

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BiY-DR-2009-0001**

**ÇEŞİTLİ DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
TERMOFİLİK BAKTERİLERİN ÜRETTİKLERİ
BAKTERİYOSİNLERİN KARAKTERİZASYONU VE
SAFLAŞTIRILMASI**

Gamze BAŞBÜLBÜL

**DANIŞMAN
Yrd. Doç.Dr. H.Halil BIYIK**

AYDIN-2009

KABUL VE ONAY SAYFASI

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

Biyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Gamze Başbülbul tarafından hazırlanan “Çeşitli Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması” başlıklı tez, 16.01.2009 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı	Adı Soyadı	Kurumu .	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. İsmail KARABOZ	Ege Üniversitesi	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Halil BIYIK	Adnan Menderes Üni.	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	Adnan Menderes Üni.	
Üye :	Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN	Adnan Menderes Üni.	
Üye :	Doç. Dr. Mustafa ATEŞ	Ege Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulununsayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

İNTİHAL BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Gamze BAŞBÜLBÜL

İmza :

ÖZET
Doktora Tezi

**ÇEŞİTLİ DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK
BAKTERİLERİN ÜRETTİKLERİ BAKTERİYOSİNLERİN
KARAKTERİZASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

Gamze BAŞBÜLBÜL

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. H.Halil BIYIK

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresindeki doğal sıcak su kaynaklarından alınan su, birikinti ve toprak örneklerinden termofilik bakteriler izole edilmiştir. 208 izolat arasından antimikrobiyal etki spektrumları en geniş olan iki suş seçilerek, bunların ürettikleri bakteriyosinlerin, izolasyonu, karakterizasyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. 16S rRNA dizi analizleri sonucunda HBB-218 ve HBB-247 suşlarının, *Geobacillus toebii* türüne yüksek oranda (%99) homoloji gösterdiği belirlenmiştir. İzolatların ürettikleri antimikrobiyal maddenin, özellikle Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu, denenen Gram negatif bakterilerin hiçbirine karşı antagonistik etki göstermediği belirlenmiştir. İzolatlardan elde edilen kültür sıvılarının proteolitik enzimlere hassas olduğu bulunmuştur. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin üretimi gelişimin logaritmik evresinde başlamakta, maksimum üretim ise durgunluk fazının sonunda gerçekleşmektedir. Optimum bakteriyosin üretimi 60 °C ve pH 6.0'da gerçekleşmektedir. Azot kaynakları içerisinde üretim açısından en iyi azot kaynağı soya pepton, en iyi şeker kaynağı ise galaktoz olarak belirlenmiştir. HBB-218 kodlu bakterinin ürettiği bakteriyosin, sırasıyla, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, jel filtrasyonu ve anyon değiştirici kromatografi metotları kullanılarak saflaştırılmıştır. Bakteriyosinin molekül ağırlığı Trisin SDS-PAGE yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve yaklaşık 5.5 kDa olduğu bulunmuştur. HBB-247 kodlu bakterinin ürettiği bakteriyosinin üretimi gelişimin logaritmik evresinde başlamakta ve logaritmik evrenin sonunda üretim maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Bakteriyosin üretimi açısından optimum sıcaklık 60 °C, optimum pH ise 6.5 olarak belirlenmiştir. En fazla bakteriyosin üretimi azot kaynaklarından soya pepton varlığında, şeker kaynaklarından ise fruktoz varlığında gerçekleşmektedir. Anyon değiştirici kromatografiden elde edilen proteinlerin elektoroforezi yapıldığında iki farklı protein bantı elde edilmiştir. Bakteriyosinlerin molekül ağırlığı Trisin SDS-PAGE yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve yaklaşık 33 ve 42 kDa olduğu bulunmuştur.

2009, 206 sayfa

Anahtar sözcükler

Bakteriyosin, *Geobacillus*, izolasyon, optimizasyon,

ABSTRACT

PhD Thesis

**CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF BACTERIOCINS
PRODUCED BY THERMOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM
VARIOUS NATURAL SPRINGS**

Gamze BAŞBÜLBÜL

Adnan Menderes University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. H.Halil BIYIK

In this study thermophilic bacteria were isolated from water, soil and mud samples from various natural hot springs around Aydın and the other provinces around. Two strains with broadest antimicrobial spectrum were selected among 208 isolates and isolation, characterization and purification of their bacteriocins achieved. According to their 16S rRNA sequences, it was found that both of two isolates showed maximum similarity (99 %) with *Geobacillus toebii*. Antibacterial substances produced by isolates were found to be effective especially against Gram positive bacteria, they didn't effect any of Gram negative bacteria used in this study. Culture supernatants from isolates are found to be sensitive to proteolytic enzymes.

It was determined that production of bacteriocin for HBB-218 starts at logarithmic growth phase and it reaches maximum level at the end of the stationary phase. Optimum bacteriocin production were observed at 60 °C and pH 6.0. Soja peptone was found to be best nitrogen source for bacteriocin production among the other sources, while galactose was found to be best sugar source. Bacteriocin from HBB-218 was purified to homogeneity by using, ammonium sulphate precipitation, dialyse, gel filtration and anion exchange chromatography. Molecular weight of the bacteriocin produced by strain HBB-218 was determined by Tricine SDS-PAGE method and it was found about 5.5 kDa.

The bacteriocin of HBB-247 was found to be produce at logarithmic growth phase and it reaches maximum level at the end of the logarithmic growth phase. Optimum bacteriocin production were observed at 60 °C and pH 6.5. Maximum bacteriocin production were determined in the presence of soja peptone and fructose. Proteins obtained from anion exchange chromatography were runned electrophoretically and two protein bants were detected. Molecular weight of the bacteriocins produced by strain HBB-247 was found about 33 and 42 kDa by Tricine SDS-PAGE method.

2009,206 pages

KeywordsBacteriocin, *Geobacillus*, isolation, optimization

ÖNSÖZ

Doktora tezimin gerçekleştirilmesinde ve bilimsel çalışmalarımızın yürütülmesinde her zaman büyük emeği geçen, bizlere elindeki tüm bilgi birikimini sunan ve paylaşmaktan asla kaçınmayan danışman hocam Sayın Yrd. Doç.Dr. H.Halil BIYIK'a, doktora tez izleme komitesinde yer alan ve değerli bilgileriyle çalışmamızı yönlendiren Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D'nin değerli öğretim üyelerinden Sayın Prof.Dr. İsmail KARABOZ'a, Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nün öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç.Dr. Kubilay METİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın moleküler tanı kısımları başta olmak üzere her aşamasında destek olan ve bilimsel bilgi birikimini paylaşan Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Sayın hocam Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, Biyoloji Bölümü Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kurtuluş OLGUN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Her zaman yanımda olan ve bana hem bilimsel hem manevi destek sağlayan çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Dr. Ali ÖZMEN, Arş.Gör. Ferhat KİREMİT'e, Biyokimya laboratuvarındaki yardımlarından dolayı arkadaşım Arş.Gör. Z.Burcu Bakır ATEŞLİER'e, fotoğrafların çekilmesindeki yardımlarından dolayı Yrd. Doç.Dr Suat ATEŞLİER'e, arazi çalışmalarından itibaren yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi Erman ORYAŞIN'a ve mezun öğrencilerimizden Ceren ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesinde 6009 no.lu proje ile araştırmamızı destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na, 106T581 no.lu proje ile finansal destek sağlayan TÜBİTAK'a ve ayrıca Biyoloji Bölümü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm yaşantım boyunca bana maddi manevi destek olan, kısa bir süre önce yitirdiğim canım babam Hulisi BAŞBÜLBÜL'e, sevgili annem Necla BAŞBÜLBÜL, ve sevgili kardeşim Gülşah BAŞBÜLBÜL'e teşekkür ederim. Tez çalışmamın başlangıcında yitirdiğim, fakat varlığımı her zaman yanımda hissettiğim ve bana sağlığında her zaman destek olmuş arkadaşım, Olcay TUNÇBAŞ'a sonsuzlukta teşekkürlerimi sunarım.

Gamze BAŞBÜLBÜL

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	v
SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1 Bakteriyosinlerin Tarihçesi.....	6
2.2 Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması ve Genel Özellikleri.....	8
2.2.1 Sınıf I bakteriyosinler (Lantibiyotikler).....	14
2.2.2 Sınıf II bakteriyosinler (Lantionin içermeyen bakteriyosinler).....	16
2.2.3 Bakteriyosin olmayan litik bakteriyosinler (Bakteriyolizinler).....	17
2.3 LAB Bakteriyosinlerinin Etki Mekanizmaları.....	17
2.3.1 Sınıf I lantibiyotiklerin etki mekanizmaları.....	20
2.3.2 Sınıf II bakteriyosinlerin etki mekanizmaları.....	22
2.4 Bakteriyosinlerin Genetiği ve Regulasyonu.....	24
2.5 Bakteriyosinlere Direnç.....	28
2.6 Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları.....	29
2.6.1. Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımı.....	30
2.6.2. Bakteriyosinlerin klinik kullanım alanları.....	34
2.6.3. Bitki hastalıklarının kontrolünde bakteriyosinler.....	35
2.6.4. Kolisinler ve kanser tedavisindeki potansiyelleri.....	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
3.1 Materyal.....	38
3.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	38
3.1.2. Örnekler.....	39
3.1.3. Antibakteriyal aktivite denemelerinde kullanılan indikatör bakteriler.....	40
3.1.4. Besiyerleri.....	43
3.1.5. Çözeltiler ve ayıracılar.....	51
3.2 Yöntem.....	58
3.2.1. Termofilik bakterilerin izolasyonu.....	58
3.2.2. İzolatların antibakteriyal aktivite taraması.....	58
3.2.3. İzolatların antibakteriyal etki spektrumlarının kuyucuk yöntemiyle belirlenmesi.....	59
3.2.4 İzolatların tanılanması.....	59
3.2.4.1. Kültürel özellikler.....	59
3.2.4.2. Morfolojik özellikler.....	60
3.2.4.3. Biyokimyasal ve fizyolojik özellikler.....	60
3.2.4.4. HBB-218 ve HBB-247 izolatlarının 16S rRNA analizi ile tanılanması.....	64
3.3 Bakteriyosinlerin Karakterizasyonları.....	66
3.3.1. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi.....	66
3.3.2. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine enzimlerin etkisi.....	66
3.3.3. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine pH'nın etkisi.....	67

3.3.4. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine organik çözücüler ve deterjanların etkileri.....	67
3.4. Bakteriyosin üretimi ve gelişim üzerine ortam koşullarının etkileri.....	68
3.4.1. Bakteriyosin aktivitesinin hesaplanması.....	68
3.4.2. Farklı besi ortamlarında gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi.....	68
3.4.3. İzolatların büyüme eğrilerinin çıkarılması ve bakteriyosin üretim evrelerinin belirlenmesi.....	68
3.4.4. Farklı pH'larda gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi.....	69
3.4.5. Farklı sıcaklıklarda gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi.....	69
3.4.6. Farklı azot kaynaklarında gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi.....	69
3.4.7. Farklı şeker kaynaklarında gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi.....	70
3.5. Bakteriyosinlerin Etki Tarzlarının Belirlenmesi.....	71
3.6. Bakteriyosinlerin Saflaştırılması.....	71
3.6.1. İzolatların geliştirilmesi ve kültür sıvılarının toplanması.....	71
3.6.2. Protein tayini.....	72
3.6.3. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	73
3.6.4. Jel filtrasyon kromatografisi.....	73
3.6.5. İyon değiştirici kromatografisi.....	74
3.6.6. Trisin SDS-PAGE yöntemi ile proteinlerin elektroforezi.....	74
3.6.7. Bakteriyosinlerin molekül ağırlıklarının hesaplanması.....	76
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	77
4.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu.....	77
4.2. Antibakteriyal Aktivite Taraması ve İzolatların Seçilmesi.....	77
4.3. İzolatların Tanınması.....	80
4.3.1. Kültürel özellikler.....	80
4.3.2. Mikroskopik özellikler.....	81
4.3.3. Biyokimyasal özellikler.....	82
4.3.4. İzolatların 16S rRNA analiziyle tanınması.....	83
4.4. İzolatların Antibakteriyal Etki Spektrumları.....	91
4.5. Ham Bakteriyosinlerin Karakterizasyonları.....	95
4.5.1. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi.....	95
4.5.2. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine enzimlerin etkisi.....	97
4.5.3. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine pH'nın etkisi.....	100
4.5.4. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine organik çözücülerin etkisi.....	101
4.5.5. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine deterjanların etkisi.....	103
4.6. Farklı Ticari Ortamlarda Gelişim ve Bakteriyosin Üretimi.....	105
4.7. İzolatların Büyüme Eğrileri ve Bakteriyosin Üretim Evrelerinin Belirlenmesi.....	106
4.8. Bakteriyosin Üretim Koşullarının Optimizasyonu.....	110
4.8.1. Farklı pH'larda izolatların gelişimi ve bakteriyosin üretimleri.....	111
4.8.2. Farklı sıcaklıklarda izolatların gelişimi ve bakteriyosin üretimleri.....	117
4.8.3. Farklı azot kaynaklarında izolatların gelişimi ve bakteriyosin üretimleri.....	124

4.8.4. Farklı şeker kaynaklarında izolatların gelişimi ve bakteriyosin üretimleri.....	131
4.9. Bakteriyosinlerin Etki Tarzlarının Belirlenmesi.....	142
4.10 Bakteriyosinlerin Saflaştırılması.....	146
4.10.1. İzolatların geliştirilmesi ve kültür sıvılarının toplanması.....	146
4.10.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	147
4.10.3. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin jel filtrasyon kromatografisi sonuçları.....	150
4.10.4. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromatografi sonuçları.....	154
4.10.5. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin saflaştırma tablosu.....	157
4.10.6. HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromatografi sonuçları.....	158
4.10.7. Bakteriyosinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi.....	148
4.11 HBB-218 Saflaştırılmış Bakteriyosinin Karakterizasyonu.....	168
4.11.1. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	168
4.11.2. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi.....	169
4.11.3. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	170
4.11.4. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	170
4.11.5. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine deterjanların etkisi.....	171
5. SONUÇ	172
KAYNAKLAR	175
ÖZGEÇMİŞ.....	204

SİMGELER DİZİNİ

ATP	Adenozin Trifosfat
sp.	Tür
Subsp.	Alttür
kDa	Kilodalton
Da	Dalton
SDS	Sodyum dodesil sülfat
σ	Sigma
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
PTS	Fosfotransferaz
Kb	Kilobaz
Sec	Sekresyon
ABC	ATP bağlayıcı kaset
M	Molar
nM	Nanomolar
pmol	Pikomol
mg	miligram
L	Litre
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
g	Gram
Log	logaritma
cfu	Koloni oluşturan birim
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
VRE	Vankomisine dirençli Enterokok
LAB	Laktobasil
MRSA	Metisilin dirençli S. aureus
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
TEMED	Tetrametiletilediamid
dNTP	dideoksinükleotidtrifosfat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
°C	Derece santigrad
HBB	Halil Bıyık bakterisi
DSMZ	Almanya Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürü Koleksiyonu
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
MRS	Man-Rogosa Shape
GYE	Glikoz Yeast Extract
BHI	Brain Heart Infusion
ml	Mililitre
atm	Atmosfer
MR-VP	Metil Red-Voges-Proskauer
BSA	Sığır serum albumini
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
UV	Ultraviyole
g	Gram

mm	Milimetre
CFS	Hücresiz kültür üstfazi
nm	Nanometre
μ L	Mikrolitre
v/v	Hacim/hacim
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
g	Yerçekimi ivmesi
mM	Milimolar
TCA	Trikloroasetik asit
AU	Aktivite ünitesi
OD	Optik yoğunluk
rRNA	Ribozomal RNA
DMSO	Dimetil sülfoksit
%	Yüzde
PMF	Proton motive edici güç
Et al.	Ve arkadaşları
NaCl	Sodyum klorür
HCl	Hidroklorik asit
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
Ve ark.	Ve arkadaşları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Lantibiyotiklerin oluşumu.....	15
Şekil 2.2 LAB bakteriyosinlerinin etki mekanizmaları.....	19
Şekil 2.3 Bakteriyosin üretiminin quorum sensing mekanizması ile düzenlenmesi.....	27
Şekil 2.4. Bakteriyosinlerin kullanım alanları.....	29
Şekil 3.1. Protein standart grafiği.....	74
Şekil 4.1. HBB-218 kolonileri.....	80
Şekil 4.2. HBB-247 kolonileri.....	80
Şekil 4.3. HBB-218 Gram boyama.....	81
Şekil 4.4. HBB-247 Gram boyama.....	81
Şekil 4.5 HBB-218 izolatına ait filogenetik ağaç.....	89
Şekil 4.6 HBB-247 izolatına ait filogenetik ağaç.....	90
Şekil 4.7 HBB-218 ve HBB-247'nin antimikrobiyal spektrumuna örnekler.....	92
Şekil 4.8 HBB-218 izolatının büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim evreleri.....	107
Şekil 4.9 HBB-247 izolatının büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim evreleri.....	107
Şekil 4.10 HBB-218 izolatının farklı pH'larda gelişimi ve bakteriyosin üretimi....	112
Şekil 4.11 HBB-218 izolatının farklı pH'larda son pH ve kuru ağırlık miktarları...112	
Şekil 4.12 HBB-247 izolatının farklı pH'larda gelişimi ve bakteriyosin üretimi	113
Şekil.4.13.HBB-247 izolatının farklı pH'larda son pH ve kuru ağırlık miktarları...114	
Şekil.4.14 HBB-218 izolatının farklı sıcaklıklarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	118
Şekil.4.15 HBB-218 izolatının farklı sıcaklıklarda son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	118
Şekil 4.16 HBB-247 izolatının farklı sıcaklıklarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	119
Şekil 4.17 HBB-247 izolatının farklı sıcaklıklarda son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	119
Şekil 4.18 HBB-218 izolatının farklı azot kaynaklarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	124
Şekil 4.19 HBB-218 izolatının farklı azot kaynaklarında son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	124

Şekil 4.20 HBB-247 izolatının farklı azot kaynaklarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	125
Şekil 4.21 HBB-247 izolatının farklı azot kaynaklarında son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	125
Şekil 4.22 HBB-218 izolatının farklı soya pepton oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	127
Şekil 4.23 HBB-218 izolatının farklı soya pepton oranlarında son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	127
Şekil 4.24.HBB-247 izolatının farklı soya pepton oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	128
Şekil 4.25 HBB-247 izolatının farklı soya pepton oranlarında son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	128
Şekil 4.26 HBB-218 izolatının farklı şekerlerin varlığında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	130
Şekil 4.27 HBB-218 izolatının farklı şekerlerin varlığında son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	130
Şekil 4.28 HBB-247 izolatının farklı şekerlerin varlığında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	131
Şekil 4.29 HBB-247 izolatının farklı şekerlerin varlığında son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	131
Şekil 4.30 HBB-218 izolatının farklı galaktoz konsantrasyonlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	133
Şekil 4.31 HBB-218 izolatının farklı galaktoz konsantrasyonlarında son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	133
Şekil 4.32 HBB-247 izolatının farklı fruktoz oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	134
Şekil 4.33 HBB-247 izolatının farklı fruktoz oranlarında son pH ve kuru ağırlık miktarları.....	134
Şekil 4.34 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin farklı konsantrasyonlarda etki tarzı.	140
Şekil 4.35 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin farklı konsantrasyonlarda etki tarzı.....	141

Şekil.4.36 Sephadex G-50 kolonunda elde edilen fraksiyonların protein ölçümleri ve aktiviteleri.....	148
Şekil 4.37 HBB-218 bakteriyosinin jel kromatografisi sonuçlarının elektroforezi.....	149
Şekil4.38 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosine ait aktif bantın jel üzerinde görüntülenmesi.....	150
Şekil 4.39 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromatografi grafiği.....	152
Şekil 4.40 HBB-218 Anyon değiştirici kromatografi sonucu aktif çıkan fraksiyonların elektroforezle görüntülenmesi.....	153
Şekil 4.41 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromatografi grafiği.....	158
Şekil 4.42 HBB-247 izolatından elde edilen diyalizatın protein elektroforezi ve aktif bantın görüntülenmesi.....	158
Şekil4.43 HBB-247 izolatından elde edilen Fraksiyon 1'in protein elektroforezi ve Fraksiyon 1'e ait aktif bantın görüntülenmesi.....	159
Şekil 4.44 HBB-247 izolatından elde edilen Fraksiyon 2'nin protein elektroforezi ve aktif bantın görüntülenmesi.....	159
Şekil 4.45 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan standart grafik.....	160
Şekil 4.46 HBB-247/diyalizatın molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan standart grafik.....	160
Şekil 4.47 HBB-247/ Fraksiyon 1 ve Fraksiyon 2'nin molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan standart grafik.....	161

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bakteriyosinlerin sınıflandırılması.....	11
Çizelge 2.2 Gram pozitif bakterilerin ürettikleri bakteriyosinler.....	13
Çizelge 3.1 Örneklerin alındığı istasyonlar.....	39
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan indikatör bakteriler.....	41
Çizelge 4.1 <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ 22, HBB-218 ve HBB-247 izolatlarının fenotipik özellikleri.....	82
Çizelge 4.2 HBB-218 izolatına ait 16S rRNA konsensus sekans ve BLAST karşılaştırma sonucu.....	83
Çizelge 4.3 HBB-247 izolatına ait 16S rRNA konsensus sekans ve BLAST karşılaştırma sonucu.....	86
Çizelge 4.4 HBB-218 izolatının antibakteriyal etki spektrumu.....	91
Çizelge 4.5 HBB-247 izolatının antibakteriyal etki spektrumu.....	92
Çizelge 4.6 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	96
Çizelge 4.7 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	96
Çizelge 4.8 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi.....	98
Çizelge 4.9 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi.....	98
Çizelge 4.10 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	100
Çizelge 4.11 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	101
Çizelge 4.12 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	102
Çizelge 4.13 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	102
Çizelge 4.14 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine deterjanların etkisi.....	104

Çizelge 4.15 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine deterjanların etkisi.....	104
Çizelge 4.16 HBB-218 izolatının farklı ticari ortamlarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	105
Çizelge 4.17 HBB-247 izolatının farklı ticari ortamlarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	106
Çizelge 4.18 HBB-218 izolatının farklı pH'larda gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	112
Çizelge 4.19 HBB-247 izolatının farklı pH'larda gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	113
Çizelge 4.20 HBB-218 izolatının farklı sıcaklıklarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	118
Çizelge 4.21 HBB-247 izolatının farklı sıcaklıklarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	119
Çizelge 4.22 HBB-218 izolatının farklı azot kaynaklarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	124
Çizelge 4.23 HBB-247 izolatının farklı azot kaynaklarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	125
Çizelge 4.24 HBB-218 izolatının farklı soya pepton oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	127
Çizelge 4.25 HBB-247 izolatının farklı soya pepton oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	128
Çizelge 4.26 HBB-218 izolatının farklı şekerlerin varlığında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	130
Çizelge 4.27 HBB-247 izolatının farklı şekerlerin varlığında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	131
Çizelge 4.28 HBB-218 izolatının farklı galaktoz konsantrasyonlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	133
Çizelge 4.29 HBB-247 izolatının farklı fruktoz konsantrasyonlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi.....	134
Çizelge 4.30 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında protein ve aktivite değerleri.....	146

Çizelge 4.31 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında protein ve aktivite değerleri.....	146
Çizelge 4.32 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin jel kromatografisi elüsyon profili.....	147
Çizelge 4.33. Jel kromatografisi sonucu toplanan fraksiyonların protein ve aktivite değerleri.....	149
Çizelge 4.34 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromatografi elüsyon profili.....	151
Çizelge 4.35 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin saflaştırma tablosu.....	153
Çizelge 4.36 HBB-247 bakteriyosinin anyon değiştirici kromatografi elüsyon profili.....	155
Çizelge 4.37 Farklı bakteriyosinlerin saflaştırma prosedürleri ve molekül ağırlıkları.....	164
Çizelge 4.38 HBB -247 izolatının ürettiği bakteriyosinin kısmi saflaştırma tablosu.....	166
Çizelge 4.39 Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	167
Çizelge 4.40 Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi.....	169
Çizelge 4.41 Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	170
Çizelge 4.42 Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	171
Çizelge 4.43. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	171

1.GİRİŞ

Moleküler dünyadaki hızlı gelişmelerin yanısıra enzim biyoteknolojisi ve sanayi alanlarındaki üretim çeşitliliği bilim insanını yeni araştırmalara sürüklemektedir. Mikroorganizmaların, hızlı bir şekilde, çok farklı ekolojik ortamlarda gelişebilmeleri ve çoğalmaları, ayrıca ekstrem şartlara adaptasyonları, bu organizmaların hem yapısal hem de hücresel düzeyde farklı özelliklerinin araştırılması gerektiğini göstermektedir. Doğada çok fazla sayıda ve çeşitte canlılar bulunmasına rağmen, prokaryotlar, biyosferin temel üyelerini oluşturmaktadırlar. Gelişme ve üreme için ideal şartların bulunduğu ekolojik ortamlardan, ekstrem çevrelere kadar, oldukça farklı habitatlarda bulunabilmektedirler. Ayrıca, prokaryotlar, gıda, tekstil endüstrilerinde, ilaç sanayinde kullanılan pek çok metaboliti üretmektedirler.

Prokaryotlar tarafından üretilen ve pek çok alanda kullanım potansiyeli taşıyan ürünlerden bir tanesi de antimikrobiyal peptidlerdir. Aslında, bu tür peptidler; tek hücreli mikroorganizmalardan, böcekler, omurgasızlar, amfibiler, kuşlar, balıklar ve insanları da içeren memeli gruplarına kadar geniş bir yelpazedeki canlılar tarafından sentezlenir (Jenssen *et al.*, 2006). Magaininler, sekropinler ve defensinler hayvansal, tioninler bitkisel, bakteriyosinler ise bakteriyal savunma peptidleridir. Antimikrobiyal peptidler, aminoasit dizileri bakımından oldukça farklılık göstermelerine rağmen, pek çok ortak özelliği paylaşırlar. Düşük molekül ağırlıklı ve ısıya dayanıklıdır, yapıları katyonik ve hidrofobik özelliktedir. Bunların tümü, yapısal genler tarafından kodlanırlar ve ribozomlarda peptidlere dönüştürülürler (Oscariz ve Pisabaro, 2001). Günümüze dek, bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan bu tür peptidlerden yüzlercesi tanımlanmıştır. Bu tür peptidler, bakteriyal, fungal veya viral membranlara zarar vererek veya destabilize ederek ya da diğer hedefler üzerine etkili olarak, antimikrobiyal etkiler gösterebilirler de kalıtsal bağışıklık ve yangısal yanıtta büyük oranda rol oynamaktadırlar. Bu yüzden, daha çok konukçunun savunma peptidleri olarak bilinmektedirler (Hancock ve Diamond, 2000).

İzolasyonu ve karakterizasyonu ilk olarak yapılan antimikrobiyal peptidler, bakteriler tarafından üretilenlerdir (Hancock ve Diamond, 2000). Ayrıca bakterilerin çoğu, *in vitro* gelişimleri esnasında ve olasıdır ki doğal habitatlarında da kendi türlerinden veya diğer türden bakterileri inhibe eden çeşitli moleküller üretme yeteneğindedirler. Bu moleküllere örnek olarak, toksinler, bakteriyolitik enzimler, bakteriyofajlar ve defektif bakteriyofajlar, primer metabolik yan ürünler, antibiyotik bileşikler, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler verilebilir (Jack *et al.*, 1995).

Genel anlamıyla antibiyotikler, bir organizma tarafından üretilen ve diğer bazı organizmaların gelişimi açısından zararlı kimyasallar olarak düşünülebilirler. Fakat, pratik anlamda antibiyotikler, nispeten düşük konsantrasyonlarda gelişimi önleyen sekonder metabolitlerdir. Bu özellikleriyle, amonyak, organik asitler ve hidrojen peroksitler gibi metabolik yan ürünlerden farklıdırlar. Bakteriyosinler ise, enfeksiyona karşı, klasik anlamda bir koruyuculukları olmasa da aynı çevrede bulunan bakterilerin, diğer bakterileri öldürerek, besin için rekabet etmesinde avantaj sağlarlar (Hancock ve Diamond, 2000). Bakteriyal antimikrobiyal peptidlerin, yani bakteriyosinlerin, birçok bakteri tarafından sentezlendiği düşünülmektedir. Klaenhammer (1988)'e göre, tüm bakterilerin %99'u en azından bir bakteriyosin sentezlemektedir ve bunların çoğu henüz tanımlanmamıştır. Bunun nedeni, henüz çok az araştırmacının bunlar için araştırma yapmış olmasıdır (Klaenhammer, 1988). Bakteriyosinlerin aktiviteleri geniş veya dar spektrumlu olabilir, aynı türden veya farklı cinsten bakterileri hedef alabilir (Jenssen *et al.*, 2006). Genetik belirleyicileri kromozomal veya plazmid kökenli olabilir. Bazıları gelişmenin erken safhalarında üretilirken bazıları geç dönemlerde sentezlenmektedir (Mishra ve Lambert, 1996). Laktik asit bakterileri başta olmak üzere, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacteria*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Streptomyces* gibi pek çok cinse ait üyelerin bakteriyosin sentezlediği bulunmuştur (Tagg, 1976).

Ökaryotik hücrelere karşı etkin olmalarından dolayı bakteriyal toksin olarak bilinen pek çok bileşik aynı zamanda antibakteriyal aktiviteye de sahiptir. Gerçekte, bazı bakteriyal toksinler (örneğin, difteri, tetanoz, kolera), moleküllere bağlanmaları ve toksik aktivite taşımaları nedeniyle kolisinleri andırmaktadırlar. Hatta *E. coli* ve

Streptococcus pyogenes'den kısmi saflaştırılan bazı bakteriyosinlerin ökaryotik hücrelere karşı toksik oldukları bulunmuştur. Bakteriyolitik enzimlere ise lizostafin, fosfolipaz ve hemolizinler örnek olarak verilebilir. Organik asitler, amonyak ve hidrojen peroksit gibi primer metabolik yan ürünler ve bakteriler tarafından üretilen pek çok sekonder metabolitler antibakteriyal aktiviteye sahiptirler. Antibiyotik bileşikler sınıfına giren gramisidin, valinomisin ve basitrasin gibi antibiyotikler multienzim kompleksleri tarafından sentezlenirler. Bu tür maddelerin sentezi bakteriyosin benzeri bileşiklerden farklı olarak, ribozomal protein sentezini doğrudan engelleyen maddeler tarafından engellenmez. Bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri moleküller ise doğrudan ribozomal olarak sentezlenen polipeptid veya öncü polipeptidlerdir (Jack, *et al.*, 1995).

Günümüze kadar bakteriyosinlerle ilgili olarak yapılan çalışmalarda daha çok gıda kökenli mikroorganizmalar kullanılmıştır. Ancak son yıllarda, ekstrem çevre koşullarında gelişebilen ve ekstremofil olarak adlandırılan mikroorganizmaların bu tür antimikrobiyal peptidler üretilip üretilmediği ve bunların karakterizasyonları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin ekstrem tuzcul mikroorganizmaların “halosin” olarak adlandırılan bakteriyosin benzeri peptidler ürettikleri ve bu peptidlerin diğer tuzcul mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkisinin olduğu bildirilmiştir (Price ve Shand, 2000; Platas *et al.*, 2002).

Ekstremofil mikroorganizmalar arasında yer alan termofilik bakteriler, özellikle ısıya dayanıklı pek çok enzimleri ve metabolitlerinden dolayı günümüz için oldukça potansiyel bir kaynaktır. *Thermus* cinsi içerisinde yer alan bakterilerde bakteriyosin benzeri aktivite belirlenmiştir. *Thermus rubens* bakterisinin diğer *Thermus* türlerine karşı etkili olan bakteriyosin benzeri madde ürettiği belirlenmiştir (Becker *et al.*, 1986). Sulfolobisiner ise başka bir ekstrem termofil cins olan ve arkea içerisinde yer alan *Sulfolobus* cinsi tarafından üretilmektedir. *Sulfolobus islandicus* bakterisinin ürettiği protein yapıdaki toksinlerin, aynı türe ait, *Sulfolobus solfataricus* P1 ve *Sulfolobus shibatae* B12 suşlarına karşı öldürücü etkisi saptanmıştır (Prangishvili *et al.*, 2000).

Bakteriyosinlerin en önemli özelliklerinden biri üretildiği mikroorganizmaya yakın türleri etkileyen antimikrobiyal peptidler olmalarıdır. Fakat termofilik bakterilerden elde edilen bazı bakteriyosinler mezofilik ve yakın akraba olmayan türlere karşı da etkin olabilmektedir. Martirani *et al.* (2002), yaptıkları çalışmada *Bacillus licheniformis*'in termofilik bir suşundan “basillosin 490” adını verdikleri yeni bir bakteriyosin elde etmişlerdir. Termofilik suşun optimum gelişme sıcaklığı 65 °C'dir ve ürettiği bakteriyosinin hem sentetik ortamda hem de sütte bakterisidal etkisinin olduğu, geniş bir pH aralığında ve 60 °C'ye kadar aktif olduğu bildirilmiştir. Ayrıca basillosin 490'ın *Listeria innocua*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus smithii* gibi patojen veya gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilere karşı etkin bir aktivite spektrumu olduğu belirlenmiştir. Yine termofilik bir tür olan *Bacillus thermoleovorans*'a ait iki suşun “termoleovorin” adı verilen bir bakteriyosin ürettikleri ve bu bakteriyosinin *Salmonella thyphimurium*, *Branhamella catarrhalis* ve *Streptococcus faecalis* gibi bakterilerin gelişimini engellediği bildirilmiştir (Novotny ve Perry, 1992).

Literatür bilgilerinden de anlaşıldığı üzere ekstrem koşullarda yaşayan termofillerin çeşitli düzeylerde etkili antimikrobiyal polipeptidler (veya bakteriyosinler) içerdiği görülmektedir. Bu bilgiler, araştırmamızda termofilik bakterilerden bakteriyosin izolasyonu için temel teşkil etmiştir. Tez çalışmamız kapsamında bölgemizde bulunan farklı sıcak su kaynaklarından ve topraklardan termofilik bakteriler izole edilmiştir ve bu sayede geniş bir termofilik bakteri kültür koleksiyonu oluşturulmuştur. İzole edilen bakteriler antibakteriyal madde üretimi açısından taranmıştır. Termofilik bakterilerin ürettiği bakteriyosinlerin çalışılmasıyla aynı zamanda ileride yapılacak olan pek çok bilimsel ve endüstriyel çalışma için temel teşkil edebilecek verilerin toplanması hedeflenmiştir. Ayrıca, termofilik bakterilere ait suşların ürettikleri bakteriyosinlerin çeşitli indikatör mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, gıda endüstrisinde istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini engellemek üzere yeni bir potansiyel sağlayacaktır.

Ülkemiz ve özellikle Ege bölgesi ekstrem doğal ortamlar bakımından oldukça zengindir. Bu doğal kaynaklardaki termofilik bakterilerin izole edilerek araştırılması

bölgenin ve ülkemizin doğal zenginliklerinin ortaya çıkarılması, özgün mikrofloramızın endüstri açısından öneminin vurgulanması ve verimli bir şekilde kullanılmasının ülke ekonomisine katkı sağlayacağını düşünülmesi bakımından önem taşımaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. BAKTERİYOSİNLERİN TARİHÇESİ

Bakteriyosin olarak tanımlanan maddeler, bakteriler tarafından üretilen, küçük, ısıya dayanıklı peptidlerdir, diğer bakterilere karşı da etkindirler ve üretici bakteri kendi bakteriyosinine karşı spesifik bağışıklık mekanizmasına sahiptir (Cotter *et al.*, 2005). Bakteriyosin araştırmalarındaki önemli gelişmelerin çoğu kolisinlerin araştırılmasından köken almıştır. Kolisinler *Enterobacteriaceae* familyasının çeşitli üyeleri tarafından üretilen prototip bakteriyosinlerdir ve bu moleküllerin, genetik temeli, yapısal özellikleri, oluşma şekilleri ve öldürücü etkileri hakkında yapılan araştırmalar sayesinde oldukça fazla bir bilgi birikimi oluşmuştur. Bununla birlikte, son yıllarda gram pozitif bakterilerin özellikle, laktobasillerin bakteriyosin benzeri aktiviteleri üzerinde yoğunlaşan çalışmalarda artış görülmektedir. Bu bakterilerin pek çoğu gıda endüstrisinde günümüzde kullanılan bakterilerdir (Jack *et al.*, 1995).

Tarihsel süreçte, Jack *et al.* (1995)'a göre, Pasteur ve Joubert, 1800'lü yıllarda bakteriler arasındaki antagonistik ilişkilere dair gözlemlerini sistematik olarak kaydeden ilk araştırmacılarıdır. İki araştırmacı, deneysel olarak enfekte ettikleri hayvanlarda, *Escherichia coli*'nin antraks basilinin gelişimini engellediğini gözlemişlerdir ve bu gerçeğin terapötikler açısından büyük bir gelecek vaat ettiğini vurgulamışlardır. Bu araştırmaları izleyen 30-40 yıl içerisinde hastalık yapma potansiyelleri nispeten düşük olan bakterilerin, potansiyel patojenlerden korunmada yani "bakteriyoterapi"de kullanımı üzerine yoğun araştırmalar yapılmıştır. Bu tür çalışmalarda antraks, en popüler hedef hastalıklardan biri olmaya devam etmiştir ve *Bacillus anthracis*'in *in vivo* veya *in vitro* gelişimini engelleyen pek çok antagonist tür bildirilmiştir. Bunlar hem gram pozitif (stafilokoklar, mikrokoklar, streptokoklar), hem de gram negatif (pseudomonadlar) türleri içermektedir. Ancak, bu tür denemelerdeki gözlemler, deneysel olmaktan çok klinik verilere dayandığı için, antibiyotik aktiviteden kaynaklananların sayısı kesin değildir. Ayrıca, o yıllarda henüz herhangi bir kimyasal inhibitör bileşiğin izolasyonu ve karakterizasyonuna dair bir bilgi de yoktur. Bugünkü bilgi birikimimize göre, gözlenen etkilerin çoğu,

muhtemelen geniş spektrumlu aktif inhibitör ajanlardan kaynaklanmıştır. Jack *et al.*, (1995)'de yer alan bilgilere göre, bakteriyoterapi ile ilgili diğer bir yaklaşımda ise, *E. coli*'nin “yüksek indeks” suşlarının intestinal mikrofloraya dahil edilmesi gündeme getirilmiştir. Bu index, Nissle (1916) tarafından geliştirilmiştir ve birlikte kültürü yapılan test sistemlerinde, *E.coli* suşunun *Salmonella thyphi* bakterisini öldürebilme yeteneğinin derecesini ifade etmektedir. Bu özellik açısından en iyi suşların “Mutaflor” adı altında ticari olarak dağıtımı yapılmış ve ürünler, kabızlık, dizanteri ve tifoid hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Bununla birlikte, o yıllarda hala bu bakterilerin laboratuvar ve klinik ortamlardaki antagonistik etkinlikleri hakkında tartışmalar sürüyordu ve bu antagonizmi açıklayacak bir inhibitör ajanın karakterizasyonu yapılmamıştı. Nihayet, 1925 yılında Gratia, *E.coli* tarafından üretilen bir antibiyotik ajanın yapısı ile ilgili net bir makale yayınladı. Araştırmaya göre *E.coli* strain V (V=deneysel enfeksiyonlarda virulent), sıvı ortamda, *E.coli* ϕ suşunun gelişimini önleyen, diyaliz edilebilir ve ısıya dayanıklı bir bileşik ürettiyordu. Bu bulguları izleyen dönemde *E.coli* bakterisinin ürettiği tüm kolisin tipleri keşfedildi. Kolisin V'nin ise, boyutlarının küçük olması ve ısı stabilitesi gibi özelliklerinden dolayı diğer kolisinlerden ayrıldığı ve mikrosin tanımına daha uygun olduğu saptandı. Kolisinlerle ilgili bilgiler Fredericq tarafından yapılan çalışmalarda büyük oranda artmıştır (Fredericq, 1948; Fredericq, 1957; Fredericq, 1967). Spesifik kolisin resistant (reseptörden yoksun), mutantlara karşı etkileri baz alınarak, 20'den fazla kolisin çeşidi tanımlanmıştır. Fredericq aynı zamanda, bazı stafilokok suşlarının diğer stafilokoklara ve bazı gram pozitif bakterilere karşı etkin, fakat gram negatif bakterileri etkilemeyen maddeler ürettiklerini gözlemiş ve bunlara “stafilokokkin” adını vermiştir. Fakat, stafilokokkinler, reseptör bazlı kolisin sınıflandırılmasında olduğu gibi, başarılı bir şekilde sınıflandırılmamıştır (Jack *et al.*, 1995).

Gram pozitif bakteriler arasındaki antagonizm ise, ilk olarak Babes (1885), tarafından katı ortamda ve stafilokok suşları arasında gözlenmiştir. Klinik gözlemler sonucunda, stafilokokların *Corynebacterium diphtheriae* bakterisini inhibe ettiği saptanmış ve stafilokok içeren burun ve boğaz spreylere difteri enfeksiyonlarının tedavisinde etkin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kolisin benzeri antibiyotik bileşiklerin, nonkoliform bakteriler tarafından da üretildiğinin bulunmasından sonra,

ilk kez, daha genel bir ifade olan “bakteriyosin” terimi türetilmiştir. Bakteriyosinler, kolisin tipteki protein antibiyotikler olarak tanımlanmıştır. Yani, letal biyosentez, özellikle tür içi suşları öldürme aktivitesi ve bakteriyosine duyarlı hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere tutunma özellikleriyle karakterize edilen moleküllerdir. Bu özelliklere ek olarak kolisinler nispeten yüksek molekül ağırlığına sahiptirler ve genetik determinantları plazmid kökenlidir (Jack *et al.*, 1995).

1976 yılında gram pozitif bakterilerin bakteriyosinleri ile ilgili derlemede, bakteriyosin alanındaki pek çok araştırmanın gram negatifler tarafından üretilenler üzerine yoğunlaştığı, ancak gram pozitif bakterilerce üretilen bakteriyosinler hakkında yapılan çalışmaların arttığından bahsedilmektedir (Tagg *et al.*, 1976). Gerçekte günümüzdeki yayınların çoğu, gram pozitif bakterilerin bakteriyosin benzeri aktiviteleri üzerinedir. Bu tür bir ilginin canlanmasının sebebi ise, bakteriyal hastalıklardan korunma ve tedavide veya gıdaların korunmasında bu tür ajanların potansiyellerinin farkedilmesidir.

2.2. BAKTERİYOSİNLERİN SINIFLANDIRILMASI VE GENEL ÖZELLİKLERİ

Sınıflandırma ve bakteriyosinlerin taksonomisi bu yüzyılın başından beri oldukça hızlı bir şekilde değişmiştir. İlk sınıflandırılan grup kolisinlerdir ve Fredericq (1957), tarafından önerilen şemaya göre, bunlar ilk olarak reseptöre tutunma özelliklerine göre, daha sonra ise spesifik immunitelerine göre gruplara ayrılmışlardır. Örneğin kolisin E1, E2 ve E3 immuniteleri bakımından birbirlerinden farklıdır. Ancak hepsi grup E içerisinde yer alır, çünkü aynı reseptöre adsorbe olurlar. Benzer olarak kolisin 1a ve 1b ortak bir reseptöre sahiptir, grup 1 içerisinde yer alırlar, fakat bağışıklık özgüllükleri farklıdır. Pek çok bakteriyosin detaylı olarak çalışılmış ve sonuçta, direnç spektrumlarına göre alt gruplara ayrılmışlardır. Üretici suşun numarasını takiben orjinal harf eklenir, örneğin kolisin CA23 Tip D kolisindir ve *E.coli* CA23 suşu tarafından üretilir (Daw ve Falkiner, 1996).

Reeves, bakteriyosin üreten türleri temel alarak 16 ayrı bakteriyosin sınıfı oluşturmuştur. Bakteriyosinler oldukça özgül moleküller oldukları için adlandırma cins isminden ziyade tür isimleri kullanılarak yapılır. Örneğin, *E.coli*'nin bakteriyosinleri kolisin, *Pseudomonas aeruginosa* (önceden *pyocynia*)'ninkiler pyocin, *Enterobacter cloacae*'nin bakteriyosini kloasin, *Bacillus cereus*'unki serein olarak adlandırılır. Bu sınıflandırma, aktivite spektrumuna göre değil, üretici organizmaya göre yapılmıştır (Reeves, 1965).

Bradley, bakteriyosinlerin sınıflandırılması için, onların doğal yapılarını temel alan bir taksonomik kriter oluşturmuştur. Bakteriyosinler düşük ve yüksek molekül ağırlıklı olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmıştır. İlk grup, küçük, ısıya dayanıklı, ultrasantrifigasyon ile çökelmeyen ve elektron mikroskopla saptanamayan bakteriyosinlerdir. İkinci grup ise, daha büyük molekülleri içerir, kolayca çökelirler, ısıya dayanıksız, trypsine dirençlidirler ve elektron mikroskopta saptanabilirler (Bradley, 1966).

Bakteriyosin terimi genelde *Enterobacteriaceae* suşları tarafından üretilen kolisin tip proteinleri belirtmek için kullanılır. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğu klasik bakteriyosin terimine uymaz. Bunlar, Gram pozitif suşlara karşı daha geniş bir aktivite spektrumuna sahiptirler, etkinlikleri spesifik reseptörlerce yönlendirilir ve hücreden salınmaları lizinler sayesinde artar. Ayrıca Gram pozitif bakterilerde dış membranın olmaması ve üretici suşun kendi bakteriyosinine karşı bağışıklık oranındaki farklılıklar, bunların ayrıca sınıflandırılmasını gündeme getirmiştir. Tagg (1992), son zamanlarda tanımlanan non-kolisin tipteki partiküllerin özelliklerini göz önünde bulundurarak bakteriyosin teriminin yeniden tanımlanmasını ya da bu tür partiküllerin BLIS (Bacteriocin Like Inhibitory Substances) olarak adlandırılmasını önermiştir.

Klaenhammer (1993), Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinleri dört farklı grup altında sınıflandırmıştır. Sınıf I bakteriyosinler, lantibiyotikler olarak da adlandırılırlar ve translasyondan sonra değişikliğe uğrayarak (post-translational modification) aktif hale geçen ve dehidre kısımlar (dehidroalanin, dehidrobutirin), lantionin ve β -metillantionin içeren küçük peptidlerdir (Deraz, 2005).

Nisin, bu gruptaki bakteriyosinler arasında en fazla çalışılmış olandır ve pek çok patojen ve gıdalarda bozunmaya neden olan bakterilere karşı aktiftir.

Sınıf II bakteriyosinler ısıya dayanıklı, düşük molekül ağırlığına sahip, membran-aktif peptidlerdir. Sınıf III üyesi bakteriyosinler ise molekül ağırlıkları büyük, ısıya dayanıklı olmayan grubu oluştururken, Sınıf IV grubunda yer alanlar, aktiviteleri için protein olmayan bir kısma (örn: karbohidrat, lipid) gereksinim duyan kompleks bakteriyosinlerdir.

Jack *et al.*, (1995), bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında ve aktivite spektrumlarında disülfid ve monosülfid (lantionine) bağların temel oluşturduğunu belirtmişlerdir. Buna göre bakteriyosinler, dört grup altında sınıflandırılmıştır. İlk sınıf, dehidroalanin, dehidrobütürin, lantionin veya β -metil lantionin gibi posttranslasyonel olarak modifiye olmuş aminoasitler içeren antibiyotikler yani lantibiyotiklerdir. İkinci grup ise, aktivite gösterebilmek için en azından bir disülfid köprüsüne ihtiyaç duyan cystibiyotiklerdir. Antibiyotiğin aktivitesi için indirgenmiş formda tek bir -SH rezidüsü içeren thiolbiotikler ise 3. grubu oluşturur. Son grupta ise, sistein kısmı içermeyen antibiyotikler yer alır (Çizelge 2.1.) (Jack *et al.*, 1995).

Çizelge 2.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması (Jack *et al.*, 1995)

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

Cotter *et al.* (2005), yayınladıkları makalede bu sınıflandırma sistemi için düzeltme önermişlerdir (Çizelge 2.2.). Önerilen düzeltilmiş sınıflandırmaya göre, bakteriyosinler başlıca iki farklı kategori altında sınıflandırılmışlardır. Sınıf I lantionin içeren Lantibiyotikler; Sınıf II ise Lantionin içermeyen bakteriyosinlerdir. Önceki sınıflandırma sisteminde Sınıf III olarak bilinen, büyük, ısıya dayanıksız, mürein hidrolazlar ise “Bakteriyolizinler” olarak ayrıca sınıflandırılmışlardır. Klaenhammer’in sınıflandırmasında IV. Grupta yer alan bakteriyosinler ise aktivite için peptid olmayan bir kısma ihtiyaç duyan bakteriyosinlere ayrılmıştır. Fakat günümüzde, bu tür bir bakteriyosinle ilgili henüz inandırıcı ve kesin bilgiler olmadığı için önerilen yeni sınıflandırmaya dahil edilmemişlerdir. Kemperman *et al.* (2003), halkasal yapıdaki LAB bakteriyosinlerinin Sınıf V bakteriyosinler olarak gruplandırılmasını; Cotter *et al.*, ise bu grubun da Sınıf II kategorisine dahil olabileceğini önermişlerdir (Cotter *et al.*, 2005).

Çizelge 2.2. Gram pozitif bakterilerin ürettikleri bakteriyosinler (Cotter 2005)

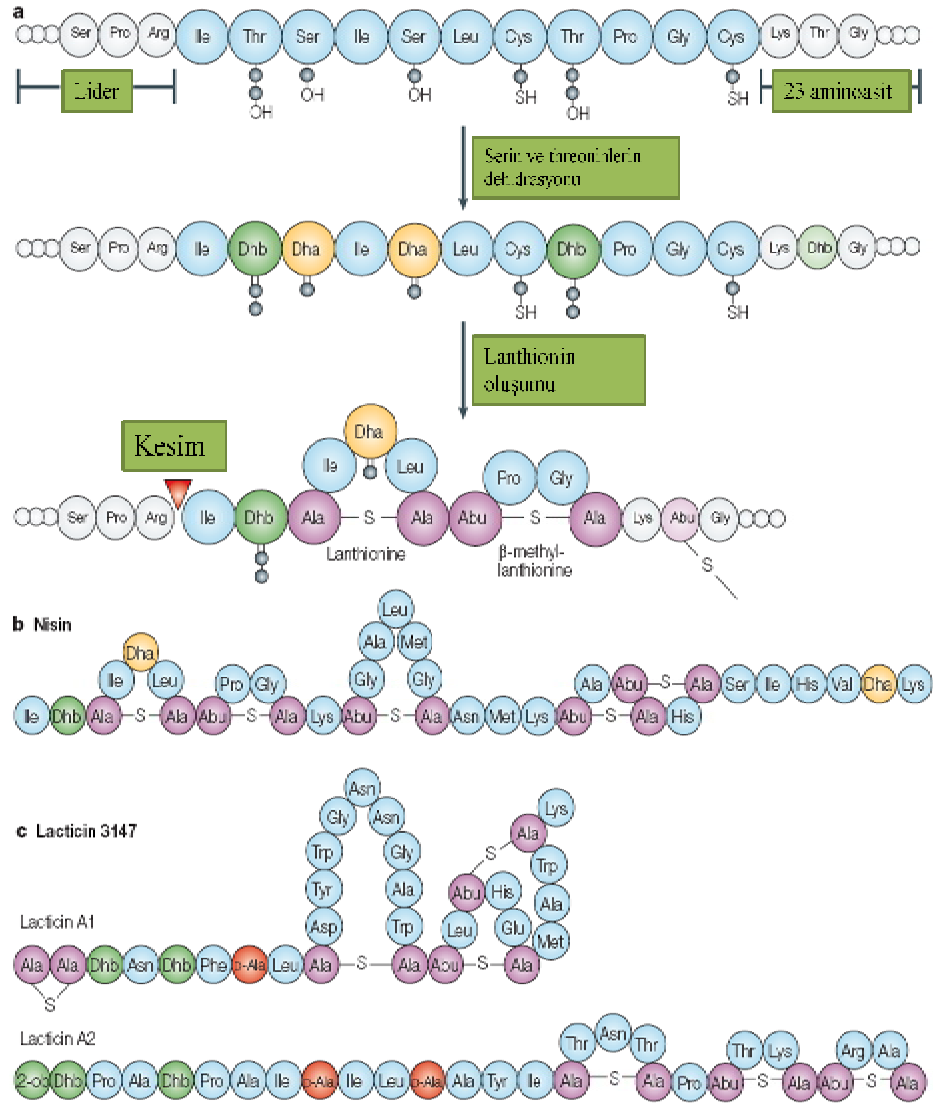
SINIF I Lantionin içeren bakteriyosinler/ Lantibiyotikler	SINIF II Lantionin içermeyen bakteriyosinler	BAKTERİYOLİZİNLER Bakteriyosin olmayan litik proteinler**
<p>Hem tek hem de iki peptidli lantibiyotikler; 11 alt sınıf önerilmiştir.</p> <p>Tek peptidli: Nisin, mersacidin, Laktisin 481</p> <p>İki peptidli: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

2.2.1. Sınıf I bakteriyosinler (Lantibiyotikler)

Lantibiyotikler (lantionin içeren antibiyotikler) 19-38 aminoasit uzunluğunda küçük peptidlerdir ve lantionin veya β -metillantionin kısımlar içerirler (Şekil 2.1). Bu alışılmadık kısımlar, aminoasitler arasında kovalent köprüler oluşturur ve bunun sonucu olarak yapıda iç “halkalar” oluşur ve lantibiyotiğe kendine özgü özelliklerini kazandırır. Dahası, lantibiyotikler, posttranslasyonel modifikasyon sonucu başka alışılmadık yapılar da kazanabilirler, D-alanin’in D-serin’e dönüşümü buna örnek olarak verilebilir (Pag ve Sahl , 2002; Xie ve Van der Donk, 2004).

