lisans eğitimine başladı.