Lantibiyotikler yapısal özellikleri ve etki tarzlarına göre sınıflandırılabilir. Genelde, uzamış amfifilik katyonik lantibiyotikler (örneğin nisin), duyarlı hücrelerde, hücre zarında porlar oluşturarak, membran potansiyelini bozar ve küçük metabolitlerin hücre dışına çıkmasına neden olur. Bu durumun tersine, globular lantibiyotikler ise (örneğin mersasidin), enzim inhibisyonuna neden olur (Jung, 1991).

Bununla birlikte yakın bir zamanda nisinin her iki mekanizmayla etkin olduğu, laktisin 3147 gibi iki-peptidli lantibiyotiklerin ise iki lantionin içeren peptidlerin birlikte iş görmesiyle etkin oldukları gösterilmiştir. Kompleks yapıları nedeniyle lantibiyotikleri alt sınıflara ayırmak güçleşmektedir. Bu durumu kolaylaştırmak için modifiye olmamış pro-peptidlerinin dizileri temel alınarak 11 alt gruba ayrılmaları önerilmiştir (Cotter *et al.*, 2005).



Şekil 2.1. Lantibiyotiklerin oluşumu (Cotter *et al.*, 2005)

Gram pozitif bakterilerin bakteriyosinleri içinde, aynı zamanda virulans faktör de olan bakteriyosinler bulunmaktadır. Enterokoklardan elde edilen ve bir lantibiyotik olan sitolizin hücre tipleri açısından geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Pek çok Gram pozitif bakteri, insan, sığır ve at eritrositleri gibi ökaryotik hücreler, retinal hücreler, polimorf lökositler ve insan bağırsağındaki epitel hücrelerine etkilidir ve insanlarda akut enfeksiyonların oluşmasına neden olur (Cox *et al.*, 2005). Diğer bir peptid olan hemolizin (lantionin içermeyen), Streptolizin S, bazı grup A streptokokları tarafından oluşan invaziv enfeksiyonlarda rol oynamaktadır (Datta *et al.*, 2005).

2.2.2. Sınıf II bakteriyosinler (Lantionin içermeyen bakteriyosinler)

En yaygın lantionin içermeyen bakteriyosinler, küçük (<10 kDa), ısıya dayanıklı peptidlerdir, fakat, lantibiyotiklerden farklı olarak bunlar post-translokasyonel değişime uğramazlar. Sınıf II bakteriyosinlerin çoğu membran geçirgenliğini artırarak (nanomolar aralıkta bile) hedef bakteriden moleküllerin çıkmasına neden olur. Bu sınıf için pek çok gruplandırma önerilmiş olsa da heterojen yapılarından dolayı sağlıklı bir sınıflandırma yapmak zordur. Tüm sınıflandırma sistemlerinde kabul gören 2 grup bulunmaktadır; Sınıf IIa pediosin benzeri (ya da *Listeria*-aktif) ve Sınıf IIb iki-peptidli bakteriyosinler (Cotter *et al.*, 2005).

Pediosin benzeri bakteriyosinlerin aktivite spektrumu dardır, fakat gıda patojeni olan *Listeria monocytogenes*'e karşı yüksek bir spesifik aktivite gösterirler. Bu bakteriyosinler 37 (leukosin A ve Mezenterisin Y105)- 48 (carnobakteriyosin B2) rezidü içerirler ve bir veya iki disülfid köprüleri vardır. Peptidler arasındaki koruma hidrofilik, katyonik N-terminal (pediosin box) kısmında görülür. Bu kısım, YGNGVXCXXXXVXV (X herhangi bir aminoasit) şeklinde aminoasit dizisi içerir ki bu dizinin hedef yüzeyine non-spesifik bağlanmadan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Nieto *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1997; Eijsink *et al.*, 1998; Kazazic 2002). C-terminal kısımlar ise bir hinge kısımdan sonra gelir, daha az korunmuştur ve non-listerial spektrumdan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Johnsen *et al.*, 2005).

İki-peptidli bakteriyosinler, her iki bakteriyosinin kombine çalışmasına gereksinim duyar. Membran potansiyelini bozarak, iyonların kaçışına ve/veya hücre içi ATP konsantrasyonunun azalmasına neden olurlar (Garneau *et al.*, 2002). Bu peptidler ayrı ayrı test edildiklerinde çok düşük aktivite gösterirler. Bu alt-grubun üyeleri nispeten heterojen olsalar da tip E (enhanced) ve tip S (sinerjistik) peptidler olarak gruplandırılabilirler (Marciset 1997).

Sınıf IIc bakteriyosinler (önceden Sınıf V) kovalent olarak bağlanmış N- ve C-terminalleri dolayısıyla halkasal yapıdadırlar ve bu uçlar baz alınarak gruplandırılırlar. Nispeten az sayıda Sınıf IIc bakteriyosin tanımlanmış olsa da, aminoasit dizisi benzerliğine göre iki alt sınıf önerilmektedir. Alt sınıf c (i), enterocin

AS48 ve non-LAB circularin A bakteriyosinlerini içerir. Altsınıf c (ii), gassericin A, reutericin 6 ve non-LAB butyrivibriocin AR10 ve acidocin B bakteriyosinlerini içerir. Gassericin A ve reutericin 6 non-lantibiyotik LAB bakteriyosinleri içerisinde D-aminoasitleri içeren nadir örneklerdir (Kawai *et al.*, 2004; Maqueda *et al.*, 2004).

Diğer bakteriyosinler ise tek peptidli linear grup altında toplanabilirler (Sınıf IId) ve lider dizileri temel alınarak daha ileri düzeyde sınıflandırılabilirler (Diep ve Nes 2002).

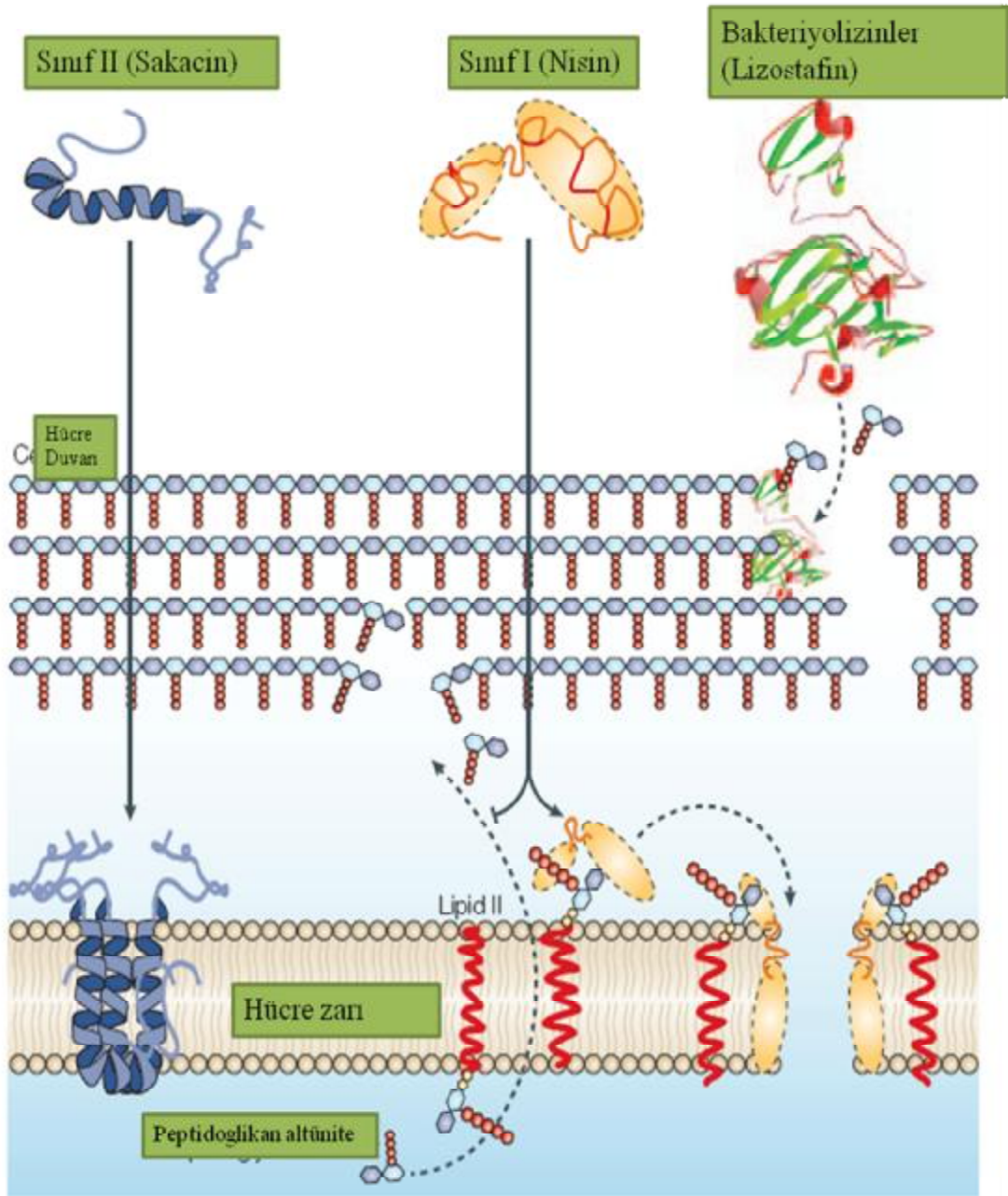
2.2.3. Bakteriyosin olmayan litik proteinler (Bakteriyolizinler)

Bakteriyolizinler, önceden Sınıf III bakteriyosinler olarak sınıflandırılmışlardır. Molekül ağırlıkları büyük, ısıya dayanıksız antimikrobiyal peptidlerdir. Translokasyon, reseptör bağlanması ve letal aktivite için farklı kısımların iş gördüğü domain tip yapıya sahiptirler. Günümüzde, sadece dört tanesi genetik olarak karakterize edilmiştir (Cotter *et al.*, 2005). Etki mekanizmaları bakteriyosinlerden farklıdır. Hücre duvarının hidrolizini katalizleyerek duyarlı hücrelerin parçalanmasına neden olurlar. Bu proteinler aynı zamanda modüler yapıdadırlar ve N-terminalde endopeptidazlarla homoloji gösteren katalitik bir kısım, C-terminalde de hedef tanıma bölgesi içerirler (Lal, 2002; Johnsen, 2004). Gerçek bakteriyosinlerin tersine, yapısal bakteriyosin genleriyle birlikte bulunan spesifik bağışıklık genlerine her zaman sahip değildirlere. Muhtemelen, üretici hücrenin hücre duvarındaki modifikasyonlar sonucu bağışıklık kazanırlar (Cotter, *et al.*, 2005).

2.3. LAB BAKTERİYOSİNLERİNİN ETKİ MEKANİZMALARI

LAB bakteriyosinleri yapısal özelliklerinin yanı sıra etki mekanizmaları temel alınarak da sınıflandırılabilir. Sınıf I bakteriyosinlerin bazıları, örneğin nisinin, ikili bir etki mekanizması olduğu gösterilmiştir. Bunlar, peptidoglikan alt ünitelerini taşıyan esas molekül olan Lipid II'ye bağlanabilir. Bu sebeple, sitoplazmadan hücre duvarına peptidoglikan alt üniteleri taşınmaz ve hücre duvarı sentezi doğru şekilde gerçekleşemez bunun sonucunda hücre ölür. Daha önemlisi, bunlar, Lipid II'yi tanıma molekülü olarak kullanarak, membrana yerleşebilir ve membranda por

oluşturmaya başlayarak hızlı hücre ölümüne neden olurlar. Laktisin 3147 gibi iki peptidli lantibiyotikler bu tür iki aktiviteye birden sahipken, mersasidin sadece Lipid II'ye bağlanma aktivitesine sahiptir, por oluşturmazlar. Genelde Sınıf II peptidler amfifilik heliks yapıdadır, bu sayede hedef hücrenin membranına yerleşebilirler, depolarizasyona ve hücre ölümüne neden olurlar. Büyük bakteriyolitik proteinler (bakteriyolizinler), örneğin Lizostafin, doğrudan Gram pozitif hedef hücrelerin hücre duvarına etki ederek, hücrelerin parçalanmasına ve ölümüne yol açar (Şekil 2.2) (Cotter *et al.*, 2005).



Şekil 2.2 LAB bakteriyosinlerinin etki mekanizmaları (Cotter *et al.*, 2005)

2.3.1. Sınıf I Lantibiyotiklerin etki mekanizmaları

Lantibiyotikler, yapıları temel alınarak grup A (elongated) ve grup B (globular) olarak iki alt gruba ayrılırlar ve farklı mekanizmalarla iş görürler. Tip A bakteriyosinler, örneğin nisin ve epidermin duyarlı hücrelerin sitoplazmik zarlarında potansiyele bağlı porlar oluşturarak zarları de-enerjize ederler ve sitoplazmadaki küçük moleküllerin ve iyonların hücre dışına çıkmasına neden olurlar. Tip B lantibiyotikler ise, örneğin mersasidin enzim inhibitörüdür (Diep ve Nes, 2002) .

Nisin, öncelikle Gram pozitif hücrelere karşı etkilidir. Nisin sebebiyle por oluşması sonucu bakterinin proton-motive gücü ayrışır, yaşamsal öneme sahip iyonlar hücre dışına çıkar ve hücre ölür. Dış membranın kimyasal olarak indüklenmiş bir zarar görmesi sonucu *E. coli* veya *Salmonella* türleri gibi Gram negatif bakterilere karşı da etkili olabilirler (Boziaris *et al.*, 1998; Boziaris *et al.*, 1999; Ganzle *et al.*, 1999).

Başlangıçta, nisinin antimikrobiyal aktivitesinin, dehidro kısımları sayesinde, enzimlerin sülfüdril gruplarıyla etkileşmesi sonucu oluştuğu veya hücre duvarı sentezini engellediği sanılıyordu. Nisikle temas eden bakteriyal hücrelerle ve izole edilen plazma membran vezikülleriyle yapılan çalışmalar sonucunda nisinin, aminoasitler, ATP, veya önceden birikmiş rubidyum gibi küçük sitoplazmik bileşenlerin hızlıca kaybına neden olduğu görülmüştür (Ruhr ve Sahl, 1985; Jack *et al.*, 1995). Bu yüzden nisinin hedefinin bakteriyal plazma membranı olduğu ve duyarlı hücreleri por oluşturarak öldürdüğü düşünülmektedir.

Mersasidin ve nisinin etki mekanizması üzerine yapılan çalışmalar, her iki bakteriyosinin de hedef bakterinin hücre duvarında bulunan reseptör benzeri moleküle etkileşime girdiğini göstermiştir. Reseptör, veya daha çok bilinen tanımıyla tanıma molekülü, hücre duvarı sentezinin öncülü olan Lipid II'dir (Brotz *et al.*, 1998; Brotz *et al.*, 1999; Breukink *et al.*, 1999; Wiedemann *et al.*, 2001). Bu peptidler spesifik olarak lipid II'ye bağlanırlar ve etkileşim o kadar güçlüdür ki SDS elektroforezin denatüre edici şartları altında bile mersasidin ve Lipid II kompleksi ayrılmamıştır. Nisin ve mersasidin, Lipid II'ye bağlanırlarken birbirlerini engellemezler, muhtemelen farklı tanıma bölgelerine sahiptirler. Epidermin ve Pep

5'de Tip A por oluşturan bakteriyosinlerdir. Fakat Pep 5; nisin, epidermin ve mersasidinden farklı bir molekülü tanımaktadır. Çünkü bu bakteriyosin, nisin ve epiderminle parçalanmış, Lipid II içeren lipozomlarda por oluşturmamaktadır ve farklı bir inhibisyon spektrumuna sahiptir (Brotz *et al.*, 1998). Diğer lantibiyotikler ise spesifik bir tanıma molekülü ile etkileşime girmektedirler, ancak bu sorunun yanıtı daha ileri çalışmalarla verilebilecektir.

Yapılan pek çok çalışmada nisinin, etki mekanizmasının oldukça kompleks olduğu ve çok farklı seviyelerde aktivite gösterdiğine işaret edilmiştir. Nisinin, sadece saflaştırılmış fosfolipid içeren yapay membranlar da dahil, membran çift tabakalarında (bilayer) iyon geçirgen porlar oluşturduğu iyi bilinmektedir. Lipid II varlığında por oluşumu "stabilize" iken ve bakteriyosin düşük konsantrasyonlarda bile etkili iken, *in vitro* denemeler göstermiştir ki Lipid II yokluğunda nisin tarafından indüklenen porlar daha az stabildir ve zarların bozunması için daha yüksek konsantrasyonlarda bakteriyosine ihtiyaç vardır (Van Den Hooven *et al.*, 1996; Van Kraaij *et al.*, 1998).

Nisin, hücre duvarı öncüsü Lipid II'yi tanıyıp membran çift tabakasına tutunduğunda peptidoglikan sentezini önleyici bir potansiyele sahiptir (Brotz *et al.*, 1998; Breukink *et al.*, 1999). Wiedemann *et al.* (2001) yaptıkları çalışmada pek çok nisin mutanını kullanmışlar ve Lipid II'ye tutunmaktan ve por oluşturmaktan sorumlu yapıları araştırmışlardır. Sonuçta, nisindeki N-terminal ucun Lipid II ile etkileştiği, C ve D halkaları arasındaki hinge (menteşe benzeri) bölgenin ise por oluşumunda önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. Bu bölge açısından mutant olanlar, lipozomlarda por oluşturmamasalar da, duyarlı hücrelerin gelişimini hala önleyebilmektedirler. *In vitro* denemeler sonucu, hinge bölge mutantlarının, lipid II'ye ilgisi azalmış N-terminal mutantlarına göre peptidoglikan sentezini önlemede daha etkili oldukları bulunmuştur. Bu bulgular nisinin çoklu etki mekanizması (por oluşumu+ hücre duvarı sentezinin önlenmesi) olduğunu desteklemektedir. Lipid II'ye bağlanan diğer bakteriyosinlerin ise bu tür çoklu etki mekanizmalarının olup olmadığı merak konusudur.

Örneğin, Tip B mersasidin ile yapılan çalışmalarda ne biyolojik ne de yapay membranlarda por oluşumu gözlenmemiştir. İki peptidli lantibiyotiklerin benzer bir tanıma molekülüne ihtiyaç duyup duymadıkları hakkında bilinenler azdır.

2.3.2. Sınıf II bakteriyosinlerin etki mekanizmaları

Hepsi olmasa da Sınıf II bakteriyosinlerin çoğu por oluşturan antimikrobiyal ajanlardır. Bunların çoğu, helikal bir ekseninde gösterildiklerinde, amfifilik bir yapıya sahiptirler. Polar kısım, membrandaki kanalın merkezinde iken, non-polar kısım fosfolipid tabakanın hidrofobik kısmına doğru yerleşir. Bakteriyosinlerin özgülükleri ile ilgili yapılan çalışmada, Sınıf II bakteriyosinlere dahil olan Laktokokkin A'nın yalnızca diğer laktokoklara karşı etkili olduğu bulunmuştur. Etki mekanizması araştırıldığında duyarlı laktokok hücrelerinin membran geçirgenliği sonucu öldüğü belirlenmiştir. Sadece tüm hücreler değil, aynı zamanda duyarlı hücrelerden hazırlanan membran vezikülleri de normal Laktokokkin A konsantrasyonlarında permeabilize olmuştur. Diğer yandan, hedef hücrelerden lipozomlar (protein ve diğer non-lipid bileşenlerden yoksun yapılar), hazırlandığında, Laktokokkin A lipozomların bozulmasını indükleyememiştir. Bu durum, hedef hücre ve bakteriyosin arasındaki tanıma işleminde reseptörlerin yer aldığına dair ilk kanıttır (Van Belkum *et al.*, 1991).

Pediosin benzeri bakteriyosinler, N-terminal uçlarındaki ortak sekans motifleri (YGNGVXCXK/ NXXC) ve antilisterial etkileri ile diğerlerinden ayrılırlar (Nes ve Holo, 2000). Laktokoklar dışındaki pekçok laktik asit bakterileri başta olmak üzere, Gram pozitif bakterilerden bu tür 20'den fazla bakteriyosin tanımlanmıştır. Pediosin benzeri bakteriyosinlerin por oluşturmalarında reseptör benzeri moleküllerin yer aldığı gösteren ilginç çalışmalar bulunmaktadır. *E. faecium* ve *L. monocytogenes*'in mezenterisin Y105'e karşı duyarlı olabilmesi için σ^{54} RNA polimeraza ihtiyaç duyulmaktadır. σ^{54} faktöre mannoz PTS permeaz operonunun ekspresyonunda ihtiyaç vardır (Dalet *et al.*, 2000).

Şekerlerin PTS permeaz ekspresyonunu indükledikleri bildirilmiştir. Görünürde, EII (+) (Man) ekspresyonu glukoz ve mannoz varlığında indüklenmektedir ve *E.*

faecium'un bakteriyosine duyarlılığını artırmaktadır. Permeaz operonunda yapılan knock-out deneyleri sonucunda, *mptD* genindeki (interruption) kesilmenin, mezenterisin Y105'e karşı direnç oluşumuna neden olduğu saptanmıştır. Bu gen E II (+) (Man)'nın IID aktivitesini kodlar. Muhtemelen MptD proteini mezenterisin Y105 ile özel etkileşime girerek (reseptör veya tanıma bölgesi olarak) hedef özgüllüğünü belirlemektedir (Hechard *et al.*, 2001).

Fimland *et al.*, (1996) tarafından yapılan çalışmada, pediosin PA-1'in C-terminal ucunun 15 rezidüsünü temsil eden kısaltılmış bir peptid kullanılmıştır. Sonuçta, bu peptidin, asıl bakteriyosine karşı antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu 15 a.a lik dizi, duyarlı hücreler üzerindeki aynı reseptör için, pediosin PA-1 ile rekabet edecek kısmı taşımaktadır. Bu durum aynı araştırma grubunun daha önceki çalışmalarında da doğrulanmıştır. Bakteriyosinin inhibisyon özgüllüğünden sorumlu kısım araştırılırken, oldukça farklı inhibisyon spektrumları olan 4 pediosin benzeri bakteriyosinin dizileri temel alınarak hibrid peptidler kullanılmıştır. Sonuçta C-terminal kısmın türe özgü tanımda önemli olduğu belirlenmiştir.

Sınıf II bakteriyosinlerin diğer bir alt grubu iki peptidli bakteriyosinlerdir. Maksimum aktivite için iki farklı peptide ihtiyaç duyarlar (Anderssen *et al.*, 1998). Bu bakteriyosinlerin peptidleri, genelde helikal bir ekseninde, amfipatik α -heliks yapıdadırlar. Bu bakteriyosinlerin oluşturduğu kanallar, substrata özgü olabilir. Örneğin *L. plantarum* C11 bu türden iki bakteriyosin üretir. Plantarisin EF monovalent katyonlar için yüksek iletkenlik gösterirken, plantarisin JK anyonların serbest geçişinde daha seçicidir (Moll *et al.*, 1999). Laktokokkin G, *Lactococcus lactis*'den elde edilen iki peptidli bir bakteriyosindir ve protonların değil, monovalent katyonların dışarı çıkmasına neden olur. Maksimum aktivite için bu peptidlerin eşit molar konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Moll *et al.*, 1998). Fakat pordaki bileşenlerin nasıl düzenlendiği, reseptör benzeri bir moleküle ihtiyaç duyulup duyulmadığı henüz aydınlatılmamıştır.

2.4. BAKTERİYOSİNLERİN GENETİĞİ VE REGULASYONU

Bakteriyosinjenik genler hem kromozom, hem de plazmidlerde yer alabilir. Bazı durumlarda bakteriyosin sentezinden sorumlu gen grupları, transpozon-benzeri elementler ya da faj DNA'sı gibi hareketli genetik elementlerde bulunabilir. Bu durum, farklı bakteri türlerinde hatta genoslarda bile, aynı bakteriyosinin nasıl bulunduğunu açıklayabilir. Örneğin Sakacin P, hem *L. sake* LB706, hem de *L. curvatus* LTH1174'de bulunur. Yakın zamanda *sap* genlerinin (Sakacin P üretiminde yer alan) taranması ile ilgili çalışmada, bu genlerin *L. sake*'nin 15 farklı izolatında bulunduğu görülmüştür ki bu izolatların çoğu sakacin üreticisi değildir. Bir bakterinin çoklu Sınıf IIa bakteriyosinleri ürettiği durumlarda genetik determinantlar farklı plazmidlerde (örneğin *E. faecium* L50), bakteriyal kromozom ve plazmidde (örneğin *Carnobacterium piscicola* LV17) veya *L. plantarum* C11'deki gibi bir lokusta yer alabilir (Diep ve Nes., 2002).

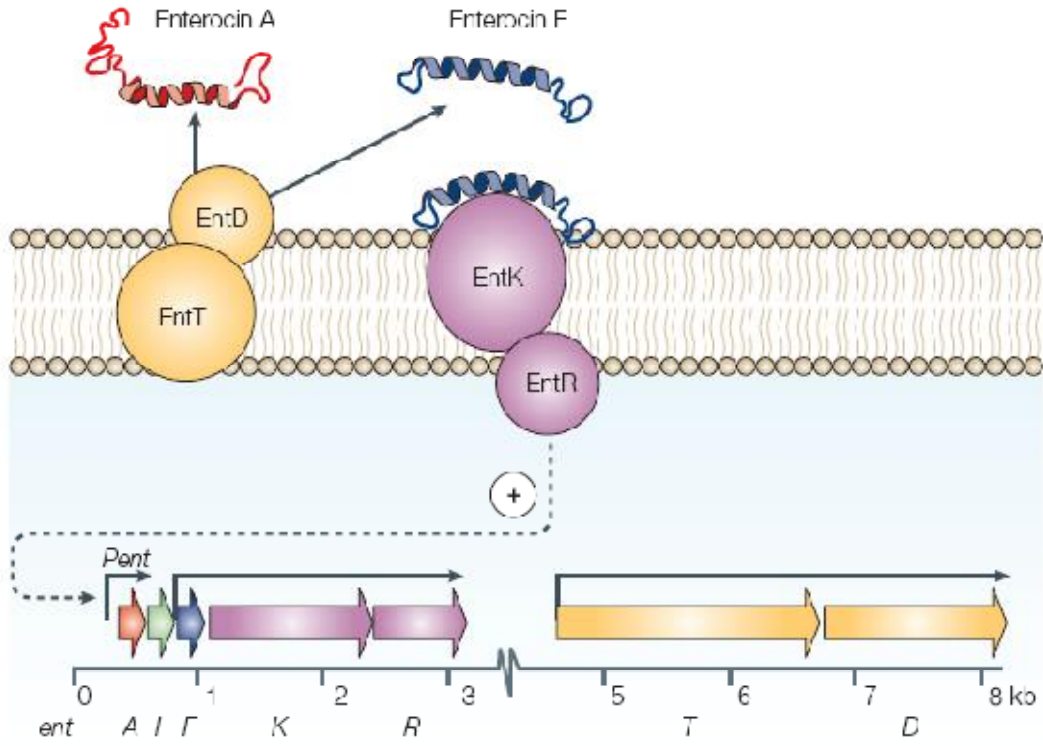
Bakteriyosinlerin üretim mekanizması incelendiğinde, laktobasillerdeki ilgili genlerin genelde konjugatif transpozonlar ya da plazmidlerce taşındığı görülmektedir. Bu doğal özellik, heterolog bakteriyosin üretimini kolaylaştırmak amacıyla kullanılabilir. Örneğin iki peptidli bir bakteriyosin olan lantibiyotik laktisin 3147'nin üretimi ve bağışıklığı için gerekli olan 10 gen, 60 kb'lik konjugatif bir plazmid üzerinde taşınmaktadır. Bu özellik sayesinde *L. lactis* DPC3147'nin atasal suşundan (non-rekombinant anlamda) çeşitli starter suşlara plazmid aktarımı sırasında bağışıklık geni marker olarak kullanılabilir (Coakley *et al.*, 1997). Bakteriyosinler, genelde bir N-terminal lider dizi içeren inaktif öncü peptid olarak sentezlenir. Bu lider dizi, muhtemelen, üretici hücre içinde, bakteriyosinin inaktif formda kalmasını sağlar, taşıyıcı ile etkileşimi kolaylaştırır. Ayrıca, lantibiyotiklerde olduğu gibi, modifikasyon sistemi tarafından tanınmakta rolü bulunmaktadır. Bu lider dizi, genelde, bakteriyosin taşıma sistemi tarafından ya da daha nadiren hücrenin genel sekresyon yol izi (Sec) ile taşıma sırasında kesilmektedir. Lider diziler içermeyen az sayıda da olsa bazı bakteriyosinler de bildirilmiştir. Yapısal öncü peptidleri kodlayan genler çoğunlukla, regulasyon, taşıma, self-bağışıklık ve (lantibiyotiklerde olduğu gibi) modifikasyondan sorumlu genlerle yakından ilişkilidir

(Diep ve Nes, 2002). Bakteriyosinlerin taşınması, ilgili membrana bağlı ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı sayesinde olmaktadır. Bu yapı aynı zamanda lider peptidin kesilmesinden sorumlu, sistein proteazlar familyasına ait bir proteolitik N-terminal kısım içerir (Haverstein *et al.*, 1995, Venema *et al.*, 1995). Bazı lantibiyotiklerde kesim, spesifik serin proteazlar tarafından yapılmaktadır (Van Der Meer *et al.*, 1993). Bazı Sınıf II peptidlerde ek proteinlerin membran translokasyonu ve lider peptidin kesimini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Ancak, rolleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Tüm bunların yanısıra, bu genel şemada pek çok varyasyon söz konusudur. Hem N-terminal, hem de C-terminali içeren durumlar ve ekstraselüler kesim bunlara örnek olarak verilebilir (Corvey *et al.*, 2003; Stein ve Entian, 2002).

Pek çok durumda, bakteriyosin üretimi ve bağışıklık mekanizmalarının regülasyonu iki bileşenli sinyal transdüksiyon sistemi ile yönlendirilir ve genelde bir quorum sensing (haberleşme ile ilgili) mekanizmasının parçasıdır. Bazı durumlarda birden fazla cevap regülatörü olabilir (Guder *et al.*, 2002; Diep *et al.*, 2003). Bunların dışında Xre familyasına ait baskılayıcılar gibi diğer regülatörler tipleri de tanımlanmıştır (McAuliffe *et al.*, 2001, Kreth *et al.*, 2004).

Bakteriyosinogenik bakteriler, bağışıklık (immunité) mekanizmasını kodlayan genler de içermektedirler. Bazı istisnalar olmakla birlikte, Sınıf I ve Sınıf II bakteriyosinlerin immunitesinde, iki farklı sistem rol oynamaktadır (Gajic *et al.*, 2003). Korunma, ilgili immunité proteini ve/veya iki veya üç alt ünite içeren özelleşmiş bir ABC taşıyıcı sistemi ile sağlanıyor olabilir. Bu sistem, muhtemelen üreticinin hücre zarından bakteriyosini pompalamaktadır (Peschel ve Gotz, 1996; Otto *et al.*, 1998; Guder *et al.*, 2002). Sınıf I bakteriyosinlerde, immunité bu sistemlerden biri veya her ikisi ile sağlanır. Sınıf IIa, IIb ve IIc bakteriyosinlerde, bağışıklık için sadece immunité proteini rol oynarken, Sınıf IIc bakteriyosinler ABC taşıyıcı sistemini kullanırlar (Diaz *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2005). İmmunité proteinleri nadiren bir diğerine benzese de, iş gördükleri mekanizma benzerdir. Yapısal protein tecrit edilir ya da bir reseptör için antagonistik rekabet olur. Bu tür bağışıklık mekanizmaları oldukça özgüldür ve genelde diğer bakteriyosinlere karşı koruma sağlamaz, ancak istisnalar mevcuttur (Eijsink *et al.*, 1998; Stein *et al.*, 2005).

Bakteriyolizine karşı başışıklık ise peptidoglikandaki, interpeptid çapraz köprülerin değişmesi ile sağlanır (Beukes ve Hastings, 2001).



Şekil 2.3 Bakteriyosin üretiminin quorum sensing mekanizması ile düzenlenmesi (Cotter *et al.*, 2005)

Pek çok durumda, bakteriyosin üretimi quorum sensing mekanizması ile düzenlenmektedir (Şekil 2.3). Nisin ve subtilinde hücre yoğunluğuna bağlı otoindüksiyon bir kez aktive olunca, yapısal peptid kendisinden yüksek oranlarda üretilmesi için feromon gibi iş görür. Sınıf II bakteriyosinler içinde, feromon gibi davranan örnekler olmakla birlikte, başka bir indükleyici peptidin bulunması da sık rastlanan bir durumdur. Bu tür peptidler, bakteriyosinlerin pek çok fizikokimyasal özelliklerini taşırlar ve $10^{-17}M$ gibi düşük konsantrasyonlarda bile iş görürler. Şekilde, Enterocin A üretiminin bu tür üç bileşenli bir sistemle düzenlendiği görülmektedir. Enterocin A geni (*EntA*) yapısal proteini, Enterocin F (*EntF*) geni ise indükleyici faktörü kodlar ve bu iki protein Pent promotorundan birlikte transkribe olurlar. Membrandan taşınmaları ise, (EntD) proteinin de yer aldığı, bir ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı (EntT) sayesinde gerçekleşir. Bu düzenlemede yer alan diğer iki bileşenli sistem, Ent K ve Ent R proteinlerinden oluşur. Ent K, membrana bağlı histidin kinazdır ve ve dış ortamdaki Ent F yoğunluğunu saptar. Ent R ise

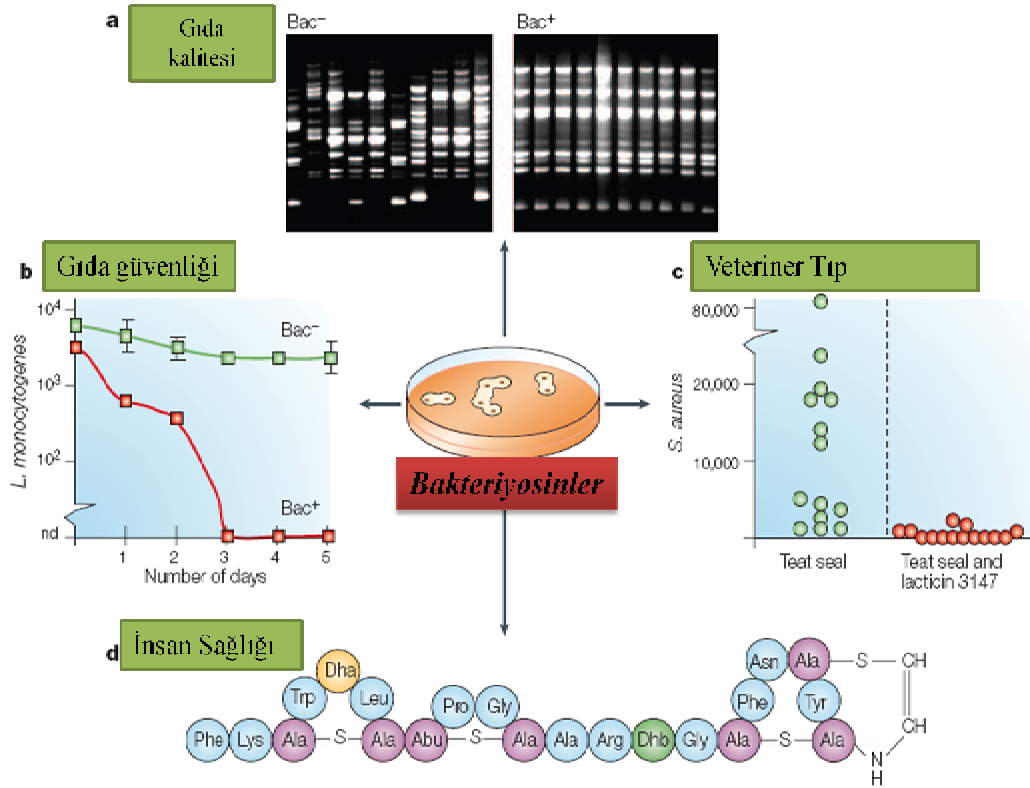
stoplazmada bulunur ve bu yoğunluğa göre cevabı düzenler, yani Pent promotorundan transkripsiyonu indükler, böylece bakteriyosin üretimi artar. Bazı durumlarda, başarılı bir indüksiyon için ek faktörler gereklidir. Örneğin, potansiyel hedef hücrelerle birlikte kültür yapıldığı durumlarda ya da gastrik geçiş esnasında bu tür bir indüksiyon sözkonusudur. Bununla birlikte, pek çok bakteriyosin üreticisi için başlangıçta feromonun düşük seviyede ifade edilmesi, bakteri iyi gelişse bile bakteriyosin üretememesine neden olur. pH, sıcaklık ve besin gibi çevresel faktörlerin bu işlemi oldukça etkilediği belirtilmektedir. Örneğin, Sakacin P üretimi ortam içeriği ve oksijen seviyesi ile oldukça ilişkilidir. Sakacin A üretimi ise, sıcaklığa bağlı olarak üç bileşenli düzenleyici sistem ile düzenlenir. Tüm bu sebeplerden dolayı, quorum sensing ve indüklenebilen bakteriyosin üretimi, arzu edilen proteinlerin daha fazla ifade edilmesine izin veren sistemlerin geliştirilmesini sağlayabilir (Cotter *et al.*, 2005).

2.5. BAKTERİYOSİNLERE DİRENÇ

Bakteriyosinlerin gıda koruma amacıyla kullanılabilmesi için, hedef türlerin direnç geliştirme potansiyelleri ve mekanizmaları göz önünde bulundurulmalıdır. Bu alanda en fazla çalışılan bakteriyosinler nisin ve bazı Sınıf IIa peptidleridir. *L. monocytogenes*'de nisine karşı spontan mutasyon oluşma sıklığı (suşa bağlı olarak) 10^{-2} – 10^{-7} oranında değişmektedir (Gravasen *et al.*, 2002). *Streptococcus pneumoniae*'nin stabil, nisine dirençli mutantları ise, lantibiyotiğe sürekli maruz kaldıkları takdirde dirençleri artmaktadır, MIC değerleri 0.4'den 6.4 mg/L'ye yükselmiştir (Severina *et al.*, 1998). Bu spontan mutantlarda direnç gelişimi hücre zarının yükü ve akışkanlığının değişimi, hücre duvarı kalınlığı, hücre duvarı yükü ve bu faktörlerin kombinasyonu ile ilgilidir (Van Schaik *et al.*, 1999). Bu tür değişimler, doğrudan düşük oranda lantibiyotiğe maruz kalımdan sonra veya başka bir strese karşı adaptif cevap olarak ortaya çıkar. Hücrelerin nisine karşı nasıl dirençli hale geldiği tam olarak anlaşılmamış olsa da, Lipid II kısmındaki varyasyonlarla ilgili olmadığı bilinmektedir. Nisin direncinin gelişime neden olan veya nisine kalıtsal tolerans sağlayan genetik lokuslar tanımlanmıştır. Kalıtsal toleransda en önemli faktör hücre duvarı yüküdür.

Sınıf II bakteriyosinlere direncin en iyi çalışıldığı örneklerden biri Sınıf II-a dirençli *L. monocytogenes*'dir. Bakteriyosine direnç fosfotransferaz sistemin mannoz permeazının ekspresyonunu azaltmaktadır. Nisine dirençli mutantlarda olduğu gibi hücre zarının akışkanlığı ve hücre yüzeyinin yükü direnç gelişiminde önemlidir (Vadyvaloo *et al.*, 2002, Vadyvaloo *et al.*, 2004).

2.6 BAKTERİYOSİNLERİN KULLANIM ALANLARI



Şekil 2.4. Bakteriyosinlerin kullanım alanları (Cotter *et al.*, 2005)

2.6.1. Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımı

Gıda endüstrisinde, üretim, işleme ve gıdaların korunması ile ilgili teknolojik gelişmeler günümüzde oldukça gelişmiş olmasına rağmen, gıdaların bozulması ve gıda kaynaklı hastalıklar henüz tam anlamıyla önlenememiştir. Gıda bilimindeki pek çok araştırma, yeni koruma teknolojilerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır, fakat bunlardan pek azı endüstriyel anlamda kullanılabilir hale getirilmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda kaynaklı hastalıklar her yıl 9.000 kadar kişinin ölümüne yol açmakta ve tekrarlayan vakalarla birlikte yıllık maliyet 5-25 milyar doları bulmaktadır. Avrupa'da ise gıda kaynaklı hastalıklar sonucu ölüm ikinci sırada yer almakta ve her yıl 50.000-300.000 akut gastro-enterit vakası gözlenmektedir (Luchansky, 1999). Gıda güvenliğindeki mikrobiyolojik problemler WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından 2002 yılında gıdalarda stratejik planlama toplantısında iki başlık altında belirtilmiştir. Bunlardan ilki, yeni patojenlerin ortaya çıkması, ikincisi ise (mikroorganizmalar adapte olma ve değişme yeteneğinde oldukları için) gıda üretimi, koruma ve paketlenme koşullarının da gıda güvenliği için değişmesi gerektiğidir (Galvez *et al.*, 2007).

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde salmonellozis, kolera, enterohemorajik *E. coli* enfeksiyonları ve Hepatit A başta olmak üzere pek çok salgın oluşmaktadır. Kolera ve diğer diyare hastalıkları geleneksel olarak suyla yayıldıkları veya insandan insana geçtikleri düşünülse de gerçekte çoğunlukla gıda kökenlidirler. Ek olarak yeniden ortaya çıkan veya yeni tanımlanmış patojenlerin çoğu da gıda kökenlidir veya gıdalar ve içme sularıyla geçme potansiyelindedir (Kaferstein ve Abdussalam, 1999). Belirtilen bu sebeplerden dolayı gıda güvenliği 21. yüzyılın oldukça önemli konulardan biri haline gelmiştir. Gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan çok sayıda mikroorganizmadan sadece bazıları çok özel role sahiptir. Örneğin; *Salmonella* serotipleri, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, enterovirulent *E. coli*, *Campylobacter jejuni* ve *Listeria monocytogenes* gıda kaynaklı rahatsızlığa neden olan etmenlerin başında gelmektedir. *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*'nin toksin oluşturan suşları, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Vibrio 'lar, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* gibi bakteriler ise hastalıkların ara sıra ortaya çıkmasına neden olurlar. Bunlardan bazılarının hastalık etmeni oldukları da hala tartışma konusudur (Tunail, 2000).

Bakteriler tarafından üretilmelerine ve antibiyotik özellikler taşımalarına rağmen, bakteriyosinler, insanlarda allerji oluşturabilen terapötik antibiyotiklerden farklıdır. Aynı zamanda protein yapıda ajanlar olmaları bakımından da terapötik antibiyotiklerden farklıdır ve sindirim sisteminde proteazlar tarafından hızla sindirilirler. Bakteriyosinlere karşı dirençli suş gelişimi oldukça nadirdir. Ayrıca bakteriyosinlerin toksisitesine dair pek az veri vardır, araştırmalar ve bakteriyosinlerin uzun süreli kullanımı bu bileşiklerin güvenle kullanılabilceğini göstermektedir (Mishra ve Lambert, 1996). Üzerinde çalışılan bakteriyosinler, pek çok gıda patojeni ve bozulma etkeni üzerine etkilidir. Ayrıca ısıya dayanıklı olması nedeniyle bazı konserve gıdalarda *C. botulinum*'a karşı ısısız işleme birlikte kullanılabilir.

Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin özellikleri, onları gıdaların korunmasında oldukça kullanışlı kılmaktadır. Genel olarak güvenilir bileşikler GRAS (Generally recognized as safe) kategorisindedirler. Ökaryotik hücrelere karşı aktif ve toksik değildirler. Sindirim yolundaki proteazlarca inaktif hale gelirler, bu yüzden barsak mikroflorası üzerinde çok az etkileri vardır. Genelde pH ve ısı karşısında stabildirler. Gıda kaynaklı patojenlere ve bozulmaya neden olan bakterilere karşı nispeten geniş bir aktivite spektrumuna sahiptirler. Bakterisidal etkiye sahiptirler, hücre zarı üzerine etkili olurlar ve antibiyotiklerle çapraz direnç oluşturmazlar. Genetik determinantları genelde plazmidlerce kodlanır, bu özellik sayesinde de genetik manipülasyona uygundur (Mishra ve Lambert, 1996).

Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, gıdaların korunmasında bakteriyosinlerin kullanımı pek çok yarar sağlamaktadır (Cleveland *et al.*, 2001). Bakteriyosinler, gıdaların raf ömürlerini uzatmaktadır. Sıcaklığın zararlı olacağı şartlar altında ekstra koruma sağlamaktadırlar. Gıda zinciri boyunca, gıda kaynaklı patojenlerin bulaşma riskini azaltmaktadır. Bakteriyosinler sayesinde, gıdaların bozulmasından kaynaklanan ekonomik kayıplar azalmaktadır ve kimyasal

koruyucular daha az kullanılmaktadır. Isıl işlem daha az kullanıldığı için, gıdalardaki besleyici maddeler ve vitaminler daha az zarar görür. Ayrıca “yeni” (daha az asidik, daha düşük tuz konsantrasyonuna sahip, yüksek su içerikli) gıdaların pazarlanmasını sağlamaktadırlar.

Gıda patojenlerine karşı bakteriyosinlerin diğer bileşiklerle birlikte kullanımı da araştırılmıştır (Solomakos, N., *et al.*, 2008). Nisin ile kekik yağının kombine kullanımı sonucunda, kıymada *L. monocytogenes* sayısında azalma olduğu bildirilmiştir. Uygulanan dozlar arasında en etkili olan, (%0.6) kekik yağı ve (1000 IU/g) nisin olarak belirlenmiştir ve bakteri sayısı, bu kombine kullanım sayesinde Avrupa Birliği'nin *L. monocytogenes* için olan 2 log cfu/g resmi limitinin altına düşmüştür.

Gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımı iki şekilde olmaktadır. Bu amaçla, ex situ üretilmiş bakteriyosin preparatları gıdalara eklenebilir veya in situ koşullarda bakteriyosin üretimini sağlayacak üretici suş gıdalara inokule edilebilir. İlk durumda, endüstriyel ölçekteki fermentörlerde üretici suş kültüve edilir ve kısmi veya tamamen saflaştırılmış bakteriyosin elde edilir. Üretilen bakteriyosinin koruyucu özelliği olduğu yasal açıdan onaylanmalıdır. Günümüzde, nisin lisanslı olan tek bakteriyosindir (Galvez *et al.*, 2007).

Ex situ üretilen bakteriyosinler, üretici suşların, süt veya peynir altısuğu gibi gıdalarda kültürasyonu ile elde edilip ham özütler halinde de gıdalara eklenebilir. Sonuçta oluşan preparatlar, gıda katkı maddesi veya gıda bileşeni olarak düşünülebilir. Çünkü bu şekilde üretilen ham özütler, gıdalarda (protein içeriğinin artması veya kalınlaşma gibi) birtakım işlemlere sahiptirler. Aynı zamanda hücrelerin ürettiği laktik asit gibi antimikrobiyal metabolitler ve bakteriyosinler içerirler ki bunlar ek koruyucu sistemlerdir. Günümüzde pazarlanan bu tür özütlerin (ALTA™ 2341 veya Microgard™) yanı sıra, yakın zamanlarda başka süt bazlı preparatlar da tanımlanmıştır. Bunlara örnek olarak lacticin 3147 (Morgan *et al.*, 1999; Guinane *et al.*, 2005) ve vairacin (O'Mahony *et al.*, 2001) verilebilir.

Ex situ üretilen bakteriyosinler, immobilize formda da uygulanabilir. Bu durumda, kısmi saflaştırılmış bakteriyosin veya konsantre edilmiş kültür sıvısı bir taşıyıcıya bağlanır. Taşıyıcı hem bir rezervuar görevi görür, hem de bakteriyosinin gıdada gradiente bağlı olarak sürekli temin edilmesini sağlar. Tüm gıda hacmine yapılan uygulamalarla kıyaslandığında, immobilize edilmiş bakteriyosin molekülleri sayesinde maliyet de düşmektedir (Galvez *et al.*, 2007).

Bakteriyosinin immobilizasyonunda çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bunlar, üretici hücreye adsorbsiyon (Yang *et al.*, 1992; Matilla *et al.*, 2003, Ghalfi *et al.*, 2006), silika partiküller veya mısır nişastası tozu (Coventry *et al.*, 1996; Dawson *et al.*, 2005), lipozom enkapsulasyonu (Degnan ve Luchansky, 1992) ve kalsiyum aljinat, jelatin, selüloz gibi jel kaplamaları veya filmlere yerleştirme (Daeschel *et al.*, 1992; Cutter ve Siragusa, 1995b; Ming *et al.*, 1997) şeklinde yapılmaktadır.

Pek çok durumda immobilize bakteriyosin preparatları işlenmiş gıdanın yüzeyine uygulanır. Bu sayede işlem sonrası kontaminasyon ve istenmeyen bakterilerin yüzeyde çoğalması önlenmiş olur. Bu alandaki yeni bir gelişme ise immobilize bakteriyosinlerin antimikrobiyal paketlemede kullanılmasıdır. *L. curvatus*'dan elde edilen 32Y bakteriyosini immobilize edilerek polietilen filme eklenmiş ve bu şekilde paketlenmiş domuz bifteği, sosis ve dana etlerinde depolama boyunca *L.monocytogenes* sayısında düşüş olduğu gözlenmiştir (Mauriello *et al.*, 2004, Ercolini *et al.*, 2006). Benzer olarak, nisin içeren selofan kaplama sonucu 8 °C de saklanan taze dana etlerinde canlı toplam aerobik bakteri sayısı azalmıştır (Guerra *et al.*, 2005). Nisinle işlenmiş film ile yapılan bir paketlemede ise *M.luteus* ATCC 10240 hücre sayısı hem sıvı ortamda, hem de çiğ süt ve pastörize sütte düşüş göstermiştir (Mauriello *et al.*, 2005). Bu yüzden, bakteriyosin içeren antimikrobiyal filmlerin kullanımı gıda ürünlerinin raf ömürlerinin uzamasını ve gıda kalite-güvenliğinin artmasını sağlayabilmektedirler.

Bakteriyosinojenik kültürlerin seçiminde dikkat edilmesi gereken pek çok nokta vardır. Seçilen suşlar, uygulanacakları gıdaya iyi adapte olabilmeli, gıdanın işlenmesi ve/veya saklanması sırasında gelişebilmelidirler. Ayrıca bu sırada hedef patojenleri ya da bozulma etkeni mikroorganizmaları inhibe etmeye yetecek kadar bakteriyosin

üretebilmelidirler. Bu yüzden, gıda üretiminde, kullanılmak üzere, seçilecek bakteriyosin üretici suş, doğru bir deneysel yaklaşımla belirlenmelidir. Bakteriyosin genlerinin heterolog ekspresyonu ile suşun özellikleri ve üretilen bakteriyosin miktarı artırılabilir. İndüklenebilir üretim sistemleri kullanılarak bakteriyosin üretim zamanı değiştirilebilir.

Üzerinde en çok çalışılmış bakteriyosinlerden biri olan nisinin genelde hücre membranını hedef aldığı ve bu maddelere duyarlı bakterilerin sitoplazmik zarlarını parçalayarak, hücrelerin ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. FAO/WHO kuruluşu tarafından 1969 yılında nisinin gıda katkısı olarak kullanılmasına izin verilmiştir ve dünyada birçok ülkede güvenli ve etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Ancak, her ne kadar bakteriyosinlere karşı mikroorganizmaların direnç kazanması nadir ise de özellikle *Listeria monocytogenes*' in nisin ve pediosin gibi geleneksel bakteriyosinlere karşı toleransının arttığı bildirilmiştir (Rasch ve Knochel 1998; Van Schaik W., *et al.*, 1999). Bu sebeple, antimikrobiyal aktiviteye sahip yeni bakteriyosinlerin araştırılması ve etki mekanizmalarının açığa çıkarılması oldukça önemli bir alan haline gelmiştir.

2.6.2. Bakteriyosinlerin klinik kullanım alanları

LAB bakteriyosinlerinin gıdalardaki kullanım alanları çok yaygın olsa da, lantibiyotiklerin toksik olmaması ve Gram pozitif patojenlere karşı etkin olmaları nedeniyle bunların klinik etkinlikleri de araştırılmaktadır. Bazı lantibiyotikler etki mekanizmaları ve çoklu ilaç direnci gösteren dirençli patojenlere etkili olmaları nedeniyle muhtemel terapotik ajanlar olarak düşünülmektedirler. Geniş spektrumlu lantibiyotikler teorik olarak klinik Gram pozitif insan veya hayvan patojeni olan bakterilere karşı kullanılabilir. Örneğin, iki peptidli bir lantibiyotik olan laktisin 3147 *Staphylococcus aureus* 'a (metisiline dirençli *S. aureus*'da dahil), enterokoklara (VRE dahil), streptokoklar (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S.uberis*, *S.mutans*), *Clostridium botulinum* ve *Propionibacterium acnes*'e karşı etkilidir (Galvin *et al.*, 1999). Hayvan modelleriyle yapılan, başlangıç in vivo denemelerde, lantibiyotiklerin, *S. pneumoniae* ve MRSA kaynaklı enfeksiyonları, önlemede başarılı olduğu bildirilmiştir (Niu ve Neu, 1991; Goldstein

et al., 1998; Kruszewska *et al.*, 2004). Nisin ve laktisin 3147, süt endüstrisinde hayvanlar için büyük problem oluşturan, streptokok ve stafilokok kaynaklı mastiti engellemektedirler (Ryan *et al.*, 1999).

Bir lantibiyotik olan Mutacin 1140 üreten su, replasman tedavisi için Amerika'da Faz 1 klinik denemelerine tabi tutulmaktadır. Salivaricin A2 ve B reten *Streptococcus salivarius* suunu içeren besin katkısı BLIS K12 ise boēaz koruyucu olarak kullanılmakta ve Yeni Zelanda da aēız kokusundan sorumlu bakteriye karşı inhibitör olarak kullanılmaktadır (Tagg 2004). Cinnamycin benzeri lantibiyotiklerin, fosfolipaz A2 ve anjiyotensin dönüştüren enzim gibi spesifik insan enzimlerine karşı aktivite gösterdikleri kefedilmi ve bunlara ilgi artmıştır. Tüm bunların yanısıra nisin'in doēum kontrol etkinliēi olduēu bulunmuştur (Reddy *et al.*, 2004).

2.6.3 Bitki hastalıklarının kontrolünde bakteriyosinler

Bakteriyosinler zgl bakterisidal özellikleri sayesinde, biyolojik kontrol amaçlı olarak hassas bakterilere karşı kullanılabilirler. Agrosin 84, *Agrobacterium radiobacter* tarafından üretilir ve kök uru hastalēında koruyucu biyolojik kontrolden sorumludur (Kerr ve Tate, 1984).

Erwinia herbicola suları fire blight olarak bilinen ve yapraklarda siyahlamaya neden olan bitki hastalēının önlenmesinde etkili bir antibiyotik üretmektedirler. Fire blight tipik, nekrotik bir bitki hastalēıdır ve *Pomoidae* familyasına ait tüm bitkileri, özellikle de elma ve armut aēalarını etkilemektedir. Konuk bitkinin tüm yeraltı organlarına zarar vererek bitkinin ölümüne neden olur. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde bu sebeble büyük ticari kayıplar olmaktadır (Van Der Zwet ve Beer, 1995). Streptomisin kullanılarak profilaktik kontrol yapılması sonucunda ise *Erwinia amylovora*'da streptomisine direnç oluşmaktadır. Ayrıca, bu antibiyotiēin hayvan ve insan saēlıēı için kullanılması yüzünden pek çok ülkede bu amaçla kullanılmamaktadır (Sobiczewski *et al.*, 1997).

Xanthomonas campestris pv. *glycines* fitopatojenik *Xanthomonas* sularına karşı, glisinesin A salgılayarak antibakteriyal aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Heu *et al.*,

2001). *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* suşu tarafından üretilen bir bakteriyosinin ise zeytinlerde knot hastalığı yapan *P. syringae* subsp. *savastanoi* suşunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Lavermicocca *et al.*, 2002).

Jabrane *et al.*, (2002), yaptıkları çalışmada *Serratia plymthicum* J7 suşunun ürettiği bakteriyosinin fire blight hastalığını oluşturan *E. amylovora*'ya karşı inhibitör aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Bakteriden elde edilen süpernatant, hem sera hem tarla denemelerinde etkili olmuştur. Bakteriyosin saflaştırılarak karakterize edilmiş ve bazı bakteriyofajlarla benzerlik taşıdığı belirtilmiştir (Jabrane *et al.*, 2002) .

Bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri bileşiklerin bitki hastalıklarını önlemeleri ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise *Bacillus licheniformis* kullanılmıştır. *B. licheniformis* P40 suşu tarafından üretilen bakteriyosin benzeri bileşiğin patateslerde soft rot hastalığına neden olan *Erwinia carotovora*'yı inhibe ettiği bildirilmiştir. Bakteriyosin benzeri bileşiğin *E. carotovora* hücreleri üzerine (30 µg/mL konsantrasyonda) bakterisidal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir ve transmisyon elektron mikroskopisi sonucunda bakteriyal hücrelerin yüzeylerinin kırıştığı ve plazmoliz sonucu tüm hücrelerin büzüldüğü gözlenmiştir (Cladera-Olivera *et al.*, 2006).

2.6.4 Kolisinler ve kanser tedavisindeki potansiyelleri

Kolisinler ve bunların insan tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkileri ile ilgili çalışmalar, yaklaşık 30 yıl önce başlamıştır (Smarda ve Obdrzalek, 1977). İlk olarak kolisin E3'ün insan HeLa hücrelerine karşı önemli derecede sitosidal etkileri olduğu gözlenmiştir. Farelerdeki lenfatik lösemi EL-4 hücrelerine karşı, *E.coli* HSC10 suşundan elde edilen kolisinle de benzer sonuçlar alınmıştır (Farkas ve Kuzniak, 1978). Fakat bu sonuçlar, kolisinin ham özütüyle elde edilmiştir ve kısa bir süre sonra anti-neoplastik aktivitenin verotoxin-1'den kaynaklandığı ortaya çıkmıştır (Farkas *et al.*, 1995). Fуска *et al.* (1978), fare lösemi P388 hücrelerinin çoğalmalarının, doza ve zamana bağlı olarak kolisin E3 ile inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Bu hücre hattı aynı zamanda kolisin D, E2 ve A ile muamele edildiğinde de canlı hücre sayısı azalmaktadır. Bu kolisinlerin arasında en güçlüsü

kolisin A'dır ve hücre sayısını yarısından fazla azaltmaktadır (Smarda ve Oravec, 1989).

Başka bir çalışmada da, kolisin A, E1, E3 ve U'nun 11 insan tümör hücrelerine karşı etkileri araştırılmıştır. Tümör hücre hatları p53 geninde mutasyon içermektedirler ve sonuçlar standart bir insan fibroblast hücre hattıyla karşılaştırılmıştır. Bu denemelerde, kolisin E3 ve U hiçbir hücre hattında etkili olmamıştır. Kolisin A ve E1 tüm hücre hatlarında gelişimi engellemiştir, sadece bir hücre hattında kolisin E1 inhibisyona neden olmamıştır. Kolisin A gelişimi %16-56 arasında azaltmıştır, fakat standart fibroblastları da inhibe etmiştir. Kolisin E1 kolisin A kadar potansiyele sahip değildir, ancak hücrelerde %17-40 oranında gelişimi engellerken, fibroblastlarda sadece %11 oranında etkili olmuştur. Bu sonuçlara göre, kolisinlerin ökaryotik tümör hücrelerine karşı etkilerinin hücreye ve kolisine özgü olduğu anlaşılmaktadır (Chumchalova ve Smarda , 2003). Farkas-Himsley ve Cheung, kolisinleri de içeren birçok bakteriyosini bakteriyal ve ökaryotik hücrelere karşı denemişlerdir. Sonuçta, tümör hücrelerinin, standart hücrelere göre, kolisinlere daha duyarlı olduğunu, fakat hayvan tümör hücrelerinin, insan tümör hücrelerine karşı daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır (Farkas ve Cheung, 1976).

Kolisinlerin, barsak kanserini engellemedeki rollerini belirlemek üzere, doğal habitatları olan barsakta da çalışılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada kolon kanserli 77 hastada ve 160 sağlıklı, kontrol kişisinde, kolisinojenik *E. coli* araştırılmış, kontrol grubunda, kolisin üreten *E. coli* % 63.8 iken, hastalarda bu oran % 41.6 olarak bulunmuştur. Araştırma sonuçları, kolisinlerin yokluğunun kolon kanserinin gelişiminde bir rolü olabileceği göstermiştir (Bores *et al.*, 1986).

Kolisinler, geleneksel antitümör ilaçlara iyi bir alternatif olarak görülmektedirler. Kolisinler hakkında hala cevaplanmamış sorular bulunmaktadır, ancak, bu moleküller gelecek için umut vaat etmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

Glukoz, Fruktoz, Sükroz, Safranin, Malaşit yeşili (**Carlo-Erba**); Yeast Extract, Kazein pepton, Agar-agar, CaCO₃, Pepton, Ethanol, Nutrient Agar, Nutrient Broth, Sülfanilik asit, α -Naftol, EDTA, NaOH, Kloroform, Kristal violet, Amonyum oksalat, İyot, Fenol-red, Üre, MRS Broth, MRS Agar, Caso Broth, Caso Agar, Soya pepton, Tryptose Broth, MR-VP Broth, MgSO₄.7H₂O, H₃BO₃, CoCl₂.6H₂O, MnSO₄.H₂O, ZnSO₄.5H₂O, Trikloroasetikasit, Tween 20, Tween 80, Nitrilotriasetik asit, Na₂MoO₄.H₂O, Tryptose Broth, Amonyum persülfat, Gluteraldehit, Coomasie Blue, Amonyum sülfat (**Merck**); Meat pepton, Tris-HCl, SDS, Tripton, Laktaz, Fenol-Kloroform-İzoamilalkol, Skim Milk, Simmon's Sitrat Agar, TEMED (**Fluka**); Na₂HPO₄.12H₂O, Lizozim, Proteinaz K, Rnase, Agaroz, Pronase E, α -Amilaz, Papain, TX-100, Tris-base, Trisin (**Sigma**); Nutrient Agar (**Lab M**); NaCl, Glasiyel Asetik asit, Para-dimetil aminobenzaldehit, Hidroklorik asit, Hidrojen peroksit, Sodyum asetat, Asetik asit, Potasyum iyodür, Aseton, Disodyum fosfat, Gliserol (**Riedel**); BHI Broth, BHI Agar (**Oxoid**); İsopropil alkol (**Kimetsan**); RNase, Lipaz, Katalaz (**AppliChem**); Taq polimeraz, dNTP, MgCl₂, PCR tamponu (**Fermentas**).

3.1.2 Örnekler

Termofilik bakterileri izole etmek amacıyla öncelikli olarak Aydın ili ve civarındaki illerdeki sıcak su kaynakları belirlenmiştir. Denizli, Aydın ve Muğla illerindeki toplam 20 istasyondan su, birikinti ve toprak örnekleri alınmıştır (Çizelge 3.1). Örnekler alınırken, pH metre (WTW, Multiline P4) ile suyun sıcaklığı ve pH'sı ölçülerek su örnekleri 200-500 mL'lik steril koyu renkli şişelere, toprak örnekleri steril poşetlere, birikintiler ise steril kaplara aktarılmıştır. Örnekler alındıktan sonra yaklaşık 4-10 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı istasyonlar

İSTASYON	SICAKLIK	pH
Ortakçı (Aydın)	48°C	7,5
İmamköy-Ilıca (Aydın)	35°C	6,4
Kuşadası-Sümerbank mevki (Aydın)	23°C	6,8
Kuşadası-Radon kaplıcası (Aydın)	42°C	6,2
Alangüllü (Aydın)1. İstasyon	73°C	6,8
Alangüllü (Aydın) 2. İst.	50°C	6,7
Alangüllü (Aydın) 3. İst.	50°C	7,4
Ortaklar-Gümüş kaplıcası (Aydın)	37°C	6,5
Kızıldere (Denizli) 1. İst.	45°C	7,0
Kızıldere (Denizli) 2. İst.	82°C	7,0
Kızıldere (Denizli) 3. İst.	40°C	6,9
Gölemezli (Denizli)1. İst	55°C	7,1
Gölemezli (Denizli) 2. İst	42°C	7,1
Kabağağaç (Denizli) 1. İst.	56°C	6,7
Kabağağaç (Denizli) 2. İst.	48°C	6,7
Karahayıt (Denizli)	55°C	6,7
Pamukkale (Denizli)	35°C	6,7
Yenice (Denizli) 1. İst.	55°C	7,2
Yenice (Denizli) 2. İst.	55°C	7,0
Dalyan (Muğla)	38°C	6,4

İzolasyon aşaması tamamlandığında, sıcak su, birikinti, toprak ve çamur örneklerinden toplam 208 adet termofilik bakteri suşu elde edilmiştir. Suşlar antibakteriyal aktivite açısından tarandıktan sonra, içlerinden aktivite spektrumu en geniş olan HBB-218 ve HBB-247 nolu izolatlar seçilmiş ve çalışmaya bu izolatlarla devam edilmiştir.

Çalışmada izole edilen tüm suşlar yatık Caso Agar tüplerine inokule edilerek, aynı zamanda % 20 lik steril skim milk içerisine alınmıştır. Yatık agarlar +4 °C'de, skim milk stokları ise -80 °C'de ADÜ Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarında muhafaza edilmekte ve stoklar periyodik aralıklarla yenilenmektedir.

3.1.3 Antibakteriyal aktivite denemelerinde kullanılan indikatör bakteriler

Çalışmamızda, seçilen izolatların antibakteriyal etki spektrumlarını belirlemek amacıyla indikatör suş olarak DSMZ Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen ve ADÜ Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan çeşitli suşlar kullanılmıştır. Bakterilerin gelişimleri için kullanılan besiyerleri ve inkübasyon koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan indikatör bakteriler

SUŞUN ADI	KOLL. NUMARASI	BESİYERİ	SICAKLIK
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	DSMZ 22	Nutrient Agar	55 °C
<i>Bacillus sphaericus</i>	DSM 396	Nutrient Agar	30 °C
<i>Bacillus sp.</i>	Toprak izolatı (Kendi izolatomız)	Nutrient Agar	30 °C
<i>B. mycoides</i>	DSM 299	Nutrient Agar	30 °C
<i>B. thuringiensis</i>	Ziraat Fakültesi (ADÜ)	Nutrient Agar	30 C
<i>B. cereus</i>	ATCC 11778	Nutrient Agar	30 °C
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	Nutrient Agar	30 °C
<i>Serratia marcescens</i>	Toprak izolatı (Kendi izolatomız)	Nutrient Agar	37 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090	Nutrient Agar	30 °C
<i>Proteus sp.</i>	Hastane izolatı (ADÜ)	Nutrient Agar	37 °C
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	DSM 30168	Nutrient Agar	26 °C
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	BHI	37 °C
<i>Listeria sp.</i>	Gıda izolatı (Kendi izolatomız)	BHI	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	BHI	37 °C
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	BHI	37 °C
<i>Streptococcus vestibularis</i>	DSM 5636	BHI	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	BHI	37 °C
<i>Listeria innocua</i>	DSM 20649	BHI	37 °C
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20174	MRS	37 °C
<i>L. acidophilus</i>	DSM 20079	MRS-ANAEROBİK	37 °C
<i>L. sakei</i>	DSM 6333	MRS	30 °C
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20343	MRS	30 °C
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	DSM 20171	Corynebacterium agar	30 °C

SUŞUN ADI	KOLL. NUMARASI	BESİYERİ	SICAKLIK
<i>Cellulomonas fimi</i>	DSM 20114	Trypticase Soy Yeast Extract Agar	30 °C
<i>Clostridium pasteurianum</i>	DSM 525	GYE-Agar- ANAEROBİK	37 °C
HBB-103	HBB-103 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-134	HBB-134 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-225	HBB-225 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-226	HBB-226 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-229	HBB-229 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-269	HBB-269 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-270	HBB-270 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-16	HBB-16 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-301	HBB-301 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-247	HBB-247 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
HBB-234	HBB-234 (Termofilik izolat)	Caso Agar	65 °C
<i>Enterococcus faecium</i>	HBB-M-1	BHI	37 °C
<i>Enterococcus faecium</i>	HBB-MS-1	BHI	37 °C
<i>E. faecium</i>	HBB-KT-2	BHI	37 °C
<i>Enterococcus gallinarium</i>	HBB-MÇ-3	BHI	37 °C
<i>Enterococcus gallinarium</i>	HBB-LC-M1	BHI	37 °C
<i>Enterococcus faecalis</i>	HBB-NÇ	BHI	37 °C
<i>Enterococcus faecalis</i>	HBB-AS-1	BHI	37 °C
<i>Enterococcus avium</i>	HBB-AS-3	BHI	37 °C
<i>Enterococcus durans</i>	HBB-KT-1	BHI	37 °C
<i>Enterococcus durans</i>	HBB-K-1	BHI	37 °C

3.1.4 Besiyerleri

***Thermus* ortamı (Williams ve Da Costa, 1991)**

Tripton	3 g
Maya özütü	1 g
Castenholz 10x bazal çözelti	100 mL
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriğindeki maddeler, 1 L distile suda çözülür, NaOH ile pH 7,5-7,8' e ayarlanır, 1000 ml için 11 g agar eklenir. Otoklavda (Hirayama HA-40 M IV, Japan) 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Termofilik bakterileri izole etmek amacıyla kullanılmıştır.

Castenholz 10x Bazal Çözeltisi

Nitrlotriasetik asit	1 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
NaCl	0,08 g
NaNO ₃	6,89 g
Na ₂ HPO ₄	1,11 g
KNO ₃	1,03 g
Ferrik klorit çözeltisi (0.28 g/L)	10 mL
Nitsch İz element çözeltisi	10 mL

Bu maddeler oda sıcaklığında, 990 mL distile suda karıştırılarak çözülür. Hacim 1 litreye tamamlanır ve çözelti +4 °C de saklanır.

Nitsch'in iz element çözeltisi

H ₃ BO ₃	0,5 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,046 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,016 g
MnSO ₄ .H ₂ O	2,2 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025 g
H ₂ SO ₄	0,5 mL
ZnSO ₄ .5H ₂ O	0,5 g

990 mL distile suda çözülür ve 1 litreye tamamlanır.

Caso Broth (Merck)

Kazein pepton	17,0 g/L
Soya pepton	3,0 g/L
D (+) glukoz	2,5 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L
Di-potasyum hidrojen fosfat	2,5 g/L

40 g ortam 1 litre distile suda çözülür, 121 °C de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. Termofilik bakterilerin geliştirilmesinde ve bakteriyosin üretim denemelerinde kullanılmıştır.

Caso Agar (Merck)

Kazein pepton	17,0 g/L
Soya pepton	3,0 g/L
D (+) glukoz	2,5 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L
Di-potasyum hidrojen fosfat	2,5 g/L
Agar	15 g/L

40 g ortam 1 litre distile suda çözülür, 121 °C de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. Termofilik bakterilerin izolasyonunda ve geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Nutrient Broth (Merck)

Et pepton	5,0 g/L
Et özütü	3,0 g/L

8 g ortam 1 litre distile suda çözülür, pH 7.0-7.2'ye ayarlanır. 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. Bakteriyosin üretim denemelerinde ve bazı indikatör suşların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

BHI Broth (Oxoid)

Dana beyin infüzyonu	12,5 g/L
Sığır kalp özütü	5,0 g/L
Proteaz pepton	10,0 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L
Glukoz	2,0 g/L
Di-sodyum fosfat	2,5 g/L

37 g ortam 1 lt distile suda çözülür, pH 7.4-7.6'ya ayarlanır. 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanır. Termofilik bakterilerin geliştirilmesinde ve bakteriyosin üretim denemelerinde kullanılmıştır.

BHI Agar (Oxoid)

Dana beyin infüzyonu	12,5 g/L
Sığır kalp özütü	5,0 g/L
Proteaz pepton	10,0 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L
Glukoz	2,0 g/L
Di-sodyum fosfat	2,5 g/L
Agar	10 g/L

47 g ortam 1 litre distile suda çözülür, pH 7.4-7.6'ya ayarlanır. 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanır. 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. Bazı indikatör suşların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

MRS Broth (Merck)

Kazein pepton	10,0 g/L
Et özütü	10,0 g/L
Maya özütü	4,0 g/L
D (+) glukoz	20,0 g/L
Di-potasyum hidrojen fosfat	2,0 g/L
Tween 80	1,0 g/L
Di-amonuyum hidrojen sitrat	2,0 g/L
Sodyum asetat	5,0 g/L
Magnezyum sülfat	0,2 g/L
Manganez sülfat	0,4 g/L

52,2 g ortam 1 litre distile suda çözülür, pH 5.7-5.9'a ayarlanır. 118 °C'de 15 dakika otoklavlanır. İndikatör suşlardan Laktobasillerin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

MRS Agar (Merck)

Kazein pepton	10,0 g/L
Et özütü	10,0 g/L
Maya özütü	4,0 g/L
D (+) glukoz	20,0 g/L
Di-potasyum hidrojen fosfat	2,0 g/L
Tween 80	1,0 g/L
Di-amonuyum hidrojen sitrat	2,0 g/L
Sodyum asetat	5,0 g/L
Magnezyum sülfat	0,2 g/L
Manganez sülfat	0,04 g/L
Agar-agar	14,0 g/L

66,2 g ortam 1 litre distile suda çözülür, pH 5.7-5.9'a ayarlanır. 118 °C'de 15 dakika otoklavlanır. 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür.

Nutrient Agar (Merck)

Et pepton	5,0 g/L
Et özütü	3,0 g/L
Agar-agar	12,0 g/L

20 g ortam 1 litre distile suda çözülür, pH 7.0-7.2'ye ayarlanır. 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. İndikatör suşların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Corynebacterium Broth

Kazein pepton	10,0 g/L
Maya özütü	5,0 g/L
Glukoz	5,0 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L

Besiyeri içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, 1 litre distile suda çözülür, pH 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra, 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. İndikatör suşlardan *B. thermosphacta*'nın geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Corynebacterium Agar

Kazein pepton	10,0 g/L
Maya özütü	5,0 g/L
Glukoz	5,0 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L
Agar	15,0 g/L

Besiyeri içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, 1 litre distile suda çözülür, pH 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra, 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. İndikatör suşlarından *B. thermosphacta*'nın geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Glukoz Yeast Ekstrakt Broth

Kazein pepton	10,0 g/L
Maya özütü	5,0 g/L
Glukoz	5,0 g/L

Besiyeri içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, 1 litre distile suda çözülür. pH 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra, 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. İndikatör suşlardan *C. pasterianum*'un geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Glukoz Yeast Ekstrakt Agar

Kazein pepton	10,0 g/L
Maya özütü	5,0 g/L
Glukoz	5,0 g/L
Agar	17,0 g/L

Besiyeri içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, 1 litre distile suda çözülür. pH 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra, 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. İndikatör suşlardan *C. pasterianum*'un geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Trypticase Soy Yeast Extract Broth

Triptik Soy Broth	30,0 g/L
Maya özütü	3,0 g/L

Besiyeri içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, 1 litre distile suda çözülür, pH 7.0-7.2'ye ayarlandıktan sonra, 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. İndikatör suşlarından *C. fimi*'nin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Trypticase Soy Yeast Agar

Triptik Soy Broth	30,0 g/L
Maya özütü	3,0 g/L
Agar	15,0 g/L

Besiyeri içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, 1 litre distile suda çözülür, pH 7.0-7.2'ye ayarlandıktan sonra, 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. İndikatör suşlardan *C. fimi*'nin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Luria-Bertani Broth (Sigma)

Tripton	10 g/L
Maya özütü	0,5 g/L
NaCl	10 g/L

Ticari olarak satılan ortamın 20 g'ı, 1 litre distile suda çözülür, pH 7.0-7.2'ye ayarlandıktan sonra, 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. Bakteriyosin üretim denemelerinde kullanılmıştır.

Tryptose Broth

Triptoz	20,0 g/L
D (+) glukoz	1,0 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L
Thiaminklorid	0,005 g/L

Ticari olarak satılan ortamın, 26 g'ı 1 litre distile suda çözülür, pH 7.3-7.5'a ayarlandıktan sonra, 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. Bakteriyosin üretim denemelerinde kullanılmıştır.

Simmon's Sitrat Agar

Magnezyum sülfat. 5H ₂ O	0,2 g/L
Amonyum dihidrojen fosfat	0,2 g/L
Disodyum amonyum fosfat	0,8 g/L
Trisodyum sitrat	2,0 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L
Bromtimol mavisi	0,08 g/L
Agar	15 g/L

Ticari olarak satılan ortamın 23,3 g'ı, 1 L distile suda çözülür, pH 7.0-7.2'ye ayarlandıktan sonra, tüplere dağıtılır. 121 °C'de, 1,1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. İzolatların sitrat testinde kullanılmıştır.

MR-VP Broth

Pepton from meat	7.0 g
D (+) Glukoz	5,0 g
Fosfat buffer	5,0 g

Ticari olarak satılan ortamın 17 g. ı 1 L distile suda çözülür, tüplere dağıtıldıktan sonra otoklavda 1,1 atm basınç altında, 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Metil Red ve Voges-Proskauer testlerinde kullanılmıştır.

Laktoz fermentasyon ortamı

Nutrient Broth	100 mL
Laktoz	0,5 g
Fenol Red çözeltisi	5 mL

0,5 g Laktoz şekeri, 100 mL Nutrient Broth'da çözülür, fenol red çözeltisi eklenir. İçerinde Durham tüpü bulunan tüplere dağıtıldıktan sonra, otoklavda 1,1 atm basınç altında, 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Laktoz fermentasyonu denemelerinde kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1984).

3.1.5. Çözeltiler ve Ayıraçlar

Skim milk çözeltisi

Skimmed milk	20 g
Distile su	100 mL

Skim milk, distile suda çözüldükten sonra, 118 °C'de 10 dakika otoklavlanır. İzolatların -20 ve -80 °C'de muhafaza edilmesinde kullanılmıştır.

Gram'm Kristal viyole boyası

Kristal viyole	2,0 g
Alkol (%95'lik)	20 mL
Amonyum oksalat	0,80 g
Distile su	80 mL

Kristal viyole alkolde; Amonyum oksalat distile suda çözülür ve iki çözelti karıştırılır. Gram boyamada kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1984).

İyot çözeltisi

İyot	1,0 g
Potasyum iodine	2,0 g
Distile su	300 mL

Potasyum iodine ve iyot porselen kapta dövülerek karıştırılır. Üzerine, distile su eklenerek, karıştırılır. Gram boyamada kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1984).

Gram safranin boyası

Safranin	0,25 g
Etanol (%95'lik)	10 mL
Distile su	100 mL

0,25 g safranin, etanolde çözülür, üzerine distile su eklenir. Filtre kağıdından süzülür. Gram boyamada kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1984).

Malaşit yeşili

Malaşit yeşili	5,0 g
Distile su	100 mL

5 g safranin, distile suda çözülür. Filtre kağıdından süzülür. Gram boyamada kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1984).

 α -naftol çözeltisi

α -naftol	5,0 g
Distile su	100 mL

5 g α -naftol, 100 mL distile suda çözülür. Voges-Proskauer testinde ve nitrat indirgenmesi testinde ayıraç olarak kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1984).

Sülfanilik asit çözeltisi

Sülfanilik asit	8,0 g
Glasiyel asetik asit	294 mL
Distile su	706 mL

294 mL glasiyel asetik asit, 706 mL distile su ile karıştırılır ve üzerine 8 g sülfanilik asit eklenerek iyice çalkalanır. Nitrat indirgenmesi testinde ayıraç olarak kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1984).

Metil kırmızısı indikatör çözeltisi

Metil red	0,1 g/L
%95'lik etanol	250 mL
Distile su	250 mL

Metil red etanolde çözülüp, üzerine distile su ilave edilerek karıştırılır ve daha sonra filtre kağıdından süzülerek hazırlanır (Tamer ve ark., 1984). Metil red testinde kullanılmıştır.

Lizis tamponu (pH 8.0)**A. Tris-HCl (50 Mm)**

Tris-HCl	0,79 g
Distile su	100 mL

B. EDTA (20 mM)

EDTA	0,74 g
Distile su	100 mL

C. Glukoz çözeltisi

Glukoz	0,99 g
Distile su	100 mL

Önce Tris-HCl sonra EDTA çözülür ve üzerine glukoz ilave edilir. Son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözülür. 0,1 M NaOH ile pH 8.0'e ayarlanır. DNA izolasyonunda, bakteri hücrelerini parçalamak amacıyla kullanılmıştır.

5X TBE Tamponu

Tris-baz	54 g/L
Borik asit	27,5 g/L
EDTA.2H ₂ O	3,72 g/L

Tampon içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, distile su ile hacim 1 litreye tamamlanır, pH 8.13-8.30'a ayarlanır. 5 kat seyreltilerek agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforezde tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

Agaroz jel (%1)

Agaroz	1 g
1X TE tamponu	100 mL
EtBr çözeltisi (10 mg/mL)	1 µL

1 g agaroz 100 mL 1X TE tamponunda çözülmesi için mikrodalga fırında kaynatılır. 50-60 C'ye kadar soğutulduktan sonra, içerisine 1 µL EtBr eklenir, jel tablasına dökülür. Genomik DNA'nın görünütlenmesinde kullanılmıştır.

Coomassie Brilliant Blue G250 çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg
% 95'lik etil alkol	50 mL
%85'lik fosforik asit	100 mL

100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 50 mL % 95' lik etil alkolde çözülür. Çözelti daha sonra 100 mL % 85' lik fosforik asitle karıştırılır ve hacmi distile su ile 1 L' ye tamamlanır. Boya çözeltisi daha sonra filtre kağıdından süzülür. Protein tayininde kullanılmıştır.

Protein standartlarının hazırlanışı

Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. BSA'nın 1 mg/mL' lik stok çözeltisi hazırlanmıştır. Standart çözeltiler bu stoktan 5-200 µg/mL olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Trisin SDS-PAGE ayırma jeli akrilamidi (1X çapraz bağlayıcı)

Akrilamid	48 g
N,N'-metilen-bis-akrilamid	1,5 g

Akrilamid az miktar distile suda çözülür. Akrilamid tamamen çözüldükten sonra, bisakrilamid eklenir, çözülmesi sağlanır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır. Çözelti filtre kağıdından süzülür. Trisin SDS-PAGE yönteminde ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılır.

Trisin SDS-PAGE Yoğunlaştırma jeli akrilamidi

Akrilamid	30 g
N,N'-metilen-bis-akrilamid	0,8 g

Akrilamid az miktar distile suda çözülür. Akrilamid tamamen çözüldükten sonra, bisakrilamid eklenir, çözülmesi sağlanır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

Çözelti filtre kağıdından süzülür. Trisin SDS-PAGE yönteminde yoğunlaştırma jelinin hazırlanmasında kullanılır.

Trisin SDS-PAGE Ayırma jeli tamponu

Tris-baz	18,17 g
SDS	0,15 g

25 mL distile su içerisinde 18,17 g Tris baz çözülür ve 3 M'lık çözelti hazırlanmış olur. Çözeltinin içerisinde son hacim %0.3 olacak şekilde SDS çözülür. Distile su ile son hacim 50 mL'ye tamamlanır ve HCl ile pH 8.9'a ayarlanır. Trisin SDS-PAGE elektroforezinde ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Trisin SDS-PAGE Ayırma jeli içeriği

Distile su	1,675 mL
Ayırma jeli tamponu	2,5 mL
Ayırma jeli akrilamidi (1X)	2,5 mL
Gliserol	0,8 mL
TEMED	2,5 µL
Amonyum per sülfat (%10)	25 µL

Tablodaki çözeltiler sırayla eklenerek Falcon tüpte karıştırılır. En son TEMED ve amonyum per sülfat eklenir. Trisin SDS-PAGE elektroforezinde (alt jel) ayırma jeli olarak kullanılmıştır.

Trisin SDS-PAGE Yoğunlaştırma jeli tamponu (1 M Tris-HCl)

Tris-HCl	7,88 g
Distile su	50 mL

50 mL distile su içerisinde 7,88 g Tris-HCl çözülür. HCl ile pH 6.8'e ayarlanır.

Trisin SDS-PAGE Yoğunlaştırma jeli içeriği

Distile su	2,575 mL
Yoğunlaştırma jeli tamponu	0,475 mL
Yoğunlaştırma jeli akrilamidi	0,625 mL
EDTA çözeltisi (0.2 M)	37,5 µL
TEMED	1,88 µL
Amonyum per sülfat (% 10)	37,5 µL

Tablodaki çözeltiler sırayla eklenerek Falcon tüpte karıştırılır. En son TEMED ve amonyum per sülfat eklenir. Trisin SDS-PAGE elektroforezinde (üst jel) yoğunlaştırma jeli olarak kullanılmıştır.

Trisin SDS-PAGE Katod tamponu (10X stok çözelti)

Tris baz	6,06 g
Trisin	8,96 g
SDS	0,5 g

20 mL distile su içerisinde Tris baz tamamen çözülür. İçerisine trisin eklenir. 0,5 g SDS eklendikten sonra son hacim 50 mL'ye tamamlanır. Çözelti hazırlandıktan sonra, pH'sı 8.25 civarında olmalıdır. Kullanılmadan önce 10 kat seyreltilmiştir. Trisin SDS-PAGE elektroforezinde yürütme tamponu olarak kullanılmıştır.

Trisin SDS-PAGE Anod tamponu (10X stok çözelti)

Tris baz	12,11g
Distile su	50 mL

12,11 g Tris baz distile suda çözülür, son hacim 50 mL'ye tamamlanır. HCl ile pH'sı 8.9'a ayarlanır. Kullanılmadan önce 10 kat seyreltilir. Trisin SDS-PAGE elektroforezinde yürütme tamponu olarak kullanılmıştır.

% 5'lik gluteraldehit çözeltisi

Gluteraldehit (%25)	20 mL
---------------------	-------

Distile su	80 mL
------------	-------

%25 'lik gluteraldehit çözeltisinden 20 mL alınır, ve hacim 100 mL'ye tamamlanır. Her seferinde taze olarak hazırlanır. Trisin SDS-PAGE elektroforezinde, jeldeki molekül ağırlığı düşük peptidlerin fikse edilmesi için kullanılmıştır.

% 0,025 Coomasie brilliant blue çözeltisi

Coomasie Brilliant blue	0,025 g
-------------------------	---------

Asetik asit (%10)	100 mL
-------------------	--------

0,025 g Coomasie Blue boyası, 100 mL, %10'luk asetik asitte çözülür. Trisin SDS-PAGE elektroforezinde jellerdeki protein bantlarını boyama amacıyla kullanılmıştır.

Trisin SDS-PAGE Boya giderme (destaining) çözeltisi

Asetik asit	100 mL
-------------	--------

Distile su	900 mL
------------	--------

%10'luk asetik asit çözeltisi, Trisin SDS-PAGE elektroforezinden sonra, jellerdeki boyanın giderilmesi için kullanılmıştır.

Örnek yükleme tamponu

0.6 M Tris-HCl (pH 6.8)	5.0 mL
-------------------------	--------

SDS	0.5 g
-----	-------

Sükroz	5.0 g
--------	-------

B-merkaptoetanol	0.25 mL
------------------	---------

Bromfenol blue (%0.5)	5.0 mL
-----------------------	--------

Son hacim 50 mL'ye tamamlanır. Trisin SDS-PAGE elektroforezlerinde örnek tamponu olarak kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Termofilik bakterilerin izolasyonu

Farklı istasyonlardan alınan termal su, çamur, birikinti ve toprak örnekleri laboratuvara getirildikten sonra zenginleştirme amacıyla sıvı *Thermus* ortamlarına inokule edilmiştir. Su örneklerinden 5 mL alınarak, 250 mL' lik erlenlerde bulunan steril 45 mL *Thermus* ortamlarına; toprak, çamur ve birikinti örneklerinden ise steril spatül ile alınarak aynı şekilde hazırlanmış sıvı *Thermus* ortamlarına ekim yapılmıştır. İnokule edilen erlenler etüvde (Selecta, Spain) termofilik bakterilerin seçimi için 65°C de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat inkübasyondan sonra erlenlerde gelişen kültürlerden steril distile suda 10⁻⁴'e kadar seyreltmeler hazırlanarak bu seyreltmelerden 1 mL alınmış ve 45°C'ye kadar soğutulmuş Caso Agar ile karıştırılarak dökme plaka yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 65°C de 24 saat inkübe edildikten sonra Caso Agar ortamında gelişen karışık kültürlerden, her seferinde özeyi yakarak izolatların saf kültürleri elde edilmiştir. Bu amaçla kolonilerden en az iki kez saflaştırma yapılmıştır.

3.2.2. İzolatların antibakteriyal aktivite taraması

İzolatların antimikrobiyal madde üretimi araştırılırken indikatör mikroorganizma olarak *Geobacillus stearothermophilus* DSMZ 22 suşu kullanılmıştır. Ön tarama amacıyla Martirani ve ark (2002), tarafından kullanılan metot kısmen modifiye edilmiştir. Caso Agar plaklarına steril kürdanla izolatların skim milkdeki kültürlerinden çizgi ekimler yapılarak plaklar, 65 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün plaklar, UV cihazı (UVP-UVGL-58) kullanılarak 15 dakika 254 nm UV' ye maruz bırakılmıştır. UV uygulanan plakların üzerine 45 °C'ye kadar soğutulmuş ve içerisine indikatör suş eklenmiş soft Caso Agar dökülmüştür. İndikatör suşun yoğunluğu 0.5 MacFarland standardına (10⁸ cfu/mL) göre ayarlanarak bu süspansiyondan soft agara 100 µL eklenmiştir. Plaklar *G. stearothermophilus* DSMZ 22 suşu için 55 °C de, yaklaşık 18 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra, izolatların petrideki kültürleri etrafında oluşan zonlara göre değerlendirme yapılmıştır. Güçlü antimikrobiyal aktivite, +++; orta derecede

antimikrobiyal aktivite ++, zayıf antimikrobiyal aktivite + olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta termofilik izolatlardan 18 tanesinin *G. stearothermophilus* DSMZ 22 suşuna karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 18 izolat, farklı indikatör bakterilere karşı tekrar denenerek sonuçta antibakteriyal aktivite spektrumu en geniş olan HBB-218 ve HBB-247 kodlu suşlar seçilmiştir.

3.2.3. İzolatların antibakteriyal etki spektrumlarının kuyucuk yöntemiyle belirlenmesi

Antibakteriyal aktivite açısından yapılan ön taramalar sonucu seçilen HBB-218 ve HBB-247 kodlu izolatlar BHI Broth ortamında geliştirilerek, 24, 48, 72 ve 96. saat sonunda kültür sıvıları 8000 g de 10 dakika (+4 °C) santrifüjlenmiştir (Hettich Universal 32 R, Germany). Santrifüjden sonra, kültür süpernatantları steril şırıngalarla çekilerek 0.45 µm por çaplı, steril membran filtreden (Sartorius) süzölmüş ve süzöntüler (CFS, cell-free supernatant) steril tüplere toplanmıştır.

Antibakteriyal aktivite denemelerinde 46 farklı indikatör suş kullanılmıştır. Bakterilerin agar ortamındaki 24 saatlik kültürlerinden, steril distile suda 0.5 MacFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan 350 µL alınarak, 45 °C'ye soğutulmuş 35 mL bakterinin geliştirildiği besiortamlarına eklenerek steril petrilere dökölmüştür. Ortamlar katılaştıktan sonra, 6 mm çaplı steril agar delici ile besiortamlarında kuyucuklar açılmıştır. Hazırlanan kuyucuklara, CFS'lerden 50 µL konularak petrilere +4 °C'de 2 saat bekletildikten sonra, plaklar suşların gelişebildiği sıcaklık derecelerinde inkübe edilmiştir. Ertesi gün oluşan zonların çapları ölçölmüştür.

3.2.4. İzolatların tanılanması

3.2.4.1. Kültürel özellikler

İzolatların sıvı ve katı besiyerindeki gelişimlerini incelemek amacıyla, bakteriler BHI Broth ve BHI Agar ortamlarına ekilmiştir. 65 °C'de, 24 saat inkübasyon sonucunda, katı besiyerindeki kolonilerin, şekli, pigmentasyonları, büyüklükleri, sıvı besiyerinde ise sedimentasyon ve bulanıklık gibi özellikleri incelenmiştir.

3.2.4.2 Morfolojik özellikler

Gram boyama

İzolatların, hücre duvarı yapılarının belirlenmesi amacıyla, Gram boyama yapılmıştır. Bunun için, Caso agardaki, genç (24 saatlikten az) kültürlerden lam üzerinde, distile su ile yayılarak, preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar, havada kurutularak, ateşte fikse edildikten sonra, Gram'ın kristal viyole boyası ile 1 dakika boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır. Havada kurutulduktan sonra, iyot çözeltisi ile 1 dakika muamele edilen preparatlar, distile su ile yıkanıp, tekrar havada kurutulmuştur. Daha sonra alkol ile renk giderilmiş ve preparatlar en son Gram'ın safranin boyası ile 30 saniye boyanmıştır. Distile su ile yıkandıktan sonra havada kurutulan preparatlar mikroskopta (Olympus Cover-015, Japan), 100x'lik immersiyon objektifinde incelenmiştir (Salle, 1967).

Endospor Boyama

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadıklarını ve endosporların hücre içerisindeki pozisyonunu belirlemek amacıyla, Caso agarda geliştirilen kültürler kullanılmıştır. Kolonilerden öze ile alınarak, lam üzerindeki suda yayıldıktan ve açık havada kurutulduktan sonra, alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Daha sonra, sıcak su buharı üzerine alınan lam üzerine malaşit yeşili ilave edilip, 5 dakika beklenmiş ve distile su ile tekrar yıkanmıştır. Preparatlara safranin boyası ilave edilerek 30- 60 saniye beklenmiş ve sonra distile su ile yıkanmıştır. Açık havada kurutulan preparatlar, mikroskop altında 100x'lik immersiyon objektifinde incelenmiştir. Pembe olarak boyanan kısımlar hücrenin vejetatif kısmı, yeşil renkli görünenler ise endosporlardır (Tamer ve ark., 1984).

3.2.4.3. Biyokimyasal ve fizyolojik özellikler

Biyokimyasal testlerin tümü iki tekrarlı yapılmış ve ekim yapılmamış tüpler negatif kontrol, *G. stearothermophilus* DSMZ 22 bakterisi ise şahit suş olarak kullanılmıştır.

Katalaz testi

İzolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla izolatlar Triptoz Fosfat Agar besiyerine ekilmiştir. 65 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra, petrilere gelişen kolonilerin üzerine, %3'lük H₂O₂ çözeltisi damlatılmıştır. Kolonilerin etrafında gaz kabarcıklarının oluşumu katalaz testi açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1984).

Nitrat redüksiyon testi

İzolatların nitratı indirgeme özelliklerini belirlemek amacıyla 24 saatlik kültürlerden Nitrat Broth'lara, öze ile inokulasyon yapılmıştır. Tüpler 65 °C'de inkübe edilerek ikinci günden itibaren temiz test tüplerine steril pipetler ile kültürlerden 1 mL aktarılmıştır. Tüplere 3 damla sulfanilik asit çözeltisi ve 2 damla α-naftol çözeltisi ilave edilmiştir. Pembemsi renk oluşumu, nitritler açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1984).

Metil Red testi

İzolatların metil red testi, MR-VP broth ortamında yapılmıştır. MR-VP Broth'a inokule edilen kültürler, 24 saat 65 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, kültürün bir kısmı temiz bir tüpe alınarak kültürlerle Metil red ayırıcı damlatılmıştır. Kırmızı renk oluşumu test açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1984).

Voges-Proskauer testi

Bu test için, hazırlanan MR-VP brothlara, izolatların 24 saatlik kültürlerinden ekim yapılarak, tüpler 65 C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, kültürlerin bir kısmı temiz tüplere aktararak, önce 0.5 ml α-naftol çözeltisinden, daha sonra ise 0.5 ml % 40' lık KOH çözeltisinden eklenmiştir. Tüpler çalkalandıktan sonra 5- 10

dakika beklenmiştir. Kırmızı renge doğru bir pembeleşme, test için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1984).

Laktoz fermentasyonu

İzolatların laktoz şekerini fermente edebilme özelliklerini test etmek amacıyla, laktozlu Nutrient broth kullanılmış ve besiyerlerine durham tüpü konulmuştur. İzolatların 24 saatlik kültürlerinden, besiyerlerine öze ile ekim yapıldıktan sonra tüpler 65 °C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda besiyerinin renginin kırmızıdan sarıya dönüşmesi, laktozdan asit oluşumu için; durham tüpünde hava kabarcığının görülmesi ise gaz oluşumu açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1984).

Sitrat testi

İzolatların sitratı karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadıklarının belirlenmesi amacıyla yatık olarak hazırlanan Simmon Sitrat Agar’lı tüplere, 24 saatlik kültürlerden iğne öze ile ekim yapılmıştır. 24- 48 saat boyunca 65 °C’ de inkübasyondan sonra besiyerinin renginin yeşilden maviye dönmesi test için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1984).

Sitokrom oksidaz testi

İzolatların sitokrom oksidaz enzim sistemlerini test etmek amacıyla, API oxidase ayırıcı (Ref. No 55 635) kullanılmıştır. İzolatların, Caso agar petrilerindeki 24 saatlik kültürlerinden plastik öze ile bir miktar alınarak, bu çözeltinin emdirildiği filtre kağıtlarına yayılmıştır. 10- 30 saniye içindeki koyu mor renk oluşumu deney için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1984).

APİ 50 CH kitinin kullanımı

İzolatların karbohidrat fermentasyon özelliklerini belirlemek amacıyla APİ 50 CH (BioMerieux, FRANCE) kiti kullanılmıştır. APİ 50 CH identifikasyon kiti ile çalışılırken, denemeler üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzolatlar Caso agar petrilere ekilmiş ve 65 °C’de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün saf kültür olduğu doğrulanan petrilere swable tüm koloniler toplanarak 1 mL steril tuzlu suda yoğun bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan 5 mL’lik APİ NaCl %0.85 çözeltisine, bulanıklık 2 MacFarlanda eşit olana kadar damlatılmış ve damla sayısı kaydedilmiştir (n). Daha sonra her bir izolat için bir APİ 50 CHB/E ortamı açılarak bu ortama önceden hazırlanan süspansiyondan 2n kadar damlatılmıştır.

APİ 50 CH stripleri traylere yerleştirildikten sonra, önceden inokule edilmiş APİ 50 CHB/E ortamından striplerdeki kuyucuklara eklenmiştir. İzolatlar termofilik olduğu için stripler 55 °C’de inkübe edilmiştir. Stripler 3, 6 ve 24. saatlerde kontrol edilmiştir. Tüplerdeki rengin kırmızıdan sarıya dönmesi karbohidratlar için pozitif sonuçtur. Eskulin testi için siyah renge dönüşüm pozitif sonuçtur.

İzolatların büyüebildiği pH aralığının belirlenmesi

İzolatların gelişebildiği pH aralıkları bakteriyosin üretimi için yapılan optimizasyon denemelerinde saptanmıştır. BHI broth ortamında, pH, 1 M HCl veya 1 M NaOH ile 65 °C’de, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, ve 8.5’a ayarlanmıştır. 72.saat sonunda alınan örneklerden spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 600 nm.’deki absorbans değerleri ölçülmüş ve gelişimin olduğu pH aralıkları belirlenmiştir.

İzolatların büyüebildiği sıcaklık aralığının belirlenmesi

İzolatların gelişebildiği sıcaklık aralıkları bakteriyosin üretimi için yapılan optimizasyon denemelerinde saptanmıştır. BHI broth ortamında, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C’de (pH 6.0) geliştirilen kültürlerden 72. saat sonunda alınan örneklerden

600 nm.'deki absorbans değerleri ölçülmüş ve gelişimin olduğu sıcaklık aralığı belirlenmiştir.

İzolatların büyüebildiği NaCl aralığının belirlenmesi

İzolatların büyüebildiği NaCl aralığının belirlenmesi için, %1, %3, %5 ve %7 oranında NaCl içeren BHI ortamlarına, izolatların gecelik kültürlerinden ekim yapılmıştır. 65 °C'de geliştirilen kültürlerde bulanıklığın gözleendiği tüpler, gelişim açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.4. HBB-218 ve HBB-247 izolatlarının 16S rRNA analizi ile tanınması

İzolatlardan genomik DNA izolasyonu

HBB-218 ve HBB-247 izolatlarının genomik DNA'ları Ronimus et al (1997)'nin fenol-kloroform yöntemi (modifiye edilerek) ile izole edilmiştir.

Fenol-kloroform yönteminde, öncelikle izolatların, Caso agar ortamında gecelik kültürleri hazırlanmıştır. Ertesi gün bu kültürden tek koloni alınarak, sıvı ortama ekim yapılmış ve kültürler 24 saat boyunca 65 °C de geliştirilmiştir. Bu sıvı kültürlerden, eppendorf tüplerine 1 mL aktarılmıştır. 4000 x g de 10 dakika (+4 °C) santrifüjlenen örneklerden süpernatant atılmış ve pellet üzerine 500 µL lizis tamponu eklenmiştir. 13.000 rpm de 5 dakika (+4 °C'de) santrifüjlenen örneklerden süpernatant tekrar atılmış ve tüplerdeki pellet üzerine 75 µL lizozim (20 mg/ml) ve 425 µL lizis tamponu eklenmiştir. Tüpler alt-üst edilerek karıştırılmış ve 37 °C'de, 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, tüplere 20 µL RNAz A (10 mg/mL) ve 25 µL SDS (%20'lik) eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 6,5 µL Proteinaz K ile muamele edilen örnekler, 50 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Tüplere (v/v) olacak şekilde fenol: kloroform: izoamil alkol karışımından eklenmiş ve 13 000 rpm'de 5 dakika (+4 °C) santrifüjlenmiştir. Üstteki berrak faz toplanarak 1/10 (v/v) oranında Na-asetat (3 M, pH 5.5) eklenmiş ve tüpler alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Tekrar eşit hacimde (v/v) olacak şekilde isopropanol eklenerek 30 °C' de 30 dakika bekletilen tüpler 13 000 rpm'de 20 dakika (+4 °C) santrifüjlenmiştir. Süpernatant

atılarak pelletin üzerine 500 µL etil alkol (%70) eklenmiştir. 15 000 rpm'de 5 dakika (+4 °C) santrifüjlenen örneklerden süpernatant tekrar atılmış ve tüpler 50 °C lik etüvde tutularak alkol uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 50 µL steril distile su eklenmiş ve tüpler kullanılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Genomik DNA'yı görüntülemek amacıyla örneklerin % 0.8'lik agarozda elektroforezi yapılmıştır (Thermo EC330). Elektoroforez sonunda, DNA bantlarını görüntülemek için (UVP LM-20E) cihazı kullanılmıştır.

PCR ve 16S rRNA analizi

HBB-218 ve HBB-247 suşlarının genomik DNA'ları izole edildikten sonra 16S rRNA geni 341F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG3')-985R (5' GTA AGG TTC TTC GCG TT 3') ve 20F (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1390R (5'- GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3') primerleri kullanılarak yaklaşık 1300 bp'lik bölge PCR ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu karışımı 100 µL için Taq buffer (10X) 10 µL, dNTP (10 mM) 2 µL, MgCl₂ (25 mM) 8 µL, Primer (100 mM) 0,4 µL, Taq polimeraz 0,6 µL, steril distile su 79 µL olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR tüplerine karışımdan 30 µL dağıtılmış ve 2 µL DNA eklenmiştir. Tüm amplifikasyon koşulları 94 °C'de 5 dakikalık ön denaturasyon, 94 °C'de 30 sn denaturasyon, 50 °C'de 30 sn bağlanma ve 72 °C'de 10 sn uzamadan oluşan 35 sikluluk amplifikasyon ve 72 °C'de 15 dakikalık final uzamadan oluşacak şekilde programlanmıştır (Techne TC-3000).

Tüm sekans işlemlerinde sekanslanacak genler standart protokollere göre saflaştırılarak, Macrogen (Kore)'de, (ABI 3730 XL) sekans cihazında dizi analizi yaptırılmıştır. Sekanslar gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve homolojiler belirlenmiştir.

3.3 Bakteriyosinlerin Karakterizasyonları

3.3.1. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini denemek amacıyla HBB-218 ve HBB-247 suşundan elde edilen CFS'ler 30, 45, 60 ve 95 °C'de 30 dakika ve 2 saat inkübe edilmiş ve 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır (Powell J.E., 2007). Ayrıca + 4 °C'de 1 ay süreyle saklanan CFS'lerin de aktivitesi araştırılmıştır. Oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra kültür süpernatantları *G. stearothermophilus* DSMZ 22 suşuna karşı kuyucuk yöntemiyle denenmiştir. İşlem görmemiş kültür süpernatantı kontrol olarak kullanılmıştır. İndikatör bakterinin bulunduğu plaklar 55 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra zon çapları ölçülerek aktivite değerlendirilmiştir. Tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır. Aynı işlemler saflaştırılmış bakteriyosin için de tekrarlanmıştır.

3.3.2. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine enzimlerin etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine çeşitli enzimlerin etkisini denemek amacıyla izolatlardan elde edilen CFS'ler kullanılmıştır. CFS'ler proteinaz K, papain, Pronaz E, lipaz, β -glukoronidaz, α -amilaz, laktaz ve Ribonükleaz A enzimleriyle final konsantrasyonları 1 mg/ mL ve 10 mg/mL olacak şekilde, karıştırılmış ve 37 °C de, 1 saat ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, enzim aktivitesini durdurmak için HBB-218 'den elde edilen CFS, su banyosunda (Memmert/P Selecta, Germany) 95–97 °C de 5 dakika tutulmuştur. HBB-247'den elde edilen CFS için ısı işlem uygulanmamıştır. Karışımlar, *G. stearothermophilus* DSMZ 22 bakterisine karşı kuyucuk yöntemiyle test edilmiştir (Riosen, 2005). 1 saat ve 24 saat 37 °C de inkübasyondan sonra enzimle muamele edilmiş CFS, kontrol gruplarıyla (tek başına enzimler, enzimlerin hazırlandığı tampon ve enzimlerle muamele edilmemiş CFS) karşılaştırılmış ve zon çaplarına bakılarak aktivite değerlendirilmiştir. Tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır. Aynı işlemler saflaştırılmış bakteriyosin için de tekrarlanmıştır.

3.3.3. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine pH'nın etkisi

Aktivite üzerine pH'nın etkisini araştırmak için, kültür süpernatantlarının pH'ları steril 1 M NaOH ya da steril 1 M HCl ile 3-11 arasında ayarlanmıştır. pH'ları ayarlanan CFS'lerin bir seti +4 °C'de, bir seti ise 65 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, kültür süpernatantlarının pH'ları tekrar 7'ye ayarlandıktan sonra kuyucuk yöntemiyle *G.stearothermophilus* DSMZ 22 suşuna karşı denenmiştir. pH'sı 3-11 arasında ayarlanmış Triptik Soy Broth ortamları da pH'ları 7'ye ayarlandıktan sonra negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır (Deraz, *et al.*, 2005). Aynı işlemler saflaştırılmış bakteriyosin için de tekrarlanmıştır.

3.3.4. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine organik çözücülerin ve deterjanların etkisi

Çeşitli organik çözücülerin (Bizani ve Brandelli, 2002) ve deterjanların (Todorov ve Dicks, 2005) bakteriyosin aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Organik çözücülerden aseton, kloroform, DMSO, etanol, metanol ve ksilol'ün steril distile suda % 20'lik, TCA (Trikolorasetik asit) 'nın ise 200 mg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Deterjanlardan Tween 20, Tween 80, Triton-X 100 ve üreden 2 mg/mL, EDTA'dan ise 20 mM'lık stok çözeltiler hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler, HBB-218 ve HBB-247'nin kültür süpernatantları ile final konsantrasyon deterjanlar için 1 mg/mL, organik çözücüler için ise %10 olacak şekilde karıştırılmış ve 30 °C de 1 saat inkübe edilmiştir. TCA'nın final konsantrasyonu 100 mg/mL olacak şekilde CFS ile karıştırılmış ve inkübasyondan sonra 10 000 x g'de 5 dakika santrifüjlenerek, pH'sı 7 'ye ayarlanmıştır. EDTA, 0.1, 2.0 ve 5.0 mM final konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Karışımlar inkübasyondan sonra, kuyucuk yöntemiyle *G. stearothermophilus* DSMZ 22 suşuna karşı denenmiştir. Pozitif kontrol olarak işlem görmemiş CFS (steril distile su ile seyreltilmiş), negatif kontrol olarak ise organik çözücülerin ve deterjanların steril distile suda hazırlanmış stok çözeltileri aynı final konsantrasyonda olacak şekilde eklenip denenmiştir. Tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır. Aynı işlemler saflaştırılmış bakteriyosin için de tekrarlanmıştır.

3.4 Bakteriyosin Üretimi ve Gelişim Üzerine Ortam Koşullarının Etkileri

3.4.1 Bakteriyosin aktivitesinin hesaplanması

Bakteriyosin aktivitesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi için CFS'lerden ardışık dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu amaçla, kullanılan ortamlardan steril eppendorflara 100 µl dağıtılmış ve CFS'lerden 100 µL alınarak 2'şer kat olacak şekilde (0,2,4,8,16,32,64,128) seyreltmeler yapılmıştır. Bu dilüsyonlardan 50 µl alınarak içerisinde indikatör bakteri *G. stearothermophilus* DSMZ 22 bulunan Nutrient Agar plaklarındaki kuyucuklara eklenmiştir. İnkübasyondan sonra zon görülen en son seyreltme baz alınarak hesaplama yapılmıştır.

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

3.4.2. Farklı besiortamlarında gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi

Farklı besiortamlarında aktivitenin değerlendirilmesi için, izolatlar ticari olarak satılan çeşitli sıvı besiyerlerine ekilmiş ve 24 saat aralıklarla üç gün boyunca absorbans ölçülerek, aynı anda aktivite tayini yapılmıştır. Caso (Triptik Soy) Broth, Brain Heart Infusion Broth, Nutrient Broth, Tryptose Broth, Luria-Bertani Broth ortamlarına inokulum miktarı % 2 olacak şekilde izolatların gecelik kültürlerinden ekim yapılmış ve erlenler 65 °C'de 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. 24 saatte bir alınan örneklerden 600 nm de absorbans ölçülmüş, kuru ağırlık tayini yapılmış ve kuyucuk yöntemiyle aktivite belirlenmiştir. Tüm denemeler 3 tekrarlı yapılmıştır.

3.4.3. İzolatların büyüme eğrilerinin çıkarılması ve bakteriyosin üretim evrelerinin belirlenmesi

İzolatların büyüme eğrilerini ve bakteriyosin üretim evrelerini belirlemek amacıyla izolatların BHI broth ortamındaki 24 saatlik kültürlerinden, 600 nm'de absorbans O.D. 0.1 olacak şekilde ayarlanmış ve erlenlere %2 oranında ekim yapılmıştır. 65 °C'de inkübe edilen erlenlerden belirli aralıklarla örnek alınmış ve örneklerden

absorbans ölçülerek bakteriyosin aktivitesi tayin edilmiştir. İzolatlardaki bakteriyosin üretiminin gelişimin hangi evresinde başladığı ve maksimum aktiviteye hangi saatte ulaştığı belirlenmiştir.

3.4.4. Farklı pH'larda gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi

İzolatların farklı pH'lardaki gelişimini izlemek ve bakteriyosin aktivitesinin en iyi hangi pH'da gerçekleştiğini belirlemek amacıyla, pH'ları 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ve 8.5'a ayarlanmış BHI broth ortamları kullanılmıştır. İzolatların gecelik kültürlerinden erlenlere % 2 oranında ekim yapıldıktan sonra, 65 °C'de inkübe edilen erlenlerden HBB-218 suşu için 72., HBB-247 suşu için ise 24. saatte, örnekler alınmış ve son pH, absorbans, kuru ağırlık ve aktivite değerleri ölçülmüştür. Tüm denemeler 2 tekrarlı yapılmıştır.

3.4.5. Farklı sıcaklıklarda gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi

Farklı sıcaklık derecelerinde büyüme ve bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi için, BHI broth ortamları kullanılmıştır. Ortamlar otoklavlanmadan önce, pH'ları 1 M HCl ile (denenecek sıcaklıklarda) HBB-218 suşu için 6.0, HBB-247 için ise 6.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Besiortamlarına, izolatların gecelik kültürlerinden % 2 oranında ekim yapılmıştır. Erlenler 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 °C'de inkübe edilmiştir. HBB-218 suşu için 72., HBB-247 suşu için ise 24. saatte, örnekler alınarak, son pH, absorbans, kuru ağırlık ve aktivite değerleri ölçülmüştür. Tüm denemeler 2 tekrarlı yapılmıştır.

3.4.6. Farklı azot kaynaklarında gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi

Farklı azot kaynaklarında gelişim ve aktiviteyi belirlemek amacıyla BHI broth ortamındaki % 2.75'lik azot kaynağı (kalp-beyin ekstresi ve proteaz pepton), aynı oranda diğer azot kaynakları ile değiştirilmiştir. Azot kaynakları olarak, maya özütü (yeast extract), et özütü (meat extract), kazein pepton, soya pepton, amonyum sülfat,

amonyum nitrat ve üre denenmiştir. Azot kaynaklarına ek olarak ortamlara BHI brothda bulunan oranda glukoz (20 g/L), NaCl (5 g/L), Di-sodyum fosfat (2,5 g/L) eklenmiştir. Ortamların pH'sı, (60 °C'de) HBB-218 için 6.0'ya, HBB-247 için ise 6.5'e ayarlanmış ve izolatların 24 saatlik kültürlerinden %2 oranında ekim yapılmıştır. HBB-218 suşu için 72., HBB-247 suşu için ise 24. saatte, örnekler alınarak son pH, absorbans, kuru ağırlık ve aktivite değerleri ölçülmüştür. Tüm denemeler 2 tekrarlı yapılmıştır.

En iyi azot kaynağı olarak her iki suş için de soya peptonun seçilmesinden sonra, farklı soya pepton oranları denenmiştir. Bu amaçla, temel ortamlara %1, %2, %2,75, %3 ve %4 oranında soya pepton eklenmiştir. Ortamların pH'sı, (60 °C'de) HBB-218 için 6.0'ya, HBB-247 için ise 6.5'e ayarlanmış ve izolatların 24 saatlik kültürlerinden %2 oranında ekim yapılmıştır. HBB-218 suşu için 72., HBB-247 suşu için ise 24. saatte, örnekler alınarak, son pH, absorbans, kuru ağırlık ve aktivite değerleri ölçülmüştür. Tüm denemeler 2 tekrarlı yapılmıştır.

3.4.7. Farklı şeker kaynaklarında gelişim ve bakteriyosin üretiminin belirlenmesi

Farklı şekerlerin gelişim ve aktivite üzerine etkisini denemek amacıyla, glikoz, maltoz, sükröz, galaktoz, fruktoz ve laktoz şekerleri kullanılmıştır. Azot kaynağı olarak %3 soya pepton içeren temel ortamlara % 0.2 oranında farklı şekerler eklenmiştir. Ortamların pH'sı, (60 °C'de) HBB-218 için 6.0'ya, HBB-247 için ise 6.5'e ayarlanarak izolatların 24 saatlik kültürlerinden %2 oranında ekim yapılmıştır. HBB-218 suşu için 72., HBB-247 suşu için ise 27. saatte, örnekler alınarak, son pH, absorbans, kuru ağırlık ve aktivite değerleri ölçülmüştür. Tüm denemeler 2 tekrarlı yapılmıştır.

En iyi şeker kaynağı olarak HBB-218 için galaktoz, HBB-247 için ise sükröz belirlendikten sonra şeker oranları optimize edilmiştir. Bu amaçla, seçilen şekerlerden temel ortamlara % 0.1, % 0.2, % 0.5, % 1, % 2, % 3 ve % 4 oranında eklenmiştir. Ortamların pH'sı, (60 °C'de) HBB-218 için 6.0'ya, HBB-247 için ise 6.5'e ayarlanmış ve izolatların 24 saatlik kültürlerinden %2 oranında ekim yapılmıştır. HBB-218 suşu için 72., HBB-247 suşu için ise 24. saatte, örnekler alındı

ve son pH, absorbans, kuru ağırlık ve aktivite değerleri ölçülmüştür. Tüm denemeler 2 tekrarlı yapılmıştır.

3.5. Bakteriyosinlerin Etki Tarzlarının Belirlenmesi

Bakteriyosinlerin etki tarzının (bakterisidal/bakteriyostatik) belirlenebilmesi için indikatör suş olarak *G. stearothermophilus* DSMZ 22 kullanılmıştır. İndikatör suşun gecelik kültüründen, (2 adet) 400 mL Nutrient Broth ortamına 2'şer mL inokule edilmiştir. Saat başı alınan örneklerden 600 nm'de absorbans ölçülmüş ve canlı hücre sayımı yapılmıştır.

55 °C'de, 5 saat inkübe edilen kültürler, 5. saat sonunda 8 erlene (40 ml) olacak şekilde dağıtılmıştır. Erlenlere, aktivitesi önceden belirlenen CFS'lerden 10, 100 ve 1000 µl eklenmiştir. HBB-218'elde edilen CFS'nin aktivitesi 6400, HBB-247 için ise 102 400 AU/mL olarak tayin edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan erlenlere CFS eklenmemiştir.

Farklı miktarlarda CFS eklenmiş erlenlerden ve kontrol grubundan 10. saate kadar ve 24. saatte absorbans ölçülmüş ve canlı hücre sayımı yapılmıştır.

3.6 Bakteriyosinlerin Saflaştırılması

3.6.1. İzolatların geliştirilmesi ve kültür sıvılarının toplanması

Bakteriyosinlerin saflaştırılması için, izolatlar optimum büyüme koşullarında geliştirilmiştir. HBB-218, %3 soya pepton ve %0,1 galaktoz içeren toplam 500 mL ortamda (60 °C, pH 6.0), 72 saat, HBB-247 ise % 3 soya pepton ve % 1 fruktoz içeren toplam 500 mL ortamda (60 °C, pH 6,5) 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, sıvı kültürler, 8 000 x g'de 10 dakika (+4 °C), santrifüjlenerek süpernatantlar toplanmıştır.

3.6.2. Protein tayini

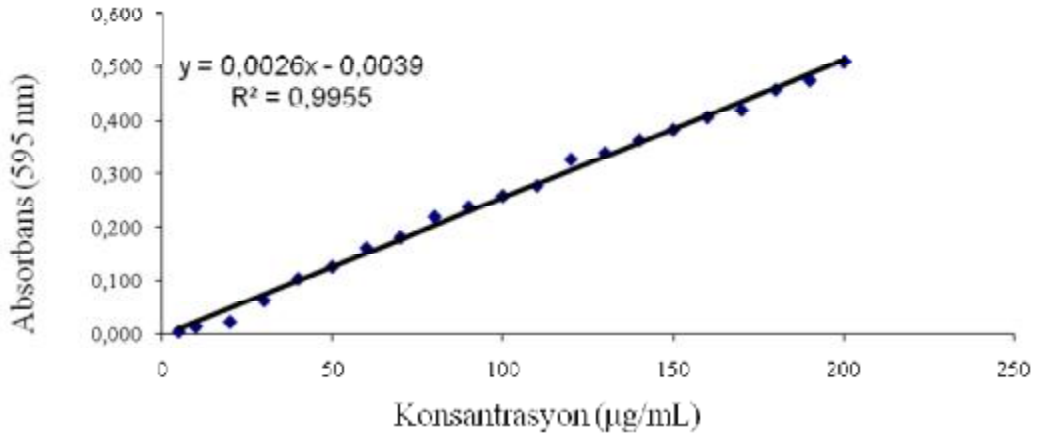
Çalışma boyunca protein tayinleri Bradford yöntemi kullanılarak yapılmıştır. (Bradford, 1976). Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının proteinlere bağlanması esasına dayanan bir yöntemdir. Coomassie Brilliant Blue

G250 negatif yüklüdür, bu durumda kırmızı renklidir ve 470 nm’de maksimum absorbans verir. Boya proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlandığında mavi renk alır ve 595 nm’ de maksimum absorbans verir. Bu yöntemde renk oluşumu 2 dakika sonra gerçekleşir ve 1 saat stabil kalır.

Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. BSA’nın 1 mg/mL’ lik stok çözeltisi hazırlanarak, standart çözeltiler bu stoktan 5-200 µg/mL olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 100’ er µL aktarılmış, köre ise 100 µL ultra saf su koyulmuştur. Bütün tüplere 5’er mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G250 çözeltisinden eklenerek karıştırılmıştır. İki dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve protein standart grafiği çizildi (Şekil 3.1).

Şekil 3.1. Protein standart grafiği



Protein tayini yapılacak örnekler, yukarıda belirtildiği şekilde Coomassie Blue ile karıştırıldıktan sonra, 2 dakika beklenmiş ve 595 nm’de absorbans ölçülmüştür. Bulunan değer formülde yerine konularak, protein miktarı µg/mL cinsinden hesaplanmıştır.

3.6.3. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Suşların sıvı kültürlerinden elde edilen hücresiz üst fazlardaki proteinleri çöktürmek amacıyla amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesini optimize etmek amacıyla %20, %40, %60, %80 oranında doymuş amonyum sülfatla yarım saat boyunca (+4 °C), manyetik karıştırıcıda (Yellowline, MSH-basic) muamele edilen örnekler 10 000 x g'de (+4 °C) 30 dakika santrifüjlenmiştir (Sigma 3K30). Oluşan pelletler (20 mM, pH 7.0) fosfat tamponunda çözülmüştür. Pelletlerde ve %80'lik çöktürmeden sonra oluşan üst fazda protein miktarları belirlenmiş ve antibakteriyal aktivite tayini yapılmıştır.

HBB-218 ve HBB-247 suşları için % 80 doymuşlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra pelletler fosfat tamponunda çözülmüştür. Çökelti, 1000 Da diyaliz membranı (ZelluTrans-Roth E887.1) kullanılarak, aynı fosfat tamponuna karşı +4 °C'de manyetik karıştırıcıda 24 saat boyunca diyaliz edilmiştir. Her seferinde diyalizatların hacmi, aktiviteleri ve protein miktarları ölçülmüştür.

Diyalizatları konsantre etmek amacıyla ultrafiltrasyon işlemi uygulanmıştır. Örnekleri yoğunlaştırmak amacıyla, azot gazı ile (3.5 atm) basınç altında, 5 000 MWCO ultrafiltrasyon membranı (Sartorius) kullanılmıştır. Konsantrasyon işlemleri çalkalamalı inkübatörde yapılmıştır.

3.6.4. Jel filtrasyon kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Sephadex G-50 kullanılmıştır. Sephadex G50 1.500-30.000 Da aralığındaki proteinleri ayırmak için kullanılan bir dolgu malzemesidir. Sephadex G-50 10 mL için 1 g tartılarak fosfat tamponu (20 mM, pH 7.0) içerisinde 1 saat kaynar su banyosunda kaynatılmış ve sonrasında soğutulmuştur (Pharmacia, Fine Chemicals). Daha sonra degaze edilerek, 100 cm (boy) x 1 cm (çap) boyutlarındaki kolona karıştırılarak dökülmüştür. Kolon tamponla yıkanıp kararlı hale getirildikten ve dolgu maddesi kolona tamamen yerleştikten sonra, konsantre diyalizattan 3 mL örnek kolona yüklenmiştir ve 0.15 M NaCl içeren fosfat tamponu kullanılarak akış başlatılmıştır. Kolonun ölü hacmi 39 mL olarak ölçülmüş ve kolon akış hızı 21 mL/saat olacak şekilde ayarlanmıştır. Kolondan çıkan örnekler, fraksiyon kollektörü (Spectra/Chrom CF1) kullanılarak,

2.5 mL hacminde toplanmış ve bu fraksiyonlardan protein ve aktivite tayini yapılmıştır. Protein tayini için örneklerin 280 nm'deki absorbanları ölçülmüştür ve absorban veren fraksiyonlar indikatör bakteriye karşı denenerek zon çapları ölçülmüştür. İndikatör bakteri kullanılarak yapılan aktivite denemelerinde, aktif çıkan fraksiyonlar toplanarak, bir sonraki saflaştırma adımında kullanılmıştır.

3.6.5. İyon değiştirici kromotografi

İyon değiştirici kromotografi için, sıvı kromotografi kolonu (Sigma, C-3794) kullanılmıştır. Çalışmamızda, yatak hacmi 8 mL olan ve 10 cm (boy) x 1.0 cm (çap) boyutlarındaki kolonda 3 mL anyon değiştirici dolgu maddesi DEAE-sepharose kullanılmıştır. Jel filtrasyonundan çıkan aktif fraksiyonlar toplanarak ultrafiltrasyon ile konsantre edilmiş ve kolona yüklenmiştir. İlk etapta, hareketli faz olarak (20 mM, pH 7.0) fosfat tamponu uygulanmıştır. Protein çıkışının kesildiği noktadan itibaren aynı tampon içerisinde hazırlanan 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 ve 1 M NaCl içeren tamponlar kullanılarak tuz gradiyenti oluşturulmuştur. Kolon akış hızı ayarlanarak, fraksiyonlar toplanmıştır. Bu fraksiyonlardan protein ve aktivite tayini yapılmıştır. Protein tayini için örneklerin 280 nm'deki absorbanları ölçülmüştür. 280 nm'de absorban veren fraksiyonlar, indikatör bakteriye karşı denenerek, zon çapları ölçülmüştür.

3.6.6. Trisin-SDS PAGE yöntemi ile proteinlerin elektroforezi

Suşların ürettikleri bakteriyosinlerin moleköl ağırlıklarını belirlemek ve saflaştırma aşamalarında protein bantlarını görüntülemek amacıyla Trisin SDS PAGE elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Trisin SDS PAGE düşük moleköl ağırlıklı proteinleri görüntülemek için kullanılan bir yöntemdir ve 1 kDa-40 kDa aralığındaki proteinlerin görüntülenmesinde kullanılır. HBB-218 suşunun ürettiği bakteriyosinin moleköl ağırlığı düşük olduğu için görüntüleme ve jellerde antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek amacıyla ayırma jelinde %16'luk akrilamid kullanılırken, HBB-247 suşunun ürettiği bakteriyosinin moleköl ağırlığını belirlemek için %12,5'luk akrilamid kullanılmıştır.

Trisin-SDS page yöntemi için jel hazırlanırken, yoğunlaştırma jeli için %4'lük akrilamid kullanılmıştır. Cam plakların arasına önce ayırma jeli dökülerek, üzerine

distile su eklenmiş ve yaklaşık yarım saat polimerize olması için beklenmiştir. Alt jel polimerize olduktan sonra, distile su filtre kağıdı ile çekilmiş ve alt jelin üzerine yoğunlaştırma jeli (2 cm) dökülerek, kuyucuklar için tarak takılmıştır (Bio-Rad miniprotean). Üst jel de polimerize olduktan sonra tarak çıkarılarak, plaklar elektroforez tankı içine yerleştirilmiştir. İç hazneye katod tamponu, dış kısma ise, tankın yarısına kadar anod tamponu doldurulduktan sonra örnekler yoğunlaştırma jelindeki kuyucuklara yüklenmiştir. Örnekler yüklenmeden önce, sample buffer ile karıştırılarak, kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra (kuyucuk başına) 0,1-0,2 mg/mL protein içeren örneklerden kuyucuklara yüklenmiş ve elektroforez 100 Voltta yaklaşık 3 saat boyunca (+ 4 °C'de) sürdürülmüştür (UVP-PSU 400/600). Daha sonra jeller plakların arasından çıkarılarak yaklaşık 5-10 dakika distile suda bekletilmiştir. Distile sudan çıkarılan örnekler, 1 saat % 5'lik taze hazırlanmış gluteraldehit çözeltisinde bekletildikten sonra, jel 3 kez arka arkaya distile su ile 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkama işlemi bitince, jel % 0.025'lik Coomasie blue çözeltisinde 1 saat çalkalayıcıda (New Brunswick Scientific, Excella E24) bekletilmiştir. Süre sonunda boyayı gidermek için % 10'luk asetik asit kullanılmış ve protein bantları görüntülenmiştir. Bakteriyosinlerin molekül ağırlığı hesaplanırken Ultra Düşük Aralıklı Moleküler Ağırlık Markerı (Sigma-M3546) kullanılmıştır. Marker içeriğinde yer alan proteinler, Trioz fosfat izomeraz (26.600 Da), Miyogloblin (17.000 Da), Laktalbumin (14.200 Da), Aprotinin (6.500 Da), İnsülin Chain B, Oxidize Bovine (3.496), Bradikinin (1.060 Da)'dır.

Bakteriyosin aktivitesini jel üzerinde saptamak ve protein bantlarında karşılık gelen bantı belirleyebilmek amacıyla, proteinlerin yüklendiği jele, SDS-siz örnek tamponuyla karıştırılan örneklerden de yüklenmiştir. Jelin bir yarısına yukarıda belirtilen şekilde boyama yapılırken, diğer kısım direkt BHI agar üzerine alınmış ve üzerine içerisinde indikatör bakteri bulunan yumuşak agar (%0,7 agar) dökülmüştür. 55 °C'de yaklaşık 7 saat inkübasyondan sonra, zon oluşan kısmın, jelin üst kısmına uzaklığı ölçülerek, jelin boyanan diğer kısmında Rf değerleri ölçülerek hangi protein bantına karşılık geldiği belirlenmiştir.

3.6.7. Bakteriyosinlerin molekül ağırlıklarının hesaplanması

Elektroforez sonucunda, çalıştığımız bakteriyosine ait protein bantları belirlendikten sonra, bakteriyosinlerin molekül ağırlıkları hesaplanmıştır. Bu amaçla, elektroforez sonunda boyanın, marker içerisinde yer alan bantların ve bakteriyosinlere ait bantların jelde aldıkları yol ve alt jelin boyu ölçülmüştür. Daha sonra ölçülen bu bantlara ait Rf değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$Rf: \frac{P_y}{J_b} \times \frac{O_b}{I_y}$$

P_y = Proteinin aldığı yol

J_b = Boyamadan sonra jelin boyu

O_b = Boyamadan önce jelin boyu

I_y = Boyamadan önce boyanın aldığı yol

Rf değerleri hesaplandıktan sonra, standartların molekül ağırlıklarının logaritması alınmış ve Rf değerine karşı grafiklendirilmiştir. Elde edilen standart grafikteki eşitlik baz alınarak, bakteriyosinlerin molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Termofilik bakterilerin izolasyonu

Çalışmamızda, Aydın, Muğla ve Denizli illerinde bulunan sıcak su kaynakları, termal çamur ve birikinti örnekleri ve toprak örneklerinden toplam 208 adet termofilik bakteri suşu izole edilmiştir. İzolatlara ADÜ Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji stoklarında HBB kodlu numaralar verilerek tümü % 20'lik skim milk içeren cryotüplerde (-80) °C'de muhafaza edilmiştir.

Termofilik izolatların büyük çoğunluğunu çamur, çamur havuzları ve birikinti örneklerinden izole edilenler oluşturmaktadır (%61). Toprak örneklerinden izole edilen termofilik suşlar, genel toplamın %31'ini oluşturmakta ve bunu su örneklerinden izole edilenler izlemektedir (%8). Özellikle sondaj sularından alınan örneklerde, zenginleştirme aşamasında bile gelişme gözlenmemiştir. Bunun nedeni, bu tip çevrelerin anaerobik karakterde olması ve çalışmamızda kültürlerin aerobik olarak inkube edilmesi olabilir.

4.2 Antibakteriyal Aktivite Taraması ve İzolatların Seçilmesi

Bakteriyal izolatların antimikrobiyal aktiviteleri araştırılırken pek çok farklı metot kullanılmaktadır. Bu metotlar arasında, agar ortamında yapılanlara örnek olarak, damlatma testi ve kuyucuk testi (Hernandez *et al.*, 2005), agar disk difüzyon yöntemi (Motta ve Brandelli 2002), ve üçlü agar tabakası (Todorov, 2000) yöntemleri verilebilir. Ayrıca bazı araştırmacılar sıvı ortamda dilüsyon yöntemini (Lash *et al.*, 2002) kullanmaktadırlar. Çalışmamızda, izolatların antibakteriyal aktivitelerini belirleyebilmek amacıyla, ön taramalar için Martirani *et al.*, (2002) tarafından kullanılan tarama metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Bakteriyosinler, özellikle üretici organizmaya yakın türleri hedef alan inhibitör maddeler oldukları için indikatör bakteri olarak yine termofilik bir tür olan *G. stearothermophilus* DSMZ 22 suşu seçilmiştir. Bu bakteri Gram pozitif, 55 °C'de gelişen ve özellikle konserve gıdalarda bozulmaya neden olan bir bakteridir.

Bu yöntem kullanılarak yapılan ön taramalarda 45 adet izolatın *G. stearothermophilus* DSMZ 22 suşuna karşı antagonistik etki gösterdiği, 18 tanesinin ise oldukça güçlü inhibisyon özelliği olduğu belirlenmiştir. Pozitif izolatların arasından antibakteriyal etki spektrumu geniş olanları seçebilmek amacıyla, aynı metot kullanıldığında, diğer bakterilere karşı da antagonistik etki gözlenmiştir. Ancak, çizgi metoduyla inhibisyon açısından pozitif çıkan suşların çoğunda, kuyucuk yönteminde aktivite gözlenmemiştir.

Araştırmacılar bunun çeşitli sebepleri olabileceğini öne sürmüşlerdir. Prangishvili *et al.*, (2000) yaptıkları çalışmadan *Sulfolobus* cinsine ait termofilik suşlarda bakteriyosin aktivitesini incelemişler ve katı ortamda damlatma metodu ile yapılan denemede geniş inhibisyon zonları gözlemlemişlerdir. Ancak sıvı ortamdaki aktiviteyi belirleyebilmek için hücresiz süpernatantları 100 kat konsantre etmeleri gerekmiştir. Araştırmacılar, plaklarda gelişen kolonilerin etrafında serbest olarak difüze olan toksinin derişiminin daha yüksek olacağını belirtmişlerdir. Ayrıca, bazı hücreye-bağlı bakteriyosinlerin sadece katı ortamlarda üretilmesi de bu gibi durumlara yol açabilmektedir.

Çeşitli Laktobasil suşlarıyla yapılan diğer bir çalışmada ise, antibakteriyal aktivite açısından taranan 87 suştan, 21 tanesinin hem agarlı ortamda, hem de hücresiz kültür süpernatantları ile denendiklerinde, pozitif sonuç verdikleri görülmüştür (Ammor, *et al.*, 2005). Geri kalan izolatların hücresiz kültür süpernatantlarında antibakteriyal etki saptanamamıştır. Araştırmacılar, bu durumla ilgili iki hipotez ileri sürmüşlerdir. Birinci hipoteze göre, bakteriyosin benzeri bileşik, N-terminal hidrofilik kısım ve C-terminal hidrofobik kısım içeriyor olabilir ve bu hidrofobik kısımlar, filtrenin hidrofilik bileşeni tarafından adsorblanıyor olabilir. Filtreden geçirilmiş süpernatanta, kritik seyreltmedeki kültür sıvısı eklendiğinde, bakteriyosin benzeri üretim görülmediği için, bu hipotez elemine edilmiştir. İkinci hipotez ise, bakteriyosin benzeri bileşiğin üretici hücrenin membranına yapışık olduğu ve bu yüzden, indikatör bakteri ile üretici bakteri temasta olamadığı sürece inhibisyon gözlenmeyeceğidir. Yıkamış hücrelerle, yapılan denemede, bu tür hücrelerin indikatör bakterileri inhibe edebildikleri görülmüş ve bu hipotez kabul görmüştür.

Bakteriyosinlerin sadece agarlı ortamlarda saptandığı benzer bir çalışmada, sosisten izole edilen bir *Staphylococcus xylosus* suşu kullanılmıştır (Villani *et al.*, 1997). Sıvı ortamda, inhibitör etkinin görülmemesinin bir diğer nedeni, gelişim sırasındaki protein inaktivasyonu olabilir (Barefoot ve Klaenhammer, 1983; Lyon ve Glatz, 1991). Sıvı kültürlerle bazı faktörlerin eklenmesi de, inhibitör aktiviteyi indükleyebilir (Barefoot ve Nettles, 1993; Saucier, *et al.*, 1995; Tagg, *et al.*, 1976).

İnhibitör maddenin karakterizasyonun yapılabilmesi için, ekstraselüler sıvıda aktivite saptamak zorunludur, çünkü tüm denemeler, hücrelerden ayrılmış kültür sıvıları ile yapılmaktadır. Bu sebeple, çalışmamızda kullanılmak üzere, pozitif izolatlar arasından kuyucuk yöntemi ile sonuç veren ve antimikrobiyal spektrumu en geniş olan HBB-218 ve HBB-247 kodlu izolatlar seçilmiştir.

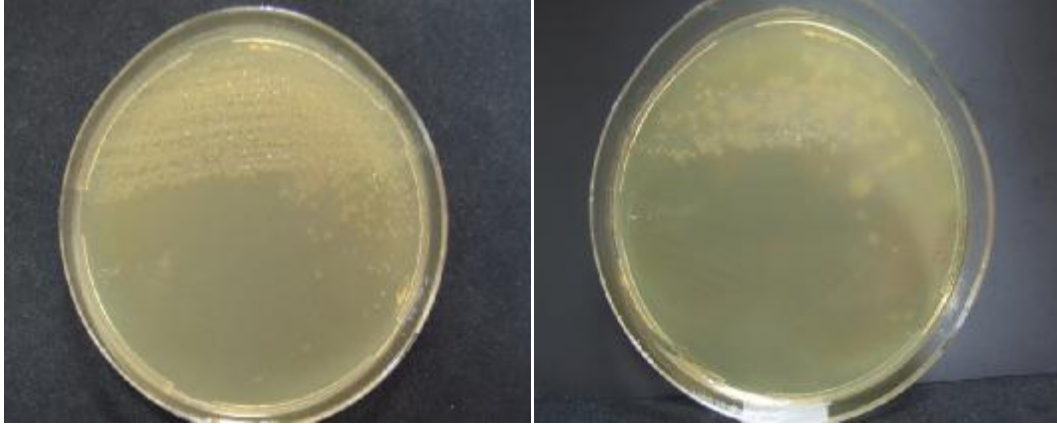
HBB-218 kodlu izolat, Denizli (Yenice)'den alınan toprak örneğinden; HBB-247 ise Gölemezli (Denizli)'de bulunan çamur havuzundan izole edilmiştir.

4.3 İzolatların Tanılanması

4.3.1. Kültürel özellikler

HBB-218 ve HBB-247 kodlu izolatlar, BHI agarda geliştirilerek koloni morfolojileri incelenmiştir. HBB-218'e ait koloniler, koyu sarı renkli, düzgün kenarlı, 1-2 mm çapında, yuvarlak görünümlüdür ve mukoid yapıdadır (Şekil 4.1). HBB-247 ise besiyerinde genelde yaygın bir şekilde gelişmektedir. Kolonileri, koyu sarı-kahve, 1-4 mm çapında, düzensiz kenarlı, yuvarlak görünümlüdür ve mukoid yapıdadır (Şekil 4.2).

Her iki izolatta, Caso broth, BHI broth gibi sıvı ortamlarda geliştiklerinde, yüzeyde yapışkan özellikte biyofilm oluşturmaktadırlar.

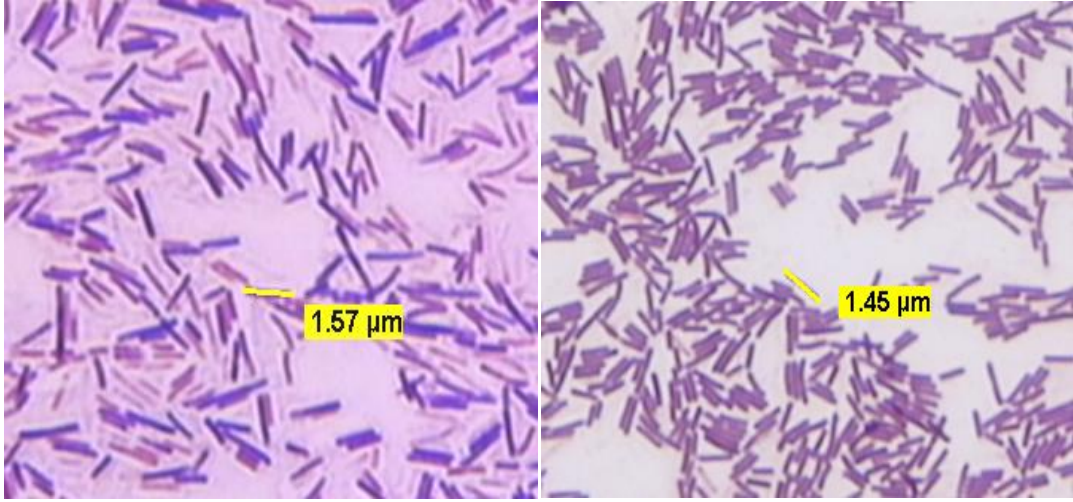


Şekil 4.1 HBB-218 kolonileri

Şekil 4.2 HBB-247 kolonileri

4.3.2. Mikroskobik özellikler

Gram boyama sonucu, HBB-218 (Şekil 4.3)ve HBB-247 (Şekil 4.4) suşuna ait hücrelerin Gram (+) çubuk morfolojide olduğu belirlenmiştir. Endospor boyama sonucu HBB-218 ve HBB-247’de sporulasyonun nadir olduğu görülmüştür. Endosporlar, her iki suşta da terminal konumlu tespit edilmiştir.



Şekil 4.3 HBB-218 Gram boyama

Şekil 4.4 HBB-247 Gram boyama

4.3.3. Biyokimyasal özellikler

İzolatların biyokimyasal özellikleri belirlenirken, genelde termofilik basiller için önemli özellikler kriter olarak alınmıştır (Banat *et al.*, 2004; Kuisiene *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2002). Biyokimyasal testler yapılırken *G. stearothermophilus* DSMZ 22 şahit suş olarak kullanılmıştır. Tanılamada kullanılan özellikler çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 *G. stearothermophilus* DSMZ 22, HBB-218 ve HBB-247 izolatlarının fenotipik özellikleri

Özellikler	DSMZ 22	HBB-218	HBB-247
Gram boyanma	+	+	+
Endospor	Var, terminal	Var, terminal	Var, terminal
Hücre uzunluğu (µm)	2-3,5	1,3-1,6	1,3-1,5
Hücre genişliği (µm)	0,6-1	0,3-0,4	0,3-0,4
Katalaz	+	+	Zayıf
Oksidaz	+	+	+
Glukozdan asit	+	+	+
Adonitolden asit	-	-	-
l-Arabinozdan asit	-	-	-
Cellobiosedan asit	-	-	-
Galaktozdan asit	-	-	-
Ribozdan asit	-	+	-
Glycerolden asit	-	+	+
Inositolden asit	-	-	-
Laktozdan asit	-	-	-
Rhamnozdan asit	-	-	-
Nişasta hidrolizi	-	-	-
Eskulin hidrolizi	-	-	+
Sitrat testi	-	-	-
Denitrifikasyon	-	+	+
Metil-Red testi	+	-	-
VP testi	-	+	+
NaCl aralığı (%)	0.5-5	0.5-<3	0.5-<3
pH aralığı	6.0-8.0	5.5-8.5	5.5-9.0
Sıcaklık aralığı (°C)	37-65	45-70	45-70

4.3.4. İzolatların 16S rRNA analiziyle tanınması

İzolatların 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılmış ve dizi analizi yapılmıştır. Sekans sonuçları Bioedit programı kullanılarak birleştirilmiş ve sonuçta iki izolat için konsensus diziler elde edilmiştir. konsensus diziler, www.pubmed.com adresinde yer alan nükleotid blast programı aracılığıyla veritabanında yer alan diğer 16S rRNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda her iki izolatın da veritabanında bulunan ve tür tanısı yapılmış bakteriler arasında en fazla (%99) oranda *Geobacillus toebii* bakterisi ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Veritabanında yer alan *Geobacillus toebii* bakterilerine ait 16S rRNA dizileri ile izolatlarımızın karşılaştırıldığı sonuçlar Çizelge 4.2 ve 4.3'de verilmiştir. Ayrıca, her iki izolat için, yine BLASTn programında yer alan ve Fast Minimum Evolution metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar Şekil 4.6 ve 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. HBB-218 izolatına ait 16S rRNA konsensus sekans ve BLAST karşılaştırma sonucu

```

5'CCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCC
GAACTGAGAGCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCCCCTCGCGGGTTCGCAGCCCTTTG
TACCGCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTG
ACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCCCCCTAGAGTGCCCAA
CTGAATGCTGGAAGTAGGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC
ATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACCCTGTCCCCC
GAAGGGGGAACGCCCTGTCTCCAGGGTTGTCAGGGGATGTCAAGACCTGGTAAG
GTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCC
GTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAA
CGCGTTAGCTACAGCACTAAAGGGTTTAACCCCTCTAACACTTAGCACTCATCGT
TTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGC
CTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACAT
CTCTACGCATTTACCAGCTACACGTGGAATTCGCTCTCCTCTTCTGCACTCAAG
TCCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACT
TAAGGGACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCCC
CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGGGGCTTCTCGTTAGGT
ACCGTCACCGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTCTTCTTCCCTAACACAGAGC
TTTACGATCCGAAGACCTTCTTCGCTCACGCGGCGTCGCTCCGTCAGACTTTCGT
CCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA
GTCCCAGTGTGGCCGGTACCCCTCTCAGGCCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGA
GCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCGTAAGTGGTAGC
AAAAGCCACCTTTCACCGAAGACCATGCGGTCTTCGGTGTATCCGGTATTAGC
CCCGTTTCCCGGAGTTATCCCGGTCTTACGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCA
CCCGTCCGCGCTAACCGAACAGAAGCAAGCTTCCGTTCCGGTCCGCTCGACTTG
CA'3

```

> [gb|EU214628.1](#) Geobacillus toebii strain mc-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1519

Score = 2386 bits (1292), Expect = 0.0
Identities = 1309/1316 (99%), Gaps = 5/1316 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1 CCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGA 60
      |||
Sbjct1362CCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGA 1303

Query 61 GAGCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCCCCTCGCGGGTTCGCAGCCCTTTGTACCGCCATTG 120
      |||
Sbjct1302GAGCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCCCCTCGCGGGTTCGCAGCCCTTTGTACCGCCATTG 1243

Query121 TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCC 180
      |||
Sbjct1242TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCC 1183

Query181 TCCG-GTTTGTCA-CCGGCAGTCCCCCTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGG-AACTAGGGG 237
      |||
Sbjct1182TCCGACTTT-T-AGCCGGCAGTCCCCCTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAGGGG 1125

Query238 CGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAC 297
      |||
Sbjct1124CGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAC 1065

Query298 CATGCACCACCTGTCACCTGTCCCCCGAAGGGGAACGCCCTGTCTCCAGGGTTGTCA 357
      |||
Sbjct1064CATGCACCACCTGTCACCTGTCCCCCGAAGGGGAACGCCCTGTCTCCAGGGTTGTCA 1005

Query358 GGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCAC 417
      |||
Sbjct1004GGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCAC 945

Query418 CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTACTCCCCAGG 477
      |||
Sbjct944 CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTACTCCCCAGG 885

Query478 CGGAGTGCTTAACGCGTTAGCTACAGCACTAAAGGGTTTAACCCCTCTAACACTTAGCAC 537
      |||
Sbjct884 CGGAGTGCTTAACGCGTTAGCTACAGCACTAAAGGGTTTAACCCCTCTAACACTTAGCAC 825

Query538 TCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGC 597
      |||
Sbjct824 TCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGC 765

Query598 GCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTC 657
      |||
Sbjct764 GCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTC 705

Query658 TACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCGCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCCCCCAG 717
      |||
Sbjct704 TACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCGCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCCCCCAG 645

Query718 TTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGGACCGCCT 777
      |||
Sbjct644 TTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGGACCGCCT 585

```

Query778 GCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCCCCCTACGTATTACCGCGGCT 837
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct584 GCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCCCCCTACGTATTACCGCGGCT 525

Query838 GCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTTCTCGTTAGGTACCGTCACCGTACCGCCCTATTTCG 897
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct524 GCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTTCTCGTTAGGTACCGTCACCGTACCGCCCTATTTCG 465

Query898 AACGGTACTTCTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCGCTCAC 957
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct464 AACGGTACTTCTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCGCTCAC 405

Query958 GCGGCGTCGCTCCGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGT 1017
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct404 GCGGCGTCGCTCCGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGT 345

Query1018AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACGC 1077
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct344 AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACGC 285

Query1078ATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCATCCGT 1137
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct284 ATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCATCCGT 225

Query1138AAGTGGTAGCAAAGCCACCTTTCAACCGAAGACCATGCGGTCTTCGGTGTATCCGGTA 1197
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct224 AAGTGGTAGCAAAGCCACCTTTCAACCGAAGACCATGCGGTCTTCGGTGTATCCGGTA 165

Query1198TTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCGGTCTTACGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCA 1257
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct164 TTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCGGTCTTACGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCA 105

Query1258CCCGTCCGCCGCTAACCGAACAGAAGCAAGCTTCCGTTCCGGTCCGCTCGACTTGCA 1313
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct104 CCCGTCCGCCGCTAACCGAACAGAAGCAAGCTTCCGTTCCGGTCCGCTCGACTTGCA 49

Çizelge 4.3 HBB-247 izolatına ait 16S rRNA konsensus sekans ve BLAST karşılaştırma sonucu

```
3' ATGCAGTTCGAGCGGACCGAACGGAAGCTTGCTTCTGTTTCGGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCGTAAGACCGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGGGCTAATACCGGATAACACCGAAGACCGCATGGTCTTCGGTTGAAAGGT
GGCTTTTGTACTACTTACGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCCGGTGAGCGAAGAAGGTCTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAGGGAAGAAGAAGTACCGTTCGAATAGGGCGG
TACGGTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
AGGCGGTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGGTCAT
TGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG
TCTGTAACGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTTTTCCCTT
TAGTGCTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGCT
TGAAACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAGCGGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGTACATCCCCTGACAACCTG
GAGACAGGGCGTTCCTCCCTTCGGGGGACAGGGTGTAGAGGTGGTGATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTC
GCCCTAGTTGCCAGCATTAGTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
CACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGGTGCGAACCCGCGAGGGGGAGCGAA
TCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
CCGGAATCGCTAGTAATCGCG 5'
```

```
> dbj|AB116120.1 Geobacillus toebii gene for 16S ribosomal RNA,
partial sequence,
strain:T1680
Length=1506
```

```
Score = 2357 bits (1276), Expect = 0.0
Identities = 1303/1316 (99%), Gaps = 8/1316 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 1 ATGC-AGTTCGAGCGGACCGAACGGAAGCTTGCTTCTGTTTCGGTTAGCGGCGGACGGGTG 59
      |||  ||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 26 ATGCAAG-TCGAGCGGACCGAACGGAAGCTTGCTTCTGTTTCGGTTAGCGGCGGACGGGTG 84

Query 60 AGTAACACGTGGGTAACCTGCCCGTAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA 119
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 85 AGTAACACGTGGGTAACCTGCCCGTAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA 144

Query 120 CCGGATAACACCGAAGACCGCATGGTCTTCGGTTGAAAGGTGGCTTTTGTACTACTTAC 179
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 145 CCGGATAACACCGAAGACCGCATGGTCTTCGGTTGAAAGGTGGCTTTTGTACTACTTAC 204

Query 180 GGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGC 239
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 205 GGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGC 264
```

Query 240 GTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC 299
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 265 GTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC 324

Query 300 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGT 359
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 325 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGT 384

Query 360 GAGCGAAGAAGGTCTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAGAAGTACCGTTTCG 419
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 385 GAGCGAAGAAGGTCTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAGAAGTACCGTTTCG 444

Query 420 AATAGGGCGGTACGGTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG 479
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 445 AATAGGGCGGTACGGTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG 504

Query 480 CCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG 539
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 505 CCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG 564

Query 540 GCGGTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACT 599
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 565 GCGGTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACT 624

Query 600 GGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA 659
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 625 GGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA 684

Query 660 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCGC 719
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 685 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCGC 744

Query 720 GAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT 779
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 745 GAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT 804

Query 780 GCTAAGTGTAGAGGGGTTTTCCCTTTAGTGCTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCT 839
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 805 GCTAAGTGTAGAGGGGTTTTCCCTTTAGTGCTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCT 864

Query 840 GGGGAGTACGGCCGCAAG-CTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA-GCGGG 897
 ||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 865 GGGGAGTACGGCCGCAAGCT-GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG- 922

Query 898 TGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCCT 957
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 923 TGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCCT 982

Query958 GACAACCCTGGAGACAGGGCGTTCCCCCTTCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGG 1017
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct983 GACAACCCTGGAGACAGGGCGTTCCCCCTTCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGG 1042

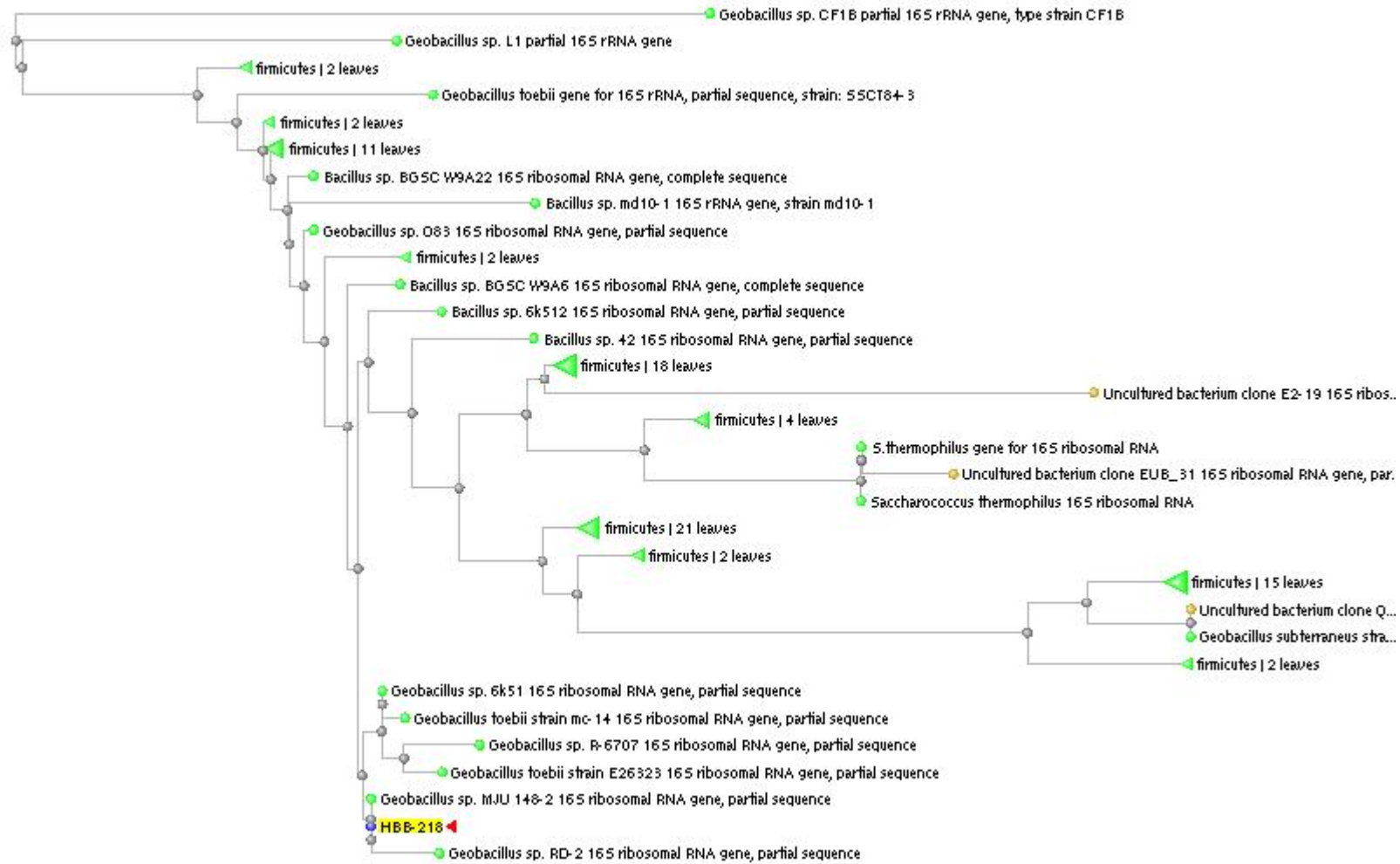
Query1018TTGTTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGC 1077
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct1043TTGTTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGC 1102

Query1078CCCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGTGACAAACGGAGGA 1137
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct1103CCCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGYKACAAAYCGGAGGA 1162

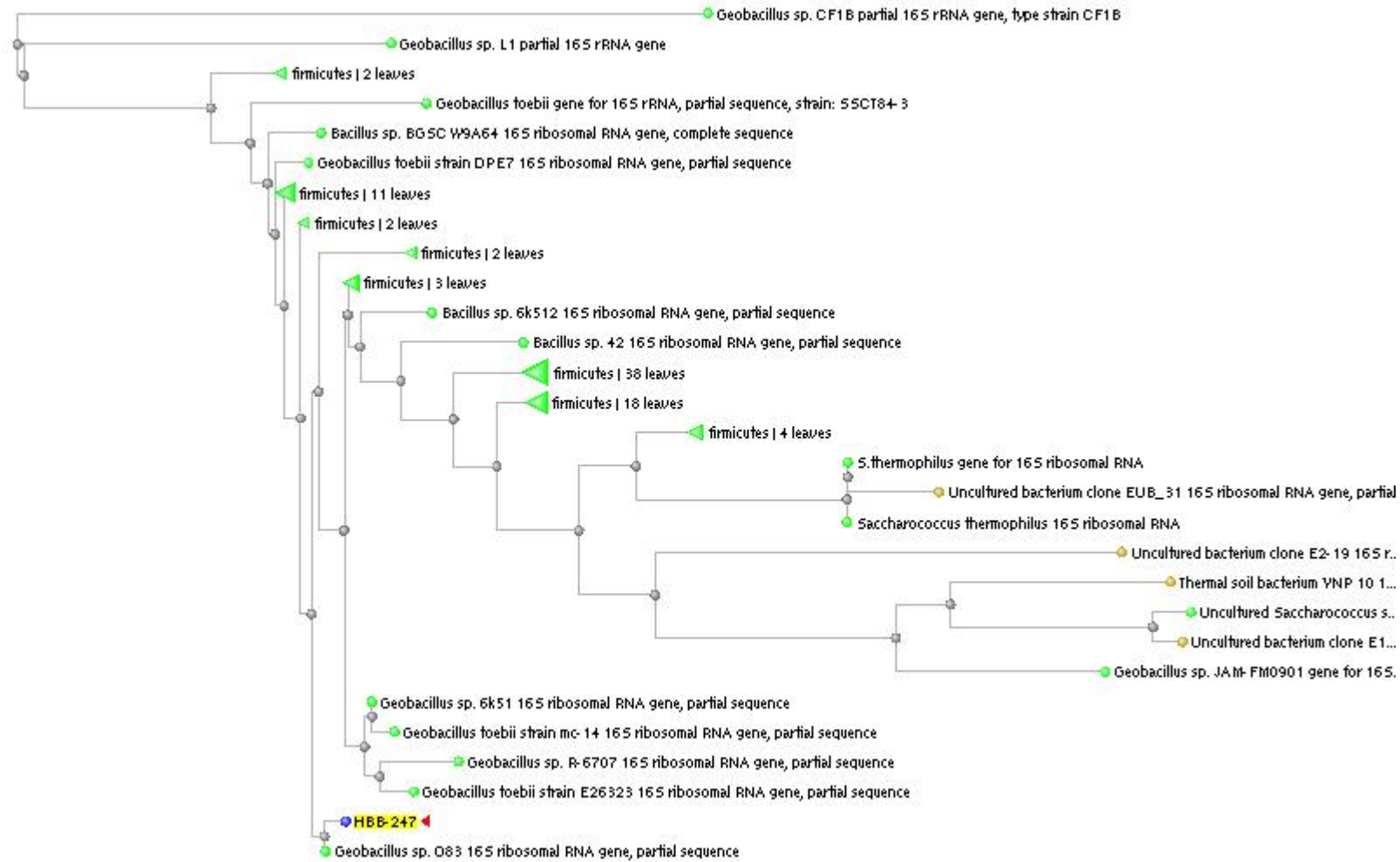
Query1138AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC--GTGCTACAA 1195
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct1163AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAA 1222


```
Query1196TGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCA 1255
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct1223TGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCA 1282

Query1256GTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCG 1311
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct1283GTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCG 1338
```



Şekil 4.5. HBB-218 izolatına ait filogenetik ağaç



Şekil 4.6. HBB-247 izolatına ait filogenetik ağaç

4.4 İzolatların Antibakteriyal Etki Spektrumları

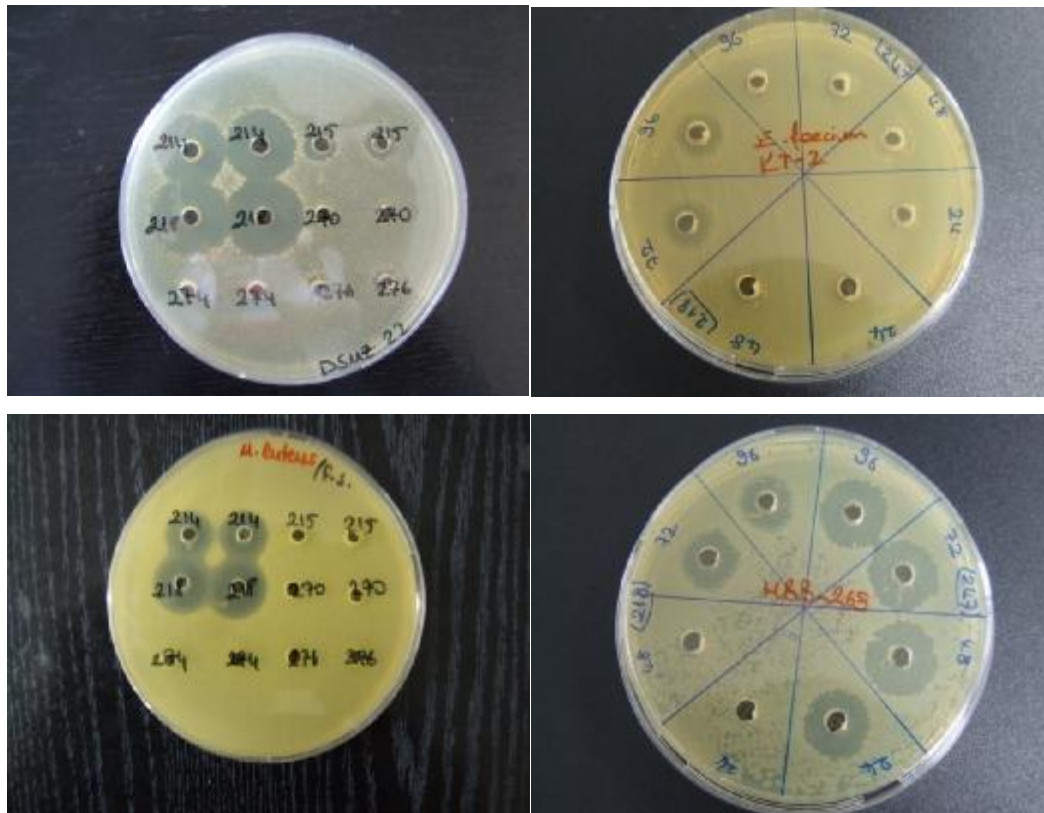
İzolatların antibakteriyal etki spektrumlarını belirlemek amacıyla, kuyucuk yöntemiyle Gram (+) ve Gram (-), toplam 46 adet bakteriye karşı antibakteriyal aktivite denendi. Denemeler yapılırken, aynı kültürün, 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde alınan örnekler kullanılarak izolatların aktivite spektrumları belirlendi.

Çizelge 4.4. HBB-218 izolatının antibakteriyal etki spektrumu

İndikatör suş	Zon çapları (mm)			
	24 saatlik CFS	48 saatlik CFS	72 saatlik CFS	96 saatlik CFS
<i>G. stearotherophilus</i> DSMZ 22	20	20	20	20
<i>B. sphaericus</i> DSM 396	9	9	9	9
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	11	11	11	11
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	9	9	9	9
<i>L. plantarum</i> DSM 20174	10	10	10	10
<i>Listeria</i> sp.	-	9	9	9
<i>E. gallinarium</i> MÇ-3	-	-	12	13
<i>E. gallinarium</i> LC-M1	-	-	14	14
<i>E. faecium</i> MS-1	-	-	10	10
<i>E. faecium</i> KT-2	-	-	13	13
<i>E. durans</i> K-1	9	10	12	13
<i>E. durans</i> KT-1	-	-	14	14
<i>E. avium</i> AS-3	-	-	14	13
<i>B. thermosphacta</i> DSM 20171	-	-	10	8
HBB-134	10	16	18	18
HBB-234	8	11	11	11
HBB-247	18	18	21	21
HBB-269	-	-	12	12
HBB-270	8	8	10	15
HBB-229	15	16	18	20
HBB-301	15	18	18	18
<i>C. fimi</i> DSM 20114	16	20	22	24
<i>C. pasteurianum</i> DSM 525	20	20	24	25

Çizelge 4.5. HBB-247 izolatının antibakteriyal etki spektrumu

İndikatör suş	Zon çapları (mm)			
	24 saatlik CFS	48 saatlik CFS	72 saatlik CFS	96 saatlik CFS
<i>G. stearotherophilus</i> DSMZ 22	20	20	20	20
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	9	9	9	9
<i>Listeria</i> sp.	9	9	9	9
<i>E. avium</i> AS-3	-	-	10	10
HBB-134	14	14	14	16
HBB-269	12	12	18	18
HBB-270	14	14	18	20
HBB-229	13	14	15	15
<i>C. pasteurianum</i> DSM 525	20	20	20	20
<i>C. fimi</i> DSM 20114	-	10	10	10



Şekil 4.7. HBB-218 ve HBB-247'nin antimikrobiyal spektrumuna örnekler

HBB-218 suşunun ürettiği bakteriyosin, 46 adet suştan 23 tanesine; HBB-247'nin ürettiği bakteriyosin ise, denenen suşların 10 tanesine karşı etkili bulunmuştur. Antibakteriyal etki açısından, HBB-218, HBB-247'ye göre daha fazla sayıda suşa karşı etkilidir. Her iki bakteriyosininde etki ettiği ortak suşlar bulunmaktadır. Bu durum, iki bakterinin de termofilik olması ve aynı türe ait suşlar olmalarına bağlanabilir.

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından doğrudan ribozomal olarak sentezlenen, ekstraselüler peptid veya proteinlerdir ve genelde üretici organizmaya yakın akraba türlere karşı antibakteriyal aktivite gösterirler (De Vuyst and Vandamme 1994; Riley and Wertz, 2002). Örneğin, Gram pozitif bakterilerin ürettiği bakteriyosinlerin büyük bir kısmı, daha çok Gram pozitif bakteriler üzerine etkilidir. Bununla birlikte hem Gram pozitif, hem de Gram negatif temsilcilerin gelişimini engelleyen bakteriyosinler de bulunmaktadır .

Çalışmamızda, kullandığımız bakterilerin her ikisi de Gram (+) organizmalardır. Antibakteriyal aktivite spektrumlarına bakıldığında, iki izolatin ürettikleri bakteriyosinlerin, sadece Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu belirlenmiştir, denenen Gram (-) suşların hiçbirinde inhibisyon gözlenmemiştir. Araştırmacılar, Gram negatif bakterilerin dış zarlarının, stoplazmik membranı antibakteriyal etkenlerden koruyarak olabileceğini bildirmişlerdir (Gao, *et al.*, 1999). Ayrıca, deneğimizde indikatör suşlar arasında, en büyük zon çaplarından biri (20 mm) yine bir termofilik bakteri olan, dolayısıyla suşlara en yakın tür olan *G. stearothermophilus* DSMZ 22 suşunda gözlemlendi. Bu veriler, çalıştığımız inhibitör maddenin, bakteriyosin olabileceğini destekleyen bulgulardır.

Gilberth ve Somkuti, (2005), yaptıkları çalışmada, *Streptococcus thermophilus* bakterisinin ürettiği Thermophilin 110 adını verdikleri bakteriyosinin antibakteriyal etki spektrumunu araştırmışlardır. Thermophilin 110'un, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbruckei*, *Pediococcus türleri*, *Enterococcus faecalis* ve *Listeria monocytogenes*'in pek çok suşuna karşı etkin olduğunu bildirmişlerdir. Bu bakterilerin tümü Gram (+)'dir.

Ekstrem termofilik bir arkebakteri olan *Sulfolobus islandicus* ile yapılan çalışmada ise, aynı cinse ait farklı suşlar kullanılmış ve sulfolobicin adı verilen bakteriyosinin *S. solfataricus* P1, *S. shibatae* B12 suşlarına karşı antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir (Prangishvilli D., et al., 2000).

Gram (+) bir bakteri olan *Bacillus cereus* ile yapılan çalışmada, Gram (+) bakterilerin yanısıra, *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella thyphimurium* gibi Gram negatif bakterilerde kullanılmış, ancak Gram negatif bakterilerin hiçbirine karşı antibakteriyal etki görülmemiştir. Çalışılan bakteriyosinin Gram (+) bakterilere karşı antibakteriyal spektrumu ise oldukça geniştir (Riosen, P.A., et al., 2004).

Thermus cinsinde yer alan bakterilerin bakteriyosin benzeri madde üretimleri ile ilgili yapılan çalışmada, diğer *Thermus* türleri dışında *G. stearothermophilus*, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı da antibakteriyal etki denemiştir. Sonuçta, *T. rubens* bakterisinin *T. aquaticus*, *T. caldophilus*, *T. thermophilus* ve *T. flavus* bakterilerine karşı etkili olduğu, ancak diğer suşlara karşı inhibisyon göstermediği belirlenmiştir (Becker, R.J., et al., 1986). *Thermus* cinsindeki bakteriler Gram (-) ve termofilik özelliktedirler. Dolayısıyla ürettikleri bakteriyosin benzeri maddenin antibakteriyal spektrumunu dar olması bu sebeple açıklanabilir.

Termofilik bir bakteri olan *Bacillus thermoleovorans*'ın iki suşunun ürettiği bakteriyosinler sırasıyla Thermoleoverin-S2 ve Thermoleoverin-N9 olarak adlandırılmıştır. Bu iki bakteriyosinin yukarıda verilen örneklerden farklı olarak *B. thermoleovorans* suşları başta olmak üzere, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella thyphimurium*, *Branhamella catarrhalis* ve *Thermus aquaticus* bakterilerini inhibe ettikleri bulunmuştur (Novotny ve Perry, 1992).

Çalışmamızda kullanılan bakteriler, termofilik olmalarına rağmen, pek çok mezofilik bakteriye karşı etkilidirler. HBB-218'in ürettiği bakteriyosin, klinik anlamda önemli suşlara, örneğin Enterokoklara ve ayrıca gıdalarda bozulma etmeni olan *M.luteus*, *B.thermosphacta*, *C. fimi* gibi bakterilere karşı etkili bulunmuştur. Ayrıca *Listeria*

sp.'ye karşı da inhibisyon özelliği vardır. *Listeria* türleri, özellikle *L. monocytogenes* gıdalarda bulunan en önemli patojenlerden biridir.

HBB-247 suşunun ürettiği bakteriyosin, *Listeria* sp. ve *E. faecalis* gibi önemli bakterilere karşı etkilidir, ancak bu bakteriyosinin aktivite spektrumu daha dardır.

Her iki suş, çalışmamızda izole edilen ve antibakteriyal aktivite açısından pozitif olan diğer bazı termofilik bakterilere karşı da denenmiştir. Muhtemelen bu türlerle yakın akraba olmalarından dolayı, seçilen bazı termofilik bakterilere karşı da antagonistik aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur.

4.5 Ham bakteriyosinlerin Karakterizasyonları

4.5.1. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi

Bakteriyosinlerin, ısı ve pH stabiliteleri, çeşitli kimyasalların ve enzimlerin aktivite üzerine etkileri araştırılarak, karakterizasyonları yapılmaktadır. Bu çalışmalar, hem inhibitör maddelerin yapısını aydınlatmaktadır hem de çalışılan bakteriyosinin dahil olduğu sınıf hakkında bilgi vermektedir. Karakterizasyon çalışmaları ya kültür sıvıları (CFS) kullanılarak ya da saflaştırılmış bakteriyosinlerle yapılabilmektedir.

Çalışmamızda, öncelikle kültür sıvıları kullanılarak bakteriyosinlerin ısı stabiliteleri belirlenmiştir. (Çizelge 4.6). Denenen tüm sıcaklıklarda, ısı işlem görmemiş kültür süpernatantları kontrol olarak kullanılmıştır. Kalan aktiviteler hesaplanırken “İşlem görmüş bakteriyosinin zonu x 100 / Kontrol kuyucuğundaki zon” formülü kullanılmıştır. Aynı işlemler saflaştırılmış bakteriyosin için de tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.6. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

SICAKLIK VE SÜRE	KALAN AKTİVİTE (%)
30 °C, 30 dakika	100
30 °C, 2 saat	100
45 °C, 30 dakika	100
45 °C, 2 saat	100
60 °C, 30 dakika	100
60 °C, 2 saat	100
95 °C, 30 dakika	100
95 °C, 2 saat	100
121 °C, 20 dakika	100
+4 C, 1 ay	100

Çizelge 4.7 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

SICAKLIK VE SÜRE	KALAN AKTİVİTE (%)
30 °C, 30 dakika	100
30 °C, 2 saat	100
45 °C, 30 dakika	100
45 °C, 2 saat	100
60 °C, 30 dakika	100
60 °C, 2 saat	100
95 °C, 30 dakika	0
95 °C, 2 saat	0
121 °C, 20 dakika	0
+4 C, 1 ay	100

HBB-218 tarafından üretilen bakteriyosin, denenen tüm sıcaklıklarda ve 121 °C’de 20 dakika otoklavlandıktan sonra aktiftir ve kontrol grubuyla kıyaslandığında aktivitede hiç kayıp olmamıştır. Powell *et al.*, (2007) yaptıkları çalışmada, benzer sonuçlar elde etmişlerdir. *Lactobacillus plantarum* ST8KF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin pH 5,5’de 121 °C’de 20 dakika otoklavlandıktan sonra, hala aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Laktobasiller ve Laktokoklar tarafından

üretilen pek çok bakteriyosin için, bu durum geçerlidir (Van Reenen *et al.*, 1998; Klaenhammer 1998; Todorov ve Dicks 2004).

HBB-247 tarafından üretilen bakteriyosin ise, 95 °C'de aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Her iki bakteriyosin de +4 °C'de, 1 ay sonunda aktivitesini korumaktadırlar.

Özellikle HBB-218'in ürettiği bakteriyosin, yüksek sıcaklıklarda bile aktivitesini koruduğu için, pastörize gıdalarda kullanılabilecek niteliktedir. Her iki bakteriyosinde gıdaların soğukta depolanmasında kullanışlıdır.

4.5.2. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine enzimlerin etkisi

Enzimlerle yapılan denemelerde, proteolitik enzimlerin inhibitör maddeler üzerine etkilerinin zamana ve konsantrasyona bağlı olduğu gözlenmiştir. Bakteriyosinlerin karakterizasyonları yapılırken, proteolitik enzimlerin aktivite üzerine etkilerinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Çünkü bu enzimlerle yapılan denemeler sonucunda aktivitede gözlenen kayıp, inhibitör maddenin protein yapıda olduğunu doğrulamaktadır.

Çalışmamızda, proteolitik enzim olarak Proteinaz K, Pronaz E ve Papain enzimleri kullanılmıştır. Enzimlerin final konsantrasyonlarının 1 mg/ml olduğu denemelerde, 1 saat ve 24 saat enzimlerle inkübe edilen örneklerde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aktivitede hiç kayıp olmadığı görülmüştür. Daha sonra enzimlerin final konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde artırılarak, deneme tekrarlanmıştır. Sonuçta, HBB-218 bakterisinin kültür sıvısı için, proteinaz K'nın bulunduğu kuyucukta aktivitenin tamamen, Pronaz E ve Papain'in bulunduğu kuyucuklarda ise aktivitede kısmi kayıp olduğu görülmüştür (Çizelge 4.8). HBB-247'nin ürettiği kültür sıvısında ise proteolitik enzimlerle 10 mg/mL final konsantrasyonda ve 24 saat inkübasyondan sonra aktivitenin kısmen kaybolduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi

ENZİMLER	KALAN AKTİVİTE (%)			
	1 saat inkübasyon		24 saat inkübasyon	
	1 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml
Proteinaz K	100	100	100	0
Proteaz	100	100	100	75
Papain	100	87,5	100	87,5
Lipaz	62,5	62,5	62,5	0
α-Amilaz	100	100	100	100
β-Glukuronidaz	100	62,5	100	0
Laktaz	100	100	100	100
RNAz	100	100	100	100
Katalaz(300IU/mL)	100	100	100	100

Çizelge 4.9 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi

*Kontrolde zon var

ENZİMLER	KALAN AKTİVİTE (%)			
	1 saat inkübasyon		24 saat inkübasyon	
	1 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml
Proteinaz K	100	100	100	69,2
Proteaz	100	100	100	61,5
Papain	*	*	*	*
Lipaz	100	100	100	100
α-Amilaz	100	100	100	100
β-Glukuronidaz	100	100	100	100
Laktaz	100	100	100	100
RNAz	100	100	100	100
Katalaz(300IU/mL)	100	100	100	100

Mezofilik bakterilerle yapılan çalışmaların çoğunda, kültür süpernatantları üzerine proteolitik enzimlerin etkisi incelenirken, genelde enzimlerin final konsantrasyonları 0,5, 1 veya 2 mg/mL (1-4 saat) olacak şekilde kullanılmakta ve sonuçta aktivitede

tamamen kayıp gözlenmektedir. (Lash *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 1998; Hernandez *et al.*, 2005).

Ancak literatürde bu durumun istisnalarına da rastlamak mümkündür. *Bacillus licheniformis* P40 suşunun ürettiği bakteriyosin benzeri bileşik, final konsantrasyonları 2 ve 10 mg/ml olacak şekilde papain, tripsin ve Pronaz E enzimleri ile 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sonuçta sadece Pronaz E'nin aktivitede kayba (%75) yol açtığı bulunmuştur. Pepsin ve tripsin enzimleri aktivitede hiçbir kayba neden olmamışlardır. *Bacillus* sp. 8A suşu ile yapılan çalışmada ise, proteolitik enzimlerden tripsin, papain, proteinaz K, pronaz E, 2 mg/mL son konsantrasyonlarda denenmiş ve sonuçta sadece proteinaz K ve pronazın aktivitede kayba (%100) neden olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar bu durumun, bazı *Bacillus* türlerinin alışılmadık aminoasitler içeren halkasal antimikrobiyal maddeler üretmesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu tür antimikrobiyal maddeler proteazlara daha dayanıklıdır (Cladera-Oliviera *et al.* 2004; Bizanni ve Brandelli, 2002).

Bacillus cereus ATCC 14579 tarafından üretilen geniş spektrumlu antimikrobiyal bileşikle yapılan çalışmada, Pronaz ve Proteinaz K enzimleri 10 mg/mL son konsantrasyonda (37 °C'de 4 saat inkübasyon) kullanılmıştır. Pronaz E ile muameleden sonra kalan aktivite % 10; proteinaz K ile muameleden sonra kalan aktivite ise %25 olarak belirlenmiştir (Risoen *et al.* 2004)

Bakteriyosin aktivitesi üzerine proteolitik enzimlerin etkisinin denendiği diğer bir çalışmada ise *Enterococcus faecium* GM-1 izolatu kullanılmıştır. Proteinaz K (7-14 U/mg), papain (10 U/mg), tripsin (7500 BAEE/mg), pepsin (10 U/mg) enzimleri ile yapılan denemelerde, proteolitik enzimlerden hiçbiri aktivitede tamamen kayba neden olmamıştır. Enzimlerle, bakteriyosin 37 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra indikatör bakteriye karşı denenmiş ve aktivitede kısmi kayıp gözlenmiştir (Kang ve Lee, 2005).

Çalışmamızda, HBB-247'nin ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine, proteinaz K ve proteaz dışındaki enzimlerin etkili olmadığı belirlenmiştir. HBB-218'in ürettiği

bakteriyosinin proteolitik enzimler dışında, lipaz ve β -glukoronidaz enzimlerine de hassas olduğu bulunmuştur.

Her iki bakteriye ait kültür sıvıları, katalaz enzimi ile muamele edildikten sonra, aktivite tayini yapılmıştır. 300 IU/mL final konsantrasyonda, 1 ve 24 saat katalaz enzimi ile muamele edilen kültür sıvılarından aktivite tayini yapıldığında, aktivitede herhangi bir kayıp olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuca göre, inhibisyon özelliğinin, bakterilerin oluşturduğu H_2O_2 'den kaynaklanmadığı ispatlanmıştır.

4.5.3. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine pH'nın etkisi

Bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine etkili en önemli faktörlerden bir diğeri de, pH'dır. Çalışmamızda, izolatların kültür süpernatantlarının pH'ları 3 ile 11 arasındaki değerlerde denenerek, aktivite tayini yapılmıştır. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosin hem +4 °C'de, hem de 65 °C'de denenen tüm pH'larda aktivitesini tamamen korumaktadır. HBB-247'nin ürettiği bakteriyosin ise, 65 °C'de inkübe edildiğinde pH 3, pH 10 ve pH 11'de aktivitesini kısmen kaybetmektedir (Çizelge 4.10-4.11).

Çizelge 4.10 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

	KALAN AKTİVİTE (%)	
	+ 4 °C	65 °C
pH 3	100	100
pH 4	100	100
pH 5	100	100
pH 6	100	100
pH 7	100	100
pH 8	100	100
pH 9	100	100
pH 10	100	100
pH 11	100	100

Çizelge 4.11 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

	KALAN AKTİVİTE (%)	
	+ 4 °C	65 °C
pH 3	100	40,9
pH 4	100	100
pH 5	100	100
pH 6	100	100
pH 7	100	100
pH 8	100	100
pH 9	100	100
pH 10	100	90,9
pH 11	100	63,6

HBB-218 ve HBB-247 tarafından üretilen bakteriyosinlerin geniş bir pH aralığında aktif olmaları onları endüstriyel açıdan avantajlı kılmaktadır. Genelde, Laktobasillerin ürettikleri bakteriyosin benzeri bileşikler, bazik pH'larda konformasyonel değişikliğe uğramaktadırlar ve pH 12.0'de antagonistik aktivite yok olmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan bakterilerin ürettikleri bakteriyosinler, özellikle HBB-218 tarafından üretilen bakteriyosin bazik pH'larda aktif olmasının yanısıra, asidik pH'larda aktivitesinde kayıp olmadan iş görmektedir. Bu özellikleri nedeniyle, fermente gıdalarda da rahatlıkla kullanılabilirler.

4.5.4. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine organik çözücülerin etkisi

Bakteriyosinlerin karakterizasyon çalışmalarında, organik çözücülerin aktivite üzerine etkileri değerlendirilir. Bu tür denemeler sayesinde kültür ortamından bakteriyosini ekstrakte ederken, ya da örneğin saflaştırma aşamasında, hangi organik çözücülerin (inaktivasyona neden olmadan), kullanışlı olduğu belirlenebilir (Hernandez *et al.*, 2005).

Çalışmamızda, izolatların kültür sıvılarındaki aktiviteleri üzerine organik çözücülerin ve deterjanların etkileri araştırılmıştır. Kültür süpernatantları aseton, metanol, ksilol, etanol, DMSO ve TCA ile muamele edildikten sonra, aktivite tayini yapılmıştır. Organik çözücülerden, sadece TCA aktivitede kayıba neden olmuştur. TCA, proteinleri çöktürmede kullanılan bir organik çözücüdür. TCA muamelesinden sonra, aktivitenin tamamen kaybolması, çalıştığımız maddenin protein yapıda olduğunu destekleyen diğer bir bulgudur.

Çizelge 4.12 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

ORGANİK ÇÖZÜCÜ (Final kons.)	KALAN AKTİVİTE (%)
Aseton (%10)	100
DMSO (%10)	100
Methanol (%10)	100
Ethanol (%10)	100
Xylol (%10)	100
Kloroform	100
TCA (100 mg/ml)	0

Çizelge 4.13 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

ORGANİK ÇÖZÜCÜ (Final kons.)	KALAN AKTİVİTE (%)
Aseton (%10)	100
DMSO (%10)	100
Methanol (%10)	100
Ethanol (%10)	100
Xylol (%10)	100
Kloroform	100
TCA (100 mg/ml)	0

Risoen *et al.* (2005), yaptıkları çalışmada, *Bacillus cereus* tarafından üretilen bakteriyosin benzeri bileşiğin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisini araştırmışlardır. Aseton, asetonitril, butanol, etanol, metanol ve isopropanol ile 25

°C’de 1 saat inkübe edilen BLİS aktivitesi üzerine yalnızca asetonun etkisi olduğu görülmüştür. Diğer organik çözücülerle muamele sonucu kalan aktivite %100 iken, aseton ile muameleden sonra kalan aktivite %12 olarak bulunmuştur.

Bacillus sp. 8A tarafından üretilen bakteriyosin ile yapılan benzer bir çalışmada, etanol (%10 v/v) ve kloroformla (%10 v/v), 25 °C’de 1 saat muameleden sonra kalan aktivite %92, TCA muamelesinden sonra ise kalan aktivite %0’dır. Aseton, DMSO, metanol, xylol aktivitede kayba neden olmamıştır (Bizani *et al.*, 2005).

4.5.5. Ham bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine deterjanların etkisi

Aktivite üzerine deterjanların etkisi incelendiğinde, her iki suşun kültür sıvılarında farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Tween 20, Triton X-100, SDS, 2 mM EDTA ve 5 mM EDTA ile yapılan denemelerde, kontrol kuyucuğunda da zon görüldüğü için değerlendirme yapılamamıştır. HBB-218 tarafından üretilen bakteriyosinin, Tween 20, Üre ve 0,1 mM EDTA varlığında kalan aktivitesi %100’dür.

HBB-247’de, 0,1 mM EDTA ile muamele edildikten sonra bakteriyosin aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.

Powell *et al.* (2007), *Lactobacillus plantarum* ST8KF ile yaptıkları çalışmada, Triton X-114 ve Triton X-100’ün aktivitede kayba neden olduğunu, Tween 20, Tween 80, SDS ve ürenin ise aktiviteyi etkilemediğini bildirmişlerdir.

Pediococcus acidilacti MM33 bakterisi tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesinin Triton X-100 (%1), Tween 80 (%1) ve SDS ile muameleden sonra, iki katına çıktığı belirtilmiştir (Milette *et al.*, 2007).

Melastan izole edilen bir *Lactobacillus plantarum* suşu tarafından üretilen iki farklı bakteriyosinle karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Her iki bakteriyosinin de Tween

20, Tween 80, Triton X-114 ve Triton X-100 (%1 m/V) deterjanlarına karşı hassas olduğu, SDS ve ürenin ise aktiviteyi etkilemediği bildirilmiştir (Todorov ve Dicks, 2005).

Çizelge 4.14 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin aktivitesi üzerine deterjanların etkisi
(* Deterjanın kontrolünde zon var.

DETERJANLAR	KALAN AKTİVİTE (%)
Tween 20 (1 mg/mL)	*
Tween 80 (1 mg/mL)	100
Triton X-100 (1 mg/mL)	*
Triton X-114 (1 mg/mL)	*
SDS (1 mg/mL)	*
Üre (1 mg/mL)	100
EDTA (0.1 mM)	100
EDTA (2 mM)	*
EDTA (5 mM)	*

Çizelge 4.15 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosini aktivitesi üzerine deterjanların etkisi
(* Deterjanın kontrolünde zon var.

DETERJANLAR	KALAN AKTİVİTE (%)
Tween 20 (1 mg/mL)	*
Tween 80 (1 mg/mL)	100
Triton X-100 (1 mg/mL)	*
Triton X-114 (1 mg/mL)	100
SDS (1 mg/mL)	*
Üre (1 mg/mL)	100
EDTA (0.1 mM)	120
EDTA (2 mM)	*
EDTA (5 mM)	*

4.6 Farklı Ticari Ortamlarda Gelişim ve Bakteriyosin Üretimi

Çalışmamızda, bakteriyosin üretimi açısından optimum şartlar belirlenmeden önce, farklı ticari ortamlarda bakteriyosin üretimi ve suşların gelişimi belirlenmiştir. Beş farklı ticari ortam kullanılarak yapılan çalışmada, en iyi gelişim ve bakteriyosin üretiminin her iki suş için de BHI broth ortamında gözlenmiştir (Çizelge 4.16-4.17). HBB-218 suşu için Caso broth ortamında da absorbans değerleri yüksektir ve bakteriyosin üretimi 72. saatte BHI broth ortamındaki ile aynıdır. Ancak, çalışmamızda, aktivite değerleri aynı çıkan, üretim koşulları arasından gelişimin en iyi gözleendiği şartlar seçilmiştir. Dolayısıyla, HBB-218 suşu için, 72. saatte en iyi gelişimin gözleendiği BHI broth ortamı seçilmiştir. Nutrient Broth ve Triptoz broth ortamlarında, bakteriyosin üretimi gerçekleşmemiştir.

HBB-247 suşunda ise, Nutrient broth ortamında aktivite gözlenmezken, Triptoz borth ortamında, 72. saatte oldukça düşük (<200 AU/mL) aktivite gözlenmiştir. En yüksek bakteriyosin üretimi, BHI broth ortamında 24. saatte gerçekleşmektedir. Absorbans değerleri ise yine BHI broth ortamında 72. saatte maksimum değere ulaşmıştır. Bu sebeplerden dolayı, HBB-247 suşu için de daha sonraki çalışmalarda modifiye etmek üzere BHI broth ortamı seçilmiştir.

Çizelge 4.16 HBB-218 izolatının farklı ticari ortamlarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi

	24. saat		48. saat		72. saat	
	Aktivite (AU/mL)	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Absorbans (600 nm)
BESİYERLERİ						
BHI B.	<200	0,900	1600	1,428	3200	1,767
Caso B.	400	0,930	800	1,062	3200	1,472
Nutrient B.	0	0,171	0	0,173	0	0,178
Tryptose B.	0	0,523	0	0,554	0	1,152
LB B.	0	0,729	400	0,640	400	0,761

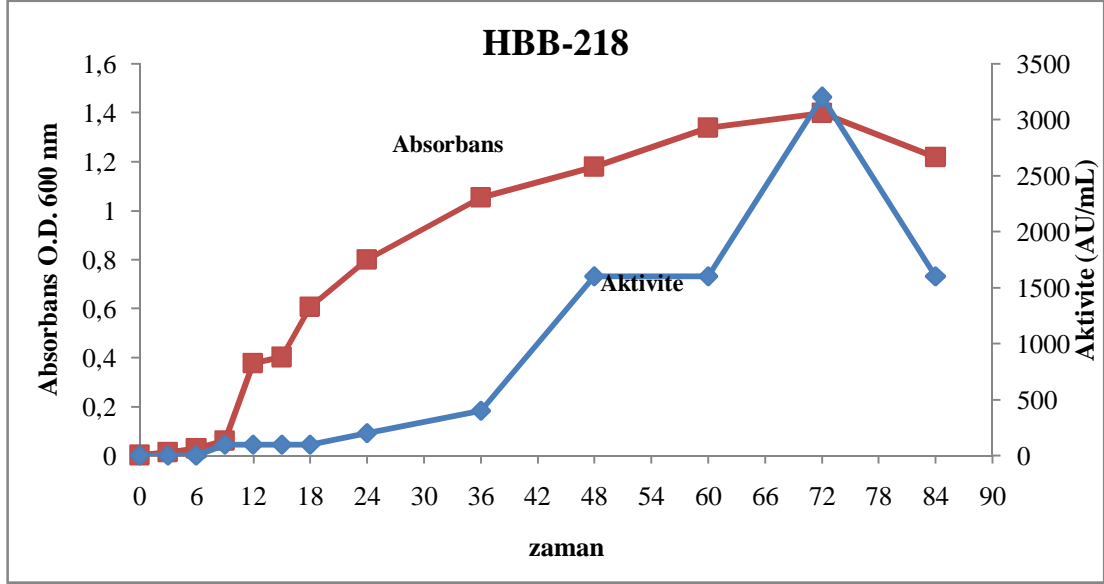
Çizelge 4.17 HBB-247 izolatının farklı ticari ortamlarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi

BESİYERLERİ	24. saat		48. saat		72. saat	
	Aktivite (AU/mL)	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Absorbans (600 nm)
BHI B.	12800	1,218	6400	2,130	6400	2,792
Caso B.	6400	0,618	800	0,810	800	0,867
Nutrient B.	0	0,069	0	0,142	0	0,168
Tryptose B.	0	0,229	0	0,340	<200	0,445
LB B.	6400	0,776	6400	2,115	6400	2,070

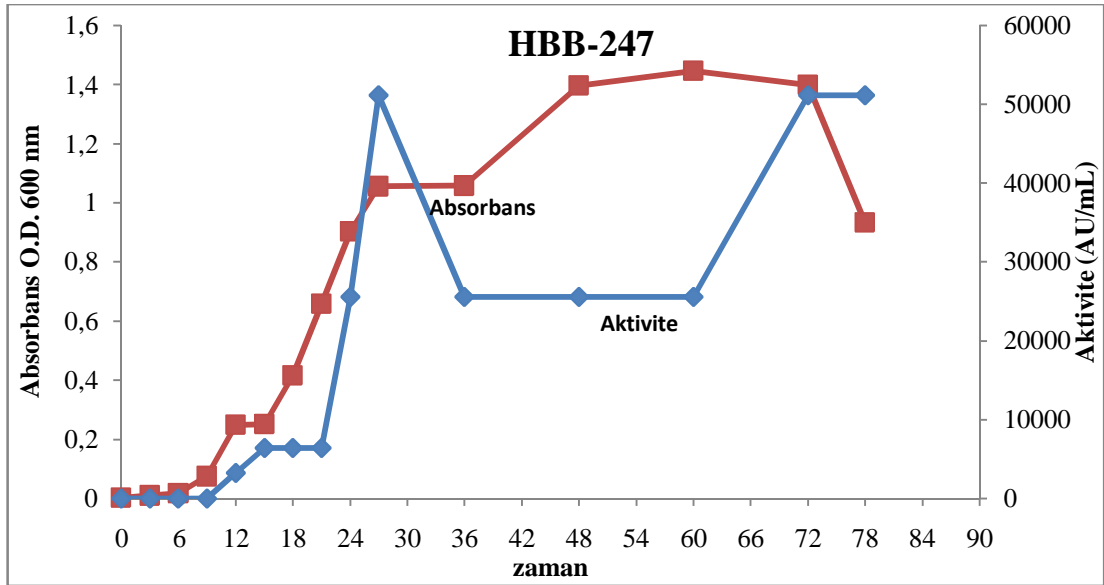
4.7. İzolatların Büyüme Eğrileri ve Bakteriyosin Üretim Evrelerinin Belirlenmesi

İzolatlar, BHI Broth ortamlarında, 65 °C’de geliştirilmiş ve çeşitli zaman aralıklarıyla alınan örneklerden absorbans (O.D._{600 nm}) ve bakteriyosin aktiviteleri ölçülerek, büyüme eğrileri çıkarılmış ve bakteriyosin üretim evreleri saptanmıştır (Şekil 4.8-4.9).

Elde edilen veriler, zaman karşı grafiklendirildiğinde, her iki suşun da, bakteriyosin üretimi logaritmik fazın başlangıcında (yaklaşık 12. saat) başladığı görülmüştür. HBB-218 suşunda bakteriyosin üretimi 72. saatte (durgunluk fazının sonlarında) maksimum seviyeye ulaşırken, HBB-247 ‘de 27. saatte (logaritmik fazın sonlarında) maksimum aktivite görülmektedir (Şekil 4.8, 4.9).



Şekil 4.8 HBB-218 izolatının büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim evreleri



Şekil 4.9 HBB-247 izolatının büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim evreleri

HBB-218 tarafından üretilen bakteriyosinin 72. saatte maksimum seviyeye ulaşmasının nedeni, gelişimin geç safhalarında hücrelerin parçalanması olabilir. Eğer, ekstraselüler bakteriyosin aktivitesinin yanısıra, hücre içi bakteriyosin varlığı da söz konusuysa, hücreler parçalandığında, aktivitenin artması normaldir. Hücre içi bakteriyosinin olup olmadığını belirlemek amacıyla, HBB-218 suşunun BHI broth ortamındaki 24 saatlik kültürü sonike edilerek, farklı fraksiyonlarda aktivite tayini yapılmıştır. Sonuçta, aynı kültür sıvısından alınan örneklerde, hücre dışı sıvıda

aktivite 800 AU/mL, hücre içi sıvıda <200 AU/mL, membrana bağlı kısımların olduğu fraksiyonda ise <200 AU/mL olarak belirlenmiştir. Bu durum, bakteriyosin aktivitesinin neden 72. saatte maksimum düzeye eriştiğini açıklar niteliktedir.

Literatürde yer alan bakteriyosin çalışmalarında genelde, ekstraselüler sıvılarda aktivite denemeleri yapılmaktadır. Ancak bu durumun istisnaları da bulunabilmektedir. Kato *et al.* (1991), yaptıkları çalışmada *Brevibacterium linens* bakterisinde hücre içi ve hücre dışı bakteriyosin üretimini araştırmışlardır. *B. linens* ATCC 9171 suşu boullion brothda kùltive edilmiş ve çeşitli zaman aralıklarında alınan örneklerden aktivite tayini yapılmıştır. Örnekler, santrifüjlenerek, ekstraselüler sıvıda hücre dışı aktivite, lizozimle muamele edilen hücrelerde ise hücre içi aktivite denenmiştir. Her iki fraksiyonun antibakteriyal etki spektrumu aynıdır, ancak 48 saat sonunda hücre dışı bakteriyosin aktivitesi 4 Unite/mL; hücre içi bakteriyosin aktivitesi ise 160 Unite/mL olarak bulunmuştur. Hücre içinde üretilen Linecin A ile hücre dışı sıvıda saptanan Linecin A'nın oldukça benzer yapıda oldukları belirlenmiştir.

Lactobacillus curvatus tarafından üretilen bakteriyosin benzeri madde ile yapılan çalışmada benzer şekilde hücre içi ve hücre dışı bakteriyosin üretimi araştırılmıştır (Chung ve Yousef, 2005). Kùltür sıvıları santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlarda hücre dışı aktivite test edilmiş, lizozimle muamele edildikten sonra sonike edilen pellet ise hücre içi aktiviteyi belirlemek için kullanılmıştır. Sonuçta hücre ekstraktlarının, kùltür süpernatantına göre, daha geniş bir inhibisyon spektrumuna sahip olduğu belirlenmiştir.

Bakteriyosinlerin üretimi genelde, bakteriyal gelişimle yakından ilgilidir. Çünkü bakteriyosinler sadece üretici organizmanın gelişimi sırasında sentezlenirler. Bakteriyosin aktiviteleri, gelişme fazının sonunda, proteazların degradasyonundan dolayı azalmaktadır (Kim *et al.*, 2006).

Çalışmamızda kullanılan her iki izolatın bakteriyosin üretimi gelişimin erken safhalarında yani logaritmik fazın başlangıcında başlamaktadır.

Lactococcus lactis USC 39, *Enterococcus faecium* USC-46 ve *E. mundtii* USC-51 suşlarının bakteriyosinleri ile ilgili yapılan çalışmada, bakteriyosin üretiminin evreleri araştırılmıştır (Campos, 2006). Üç bakteride de, bakteriyosin üretimi ilk olarak logaritmik fazın ortalarında başlamaktadır, ancak maksimum üretim farklı evrelerde gerçekleşmektedir. 72 saat boyunca absorbans ve aktivite ölçümü yapılan çalışmada, *L. lactis* USC-39 için maksimum üretim indikatör suşa göre değişmektedir. İndikatör suş olarak *Listeria monocytogenes* LHICA 1112 kullanıldığında 33. saatte, *L. monocytogenes* NCTC 11994 kullanıldığında 46. saatte, *S. aureus* LHICA 1010 kullanıldığında ise 21. saatte maksimum üretim gerçekleşmektedir. Bakterinin büyüme eğrisinde logaritmik fazın sonu 21. saate karşılık gelmektedir ve aktivite durgunluk fazı boyunca sabit kalmaktadır.

E. faecium USC-46 suşunun ürettiği bakteriyosin ise denenen 3 indikatör suşa karşı 46-55. saatte, *S. aureus* LHICA 1010'a karşı ise 21. saatte maksimum aktivite olduğu bildirilmiştir.

Termofilik *B. thermoleovorans* S-II suşu ile yapılan çalışmada, bakteriyosin üretiminin logaritmik fazın ortalarında (7.saat) başladığı ve maksimum seviyeye durgunluk fazında ulaştığı gözlenmiştir. Kültür süpernatantı, hücre ekstraktı ve membran fraksiyonlarında aktivite tayini yapılmış ve sadece kültür süpernatantında aktiviteye rastlanmıştır (Novotny ve Perry, 1992).

Lactococcus lactis WNC 20 suşunun bakteriyosin üretim özellikleri araştırıldığında, benzer şekilde üretimin logaritmik fazın ortalarında başladığı ve erken durgunluk fazında en üst seviyeye ulaştığı bildirilmiştir. Geç durgunluk fazında ise aktivitede düşüş gözlenmiştir (Noonpakdee *et al.*, 2003).

Bakteriyosin üretim evreleriyle ilgili bazı çalışmalarda, araştırmamızdakine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, *Lactobacillus plantarum* TF711 suşunun bakteriyosin üretimi erken logaritmik fazda başlamaktadır ve logaritmik faz-durgunluk fazının başlangıcı (12-22 saat) arasında maksimum seviyededir.

Biyoaktivite, 24 saat sonunda %50 oranında, 48 saat sonunda ise %90 oranında azalmaktadır (Hernandez *et al.*, 2005).

Ocana *et al.* (1999), vajinal bir *Lactobacillus salivarius* suşunun bakteriyosin üretimini araştırmışlardır. Üretimin logaritmik fazın başlangıcında başladığını ve durgunluk fazında maksimum seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir.

Antibakteriyal, antifungal ve antimikobakteriyal özellikteki “Stafilokokkin Bac188” *S. auerus* AB188 tarafından üretilmektedir. Bakterinin büyüme eğrisine bakıldığında, maksimum üretimin logaritmik fazın ortalarında (7. saat) gerçekleştiği ve 24 saat boyunca bakteriyosin miktarının sabit olduğu görülmüştür. Bu sebeple, örnekler 24. saatte toplanmıştır (Saeed *et al.*, 2006).

E. faecium MMT21 suşu bakteriyosin üretimine erken log fazında (7. saat) başlamakta ve maksimum üretim log fazının sonunda (17. saat) gerçekleşmektedir. Durgunluk fazı boyunca bakteriyosin üretiminin sabit olduğu belirlenmiştir (Ghraiiri *et al.*, 2007).

4.8 Bakteriyosin Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Bakteriyosin üretimi, ortam bileşenleri, kültür şartları (pH, sıcaklık, çalkalama) gibi faktörlerden etkilenmektedir. Genelde optimum gelişme için gerekli şartlara yakın değerlerde bakteriyosin üretimi artmaktadır. Bu yüzden, üretimi artırmak için, çevresel şartların optimize edilmesi oldukça önemlidir. Nisin, pediosin, enterosin, laktokokkin ve mezenterosin üretimi üzerine ortam bileşenlerinin etkileri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Nisin üretimi karbon kaynaklarının regülasyonu, azot kaynakları ve fosfor ile etkilenmektedir. Ayrıca, nisin, laktokokkin ve bavaricin üretiminde ortam pH’sı önemli bir rol oynamaktadır (Todorov ve Dicks, 2005)

Krier *et al.* (2000), aynı mikroorganizma tarafından üretilen 2 ayrı bakteriyosinin üretimi üzerine pH ve sıcaklığın etkisinin farklı olabileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, izolatların bakteriyosin üretimlerinin optimum gerçekleştiği şartlar belirlenmiştir. Bu amaçla, sırasıyla, farklı pH, sıcaklık, azot kaynakları ve karbon kaynaklarının izolatların gelişimi ve bakteriyosin üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

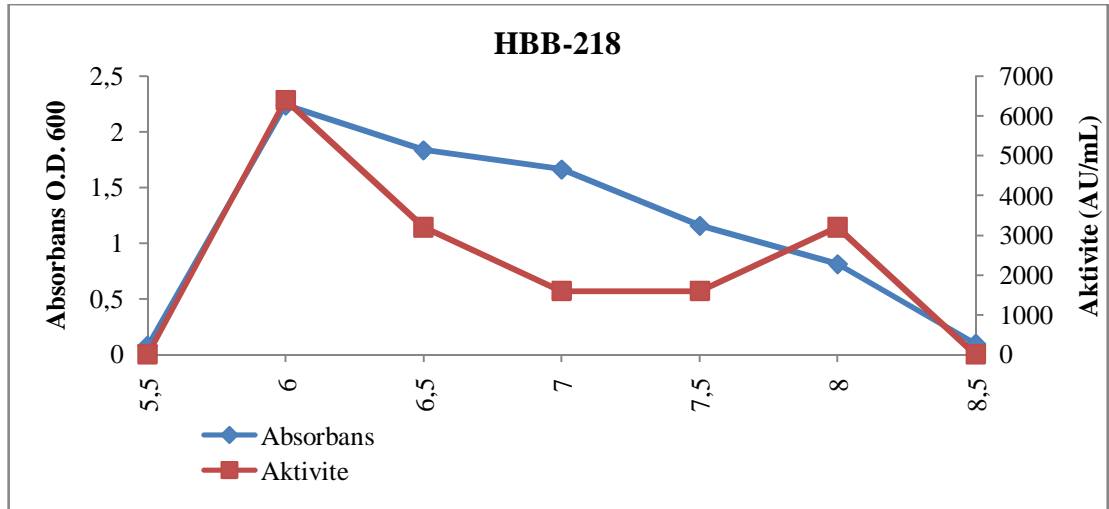
4.8.1. Farklı pH'larda izolatların gelişimi ve bakteriyosin üretimleri

Farklı pH'larda izolatların gelişimlerini ve bakteriyosin üretimlerini belirlemek amacıyla, BHI Broth ortamı kullanılmış ve kültürler 65 °C'de inkübe edilmiştir. İzolatlardaki bakteriyosin üretiminin en fazla gerçekleştiği zamanlarda örnekler alınmıştır. HBB-218 için gelişimin 72. saatinde; HBB-247 izolatı için ise gelişimin 27. saatinde örnekler alınarak, absorbans, kuru ağırlık, pH ve bakteriyosin aktiviteleri belirlenmiştir.

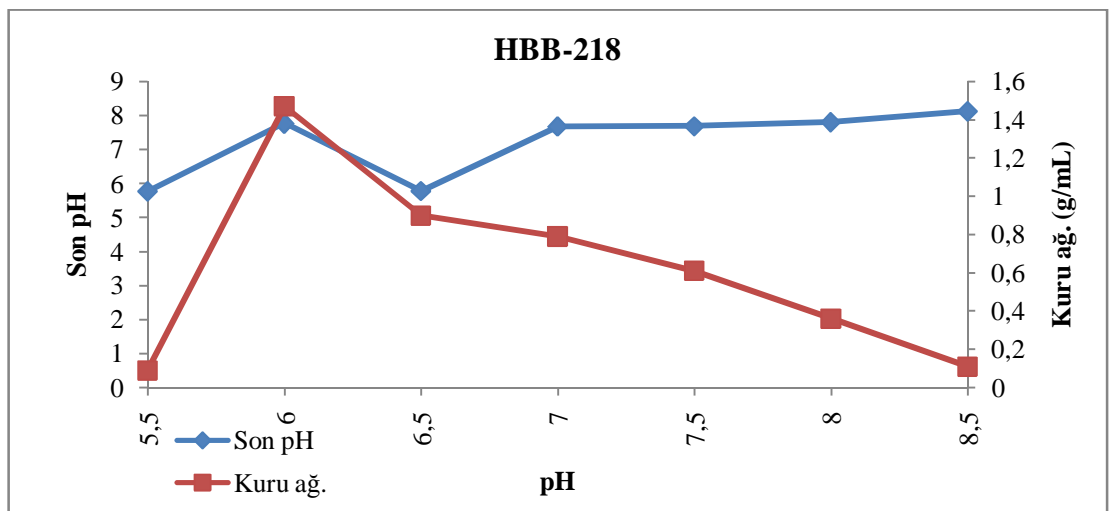
Farklı pH'larda gelişim ve bakteriyosin üretimleri de değişkenlik göstermektedir. HBB-218 suşunun bakteriyosin üretimi en iyi pH 6.0'da (Çizelge 4.18) ; HBB-247 için ise en iyi pH 6.5'da gerçekleşmektedir. (Çizelge 4.19). Çizelgedeki veriler kullanılarak farklı pH'lardaki gelişim, son pH ve bakteriyosin değerleri ayrıca grafik olarak verilmiştir.

Çizelge 4.18 HBB-218 izolatının farklı pH'larda gelişimi ve bakteriyosin üretimi

<i>Başlangıç pH</i>	<i>Absorbans (600 nm)</i>	<i>Aktivite (AU/mL)</i>	<i>Son pH</i>	<i>Kuru ağırlık (g/L)</i>
5,5	0,075	-	5,77	0,09
6,0	2,238	6400	7,77	1,47
6,5	1,834	3200	5,78	0,90
7,0	1,662	1600	7,68	0,79
7,5	1,155	1600	7,69	0,61
8,0	0,810	3200	7,81	0,36
8,5	0,094	-	8,13	0,11



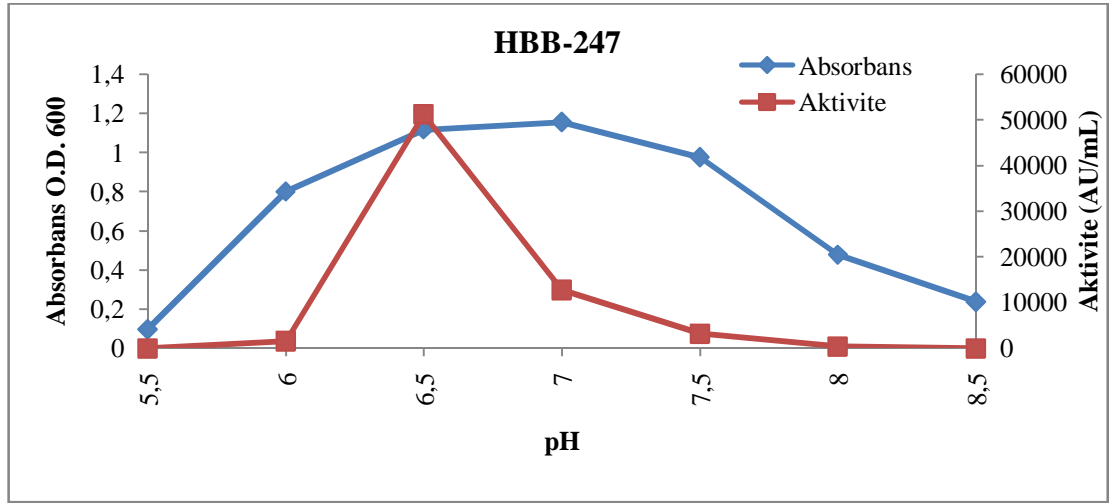
Şekil 4.10 HBB-218 izolatının farklı pH'larda gelişimi ve bakteriyosin üretimi



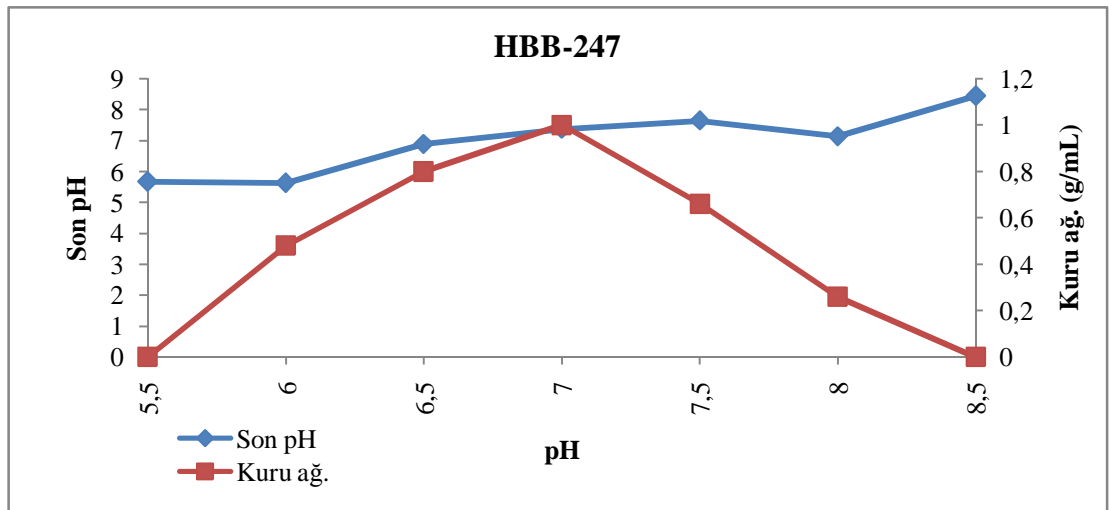
Şekil 4.11 HBB-218 izolatının farklı pH'larda son pH ve kuru ağırlık miktarla

Çizelge 4.19 HBB-247 izolatının farklı pH'larda gelişimi ve bakteriyosin üretimi

<i>Başlangıç pH</i>	<i>Absorbans (600 nm)</i>	<i>Aktivite (AU/mL)</i>	<i>Son pH</i>	<i>Kuru ağırlık (g/L)</i>
5.5	0,099	-	5,67	-
6.0	0,802	1600	5,63	0,48
6.5	1,119	51200	6,89	0,80
7.0	1,157	12800	7,38	1,00
7.5	0,978	3200	7,65	0,66
8.0	0,480	400	7,14	0,26
8.5	0,239	-	8,45	-



Şekil 4.12 HBB-247 izolatının farklı pH'larda gelişimi ve bakteriyosin üretimi



Şekil 4.13 HBB-247 izolatının farklı pH'larda son pH ve kuru ağırlık miktarları.

pH ve sıcaklık gibi fizikokimyasal faktörler, bakteriyosin üretiminde önemli etkiye sahiptirler. Maksimum bakteriyosin üretimi için gerekli olan optimum pH ve sıcaklık değerleri, gelişim için gerekli olanlarla nadiren aynı değerdedir (Tomas *et al.*, 2002).

HBB-218 ve HBB-247 suşunun bakteriyosin üretimi nötre yakın pH'larda gerçekleşmektedir. HBB-218'in gelişimi açısından en iyi pH 6.0; HBB-247 için ise pH 6.5-7.0'dir. Her iki suş için de, optimum bakteriyosin üretimleri gelişimin en iyi gözlemlendiği pH'larla aynı ya da yakın pH'larda gerçekleşmektedir.

Lactobacillus salivarius CRL 1328 suşuyla yapılan çalışmada, bakterinin 37 °C'de ve pH 6.5-8.0 arasında gerekli ortam bileşenlerini daha etkili biçimde kullandığını ve bu değerlerin hem gelişim hem de bakteriyosin üretimi açısından optimum olduğunu belirtmişlerdir (Tomas *et al.*, 2002). Bununla birlikte, gelişim için geçerli optimum pH ve sıcaklık değerlerinin maksimum bakteriyosin üretimi açısından aynı olmadığı durumlar da sözkonusudur (Parente ve Riccardi 1994; Parente *et al.*, 1994; Lejeune *et al.*, 1998; Moretro *et al.*, 2000).

Kaiser ve Montville (1993), fermentor kullanarak, *Lactobacillus bavaricus* suşunun farklı pH'larda ve gelişim oranlarında (growth rate) bakteriyosin üretimini araştırmışlardır. Sonuçta, bavaricin titresinin gelişim oranından ziyade, pH tarafından daha çok etkilendiğini bulmuşlardır. Bavaricin MN üretimi, pH-kontrollü fermentörde çalışılmış ve pH 6.0'daki üretimin, pH 6.5'deki üretimin 12 katına ulaştığı belirlenmiştir.

HBB-218 suşunun bakteriyosin üretiminin gelişim az olmasına rağmen pH 8.0 de arttığı (3200 AU/mL) görülmüştür. Bu durum gelişimin yavaş olması, yani gelişim oranının düşük olması ile açıklanabilir. Drosinos *et al.* (2006), *Leuconostoc mesenteroides* E131 ile yaptıkları çalışmada, bakteriyosin üretimi için geçerli olan optimum pH değerinin, gelişim için geçerli olmadığını belirtmişlerdir ve bakteriyosin üretimi düşük gelişim oranlarında artmaktadır. Araştırmacılar, maksimum bakteriyosin aktivitesinin düşük gelişim oranlarında gözlenmesinin sebebini, yavaş gelişen kültürlerde enerjinin daha iyi kullanılmasıyla açıklamışlardır.

Bakteriyosin üretimi üzerine pH'nın etkili olmasının nedenlerinden biri de farklı pH değerlerinde, bakteriyosinin üretici hücre yüzeyine tutunma oranının değişmesidir. *Lactobacillus sake* L45 suşuyla yapılan çalışmada Laktosin S üretimi üzerine pH'nın oldukça önemli etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. pH 5.0'de geliştirilen kültürlerde, hücrelerden oldukça fazla miktarda Laktosin S salınırken, pH 6.0'da elde edilen aktivite pH 5.0'dekinin %10'unundan azdır. Araştırmacılar bu durumun sadece biomass miktarıyla açıklanamayacağını, üretici hücre yüzeyine bakteriyosinin tutunması ile ilgili olabileceğini belirtmişlerdir. Bu durumu doğrulayabilmek için pH 2.0 ve pH 5.0 'de hücreler yıkanmış, fakat bakteriyosin aktivitesinde (salınımında) herhangi bir artış gözlenmemiştir. Bakteriyosinin üretiminin pH 6.0'da bu kadar düşmesinin sebebi uzun süreli saklama (24 saat boyunca pH 6.0'da kulture etme) olarak düşünülmüştür. Ancak bakteriyosin pH 2.0-9.0 arasında stabilitesini uzun süre korumaktadır.

Laktosin S, lantibiyotikler olarak adlandırılan bakteriyosin sınıfına dahildir. Lantibiyotiklerin üretimi oldukça karmaşıktır ve pekçok biyosentetik ve düzenleyici genin ifadesine bağlıdır. Biyosentetik genler, polipeptidde bulunan modifiye aminoasitlerin oluşumunda rol oynarlar. Laktosin S üretiminin pH'ya bu kadar bağlı olmasının nedeni, biyosentetik genlerin ifadesinin pH tarafından kontrol ediliyor olması olabilir ki bu durum daha önceden pek çok gen sınıfı için bildirilmiştir. Ancak, laktosin S operonunun DNA dizi analizi yapıldığında laktosin S üretiminde düzenleyici rol oynayan genetik elementlere rastlanmamıştır (Mordvedt-Abildgaard *et al.*, 1995).

Enterococcus faecium GM-1 izolatıyla yapılan çalışmada, bakteriyosin üretimi açısından optimum pH 6.5 olarak belirlenmiştir. Organizmanın gelişimi açısından da en iyi pH derecesi 6.5 olarak bulunmuştur (Kang ve Lee, 2005).

Bezares *et al.*, (2006), *Lactobacillus plantarum* J23 ve *L. hilgardii* J81 suşlarını kullanarak yaptıkları çalışmada, her iki suşun pH 3-6 arasında bakteriyosin üretmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu, düşük pH'larda hücresel gelişimin az olması ile açıklamışlardır. Her iki bakteri birlikte inkübe edildiğinde

(kokültür), pH 3,4 ve 5'deki aktivite, pH 6.2'de gözlenen aktiviteden daha düşük bulunmuştur.

Lactobacillus plantarum ST23LD ve ST341LD suşları ile yapılan çalışmada ST341LD suşunun pH 6.5'da geliştirildiği zaman bakteriyosin üretiminin inhibe olduğu, pH 5.5 ve pH 6.0'da geliştirildiğinde ise bakteriyosin üretiminin arttığı (sırasıyla 2850 AU/O.D. ve 2841 AU/O.D.) bildirilmiştir. ST23LD suşunda ise bakteriyosin üretimi pH 6.5'da artmakta (2930 AU/O.D.), pH 6.0'da ise bakteriyosin üretiminde yaklaşık %50 oranında düşüş (1460 AU/O.D.) gözlenmektedir. *L. plantarum* tarafından üretilen diğer bakteriyosinler için benzer sonuçlar bildirilmiştir. ST23LD ve ST341LD suşlarının bakteriyosin üretiminde pH'nın düzenleyici (regulatör) etkisi olabileceği düşünülmüştür. Araştırmacılar bu sorunun yanıtının bakteriyosinleri kodlayan yapısal genlerin Real Time PCR ile belirlenmesi sonucu verilebileceğini bildirmişlerdir (Todorov ve Dicks, 2006).

Melastan izole edilen iki *L. plantarum* suşunun (ST28MS ve ST26MS), farklı pH'larda bakteriyosin üretimleri araştırılmıştır (Todorov ve Dicks, 2005). MRS broth'da, pH 5.0 ve pH 5.5'da bakteriyosin ST28MS üretimi 12 800 AU/mL iken, pH 6.0-6.5'da üretim 25 600 AU/ML'ye yükselmiştir. Kültürlerin final pH'ları ise 3.5-3.8 arasındadır. ST26MS suşunun bakteriyosin üretimi ise MRS broth ortamında, pH 4.5 ve pH 5.0'de 3200 AU/mL; pH 6.0 ve pH 6.5'da ise 6400 AU/mL'dir. En yüksek aktivite ise (12 800 AU/mL), başlangıç pH'sı 5.5 olduğunda gözlenmiştir.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* HV219 suşu HV219 bakteriyosinin üretmektedir ve önceki bulgulara benzer şekilde optimum üretim (1600 AU/mL) pH 6.0'da gerçekleşmektedir. pH 5.5 ve pH 6.5'da bakteriyosin üretimi 800 AU/mL olarak belirlenmiştir (Todorov *et al.*, 2006).

Bozadan izole edilen *L. plantarum* ST414B2 ve ST664BZ suşlarının bakteriyosin üretimini etkileyen ortam bileşenleri araştırılmıştır (Todorov ve Dicks, 2006). Bakteriyosin ST414BZ üretimi pH 6.5, 6.0, 5.5 ve 5.0'de 12 800 AU/mL iken pH

4.5’da bu deęer 3200 AU/mL’ye dūřmūřtur. ST664BZ bakteriyosinin ise pH 6.0 ve 6.5 da 12 800 AU/mL iken pH 4.5’da bu deęer 1600 AU/mL’ye dūřmūřtur.

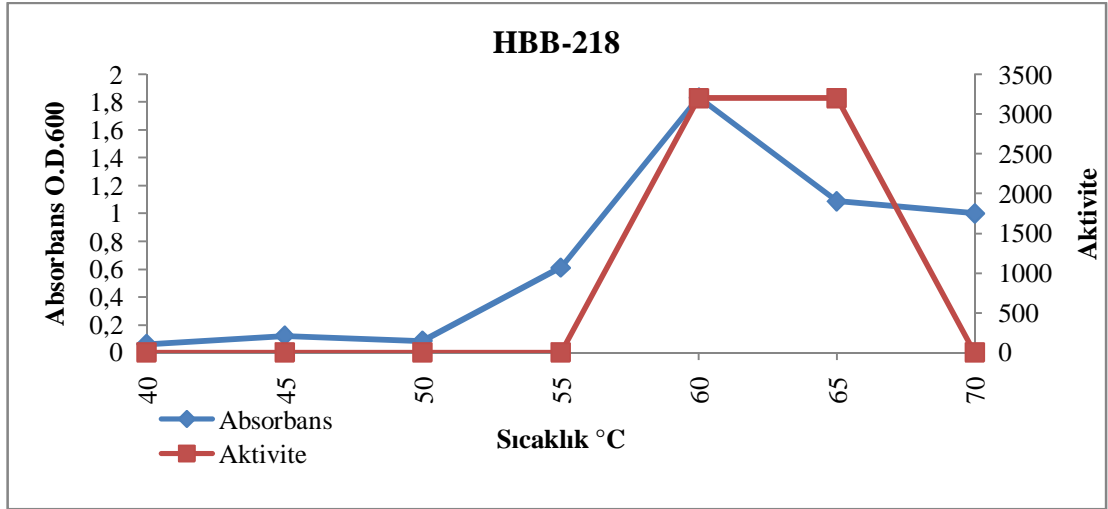
4.8.2. Farklı sıcaklıklarda izolatların gelişimleri ve bakteriyosin üretimleri

Farklı sıcaklıklarda izolatların gelişimlerini ve bakteriyosin üretimlerini belirlemek amacıyla, BHI Broth ortamı kullanılmış ve kültürlerin pH’ları denenen sıcaklıklarda HBB-218 için 6.0; HBB-247 için ise 6.5’a ayarlanmıştır. İzolatlardaki bakteriyosin üretiminin en fazla gerçekleştiği zamanlarda örnekler alınmıştır. HBB-218 için gelişimin 72. saatinde; HBB-247 izolatı için ise gelişimin 27. saatinde örnekler alınarak, absorbans, kuru ağırlık, pH ve bakteriyosin aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.14-4.17).

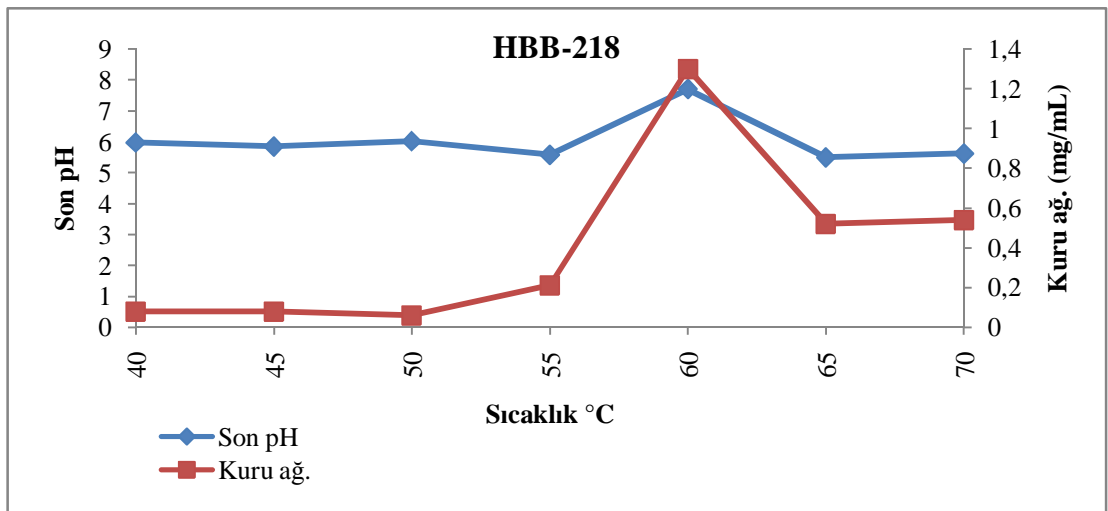
Farklı sıcaklıklarda gelişim ve bakteriyosin üretimleri de değişkenlik göstermektedir. Her iki suşun bakteriyosin üretimi için en iyi sıcaklık 60 °C olarak saptanmıştır (Çizelge 4.20-4.21). Çizelgedeki veriler kullanılarak farklı sıcaklıklardaki gelişim, pH ve bakteriyosin değerleri ayrıca grafik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.20 HBB-218 izolatının farklı sıcaklıklarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi

Sıcaklık	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Son pH	Kuru ağırlık (g/L)
40 °C	0,059	-	5,98	0,08
45 °C	0,120	-	5,85	0,08
50 °C	0,084	-	6,02	0,06
55 °C	0,608	-	5,58	0,21
60 °C	1,832	3200	7,70	1,30
65 °C	1,086	3200	5,50	0,52
70 °C	0,999	-	5,62	0,54



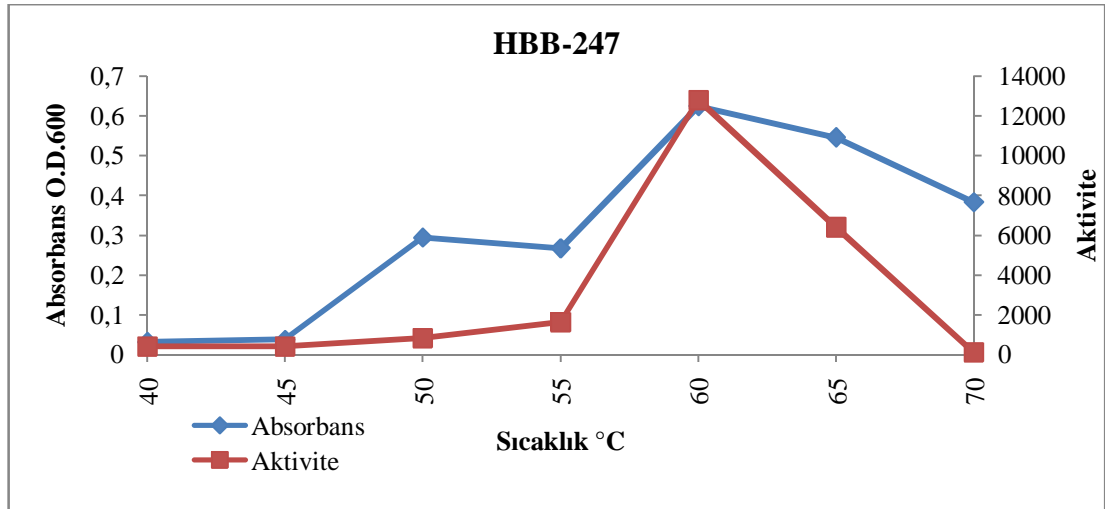
Şekil 4.14 HBB-218 izolatının farklı sıcaklıklarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi



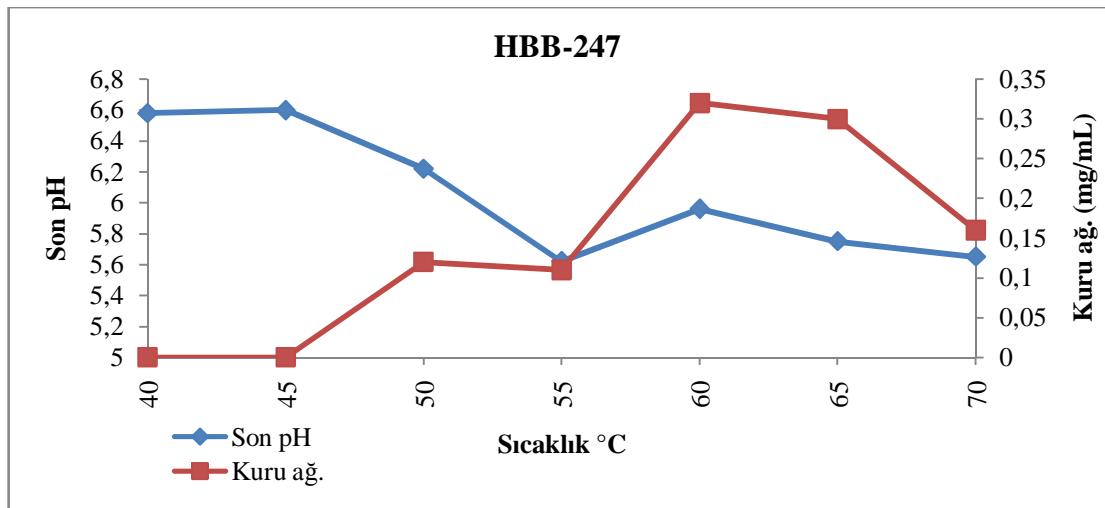
Şekil 4.15 HBB-218 izolatının farklı sıcaklıklarda son pH ve kuru ağırlık miktarları.

Çizelge 4.21 HBB-247 izolatının farklı sıcaklıklarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi

Sıcaklık	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Son pH	Kuru ağırlık (g/L)
40 °C	0,031	400	6,58	-
45 °C	0,037	400	6,60	-
50 °C	0,294	800	6,22	0,12
55 °C	0,267	1600	5,62	0,11
60 °C	0,625	12800	5,96	0,32
65 °C	0,546	6400	5,75	0,30
70 °C	0,383	<200	5,65	0,16



Şekil 4.16 HBB-247 izolatının farklı sıcaklıklarda gelişimi ve bakteriyosin üretimi



Şekil 4.17 HBB-247 izolatının farklı sıcaklıklarda son pH ve kuru ağırlık miktarları

HBB-218 suşu, 40-70 °C arasında gelişmektedir. Bakteriyosin üretimi ise sadece 60 °C ve 65 °C'de gerçekleşmektedir. En iyi gelişim 60 °C'de gözlenmiştir.

HBB-247 suşu 40-70 °C arasında gelişim göstermektedir. HBB-218 suşunun aksine, HBB-247 denenen tüm sıcaklıklarda bakteriyosin üretmektedir. En fazla bakteriyosin üretimi ve gelişim 60 °C'de gözlenmiştir.

Her iki suş için de maksimum bakteriyosin üretimi, bakterilerin gelişimi açısından optimum sıcaklık değerlerinde (60 °C) gerçekleşmektedir. HBB-218 daha dar bir sıcaklık aralığında bakteriyosin üretirken, HBB-247 suşunda oldukça geniş bir sıcaklık aralığında (40-70 °C) bakteriyosin üretimi gerçekleşmektedir.

Literatürde, termofilik bakterilerin bakteriyosin üretimleri ile ilgili pek az veri bulunmaktadır. Sıcaklık, pH gibi çevresel koşulların bakteriyosin üretimi üzerine etkileri genelde mezofilik bakterilerde araştırılmıştır. Bu tür çalışmalarda, maksimum bakteriyosin üretimi, optimum gelişim için gerekli olan sıcaklık değerleri ile aynı ya da bu değerlere yakın sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Literatürdeki bu tür veriler, çalışmamızdaki bulguları desteklemektedir.

Bismas *et al.* (1991), *Pediococcus acidilacti* H suşu ile yaptıkları çalışmada sıcaklığın bakteriyosin üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. 30, 37 ve 40 °C'de inkübe edilen kültürlerde en yüksek aktivite, 30 ve 37 °C'de gözlenmiştir (4×10^4 AU/mL). 30 °C'de inkübe edilen kültürün O.D. 600 nm'de absorbansı 3.6; 37 °C'de inkübe edilen kültürün absorbansı ise 3.8'dir. 40 °C'de ise O.D. 600 nm'de 2.7; aktivite ise 2.6×10^4 AU/mL olarak bulunmuştur.

Enterococcus faecium GM-1 izolatıyla yapılan optimizasyon çalışmasında, farklı sıcaklıklarda (10,25, 35, 37, 40, 45, 50 °C), MRS borth ortamında 24 saat sonundaki canlı hücre sayısı ve bakteriyosin aktivitesi araştırılmıştır. Optimum bakteriyosin üretiminin 35-40 °C arasında gerçekleştiği belirtilmiştir. 37 °C'de bakteriyosin üretimi (177.8 AU/mL) ve canlı hücre sayımı (1.9×10^8 kob/mL) maksimum

düzeindedir. 10 °C hariç, denenen tüm sıcaklıklarda bakteriyosin üretildiği gözlenmiştir (Kang ve Lee, 2005).

Lactobacillus plantarum ST28MS ve ST26MS suşlarının bakteriyosin üretimi 30 ve 37 °C'de denenmiş ve her iki sıcaklıkta da suşların aynı oranda bakteriyosin ürettiği, dolayısıyla gelişme sıcaklığının üretim üzerinde çok etkili olmadığı bildirilmiştir. HBB-218 suşunda gözlendiği gibi gelişim sıcaklığı ile bakteriyosin üretiminin ilişkili olduğu bakteriyosinlere örnek olarak, laktosin A, enterosin 1146, laktosin S, amilovorin 1471, nisin Z ve mezenterosin verilebilir (Todorov ve Dicks, 2005).

Staphylococcus warneri FM10, FM20 ve FM30 suşlarının bakteriyosin üretimi üzerine sıcaklığın etkisini denemek amacıyla kültürler 12 saat boyunca, 25,30, 35, 37 ve 40 °C'de inkübe edilmişler ve 12 saat sonunda absorbans ve bakteriyosin aktiviteleri ölçülmüştür. Suşların tümünün optimum 37 °C'de geliştiği ve maksimum bakteriyosin üretiminin de 37 °C'de gözlendiği bildirilmiştir (Prema *et al.*, 2006).

Lactobacillus salivarius CRL 1328 bakterisinin bakteriyosin üretimi farklı pH'larda 44 °C'de denendiğinde bu kombinasyonlarda gelişim gözlenmesine rağmen bakteriyosin üretimi gerçekleşmemektedir. 44 °C gibi, bakteri için yüksek bir sıcaklıkta, mikroorganizma bakteriyosin sentezleme ya da ortama bakteriyosin salgılama yeteneğinden yoksundur. HBB-218 suşu için de benzer bir durum sözkonusu olabilir. Organizma, 60 ve 65 °C dışındaki sıcaklıklarda gelişme yeteneğinde olmasına rağmen bakteriyosin üretimi ya da ortama salınımın engellenmesi sözkonusu olabilir. Araştırmacılar, *L. salivarius* CRL 1328 suşunun 37 °C'de (pH 6.5-8.0 arasında) optimum geliştiğini ve bu koşullarda gerekli ortam bileşenlerini daha iyi kullanılabiliyor olabileceğini bildirmişlerdir (Tomas *et al.*, 2002).

Drosinos *et al.* (2006), hücrelerin enzimatik reaksiyon oranlarının, mikroorganizmanın geliştiği pH veya sıcaklık gibi çevresel koşullar tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir. pH veya sıcaklık kritik değerlerin altına düştüğünde, enzimatik reaksiyonlar baskılanır ve gelişim oranının düşmesine neden

olur. Dolayısıyla, çevresel koşulların değerlerindeki sapmalar sonucu, gelişim oranlarının kritik değer altına düşmesi, bakteriyosin biyosentezi gibi prosedürlerin baskılanmasına yol açar. Çünkü, bakteriyosin sentezi, çeşitli enzimatik reaksiyonların sonucunda gerçekleşir.

HBB-247 suşunda, optimum gelişme sıcaklığının (60 °C) dışındaki sıcaklıklarda da bakteriyosin üretimi gözlenmektedir. Bakteriyosin üretimi, absorbans değerleriyle uyumludur. HBB-247 suşunun bakteriyosin üretimi ile sıcaklık arasındaki ilişkiye benzer bulgular literatürde bildirilmiştir. *Lactobacillus casei* CRL 705 suşu ile yapılan çalışmada, 15, 20, 25 ve 30 °C’lerde gelişim ve bakteriyosin üretimi araştırılmıştır. En yüksek canlı hücre sayımı (3.8×10^8 kob/mL), 20 °C’de elde edilmiştir. Denenen tüm sıcaklıklarda, canlı hücre sayıları değişmesine rağmen, aktivite aynı değerde (1066 AU/mL) bulunmuştur.(Vignolo *et al.*, 1995).

Streptococcus thermophilus SBT1277 suşuyla yapılan çalışmada M17 broth ortamında, 25, 30, 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarda bakteriyosin üretimi ve gelişim araştırılmıştır. Denenen tüm sıcaklıklarda, bakteriyosin üretimi geç log fazda başlamakta ve maksimum üretim durgunluk fazında gerçekleşmektedir. En yüksek bakteriyosin miktarı (640 AU/mL) 35 °C’de gerçekleşmiş, 45 °C’de ise maksimum üretim 160 AU/mL olarak bulunmuştur. İnkübasyon sıcaklığı maksimum canlı hücre sayısını etkilemezken hücre gelişim oranını etkilemiştir. SBT1277, 45 °C’de veya 35 °C’nin altında inkübe edildiğinde hücreler gelişmektedir, ancak bakteriyosin üretimi azalmaktadır (Kabuki *et al.*, 2007).

Streptococcus thermophilus 347 suşuyla yapılan çalışmada 16 saat sonunda, 30 ve 42 °C’deki absorbans değerleri aynıdır. Ancak, 30 °C’deki termofilin üretimi, 42 °C’deki üretimin 8 katına çıktığı belirlenmiştir (Villani *et al.*, 1995).

Streptococcus thermophilus 81, 30 °C’de inkübe edildiğinde, 42 °C’de üretilenden daha fazla miktarda bakteriyosin ürettiği bildirilmiştir (Ivanova *et al.*, 1998).

Genelde, gelişme ortamı, pH ve sıcaklık gibi çevresel şartların hücre gelişimi ve bakteriyosin üretimini etkilediği kabul edilmektedir (El-Shafei *et al.*, 2000; Juarez-Tomas *et al.*, 2002). Bununla birlikte, bakteriyosin üretimini kontrol eden mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bakteriyosin üretimi için gerekli koşullar her üretici organizma için değişebilmektedir (Kabuki *et al.*, 2007).

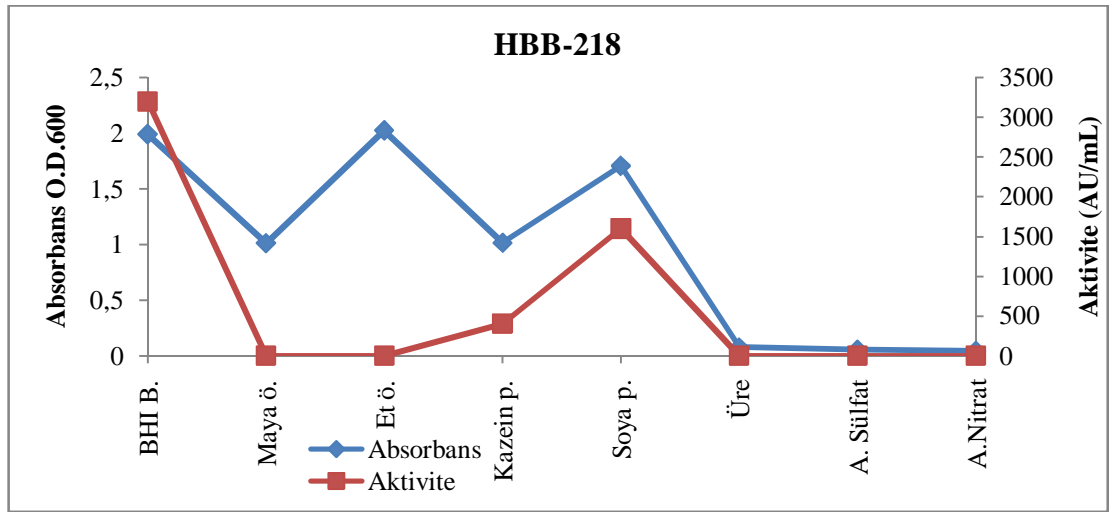
4.8.3. Farklı azot kaynaklarında izolatların gelişimleri ve bakteriyosin üretimleri

Farklı azot kaynaklarında izolatların gelişimlerini ve bakteriyosin üretimlerini belirlemek amacıyla, BHI Broth ortamı kullanılmış ve kültürler HBB-218 suşu için 60 °C'de, pH 6.0'da; HBB-247 suşu için ise 60 °C'de pH 6,5'da inkübe edilmiştir. BHI broth ortamında %2,75 oranında bulunan azot kaynaklarının yerine diğer azot kaynakları temel besi ortamına ilave edilmiştir. İzolatlardaki bakteriyosin üretiminin en fazla gerçekleştiği zamanlarda örnekler alınmıştır. HBB-218 için gelişimin 72. saatinde; HBB-247 izolatı için ise gelişimin 27. saatinde örnekler alınarak, absorbans, kuru ağırlık, pH ve bakteriyosin aktiviteleri belirlenmiştir. Azot kaynakları denenirken BHI broth ortamı kontrol olarak kullanılmıştır. Maya özütü, et özütü, kazein pepton, soya pepton, üre, amonyum sülfat ve amonyum nitrat kullanılarak yapılan denemelerde, her iki suş için de en iyi azot kaynağı soya pepton olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.22-4.23).

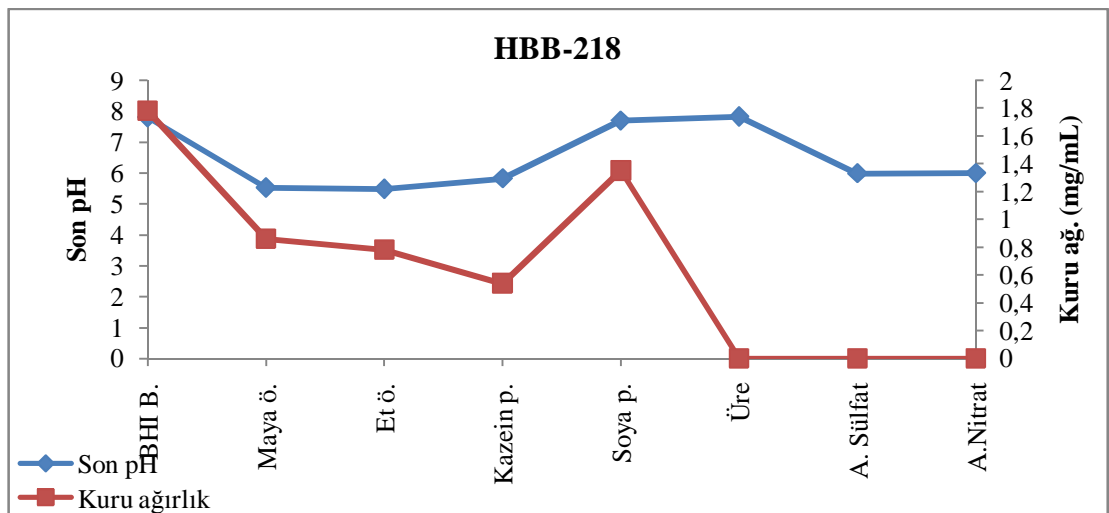
En iyi azot kaynağı olarak soya pepton seçildikten sonra, besi ortamındaki başlangıç miktarı esas alınarak, temel besi ortamına %1; %2; %2,75; %3 ve %4 oranlarında soya pepton eklenmiştir. Sonuçta, her iki suş için de en verimli soya pepton oranı %3 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.24-4.25).

Çizelge 4.22 HBB-218 izolatının farklı azot kaynaklarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi

Azot kaynakları	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Son pH	Kuru (g/L)	ağırlık
BHI (Kontrol)	1,989	3200	7,80		1,78
Yeast Extract	1.010	-	5,52		0,86
Meat Extract	2,022	-	5,48		0,78
Kazein pepton	1013	400	5,82		0,54
Soya pepton	1,704	1600	7,69		1,35
Üre	0,073	-	7,82		-
A. sülfat	0,054	-	5,98		-
A.nitrat	0.041	-	5.99		-



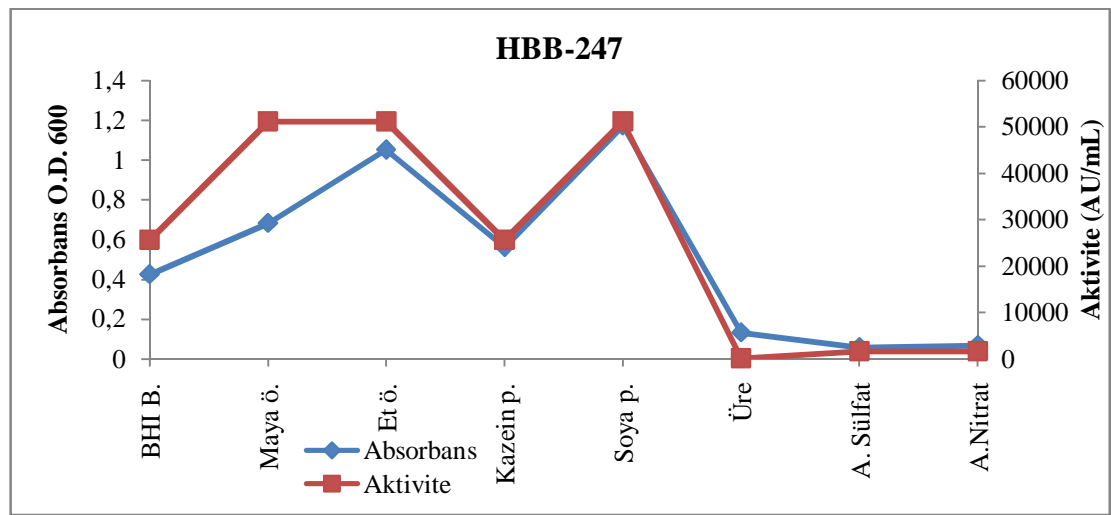
Şekil 4.18 HBB-218 izolatının farklı azot kaynaklarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi



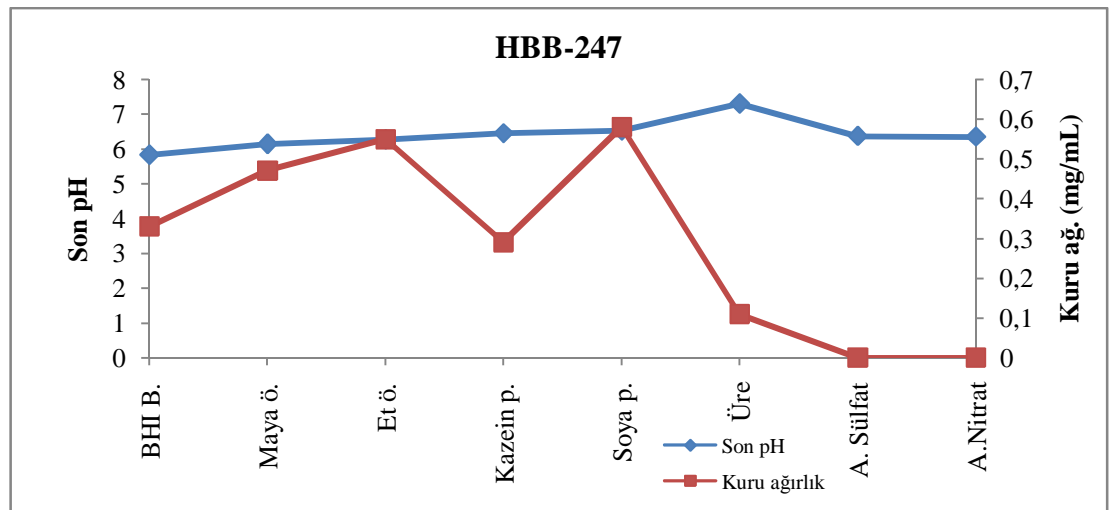
Şekil 4.19 HBB-218 izolatının farklı azot kaynaklarında son pH ve kuru ağırlık miktarları

Çizelge 4.23 HBB-247 izolatının farklı azot kaynaklarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi

Azot kaynakları	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Son pH	Kuru ağırlık (g/L)
BHI (Kontrol)	0,425	25600	5,83	0,33
Yeast Extract	0,683	51200	6,14	0,47
Meat Extract	1,053	51200	6,27	0,55
Kazein pepton	0,562	25600	6,45	0,29
Soya pepton	1,175	51200	6,52	0,58
Üre	0,132	<200	7,30	0,11
A. sülfat	0,057	1600	6,37	-
A. nitrat	0,068	1600	6,35	-



Şekil 4.20 HBB-247 izolatının farklı azot kaynaklarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi



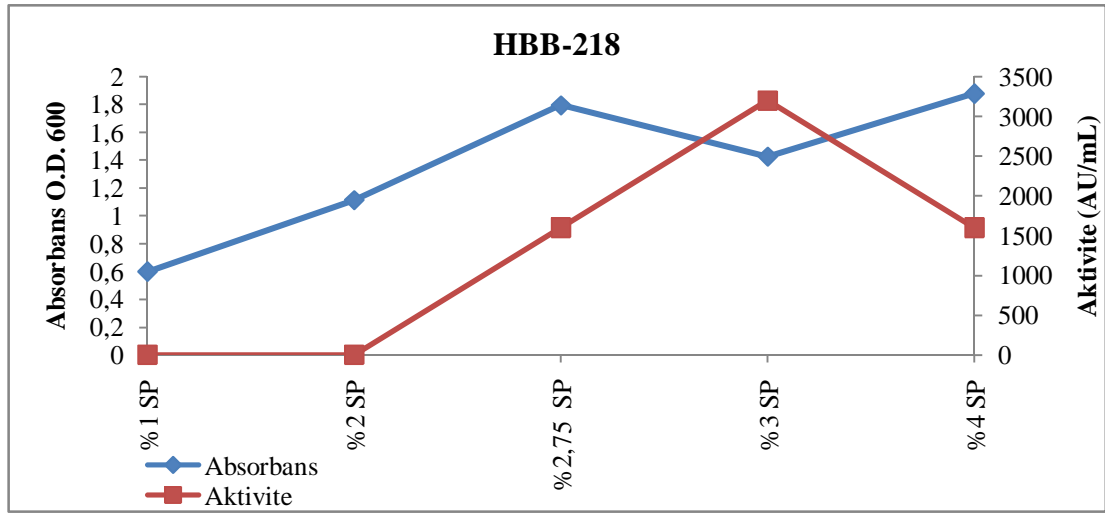
Şekil 4.21 HBB-247 izolatının farklı azot kaynaklarında son pH ve kuru ağırlık miktarları

HBB-218 suşunun üre, amonyum sülfat ve amonyum nitratın bulunduğu ortamlardaki gelişimi zayıftır ve bakteriyosin aktivitesine rastlanmamıştır. Maya özütü ve et özütünün bulunduğu ortamlarda ise, absorbans verileri oldukça yüksek olmasına rağmen, aktivite gözlenmemiştir (Şekil 4.18, 4.19). HBB-218 suşu için bakteriyosin üretiminin daha çok gelişime bağlı olduğu söylenebilir. Et özütü ve maya özütü karbon kaynağı olarak kullanıldığında aktiviteye rastlanmasının sebebi ise, son pH ile açıklanabilir. HBB-218 suşuyla yapılan denemelerde genelde pH 5.5 ve buna yakın değerlerde bakteriyosin üretimi azalmaktadır. BHI broth ortamında aktivite daha yüksek olmasına rağmen, sonraki çalışmalar için soya pepton seçilmiştir. BHI broth ortamında üç farklı kompleks azot kaynağı bulunmaktadır, araştırmacılar bu tür zengin kompleks azot kaynaklarının sonraki saflaştırma aşamalarını zorlaştırdığını belirtmektedirler (Barefoot ve Klaenhammer, 1983)

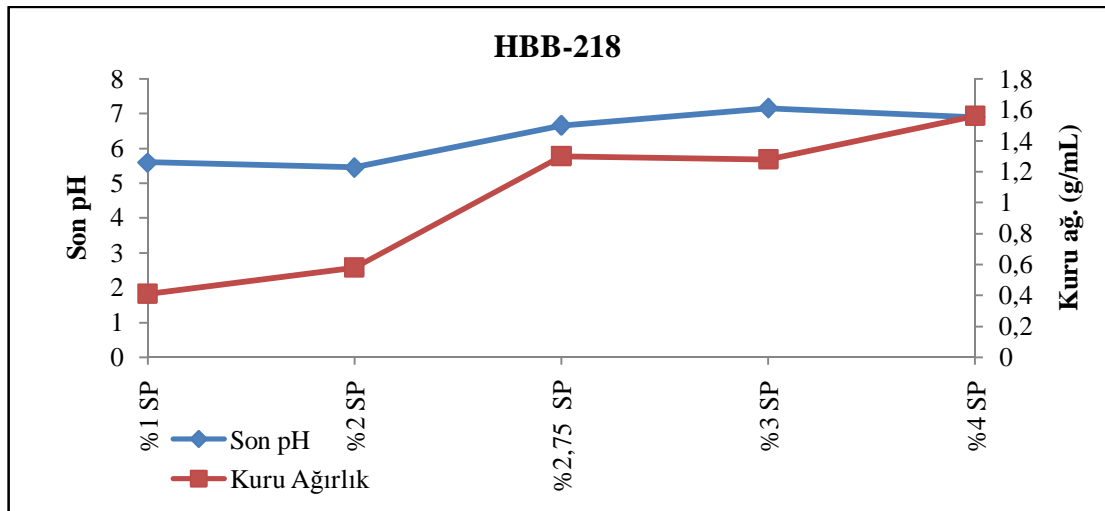
HBB-247 suşu ise denenen tüm azot kaynaklarında bakteriyosin üretme yeteneğindedir. En iyi aktivite değerleri (51 200 AU/mL), maya özütü, et özütü ve soya peptonun bulunduğu ortamlarda gözlenmiştir. Ancak, bu azot kaynaklarının tümünde aynı aktiviteye rastlanmasına rağmen daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere soya pepton seçilmiştir.

Çizelge 4.24 HBB-218 izolatının farklı soya pepton oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi

<i>Soya pepton oranları</i>	<i>Absorbans (600 nm)</i>	<i>Aktivite (AU/mL)</i>	<i>Son pH</i>	<i>Kuru ağırlık (g/L)</i>
%1	0,598	-	5,60	0,41
%2	1,112	-	5,46	0,58
%2.75	1,794	1600	6,67	1,30
%3	1,425	3200	7,16	1,28
%4	1,878	1600	6,91	1,56



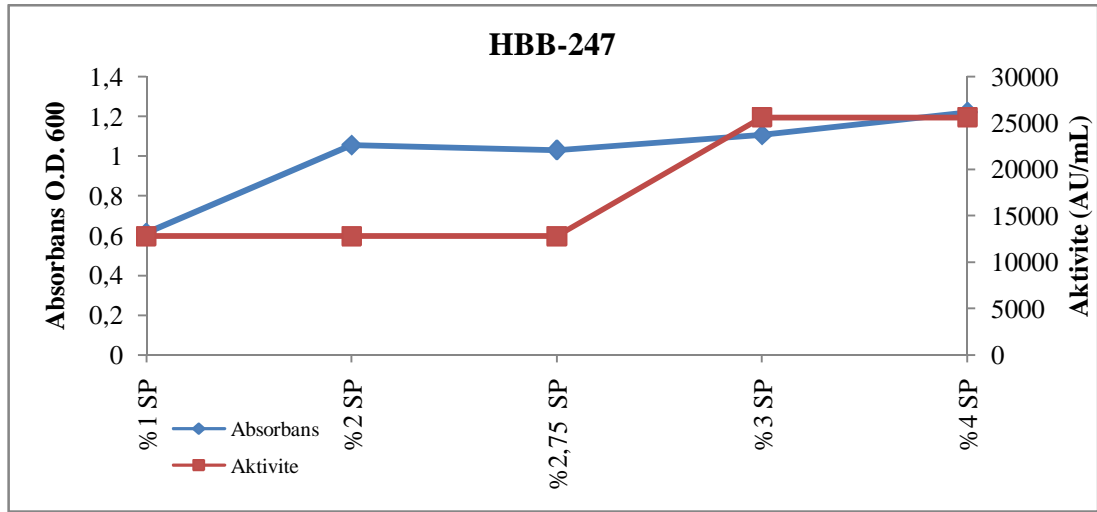
Şekil 4.22 HBB-218 izolatının farklı soya pepton oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi



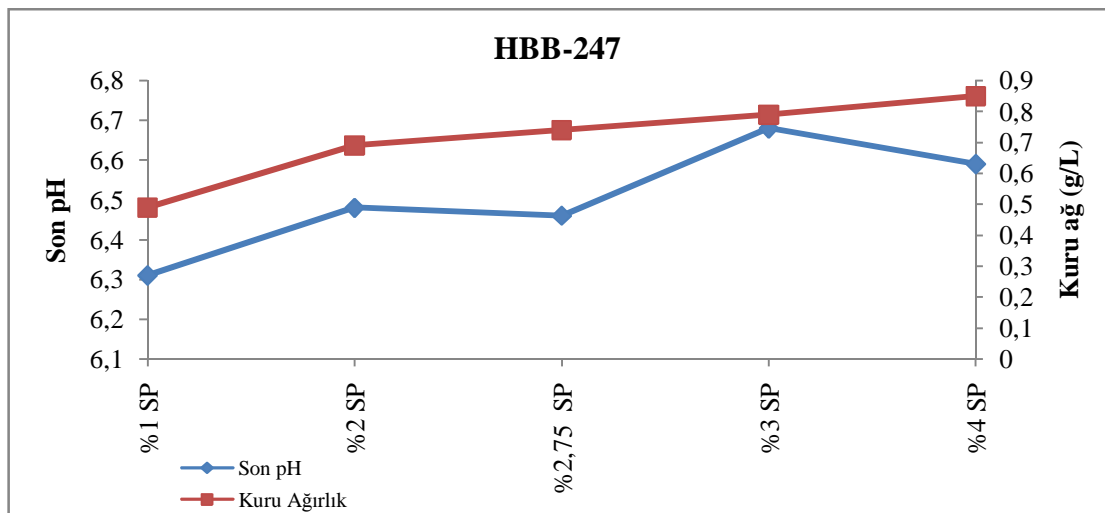
Şekil 4.23 HBB-218 izolatının farklı soya pepton oranlarında son pH ve kuru ağırlık miktarları

Çizelge 4.25 HBB-247 izolatının farklı soya pepton oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi

Soya pepton oranları	Absorbans (600nm)	Aktivite (AU/mL)	pH	Kuru ağırlık (g/L)
%1	0.614	12800	6.31	0.49
%2	1.055	12800	6.48	0.69
%2.75	1.031	12800	6.46	0.74
%3	1.106	25600	6.68	0.79
%4	1.220	25600	6.59	0.85



Şekil 4.24 HBB-247 izolatının farklı soya pepton oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi



Şekil 4.25 HBB-247 izolatının farklı soya pepton oranlarında son pH ve kuru ağırlık miktarları

Suşların gelişimi ve bakteriyosin üretimleri açısından farklı soya pepton oranları denendiğinde, HBB-218'in %1 ve %2'lik soya peptonlu ortamda bakteriyosin üretmediği, en iyi aktivitenin ise %3 oranında soya pepton varlığında gerçekleştiği gözlenmiştir.

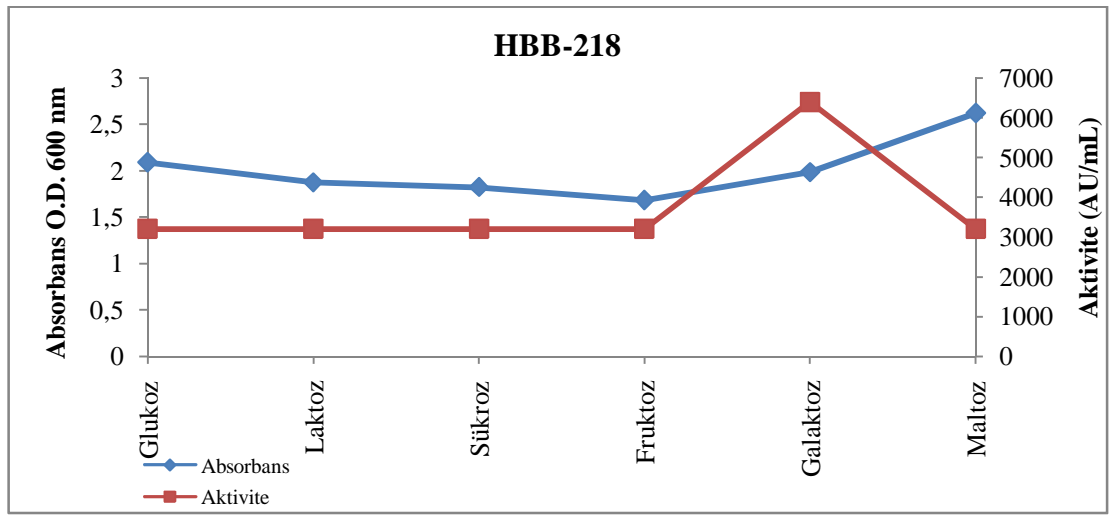
HBB-247 suşu denenen tüm soya pepton oranlarında bakteriyosin üretmektedir. En yüksek aktivite ise %3 ve %4 oranında soya pepton içeren ortamlarda saptanmıştır. Gelişim %4'lük soya peptonlu ortamda daha iyi olmasına rağmen, aktivite değerleri aynı olduğu için, sonraki çalışmalar için, %3'lük soya pepton seçilmiştir. Bu şekilde ortama daha az azot kaynağı ilave ederek aynı verimi elde etmek mümkündür.

4.8.4. Farklı şeker kaynaklarında izolatların gelişimleri ve bakteriyosin üretimleri

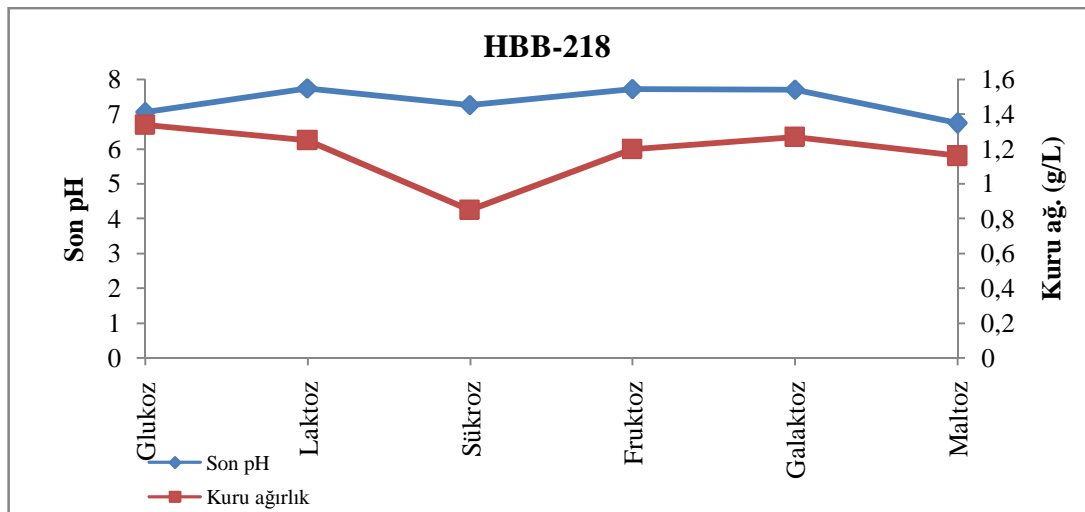
Farklı şeker kaynaklarında izolatların gelişimlerini ve bakteriyosin üretimlerini belirlemek amacıyla, kültürler HBB-218 suşu için 60 °C'de, pH 6.0'da ve %3 soya pepton içeren; HBB-247 suşu için ise 60 °C'de pH 6,5'da %3 soya pepton içeren modifiye ortamda inkübe edilmiştir. HBB-218 için gelişimin 72. saatinde; HBB-247 izolatı için ise gelişimin 27. saatinde örnekler alınarak, absorbans, kuru ağırlık, pH ve bakteriyosin aktiviteleri belirlenmiştir. Glukoz, laktoz, sükroz, fruktoz, galaktoz, maltoz kullanılarak yapılan denemelerde, HBB-218 suşu için en iyi şeker kaynağı olarak galaktoz, HBB-247 için ise fruktoz şekeri seçilmiştir.

Çizelge 4.26 HBB-218 izolatının farklı şekerlerin varlığında gelişimi ve bakteriyosin üretimi

<i>Şekerler</i>	<i>Absorbans (600 nm)</i>	<i>Aktivite (AU/mL)</i>	<i>Son pH</i>	<i>Kuru ağırlık (g/L)</i>
Glukoz	2,090	3200	7,06	1,34
Laktoz	1,874	3200	7,74	1,25
Sükroz	1,821	3200	7,27	0,85
Fruktoz	1,682	3200	7,72	1,20
Galaktoz	1,985	6400	7,71	1,27
Maltoz	2,622	3200	6,74	1,16



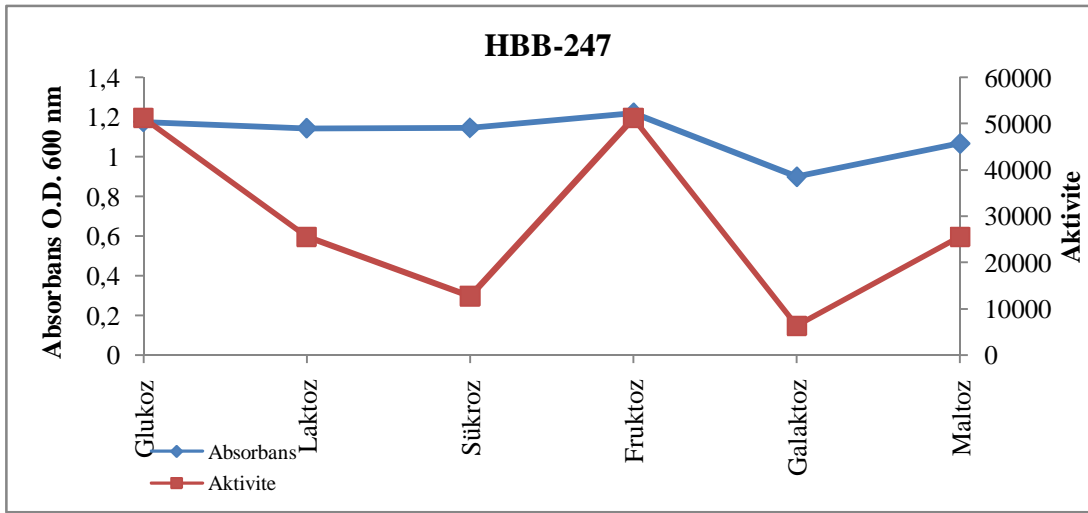
Şekil 4.26 HBB-218 izolatının farklı şekerlerin varlığında gelişimi ve bakteriyosin üretimi



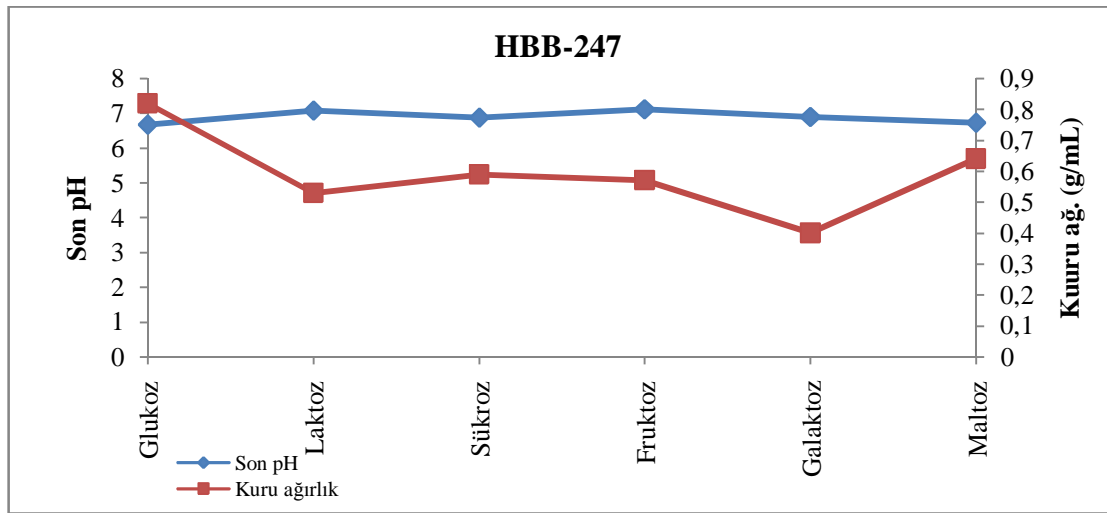
Şekil 4.27 HBB-218 izolatının farklı şekerlerin varlığında son pH ve kuru ağırlık miktarları.

Çizelge 4.27 HBB-247 izolatının farklı şekerlerin varlığında gelişimi ve bakteriyosin üretimi

Şekerler	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Son pH	Kuru ağırlık (g/L)
Glukoz	1,176	51200	6,68	0,82
Laktoz	1,143	25600	7,08	0,53
Sükroz	1,145	12800	6,88	0,59
Fruktoz	1,220	51200	7,12	0,57
Galaktoz	0,900	6400	6,90	0,40
Maltoz	1,067	25600	6,73	0,64



Şekil 4.28 HBB-247 izolatının farklı şekerlerin varlığında gelişimi ve bakteriyosin üretimi



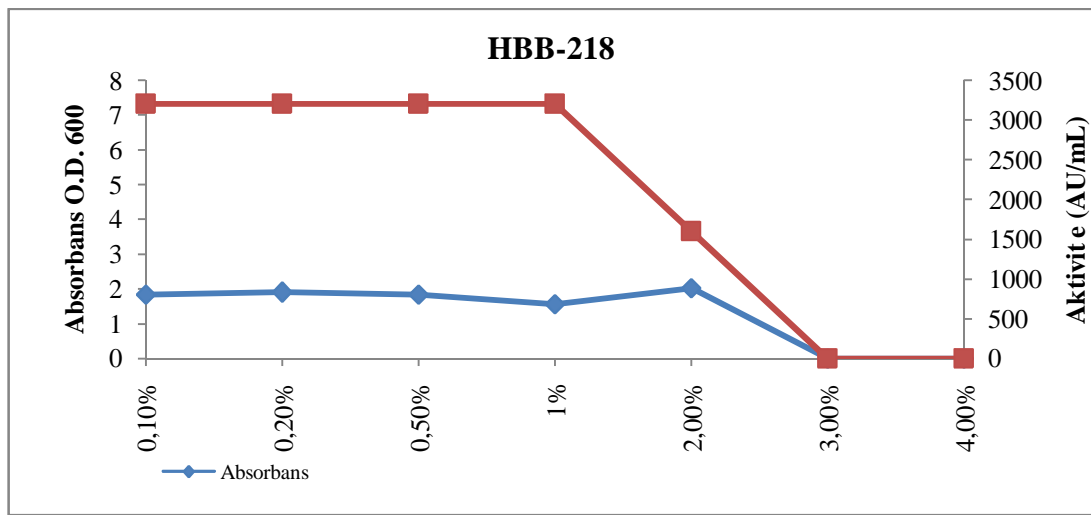
Şekil 4.29 HBB-247 izolatının farklı şekerlerin varlığında son pH ve kuru ağırlık miktarları.

En iyi şeker kaynakları belirlendikten sonra, şeker kaynaklarının oranları optimize edilmiştir. Denemeler %0,1; %0,2; %0,5; %1, %2, %3 ve %4 oranlarında galaktoz (HBB-218 için) ve fruktoz (HBB-247 için) içeren temel ortamlarda yapılmıştır. Sonuçta, HBB-218 suşu için en iyi bakteriyosin üretimi %0,1, %0,2, %0,5 ve %1 oranında galaktoz içeren ortamlarda (3200 AU/mL) gözlenmiştir. Sonraki denemeler için kullanılmak üzere ise %0,1 oranında galaktoz seçilmiştir. %3 ve 4 oranında galaktoz şekeri gelişimi inhibe etmiştir (Çizelge 4.28).

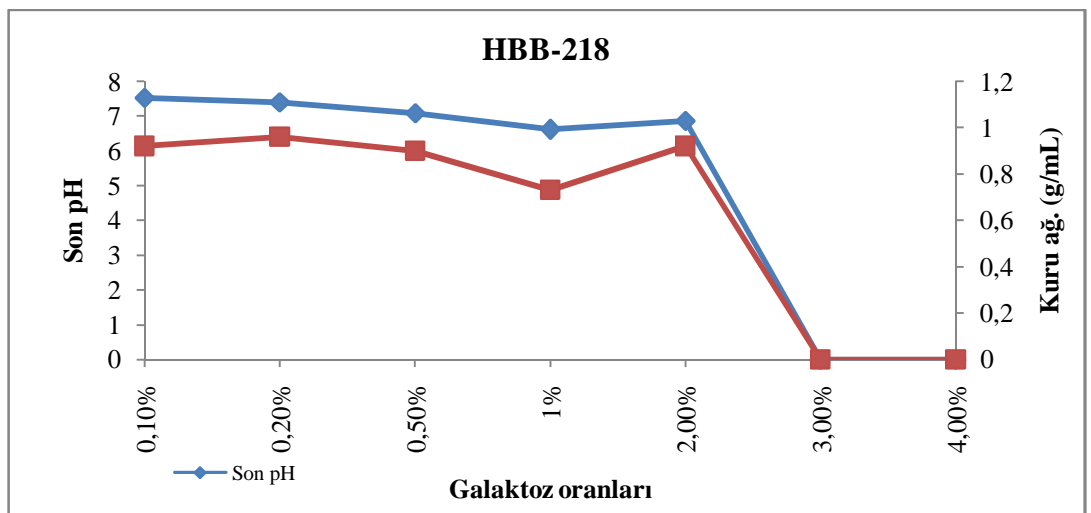
HBB-247 için ise en iyi bakteriyosin üretimi (51 200 AU/mL) %1 oranında fruktoz varlığında gerçekleşmiştir. %0,1; 0,2 ve 0,5 oranlarında absorbans değerleri daha yüksek olmasına rağmen % 1'lik fruktoz varlığında bakteriyosin üretimi 2-3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.28 HBB-218 izolatının farklı galaktoz konsantrasyonlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi

Galaktoz oranları	Absorbans (600 nm)	Aktivite (AU/mL)	Son pH	Kuru ağırlık (g/L)
%0,1	1,830	3200	7,52	0,92
%0,2	1,898	3200	7,39	0,96
%0,5	1,835	3200	7,08	0,90
%1	1,563	3200	6,61	0,73
%2	2,015	1600	6,86	0,92
%3	Gelişmedi	-	-	-
%4	Gelişmedi	-	-	-



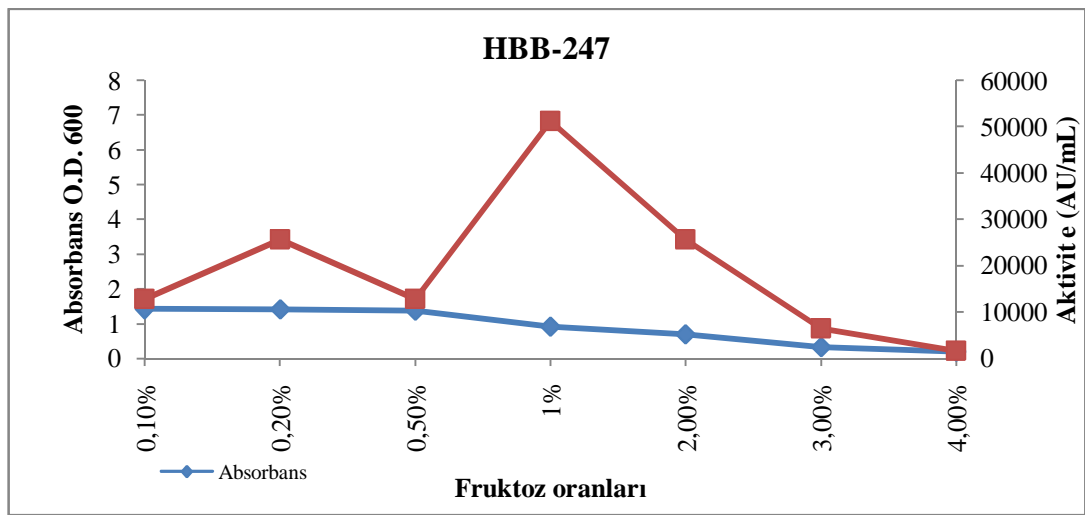
Şekil 4.30 HBB-218 izolatının farklı galaktoz konsantrasyonlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi



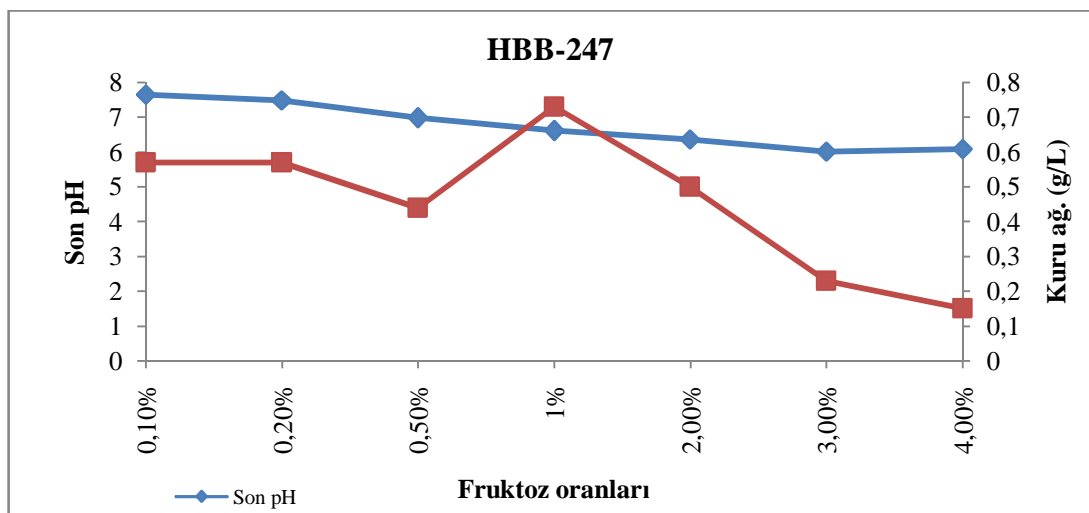
Şekil 4.31 HBB-218 izolatının farklı galaktoz konsantrasyonlarında son pH ve kuru ağırlık miktarları

Çizelge 4.29 HBB-247 izolatının farklı fruktoz konsantrasyonlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi

<i>Fruktoz oranları</i>	<i>Absorbans (600 nm)</i>	<i>Aktivite (AU/mL)</i>	<i>Son pH</i>	<i>Kuru ağırlık (g/L)</i>
%0,1	1,420	12800	7,65	0,57
%0,2	1,408	25600	7,48	0,57
%0,5	1,370	12800	6,98	0,44
%1	0,918	51200	6,61	0,73
%2	0,690	25600	6,36	0,50
%3	0,326	6400	6,02	0,23
%4	0,198	1600	6,08	0,15



Şekil 4.32 HBB-247 izolatının farklı fruktoz oranlarında gelişimi ve bakteriyosin üretimi



Şekil 4.33 HBB-247 izolatının farklı fruktoz oranlarında son pH ve kuru ağırlık miktarları

Bakteriyosin üretimi, pH, besin kaynakları ve inkübasyon sıcaklığı ile yakından ilgilidir. Aktivite oranları her zaman üretici hücrenin kütlesi veya gelişim oranı ile uyumlu olarak değişmemektedir. Bakteriyosin üretim oranları, genelde optimum gelişim için gerekli şartların altındaki seviyelerde artmaktadır. Ortamın, gelişimi sınırlayıcı faktörlerle, örneğin karbohidratlar, azot kaynakları, vitaminler ve potasyum fosfatla desteklenmesi veya ortam pH'sının değiştirilmesi sayesinde bakteriyosin üretimi genelde artırılabilir (Todorov ve Dicks, 2005).

Todorov *et al.*, (2006) yaptıkları çalışmada, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 suşunun bakteriyosin üretimi üzerine ortam koşullarının etkilerini araştırmışlardır. Denenen azot kaynakları içerisinde, en yüksek aktivite maya özütünün (20 g/L) kullanıldığı ortamda gözlenmiştir. Şeker kaynaklarından ise, fruktoz (10, 20 ve 30 g/L) varlığında bakteriyosin üretiminin maksimum olduğunu, sükroz, maltoz ve mannoz varlığında ise, hiç aktiviteye rastlanmadığını bildirmişlerdir. Fruktozun aktiviteyi artırıcı etkisi sakasin P (Aasen *et al.*, 2000) ve nisin (DeVuyst ve VanDamme, 1992) bakteriyosinleri içinde bildirilmiştir. Denenen glikoz konsantrasyonlarında ise, 5.0, 10 ve 20 g/L konsantrasyonda aktivite aynı değerdeyken, 30 ve 40 g/L glukozlu ortamda aktivitede %50 kayıp olduğunu saptamışlardır.

Lactobacillus plantarum ST23LD ve ST341LD suşlarının bakteriyosin üretimi için MRS broth ortamın temel ortam olarak seçilmiş ve çeşitli azot kaynaklarının aktivite üzerine etkileri araştırılmıştır. ST23LD suşunun bakteriyosin üretiminin tripton + maya özütü kullanıldığında arttığı, et özütü veya et özütü + maya özütü kullanıldığında ise aktivitede %50 oranında düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir. Karbon kaynaklarından ise yalnızca maltoz kontrole göre aktivitede artışa neden olmuştur. Laktoz, mannoz, fruktoz, maltoz ve glukonat varlığında aktivitede düşüş gözlenmiştir. ST341LD suşunda ise bakteriyosin üretimi tripton, tripton + maya özütü ve tripton + et özütü içeren ortamlarda %100 oranında artmıştır. Azot kaynağı olarak sadece maya özütü içeren ortamda ise aktivite yarı yarıya azalmıştır. Dolayısıyla her iki suş için anahtar azot kaynağı tripton olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar, MRS ortamının yanısıra M17 broth, BHI broth, %10 soya pepton ve

%10 melas kullandıklarında gelişim iyi olmasına rağmen bakteriyosin üretiminin oldukça düştüğünü belirlemişlerdir. Bu durum, bakteriyosin üretimi için spesifik besinlere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Todorov ve Dicks, 2005).

Todorov ve Dicks (2006) bozadan izole edilen iki laktobasil suşunun bakteriyosin üretimi üzerine ortam bileşenlerinin etkisini incelemişlerdir. Tek karbon kaynağı olarak tripton kullanıldığında bakteriyosin aktivitesi iki katına ulaşmaktadır (12 800'den 25 600'a artmıştır). Bakteriyosin üretimi, kullanılan azot kaynağının oranıyla birlikte çok fazla değişmemektedir. Ancak, glukoz yerine sükroz, mannoz veya maltoz kullanıldığında aktivite kontrole göre iki kat artmıştır. Maya özütü veya et özütü tek başlarına ya da birlikte kullanıldıklarında bakteriyosin üretimi azalmıştır. Maya özütü bulunan ortamda aktivite %88, et özütünde %50, maya özütü + et özütü içeren ortamda ise aktivite %75 oranında azalmıştır. Çalışmamızda kullandığımız HBB-218 suşu maya özütü ve et özütü bulunan ortamlarda iyi gelişmesine rağmen bakteriyosin üretimi gerçekleşmemiştir. Literatürdeki, azot kaynakları ile ilgili bu bulgular, bizim sonuçlarımıza benzer veriler içermektedirler.

Melastan izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşunun bakteriyosin üretimi incelendiğinde benzer şekilde maya özütü ve et özütü kullanıldığında triptona göre aktivitenin sırasıyla %75 ve %50 oranında azaldığı bildirilmiştir. Aynı suş tarafından üretilen iki bakteriyosinin aktivitesi glukoz, sükroz, maltoz ve mannoz varlığında artarken fruktoz ve laktozlu ortamlarda üretim azalmıştır (Todorov ve Dicks, 2005).

Kang ve Lee (2005), *Enterococcus faecium* GM-1 suşu için en yüksek bakteriyosin aktivitesini % 2 maya özütünde, en düşük aktiviteyi ise et özütü içeren modifiye MRS broth ortamında saptamışlardır. Şeker kaynakları içerisinde ise, en fazla bakteriyosin üretimi mannoz ve maltoz varlığında gözlenmiştir.

Staphylococcus warneri FM10, FM20 ve FM30 suşlarıyla yapılan çalışmada ise en yüksek bakteriyosin üretimi üre (%1) varlığında gözlenmiştir. Azot kaynağı olarak üre, maya özütü, amonyum sülfat ve sodyum nitrat kullanılan çalışmada suşların gelişimi açısından da en iyi azot kaynağı üre olara belirlenmiştir. 600 nm'de ölçülen

absorbans değerleri FM10 suşu için 1.4; FM20 için 1.7; FM30 için ise 1.2 olarak bulunmuştur. Şeker kaynaklarının bakteriyosin üretimi üzerine etkisi araştırıldığında en yüksek aktivite FM10 suşu için glukoz ve fruktoz şekerlerinde, FM20 VE FM30 suşları için ise glukoz ve maltoz varlığında gözlenmiştir (Prema *et al.*, 2006).

Bakteriyosinler, farklı karbon kaynakları içeren çeşitli ortamlarda üretilebilirler. *Lactococcus lactis* 10-1 suşunun glukoz, sukroz ve ksiloz varlığında nisin Z üretebildiği, ancak glukozlu ortamda aktivitenin (4000 IU/mL), ksiloz içeren ortama göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Chinachoti *et al.*, 1997). Diğer yandan enterosin 1146 üretimi için sükrozun glukozdan daha iyi bir karbon kaynağı olduğu bulunmuştur (Leroy ve DeVuyst, 2001).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* F-116 suşu, glukoz, sukroz ve maltoz içeren ortamlarda geliştirildiğinde ortam pH'sının düştüğü ve bu duruma paralel olarak antibiyotik aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, aynı konsantrasyonda (%1) sükroz bulunan ortamda aktivitenin glukozu göre %26.1, maltozu göre ise %18.9 oranında daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Laktoz, rafinoz ve arabinoz içeren ortamlarda ise aktivite sırasıyla %6, %51.2 ve %53.7 oranında azalmıştır (Stoyanova ve Levina, 2006).

Cheigh *et al.* (2002), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 suşuyla yaptıkları çalışmada, bakteriyosin üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Et özütü, tripton, soya pepton, maya özütü, pepton, kaziton, proteaz pepton ve kazein kullanılan çalışmada en yüksek bakteriyosin üretimi maya özütü varlığında elde edilmiştir ve gelişimde yüksek seviyededir. Maya özütünün konsantrasyonu artırıldığında ise, %3 konsantrasyonda aktivitenin iki katına ulaştığı, %4 ve %5 oranında ise gelişim artmasına rağmen aktivitenin değişmediği belirlenmiştir. Araştırmacılar karbon kaynaklarının etkilerini incelemek amacıyla M17 broth ortamına % 0.5 oranında farklı şekerler eklemişlerdir. Denenen 9 farklı karbon kaynağı içerisinde hücresel gelişim için en iyi olanlar sükroz ve laktoz iken, laktoz varlığında sükrozu göre aktivitenin 8 kat arttığı gözlenmiştir.

Devuyst *et al.*, (1996), az büyüme oranlarında veya uygun olmayan gelişme koşullarında bakteriyosin üretiminin artabileceğini iddia etmişlerdir. Kim *et al.* (1997), hücreler zengin bir ortamda geliştirilse dahi, ortamda yüksek seviyede nisin bulunduğu takdirde, nisin üretiminin engellendiğini bildirmişlerdir. Üretici hücrenin bakteriyosine olan direnci, bakteriyosin üretimini etkileyebilmektedir. Bağışıklık geni içeren plazmid aktarılan suşlarda nisine direnç de artmış ve bu sayede nisin üretimi oranı ve nisin seviyesi de yükseltilmiştir (Kim *et al.*, 1998). Verilen bu bilgilere rağmen, laktobasillerin bakteriyosin üretimini etkileyen faktörler henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır (Cheigh *et al.*, 2002).

Brevibacterium linens ATCC 9175 bakterisi, peyniraltı suyunda geliştirildiğinde, bakteriyosin üretimi, gelişimin 16. saatinde başlamakta, 72. saatte ise durgunluk fazına ulaşılmaktadır. Bakteriyosin üretiminin ise, 32. saate kadar devam ettiği, 40. saatte kaybolduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar bu durumu proteolizis ile açıklamışlardır. Bakteriyal proteazların üretimi genelde kazein veya jelatin gibi kompleks organik azot kaynaklarının varlığında indüklenmekte ve metabolize edilebilen azot kaynaklarının varlığında hızla baskılanmaktadır. Önceki çalışmalarda da, *B. linens* bakterisinde gelişme ortamına mısır nişastası veya yumurta albumini eklendiğinde proteaz üretiminin arttığı bulunmuştur. *B. linens* ATCC 9175 suşunun peynir altı suyunda üretilmesi sonucu ortamda bulunan peptidlerin proteaz üretimini artırmış olabileceği belirtilmiştir (Motta ve Brandelli, 2002).

Pediococcus damnosus NCFB 1832 suşu tarafından üretilen pediocin PD-1 bakteriyosini ile yapılan çalışmada, farklı azot kaynakları denenmiştir. MRS broth ortamı et özütü (%1.9), tripton (%1.9), maya özütü (%2.5), bakteriyolojik pepton (%1.7) ve kazamino asitlerle (%3.4), desteklenmiştir. MRS broth ortamındaki ve diğer azot kaynaklarının bulunduğu ortamlardaki bakteriyal gelişim ve bakteriyosin üretimi 115 saat boyunca izlenmiştir. En hızlı gelişim oranı ve en yüksek pediocin PD-1 spesifik aktivitesi bakteriyolojik peptonda saptanmıştır. Et özütü gelişim oranını azaltırken bakteriyosin üretim seviyesi, bakteriyolojik peptonda gözlenene yakın bulunmuştur. Kazamino asitler dışında, denenen tüm azot kaynaklarının varlığında, gelişim gözlenmiştir (Nel, *et al.*, 2001).

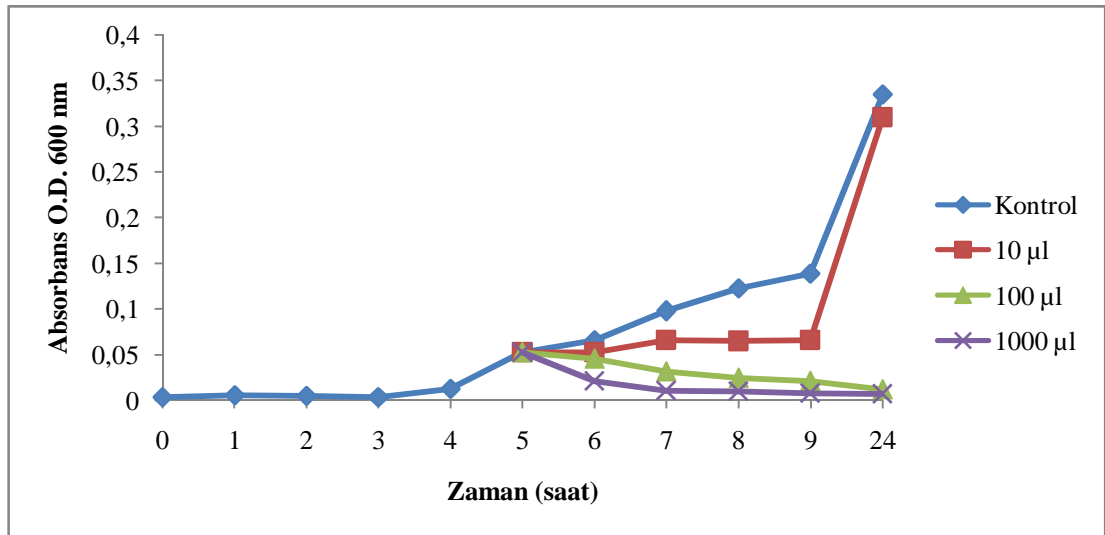
Leroy ve Devuyst, (2001), yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus sakei* CTC 494 suşunun bakteriyosin üretimini incelemişlerdir. *L. sakei* CTC 494 suşunun hücresel gelişimi sınırlı olmasına rağmen MRS broth ortamında bulunan besin miktarı bakteriyosin üretimine yetecek seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Ortamdaki besin miktarı artırıldığında ise, hücresel gelişim de artmasına rağmen, kültür süpernatantlarındaki maksimum bakteriyosin seviyesi değişmemiştir. Bakteriyosin üreten hücre sayısı artarken, hücre başına düşen bakteriyosin üretimi azalmıştır. Benzeri bir durum *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşunun nisin üretiminde gözlenmiştir. Düşük konsantrasyonda besin bulunan ortamda, zengin besi ortamına göre, spesifik nisin üretim oranı artmıştır (Kim *et al.*, 1997). Fazla besinin kullanılabilirliğine rağmen, total nisin seviyesi yükselmemiştir. *Lactobacillus amylovorus* DCE471 suşunda ise MRS broth ortamında bulunan azot kaynağı artırıldığında spesifik bakteriyosin üretimi azalmıştır (Callewaert ve Devuyst, 2000). Besin yönünden zengin çevrelerdeki bakterilerin, bakteriyosin üretim mekanizmalarını indirgedikleri bilinmektedir. Çünkü, bakteriyosinler, doğal, rekabet gerektiren ve besin yönünden fakir çevrelerde kullanılan savunma amaçlı moleküllerdir. Yapay kültür şartlarında bakteriyosin üretiminin azalmasının olası nedeni, üretici hücrenin kendini korumasıdır (self-protection). Hücresel ortamda, yüksek miktarda bakteriyosin bulunması, daha fazla sentezlenmesini engelleyebilir. Çünkü, üretici hücrenin kendi bakteriyosinine bağışıklığı kısıtlıdır. Diğer yandan, *L. sakei* CTC 494 suşu için besinsel açıdan çok fakir çevreler bakteriyosin üretimine zarar verir. Ortamdaki maya özütünün artırılmasıyla birlikte, *L. sakei* CCUG 42687 suşunun spesifik bakteriyosin üretimi de artmıştır (Aasen, *et al.*, 2000). Diğer bir örnekte ise, MRS broth ortamındaki azot kaynağının değiştirilmesi, *L. plantarum* TMW1.25 suşunun plantarisin üretimini etkilememiştir (Klostermaier *et al.*, 1999).

Pratik uygulamalar açısından bakıldığında, bakteriyosin üreten suş, besinsel çevreye mükemmel şekilde uyum sağlamıştır. *L. sakei* CTC 494 suşu, doğal fermente sosislerden izole edilmiştir ve et benzeri ortamda (MRS broth) yüksek oranda bakteriyosin üretmektedir, ancak bakteriyosin üretimi kazein-tripton ortamında tamamen durmaktadır. Kazein-tripton ortamında bulunan besin spektrumu, ne hücresel gelişimi ne de bakteriyosin üretimini destekler niteliktedir. Bakteriyosin

üretimini artırmak için besin yönünden zengin ortamlar şart değildir. Kullanılabilir besin miktarı arttığı takdirde hücresel gelişimle birlikte bakteriyosin üretimi de artacaktır. Fakat bu artış, belli bir plato değere kadar olur. Bakteriyosin aktivitesi seviyeleri genelde bağışıklık sebeplerinden dolayı belli bir değerden sonra sınırlanmaktadır (Leroy ve DeVuyst, 2001).

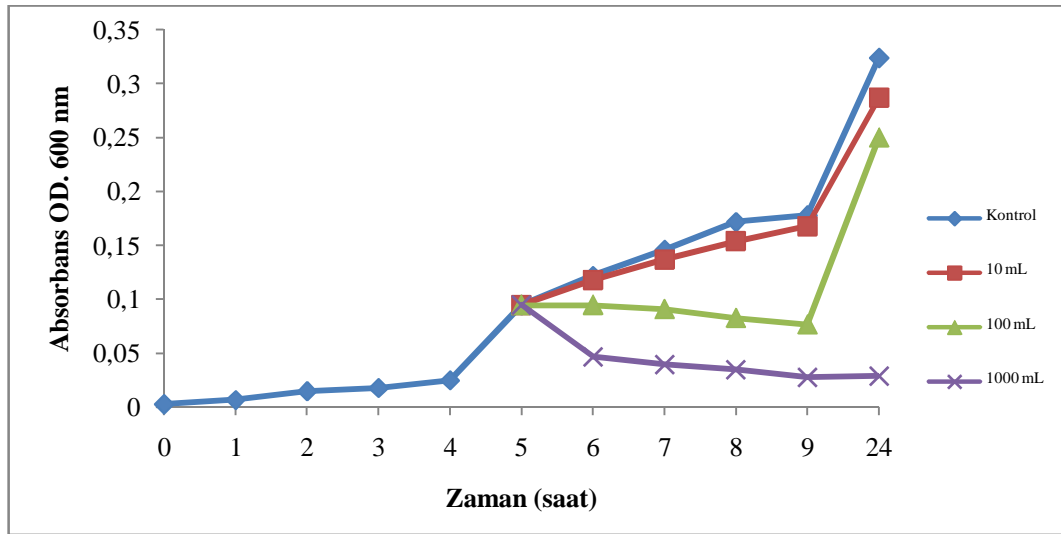
4.9. Bakteriyosinlerin Etki Tarzlarının Belirlenmesi

HBB-218 ve HBB-247 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin, bakteriyostatik/bakterisidal etki mekanizmalarından hangisine sahip olduğunu belirlemek amacıyla yapılan denemelerde, HBB-218 suşunun ürettiği bakteriyosinin düşük dozda (10 μ L), bakteriyostatik, yüksek dozlarda ise (100-1000 μ L) bakterisidal etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.34). 100 ve 1000 μ L bakteriyosin eklenen erlenlerdeki absorbans değerleri, bakteriyosinin eklenmesinden hemen sonra azalmakta ve sonrasında ortam tamamen berraklaşmaktadır. 24. saatin sonunda bile erlenlerdeki besiyortamları hala berraktır. Ayrıca 100 ve 1000 mL bakteriyosin eklenen erlenlerde, 6. saatten sonra yapılan sayımlarda canlı hücre kalmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.34 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin farklı konsantrasyonlarda etki tarzı

HBB-247 suşunun ürettiği bakteriyosinle yapılan denemede ise, 1000 µL bakteriyosin eklenen erlenlerde, kontrol grubuna göre, absorbandsa düşüş kaydedilmiştir. 10 ve 100 µL bakteriyosinin eklendiği gruplarda absorbands değişmemiş ve artmaya devam etmiştir. HBB-247 bakteriyosini 100 µL eklendiğinde, bakteriyostatik, 1000 µL eklendiğinde ise bakterisidal etki göstermektedir (Şekil 4.35). 1000 µL bakteriyosin eklenen erlenlerdeki bulanıklık, bakteriyosinin eklenmesinden hemen sonra azalmaktadır, ayrıca, 6. saatten itibaren yapılan sayımlarda canlı hücre saptanmamıştır. 24. saat sonunda ise, besiortamları hala berrak kalmaktadır.



Şekil 4.35 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin farklı konsantrasyonlarda etki tarzı

Gram pozitif bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin antibiyotik aktiviteleri, modifiye (Sınıf I bakteriyosinler, lantibiyotikler), ve modifiye olmamış bakteriyosinler (Sınıf II) için bakteriyel zarla etkileşime dayanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, bakteriyosinlerin membranda por oluşturmaları ya da diğer aktiviteleri için spesifik hedeflere ihtiyaç duyduklarını göstermektedir. Lantibiyotikler sınıfında yer alan nisin ve epidermin gibi bakteriyosinlerin, membrana bağlı, hücre duvarı öncüsü olan Lipid II'yi hedef molekül olarak tanıdıkları bildirilmiştir. Lantibiyotikler içerisinde yer alan duramisin ise fosfoetanolamine özgül olarak bağlanmakta ve sonuçta fosfolipaz A2 ve diğer çeşitli hücre fonksiyonları inhibe olmaktadır. Sınıf II bakteriyosinlerin çoğu, por

oluşturarak hedef hücrelerdeki membranın proton motive gücünü ayrıştırır. Ila alt sınıfındaki bakteriyosinlerin aktiviteleri, spesifik hedef olarak fosfotransferaz sistemin (PTS), mannoz permeazına bağlıdır. İki bileşenli Alt sınıf IIB bakteriyosinleri de, katyon veya anyon-spesifik porlar oluşturarak PMF'nin ayrışmasına neden olurlar, ancak spesifik hedefleri henüz tanımlanmamıştır. Son olarak IIC alt sınıfındaki bakteriyosinler ise çeşitli peptidlerdir ve membran geçirgenliği, septum oluşumunun ve feromon aktivitesinin engellenmesi şeklinde etki gösterirler (Hechard ve Sahl, 2002).

Gram pozitif bakterilerin membranlarında oldukça fazla miktarda anyonik lipid bulunmaktadır. Bakteriyosinler oldukça katyonik özellikte moleküller oldukları için, membrandaki anyonik lipidlere sıkıca bağlanırlar. Nisin, anyonik lipozomlara sıkıca bağlanmakta, ancak zwitter-iyonik lipozomlara bağlanmamaktadır (Driessen *et al*, 1995).

Literatürde bakteriyosinlerin etki tarzlarına ait bulgular oldukça çeşitlidir. *Bacillus thermoleovorans* LEH-1 bakterisinin ürettiği bakteriyosinin etki tarzı araştırıldığında, özellikle aktif olarak gelişen kültürlerde lizise neden olduğu bulunmuştur. İndikatör bakteriye ait hücreler logaritmik gelişme fazında buldukları zaman, diğer evrelere göre bakteriyosinden daha fazla etkilenmektedirler (Novotny ve Perry, 1992).

Staphylococcus aureus AB201 suşuna ait bakteriyosin kısmi olarak saflaştırılmış ve çeşitli konsantrasyonlarda, *S.aureus* AB 211 suşuna karşı denenmiştir. Doza bağlı olarak canlı hücre sayılarında düşüş kaydedilmiştir, ancak optik yoğunlukta değişiklik olmamıştır. Bu durum, bakteriyosinin etki tarzının bakterisidal olduğunu, ancak hücrelerde parçalanmaya neden olmadığını göstermektedir (Iqbal, *et al.*, 1999).

Lactobacillus plantarum ST8KF bakterisinin ürettiği bakteriyosin ise *Lactobacillus casei* LHS suşuna karşı denendiğinde bakteriyostatik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Dokuz saat sonunda kontrol kültürünün absorbans değeri 600 nm'de 4.0 iken, bakteriyosinle muamele edilen kültürde absorbans değeri 1.0 olarak

bulunmuştur ve gelişimin son 3 saatinde ancak 1.2'ye yükselmiştir. Bu durum hücrelerin işlemden sonra yenilenmediğini göstermektedir (Powell, *et al.*, 2007).

Plantaricin 423 ile yapılan diğer bir çalışmada, bakteriyosinle muamele edilen *Oenococcus oeni* 19Cl hücrelerinin, 24 saat sonunda sayılarında hafif bir azalma olduğu ($2.5 \times 10^6 - 1 \times 10^6$ kob/mL), bu sebeple peptidin zayıf bakterisidal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Aynı kültüre ait absorbans verileri ilk 6 saat azalırken, sonrasında sabit kalmıştır. İnkübasyonun geri kalan zamanında, absorbans verilerinin sabit olması, indikatör bakteriye ait hücrelerin parçalanmadığını göstermektedir (Van Reenen *et al.*, 1998).

Bacillus thuringiensis NEB17 bakterisinin ürettiği bakteriyosinin doza ve indikatör suşa göre farklı etki gösterdiği belirlenmiştir. İndikatör bakteri olarak *B. cereus* kullanıldığında, 100 µL bakteriyosin eklenmiş kültürde değişiklik gözlenmezken, 300 ve 600 µL bakteriyosin eklenen kültürlerde bakterisidal etki gözlenmiştir. 24 saat sonunda ise, bakteriyosinle muamele edilen kültürlerde canlı hücre sayısı artmamıştır. Bu bulgular, çalışmamızdaki sonuçlara benzer nitelik taşımaktadır. Aynı bakteriyosin, *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* Bt1627 bakterisine karşı denendiğinde, 100 µL ve 300 µL bakteriyosin eklenen kültürlerde, canlı hücre sayısı azalmaya başlamış, ancak 24 saat sonunda, sayının arttığı gözlenmiştir (Gray, *et al.*, 2004).

Çalışmamızda bakteriyosinler yüksek dozlarda kullanıldığında canlı hücreye rastlanmamıştır, ayrıca absorbans değerlerinde düşüş kaydedilmiştir. Dolayısıyla etkilerinin bakterisidal olduğunu ve hücrelerde lizise yol açtıklarını söylemek mümkündür. Düşük dozlarda ise bakteriyostatik etki göstermektedirler, çünkü canlı hücre sayımında değişiklik kaydedilmemiştir ve absorbans verileri 24. saat sonunda kontrol grubuna yakın bulunmuştur.

4.10. Bakteriyosinlerin Saflaştırılması

Çalışmamızda, bakteriyosinler saflaştırılırken öncelikle, ham kültür süpernatantları (CFS) na amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış ve diyaliz işlemine geçilmiştir. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosine sonraki adımlarda sırasıyla jel kromatografisi ve anyon değiştirici kromatografi uygulanmıştır.

HBB-247 suşunun ürettiği bakteriyosinin saflaştırma aşamasında, kültür sıvılarında, önceki denemelerimizde olduğu gibi yüksek aktivite saptanamamıştır. BHI broth veya soya peptonlu modifiye ortam kullanılarak yapılan üretim çalışmalarında aktivite artırılamamıştır. HBB-247 suşunun ürettiği bakteriyosin saflaştırılırken anyon değiştirici kromatografi uygulanmıştır. Kolondan çıkan aktif fraksiyonlar toplandığında, aktivite tayini yapılmış ve aktivitenin jel kromatografisine uygulanamayacak kadar düşük olduğu gözlenmiştir. Bakteriyosin saflaştırılırken sadece amonyum sülfat çöktürmesi ve anyon değiştirici kromatografi uygulanmıştır ve kısmi saflaştırma yapılmıştır.

Tüm saflaştırma adımlarında, örneklerdeki protein miktarları Bradford metoduyla ölçülmüş ve aktivite tayinleri yapılmıştır. Total aktivite, total protein, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayıları hesaplanarak saflaştırma tabloları elde edilmiştir.

4.10.1. İzolatların geliştirilmesi ve kültür sıvılarının toplanması

Bakteriyosinlerin saflaştırılması için, izolatlar optimum büyüme koşullarında geliştirilmişlerdir. HBB-218, %3 soya pepton ve %0,1 galaktoz içeren toplam 500 mL ortamda (60 °C, pH 6.0), 72 saat, HBB-247 ise % 3 soya pepton ve %1 fruktoz içeren toplam 500 mL ortamda (60 °C, pH 6,5) 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, sıvı kültürler, 8 000 x g'de 10 dakika (+4 °C), santrifüjlendi ve süpernatantlar toplandı.

HBB-218'in ürettiği bakteriyosin, 121 °C'de 20 dakika otoklavlandıktan sonra, aktivitesinde hiç kayıp olmamaktadır. İzolat, besiyerinde geliştirildikten sonra,

hücreler kültür ortamından santrifüjle ayrılmış ve süpernatant 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Bu sayede, ortamda bulunan proteinlerin bir kısmının elimine edilebileceği düşünülmüştür. Otoklavlanan kültür sıvısı 8 000 x g'de 10 dakika (4 °C) tekrar santrifüjlenmiştir. Böylece denatüre proteinler uzaklaştırılmıştır.

HBB-247 kodlu bakterinin ürettiği bakteriyosin ise yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmektedir. Dolayısıyla HBB-247'nin bakteriyosini saflaştırılırken, böyle bir ön işlem uygulanmamıştır.

4.10.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Kültür sıvılarındaki proteinleri çöktürmek için öncelikle farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat ile denemeler yapılmıştır. %40, %60, %80 oranında doymuş amonyum sülfat çöktürmesinden sonra oluşan pelletlerde ve % 80 amonyum sülfat çöktürmesi sonucu toplanan üst fazlarda, protein ve aktivite tayini yapılmıştır (Çizelge 4.30-4.31). Bu sonuçlara göre, HBB-218 suşu için % 80 doymuşlukta amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır.

400 mL otoklavlanmış ve santrifüjlenmiş kültür sıvısına %80'lik amonyum sülfat azar azar eklenerek, 30 dakika boyunca +4 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra, örnek, 10 000 x g'de 30 dakika +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Oluşan pelletler, 20 mM sodyum fosfat tamponunda çözüldü ve 24 saat boyunca, +4 °C'de, 1000 Da'lık diyaliz membranında, aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir. Ertesi gün diyalizat hacmi ölçülerek ve 5000 Da'lık ultrafiltrasyon membranında konsantre edilmiştir.

Çizelge 4.30. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında protein ve aktivite değerleri

Amonyum sülfat yüzdesi	Bakteriyosin aktivitesi (AU/mL)	Protein (mg/ml)	Spesifik aktivite
%40 pellet	1600	0,791	2022
%60 pellet	12 800	1,318	9711
%80 pellet	12 800	0,830	15421
%80 (süpern.)	100	0,641	312

Çizelge 4.31 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında protein ve aktivite değerleri

Amonyum sülfat yüzdesi	Bakteriyosin aktivitesi (AU/mL)	Protein (mg/ml)	Spesifik aktivite
%40 (pellet yok)	-	-	-
%60 (pellet yok)	-	-	-
%80 pellet	25 600	0,950	26947
%80 (süpern.)	100 (<200)	0,009	11111

4.10.3. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin jel filtrasyon

kromatografisi sonuçları

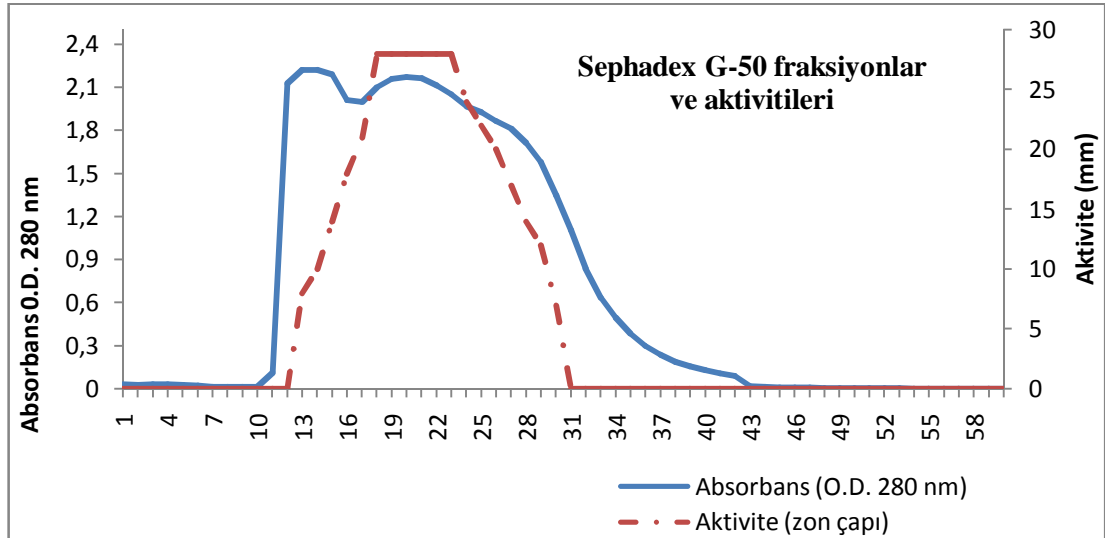
HBB-218 suşu için, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden sonra konsantre edilen örnek (2 mL), Sephadex G-50 kolonuna uygulanmıştır. Kolon akış hızı 21 mL/saat olacak şekilde ayarlanarak, 20 mM (pH 7.0) sodyum fosfat tamponuyla yıkanmış ve çıkan fraksiyonlar 2,5 mL hacimde toplanmıştır. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin jel kromatografisi elüsyon profilleri çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.32, Şekil 4.36).

HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin jel kromatografisi sonucu elde edilen ve aktivite gözlenen fraksiyonlar, 4 ayrı kısımda toplanmıştır. Birleştirilen fraksiyonlarda tekrar aktivite tayini ve protein ölçümü yapılmıştır (Çizelge 4.33).

Çizelge 4.32 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin jel kromatografisi elüsyon profili

Fraksiyon no	Absorbans (O.D. 280 nm)	Aktivite (zon çapı)
1	0,033	0
2	0,031	0
3	0,034	0
4	0,033	0
5	0,027	0
6	0,024	0
7	0,017	0
8	0,016	0
9	0,016	0
10	0,015	0
11	0,114	0
12	2,128	0
13	2,223	8
14	2,223	10
15	2,189	14
16	2,011	18
17	2	21
18	2,101	28
19	2,157	28
20	2,173	28
21	2,165	28
22	2,114	28
23	2,051	28
24	1,969	24
25	1,927	22
26	1,864	20
27	1,81	17
28	1,713	14
29	1,579	12
30	1,349	7
31	1,106	0
32	0,838	0
33	0,635	0
34	0,497	0
35	0,386	0
36	0,3	0
37	0,239	0
38	0,191	0
39	0,157	0
40	0,13	0
41	0,11	0
42	0,092	0
43	0,019	0
44	0,016	0

45	0,013	0
46	0,011	0
47	0,01	0
48	0,008	0
49	0,008	0
50	0,007	0
51	0,007	0
52	0,006	0
53	0,005	0
54	0,004	0
55	0,003	0
56	0,003	0
57	0,003	0
58	0,002	0
59	0,002	0
60	0,002	0

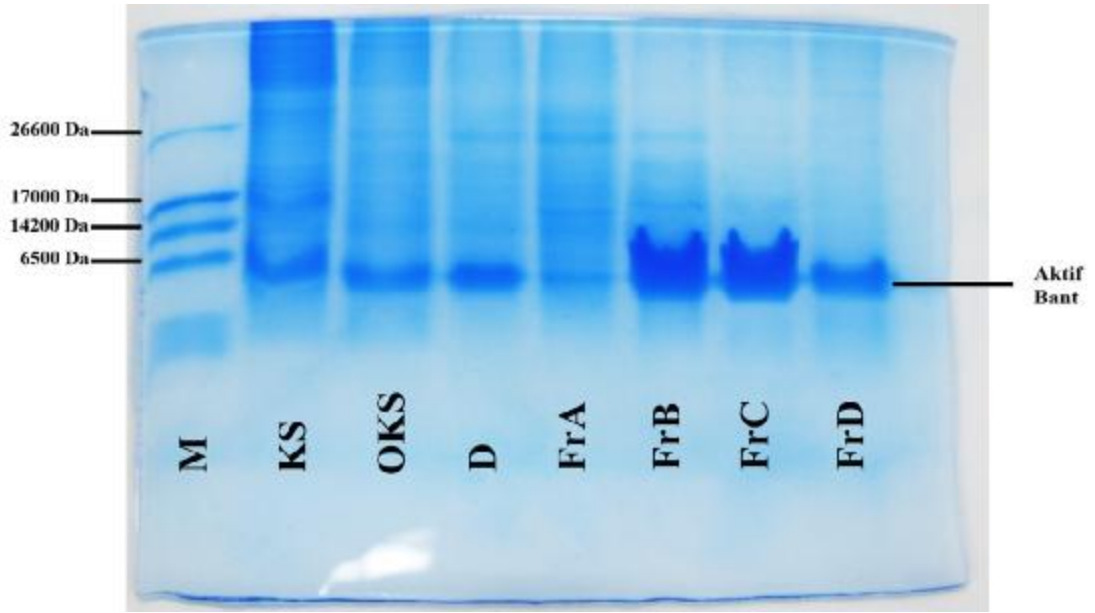


Şekil 4.36 Sephadex G-50 kolonunda elde edilen fraksiyonların protein ölçümleri ve aktiviteleri

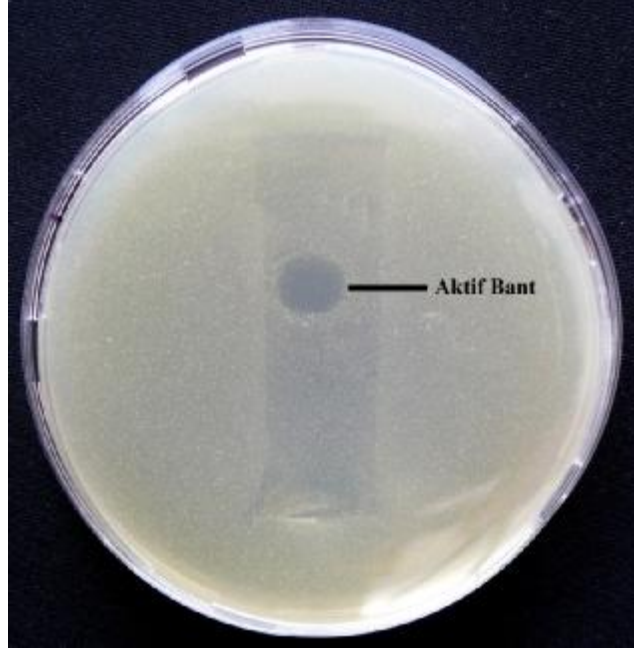
Çizelge 4.33. Jel kromatografisi sonucu toplanan fraksiyonların protein ve aktivite değerleri

Kısım	Fraksiyonlar	Aktivite	Protein (mg/mL)
A	13-17	1600	0,670
B	18-22	6400	0,240
C	23-26	1600	0,080
D	27-30	100 (<200)	0,015

Jel kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlar elektroforezle görüntülenmiş ve sonuçta sonraki saflaştırma adımı olan anyon değiştirici kromatografi için B fraksiyonu seçilmiştir (şekil 4.37). Aynı zamanda HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin moleköl ağırlığını belirlemek amacıyla aktif bant besiyeri üzerinde belirlenmiştir (şekil 4.38). Fraksiyon B, konsantre edildikten sonra anyon değiştirici kolona uygulanmıştır.



şekil 4.37 HBB-218 bakteriyosinin jel kromatografisi sonuçlarının elektroforezi (M: Marker, KS: Kùltür sıvısı, OKS: otoklavlanmış kùltür sıvısı, D: Diyalizat, FrA: Fraksiyon A, FrB: Fraksiyon B, FrC: Fraksiyon C, FrD: Fraksiyon D)



Şekil 4.38 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosine ait aktif bantın jel üzerinde görüntülenmesi

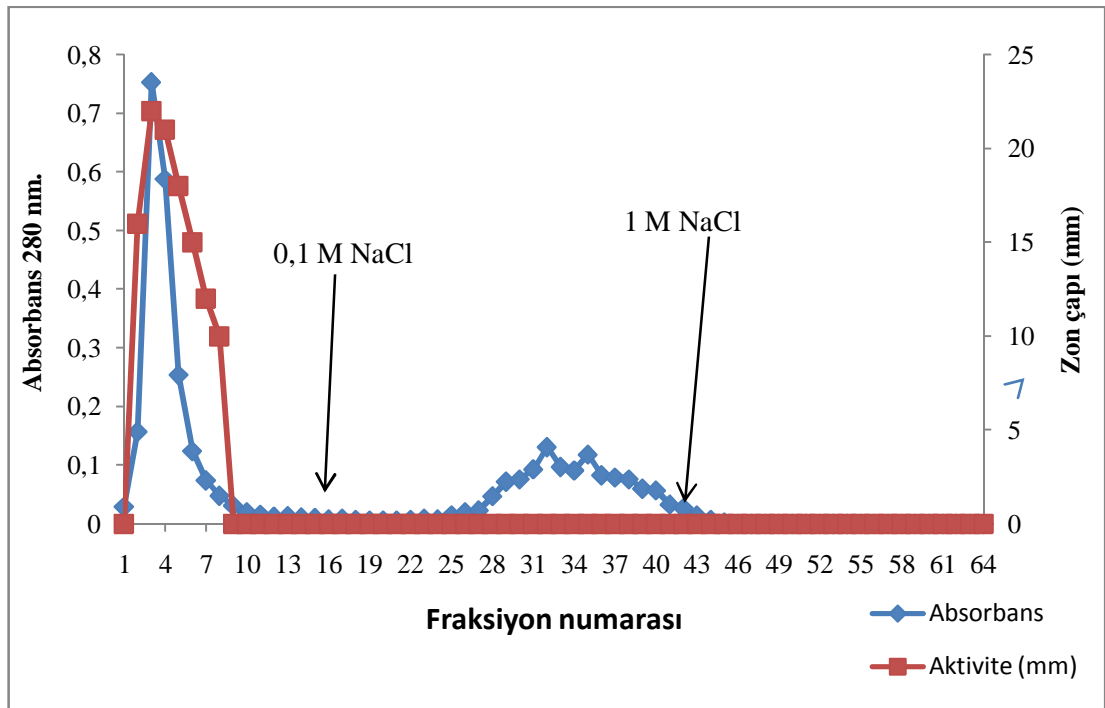
4.10.4. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromotografi sonuçları

Jel kromotografisinden çıkan B fraksiyonu konsantre edildikten sonra, anyon değiştirici kolona uygulanmıştır. Konsantre örneğin protein miktarı 1,82 mg/mL, aktivitesi ise 51200 AU/mL olarak hesaplanmıştır. Bu örnekten kolona 600 µL yüklenmiş ve kolon akış hızı 38 mL/saat olacak şekilde ayarlanarak fraksiyonlar 1.6 mL hacimde toplanmıştır. Kolon yaklaşık yaklaşık 20 mL fosfat tamponuyla yıkandıktan sonra, tuz gradiyenti uygulanmaya başlamıştır. 0,1 M NaCl içeren fosfat tamponuyla yıkama başlatılmış ve NaCl konsantrasyonu 1 M olana kadar kademeli olarak yıkamaya devam edilmiştir (Şekil 4.39). Kolondan çıkan fraksiyonlarda protein ve aktivite tayini yapılarak, aktif çıkan fraksiyonlar elektroforezle görüntülenmiştir. Aktivite çıkan toplam 8 fraksiyon öncelikle elektorforezle ayrı ayrı görüntülenmiştir (Şekil 4.40). Daha sonra tek bant olarak görüntülenen 2, 3, 4 ve 5. fraksiyonlar Fraksiyon 1; 6,7 ve 8. fraksiyonlar ise Fraksiyon 2 olarak toplanmıştır ve tekrar protein ve aktivite tayini yapılmıştır. Fraksiyon 1'in aktivitesi 3200 AU/mL, protein miktarı ise 0,029 mg/mL olarak ölçölmüştür. Fraksiyon 2'nin ise aktivitesi 400 AU/mL; protein miktarı ise 0,011 olarak tayin edilmiştir.

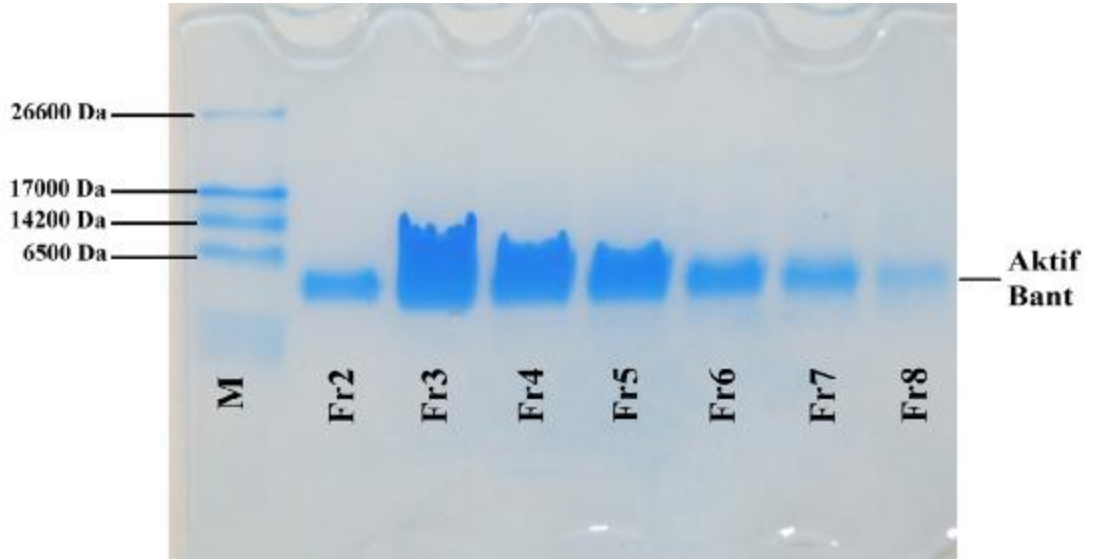
Çizelge 4.34. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromotografi elüsyon profili

Fraksiyon no	Absorbans (O.D. 280 nm)	Zon çapı (mm)
1	0,029	0
2	0,157	16
3	0,753	22
4	0,588	21
5	0,254	18
6	0,124	15
7	0,074	12
8	0,048	10
9	0,031	0
10	0,020	0
11	0,016	0
12	0,012	0
13	0,013	0
14	0,011	0
15	0,010	0
16	0,008	0
17	0,009	0
18	0,007	0
19	0,006	0
20	0,006	0
21	0,006	0
22	0,007	0
23	0,009	0
24	0,008	0
25	0,015	0
26	0,020	0
27	0,023	0
28	0,047	0
29	0,072	0
30	0,076	0
31	0,093	0
32	0,131	0
33	0,097	0
34	0,091	0
35	0,118	0
36	0,083	0
37	0,079	0
38	0,076	0
39	0,060	0
40	0,057	0
41	0,033	0
42	0,027	0
43	0,014	0

Fraksiyon no	Absorbans (O.D. 280 nm)	Zon çapı (mm)
44	0,007	0
45	0,003	0
46	0	0
47	0	0
48	0	0
49	0	0
50	0	0
51	0	0
52	0	0
53	0	0
54	0	0
55	0	0
56	0	0
57	0	0
58	0	0
59	0	0
60	0	0
61	0	0
62	0	0
63	0	0
64	0	0



Şekil 4.39 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromotografi grafiği



Şekil 4.40 HBB-218-Anyon değiştirici kromotografi sonucu aktif çıkan fraksiyonların elektroforezle görüntülenmesi (M: Marker, Fr: Fraksiyonlar)

4.10.5. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosininin saflaştırma tablosu

Anyon değiştirici kromotografi sonucu aktivite gözlenen 8 fraksiyon elektroforezle görüntülenmiştir. 2, 3, 4 ve 5. fraksiyonlarda tek bant görüldüğü ve bu fraksiyonların aktiviteleri yüksek olduğu için fraksiyonlar birleştirilmiştir (Fraksiyon 1). Fraksiyon 1 den tekrar protein tayini (Bradford) ve aktivite tayini yapılarak değerler saflaştırma tablosuna yerleştirilmiştir (izelge 4.34). Sonuç olarak HBB-218 bakteriyosini 1,33 verimle 16 kat saflaştırılmıştır.

Çizelge 4.35. HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin saflaştırma tablosu

Fraksiyon	Hacim (mL)	Aktivite (AU/mL)	Protein (mg/mL)	T. Aktivite	T. protein	Spesifik aktivite	Saflaştırma katsayısı	Verim
CFS	450	1600	0,234	720000	105,3	6 838	1	100
Otokl.CFS	400	1600	0,154	640000	61,6	10 390	1,52	89
Diyalizat	21	25 600	2,03	537600	42,63	12 611	1,84	75
Konsantre diyalizat	3	102 400	11,35	307200	34,05	9 022	1,32	43
Fraksiyon B (jel kro.)	12,5	6400	0,240	80000	3,00	26667	3,90	11,1
Fraksiyon 1 (anyon değ. kro.)	3	3200	0,029	9600	0,087	110345	16	1,33

4.10.6. HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromotografi sonuçları

HBB-247 suşunun ürettiği bakteriyosin, %80 amonyum sülfatla çöktürülmüş ve diyaliz edilmiştir. Daha sonra diyalizat konsantre edilerek anyon değiştirici kolona (DEAE-Sepharose) bu örnekten 700 µL yüklenmiştir. Kolona yüklenen konsantre örneğin protein miktarı 5,750 mg/mL, aktivitesi ise 25 600 AU/mL olarak ölçlmştir. Kolon akış hızı 41 mL/saat olacak şekilde ayarlandıktan sonra, fraksiyonlar 2 mL hacimde toplanmıştır. 280 nm'de protein ölçümleri yapılmış ve absorbans değerleri tamamen düşen kadar (yaklaşık 142 mL) fosfat tamponuyla yıkama yapılmıştır. Protein çıkışının kesildiği noktada tuz gradiyenti uygulanmaya başlanmıştır (izelge 4.36).

Fraksiyonlardan aktivite tayini yapılarak aktif çıkan fraksiyonlar iki kısıma toplanmıştır. NaCl gradiyenti uygulanmadan, kolondan ilk etapta çıkan örnekler (2-57. fraksiyon) Fraksiyon 1 olarak toplanmıştır. Fraksiyon 2 ise, 0.1, 0.2 ,0.3 ve 0.4 M NaCl gradiyenti uygulandığında çıkan örneklerden (75-86. fraksiyon) oluşmaktadır. Protein çıkan diğer fraksiyonlarda aktiviteye rastlanmamıştır (şekil 4.41)

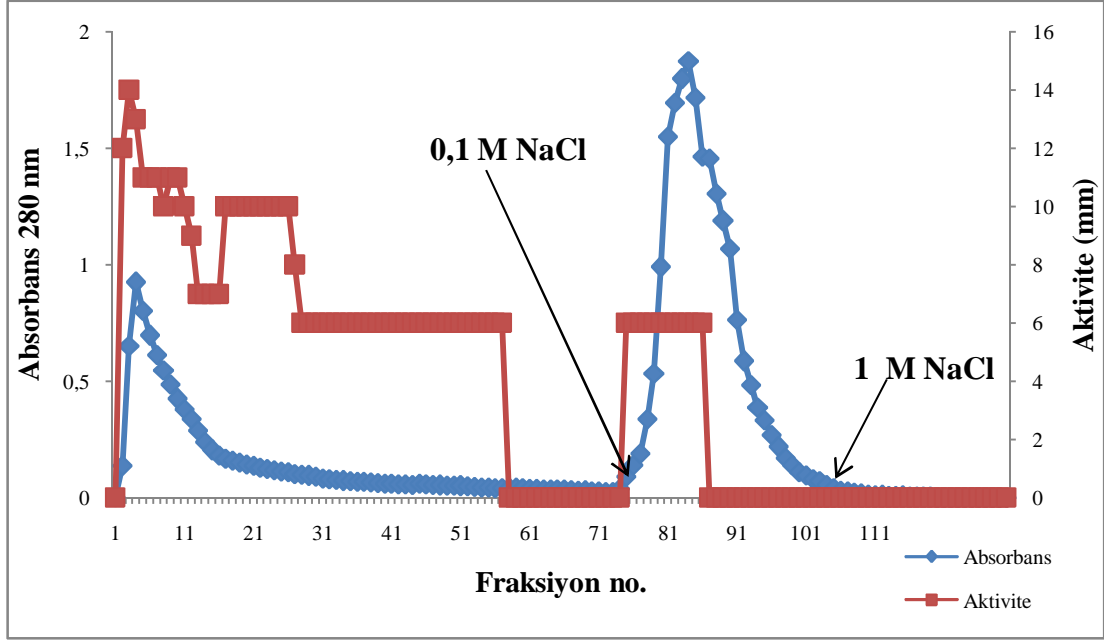
Anyon değiştirici kromotografi sonucu elde edilen Fraksiyon 1 ve Fraksiyon 2, ayrıca diyalizat proteinleri elektoroforezle görüntülenmiş ve bakteriyosin aktivitesi jel üzerinde belirlenmiştir (şekil 4.42-4.44).

Çizelge 4.36. HBB-247 bakteriyosinin anyon değiştirici kromotografi elüsyon profili

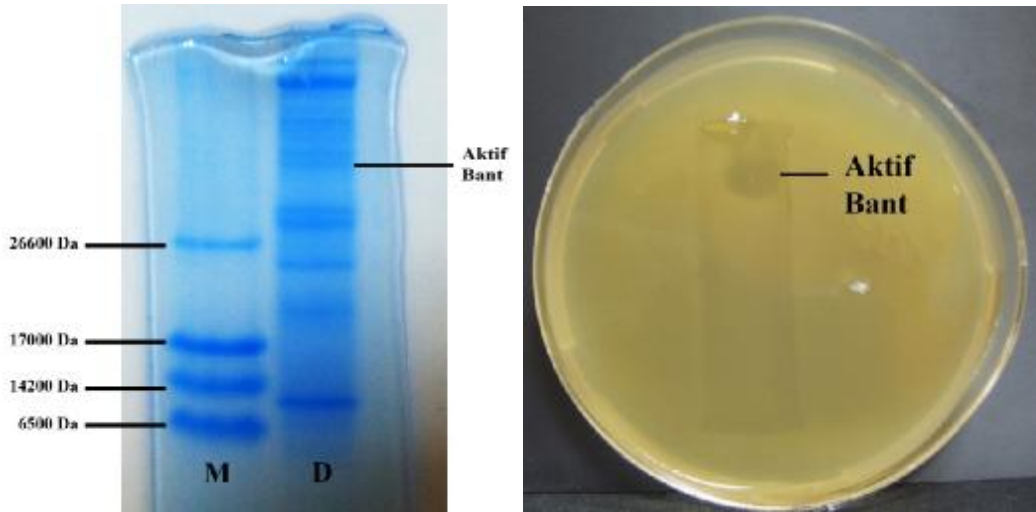
Fraksiyon no	Absorbans (O.D. 280 nm)	Zon çapı (mm)
1	0,004	0
2	0,138	12
3	0,651	14
4	0,925	13
5	0,802	11
6	0,697	11
7	0,614	11
8	0,548	10
9	0,486	11
10	0,425	11
11	0,380	10
12	0,338	9
13	0,288	7
14	0,239	7
15	0,205	7
16	0,181	7
17	0,167	10
18	0,159	10
19	0,151	10
20	0,144	10
21	0,137	10
22	0,130	10
23	0,123	10
24	0,118	10
25	0,113	10
26	0,110	10
27	0,103	8
28	0,099	6
29	0,095	6
30	0,090	6
31	0,083	6
32	0,080	6
33	0,077	6
34	0,073	6
35	0,072	6
36	0,070	6
37	0,069	6
38	0,066	6
39	0,064	6
40	0,061	6
41	0,060	6
42	0,058	6
43	0,059	6
44	0,055	6

Fraksiyon no	Absorbans (O.D. 280 nm)	Zon çapı (mm)
45	0,059	6
46	0,059	6
47	0,055	6
48	0,054	6
49	0,053	6
50	0,052	6
51	0,051	6
52	0,050	6
53	0,048	6
54	0,045	6
55	0,044	6
56	0,042	6
57	0,042	6
58	0,040	0
59	0,040	0
60	0,041	0
61	0,039	0
62	0,038	0
63	0,036	0
64	0,036	0
65	0,036	0
66	0,036	0
67	0,033	0
68	0,031	0
69	0,029	0
70	0,028	0
71	0,027	0
72	0,026	0
73	0,026	0
74	0,038	0
75	0,091	6
76	0,141	6
77	0,191	6
78	0,339	6
79	0,533	6
80	0,991	6
81	1,551	6
82	1,696	6
83	1,799	6
84	1,875	6
85	1,718	6
86	1,464	6
87	1,456	0
88	1,306	0
89	1,189	0

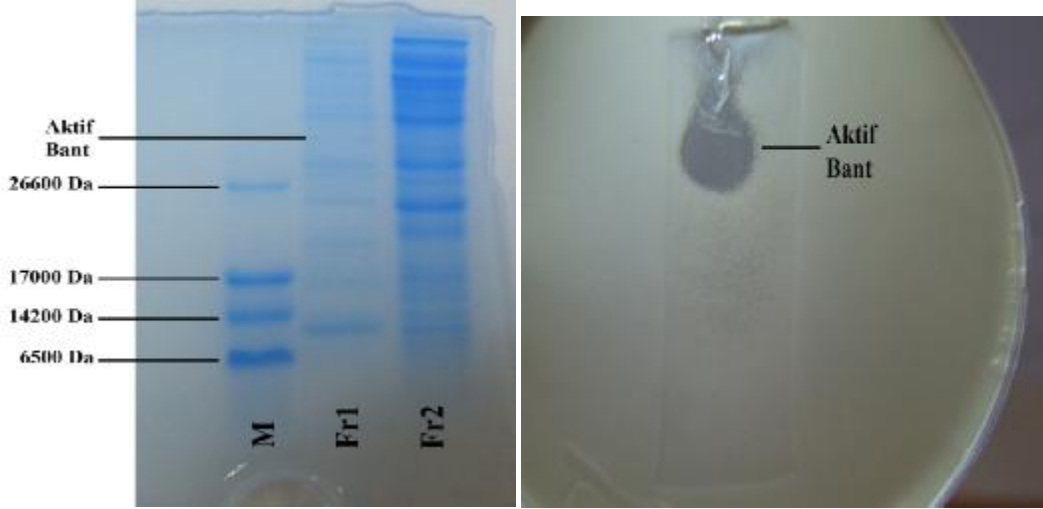
Fraksiyon no	Absorbans (O.D. 280 nm)	Zon çapı (mm)
90	1,069	0
91	0,765	0
92	0,587	0
93	0,485	0
94	0,387	0
95	0,332	0
96	0,270	0
97	0,219	0
98	0,171	0
99	0,140	0
100	0,111	0
101	0,097	0
102	0,080	0
103	0,071	0
104	0,056	0
105	0,041	0
106	0,031	0
107	0,028	0
108	0,023	0
109	0,019	0
110	0,015	0
111	0,012	0
112	0,010	0
113	0,009	0
114	0,008	0
115	0,007	0
116	0,006	0
117	0,006	0
118	0,006	0
119	0,006	0
120	0,00	0



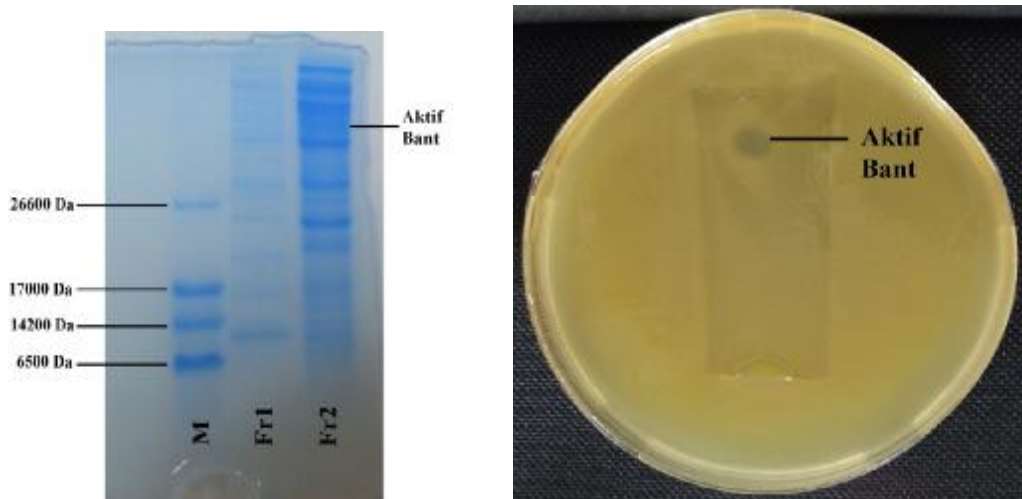
Şekil 4.41 HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kromotografi grafiği



Şekil 4.42 HBB-247 izolatından elde edilen diyalizatın protein elektroforezi ve aktif bantın görüntülenmesi



Şekil 4.43 HBB-247 izolatından elde edilen Fraksiyon 1'in protein elektroforezi ve Fraksiyon 1'e ait aktif bantın görüntülenmesi



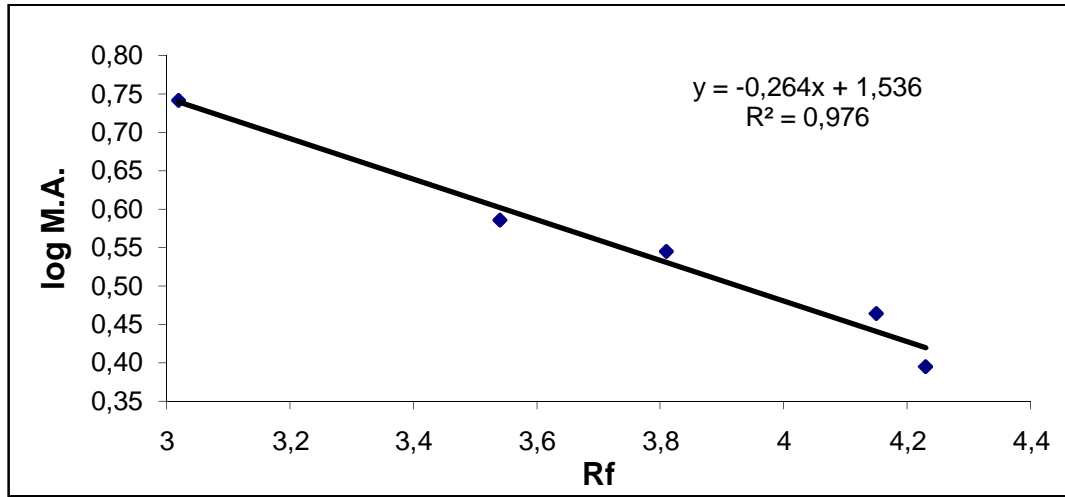
Şekil 4.44 HBB-247 izolatından elde edilen Fraksiyon 2'nin protein elektroforezi ve aktif bantın görüntülenmesi

4.10.7. Bakteriyosinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi

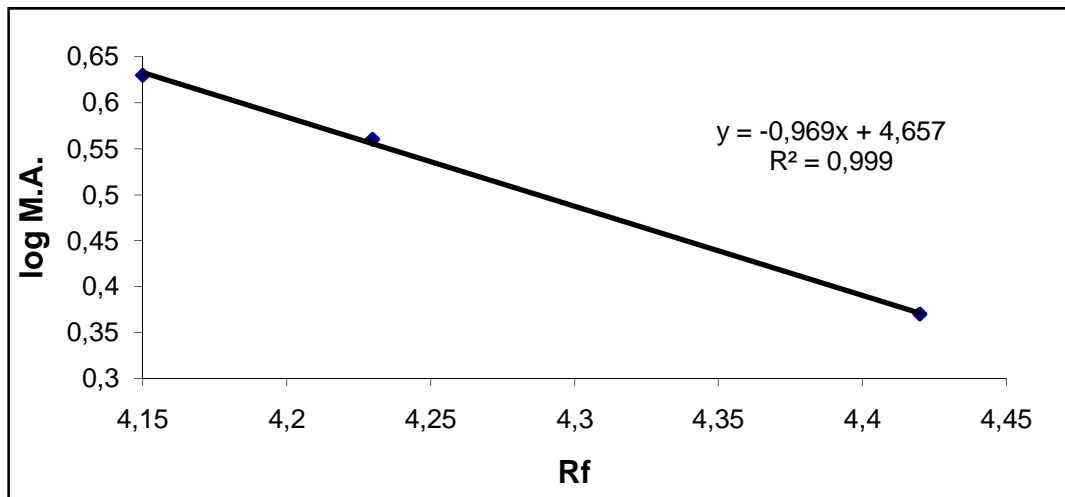
Bakteriyosinlerin molekül ağırlığını belirleyebilmek için, protein markerlarına göre oluşturulan standart grafikten yararlanılmıştır. Bakteriyosinlerin molekül ağırlığı hesaplanırken, ultra düşük molekül ağırlıklı standart, Sigma M-3456 (1.060-26.600 Da) kullanılmıştır.

Standart grafikten yararlanılarak yapılan hesaplamada, HBB-218 suşuna ait bakteriyosinin molekül ağırlığı 5455 Da olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.45). HBB-247

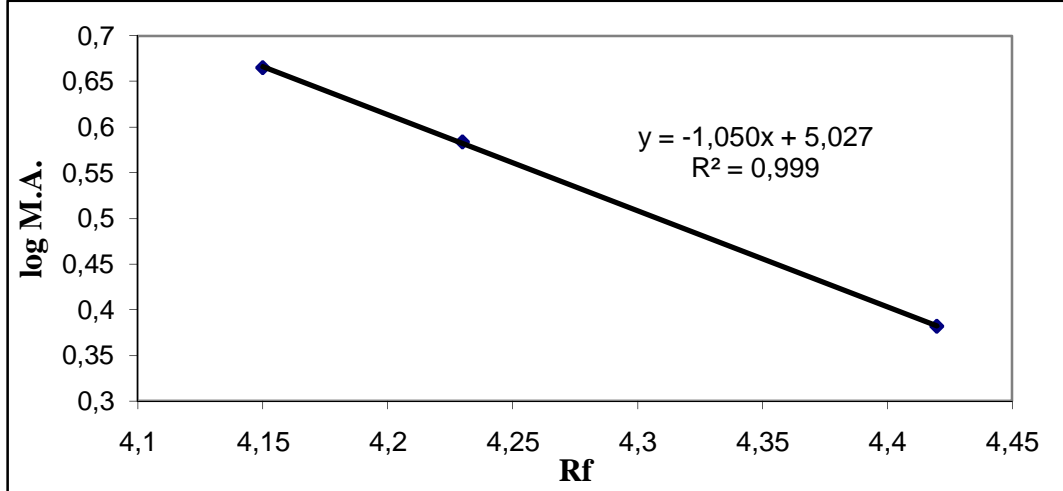
suşuna ait bakteriyosinin molekül ağırlığı hesaplanırken, diyalizat için ayrı, (Şekil 4.46) Fraksiyon 1 ve Fraksiyon 2 için ise ayrı bir molekül ağırlık standart grafiği (Şekil 4.47) oluşturulmuştur. Diyalizatın molekül ağırlığı 37.844, Fraksiyon 1'in molekül ağırlığı 33.113 Da, Fraksiyon 2'nin molekül ağırlığı ise 41.686 Da olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.45 HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosinin molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan standart grafik



Şekil 4.46 HBB-247/diyalizatın molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan standart grafik



Şekil 4.47 HBB-247/ Fraksiyon 1 ve Fraksiyon 2'nin molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan standart grafik

Bakteriyosinlerin, biyokimyasal yapılarının aydınlatılması ve karakterize edilmeleri homojen olarak saflaştırılmalarına ve yeterli miktarda elde edilmelerine bağlıdır (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). Laktobasillerin ürettikleri bakteriyosinlerin saflaştırılması ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu türlerin kaynağı genelde, süt ürünleri ve bitkisel materyallerin fermentasyonu sonucu oluşan ürünler yada hayvan veya insan orjinlidirler. Sınıf 4 grubuna dahil olan kompleks bakteriyosinler, örneğin, laktosin 27, plantasin B ve plantarisin S genelde laktobasillerden izole edilmektedir. Laktobasillerden bakteriyosinlerin saflaştırılması ile ilgili prosedürler oldukça çeşitlidir. Amonyum sülfat çöktürmesi, iyon-değiştirici kromatografi, hidrofobik etkileşim ve RP-HPLC kurvasın A, sakasin P, laktosin S ve bavarisin A'nın saflaştırılmasında kullanılmıştır (Tichaczek *et al.*, 1992; Mordvedt *et al.*, 1991; Larsen *et al.*, 1993). Amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi helvetisin J ve laktasin F'nin saflaştırılmasında kullanılan yöntemlerdir (Joerger ve Klaenhammer, 1986; Muriana ve Klaenhammer, 1991). İyon değiştirici kromatografi, ultrafiltrasyon ve jel kromatografisi laktasin B'nin saflaştırılmasında kullanılmıştır (Barefoot ve Klaenhammer, 1984).

Bakteriyosinlerin kompleks besin ortamlarından saflaştırılmalarında, onların katyonik ve hidrofobik özellikleri esas alınır. Nisin A'nın saflaştırılmasında izoelektrik odaklama (Venema *et al.*, 1997) ve immunoafinite kromatografisi (Suarez *et al.*, 1997) kullanılarak tek adımda saflaştırma yapılmıştır. Bu tür

yöntemler verim ve saflaştırma açısından çok iyi sonuçlar verse de bakteriyosinlerin geniş ölçekte geri kazanılması ve saflaştırılması için uygun değildir.

Bakteriyosinlerin geniş ölçekte saflaştırılmaları için adsorbsiyon/desorbsiyon temel alınarak pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu metotlar bakteriyosinler öncelikle pH 6.0-6.5'da üretici hücreye adsorbe olur ve daha sonra pH 2.0'de 0,1 M NaCl varlığında bakteriyosinin üretici hücrelerden ayrılması sağlanır. Bu metot pediosin AcH, nisin, sakasin A ve leukonosin Lcm1 (Yang *et al.*, 1992) için etkilidir, fakat geri kazanım diğer suş veya bakteriyosinler için sınırlı olabilir. Farklı bakteri türlerinden elde edilen bakteriyosinlerin saflaştırma prosedürlerine ilişkin örnekler Çizelge 4.36 'da verilmiştir.

Çalışmamızda saflaştırma prosedüründe, öncelikle amonyum sülfat çöktürmesi (%80), diyaliz, ultrafiltrasyon, jel kromatografisi ve anyon değiştirici kromatografi uygulanmıştır. HBB-218 suşunun ürettiği bakteriyosinin molekül ağırlığı yaklaşık 5.5 kDa olarak hesaplanmıştır. Ultrafiltrasyon işlemleri sırasında 5000 Da'lık membran kullanıldığında filtrat (alta geçen sıvı) da aktivite saptanmamıştır. Ayrıca jel kromatografisinde çalıştığımız bakteriyosinin, molekül ağırlığı küçük olduğu için son fraksiyonlarda çıkması beklenmiştir. Oysa, jel kromatografisinde, aktif fraksiyonlar, diğer proteinlere göre nispeten önce çıkmaktadır. Araştırmacılar, bu durumu bazı bakteriyosinlerin multimerik yapıda olmalarıyla açıklamışlardır.

Cladera-Olivera *et al.*, 2004 yaptıkları çalışmada, *Bacillus licheniformis*'ten izole ettikleri bakteriyosini Sephadex G-100 kolonuna uygulamışlar ve bakteriyosinin molekül ağırlığının 150 kDa'dan fazla olduğunu ve ilk fraksiyonlarda çıktığını bildirmişlerdir. Ancak, örnek aynı kolona , 0.15 M NaCl varlığında uygulandığında molekül ağırlığı yaklaşık 20 kDa olarak hesaplanmıştır ve kolondan daha geç çıkmaktadır. Araştırmacılar, bu durumu bakteriyosin benzeri bileşiğin kültür ortamına büyük agregatlar halinde salınmasıyla açıklamışlardır. Bakteriyosin moleküllerinin büyük kümeler halinde birikmesinin, yapılarının oldukça hidrofobik olmasıyla ilgili olabileceğini belirtmişlerdir.

Bonade *et al.*, 2001, *Lactobacillus helveticus*'un ürettiği bakteriyosinin saflaştırılmasında jel kromatografisi kullanmışlardır. Jel kromatografisine göre, bakteriyosinin molekül ağırlığını 60 kDa; SDS-PAGE sonucunda ise (elektroforetik olarak) 12.5 kDa olarak hesaplamışlardır. Molekül ağırlığındaki bu farklılığın, bakteriyosinin kümeler halinde bulunmasının bir sonucu olduğunu ve elektroforezde SDS varlığında bu kümelerin dağıldığını belirtmişlerdir. Benzer sonuçlar *Brevibacterium linens* bakterisinin ürettiği linocin (Valdes-Stauber ve Scherer, 1994) ve *Bacillus cereus*'un ürettiği cerein 7 (Oscariz ve Pisabarro, 2000) için de bildirilmiştir.

Çizelge 4.37. Farklı bakteriyosinlerin saflaştırma prosedürleri ve molekül ağırlıkları

Üretici organizma/Bakteriyosin	Saflaştırma prosedürü	Saflaştırma katsayısı/ Verim (%)	M.A (kDa)	Referans
<i>L.acidophilus/ Laktasin F</i>	AS çöktürme, jel filtrasyon, HPLC	474 / 0.04	2.5	Muriana ve Klaenhammer, 1991
<i>S. thermophilus ACA-DC0001/ Termofilin ST-1</i>	AS çöktürme, anyon değiştirici kr., jel filt.	500 / 0.1	30	Aktypis ve Kalantzopoulos, 2003
<i>Bacillus sp.</i>	AS çöktürme, jel filt., iyon değiştirici kr.	263 / 3.75	5	Motta, <i>et al.</i> , 2007
<i>L. acidophilus DSM 20079/ Asidosin D20079</i>	AS çöktürme, katyon değiştirici kr., hidrofobik etkileşim	- / 16	6.6	Deraz <i>et al.</i> , 2005
<i>E. faecium / enterosin M</i>	AS çöktürme, katyon değiştirici kr., FPLC	- / 9	4.6	Marekova <i>et al.</i> , 2007
<i>L. curvatus L442 / kurvatisin L442</i>	AS çöktürme, katyon değiştirici kr., HPLC, jel filt.,	45 /	4.5	Xiraphi, <i>et al.</i> , 2005
<i>P. damnosus NCFB 1832 / pediosin PD-1</i>	AS çöktürme, liyofilizasyon, metanol-kloroform ekstraksiyonu, katyon değiştirici kr.	1700 / 34	2.5	Bauer <i>et al.</i> , 2005
<i>L. mesenteroides E131</i>	AS çöktürme / katyon değiştirici kr., RP-HPLC	9.3 /	2.5-3.5	Xiraphi <i>et al.</i> , 2008
<i>L. acidophilus TK920 / Asidosin A</i>	AS çöktürme, katyon değiştirici kr., RP-HPLC	3000 / 10	6.5	Kanatani <i>et al.</i> , 1995
<i>L. plantarum / plantarisin C</i>	AS çöktürme, hidrofobik etkileşim, katyon değiştirici kr.	3630 / 48	3.5	Gonzalez <i>et al.</i> , 1994
<i>L. gasseri KT7</i>	AS çöktürmesi, katyon değiştirici kr., hidrofobik etkileşim, RP-HPLC	295 / 0.7	4.5-5.0	Zhu, <i>et al.</i> , 2000
<i>P.acidilactici SJ-1 / pediosin SJ-1</i>	Katyon değiştirici kr.	262 / 48	4.0	Schved, <i>et al.</i> , 1993
<i>L. sake / bavarisin</i>	AS çöktürme, anyon değiştirici kr., katyon değiştirici kr.	135 / 10.7	4.7	Kaiser ve Montville, 1996
<i>Pr.nigrescens / nigresin</i>	AS çöktürme, anyon değiştirici kr., jel filt.,	-	41	Kaewsrichan, <i>et al.</i> , 2004
<i>B. cereus / cerein 8A</i>	AS çöktürme, butanol ekstraksiyonu, anyon değiştirici kr.	-	26	Bizani, <i>et al.</i> , 2005

HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosin anyon değiştirici kolona uygulandığında, kolondan ilk etapta ve tuz gradiyenti uygulanmadan önce çıkmaktadır. Anyon değiştirici kromotografide, anyonik moleküller kolona bağlanırken, katyonik moleküller farklı tuz konsantrasyonlarında kolondan ayrılırlar. Gram pozitif bakterilerin genelde membran geğirgenliğini artıran, 60 aminoasitten daha az rezidü içeren katyonik peptidler (bakteriyosinler) ürettikleri bildirilmiştir (Motta *et al.*, 2007). Çalıştığımız proteinin kolondan ilk etapta çıkması oldukça katyonik bir yapısı olduğuna işaret etmektedir ve literatürde yer alan tanıma uymaktadır. Aktif fraksiyonlar toplandığında elektoroforezde aktiviteden sorumlu tek bir bant saptanmıştır.

HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosin anyon değiştirici kolona uygulandığında, tuz gradiyenti uygulanmadan önce, çıkan ve antagonistik aktiviteye sahip olan örnekler Fraksiyon 1 olarak toplanmıştır. Kolondan örnek çıkışı devam ederken 0,1 M- 0,4 M NaCl gradiyenti arasında da aktif fraksiyonların çıktığı belirlenmiştir ve bu fraksiyonlardaki örneklerde toplanarak Fraksiyon 2 olarak adlandırılmıştır. Bu durum antibakteriyal etkiye sahip birden fazla protein olabileceğini düşündürmüştür.

Bacillus licheniformis ZJU12 bakterisiyle yapılan çalışmada, bakteriyosin anyon değiştirici kromotografiye uygulanmıştır. Çalışmamızdaki duruma benzer şekilde, aktif fraksiyonların 4 farklı yerde pik yaptığı saptanmıştır. İlk pik, tuz gradiyenti uygulamadan çıkan örneklerde, diğer aktif fraksiyonlar ise farklı tuz konsantrasyonlarında elde edilmiştir. araştırmacılar bu durumu iki farklı hipotezle açıklamışlardır. İlk hipotez *Bacillus* cinsine ait bazı bakterilerin birden fazla bakteriyosin benzeri peptid ürettiklerinin bilindiğini ve bu yüzden aktiviteden sorumlu birden fazla peptid olabileceğidir. Diğer bir yaklaşım ise, 4 farklı pik elde edilmesinin sebebinin bir bakteriyosinin farklı polimerlerden oluşabileceği yönündedir. Bunun yanısıra, bakteriyosinin üretimi ve saflaştırılması esnasında kısmi olarak parçalanmış olabileceğini de bildirmişlerdir (He *et al.*, 2005).

Çalışmamızda, HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosinin anyon değiştirici kolondan çıkan her iki fraksiyonu ve kolona uygulanan örnek (diyalizat) elektroforezle görüntülüğünde, aktiviteden sorumlu bantın Fraksiyon 1 ve Fraksiyon 2’de farklı bantlar olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, HBB-247 izolatının aktiviteden sorumlu iki farklı protein ürettiği düşünülmektedir. Sonuç olarak HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosin amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır ve anyon değiştirici kromotografiden çıkan örneklerde aktivite düşük olduğu için saflaştırma tablosuna alınmamıştır.

Çizelge 4.38. HBB -247 izolatının ürettiği bakteriyosinin kısmi saflaştırma tablosu

Fraksiyon	Hacim (mL)	Aktivite (AU/mL)	Protein (mg/mL)	T. Aktivite	T. protein	Spesifik aktivite	Saflaştırma katsayısı	Verim
CFS	400	3200	0,044	1280000	17,6	72727	1	100
Diyalizat	12	25600	1,180	307200	14,16	21695	0,3	29

4.11. HBB-218 Saflaştırılmış Bakteriyosinin Karakterizasyonu

HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosin saflaştırıldıktan sonra, karakterizasyon denemeleri saflaştırılmış örnek ile tekrarlanmıştır. HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosin ise kısmi olarak saflaştırıldığı ve saflaştırma katsayısı düşük olduğu için, tekrar karakterizasyon yapılmamıştır.

HBB-218 izolatının ürettiği kültür sıvısına aynı işlemler uygulanarak (amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, jel kromotografisi ve anyon değiştirici kromotografi), elde edilen örnek, fosfat tamponuyla seyreltilerek (yaklaşık 17 mL), karakterizasyon işlemlerinde kullanılmıştır. Karakterizasyonda kullanılan örneğin aktivitesi 800 AU/mL olarak hesaplanmıştır.

4.11.1. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Saflaştırılan bakteriyosin için öncelikle ısı stabilitesi belirlenmiştir. 121 °C’de 20 dakika otoklavlanan örnek dışında diğer tüm örneklerde aktivitenin % 100 korunduğu belirlenmiştir. Ham kültür sıvısına göre, saflaştırılmış bakteriyosinin ısı stabilitesi daha düşüktür. Ancak, bakteriyosin saflaştırıldıktan sonra bile, otoklavda aktivitesinin büyük bir kısmını (yaklaşık %70) korumaktadır. Bu durum da bakteriyosinin yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel işlemlerde, saflaştırıldıktan sonra bile kullanışlı olacağını göstermektedir.

Çizelge 4.39 Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

SICAKLIK ve SÜRE	KALAN AKTİVİTE (%)
30 °C, 30 dakika	100
30 °C, 2 saat	100
45 °C, 30 dakika	100
45 °C, 2 saat	100
60 °C, 30 dakika	100
60 °C, 2 saat	100
95 °C, 30 dakika	100
95 °C, 2 saat	100
121 °C, 20 dakika	69
+4 C, 1 ay	100

4.11.2. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi

Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi denendiğinde, ham bakteriyosine göre, daha dirençsiz olduğu belirlenmiştir. Özellikle proteolitik enzimler, saflaştırılmış bakteriyosin üzerinde daha düşük konsantrasyonda ve daha kısa sürede etki göstermiştir. Kültür sıvıları ile yapılan enzimatik denemelerde, proteinaz K ve Proteaz enzimleri, sadece 10 mg/mL konsantrasyonda ve 24 saat sonunda etki ederken, saflaştırılmış bakteriyosin üzerinde 1 mg/mL final konsantrasyonda bile etkili olmuşlardır. Bu durum, kültür sıvısında daha fazla protein bulunması ve bu nedenle enzimatik aktivitenin zayıflaması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak hem kültür sıvılarında, hem de saflaştırılmış bakteriyosinde proteolitik enzimlerle muamele sonucu aktivitenin kaybolması, çalıştığımız maddenin protein yapıda olduğunu doğrulamıştır (Çizelge 4.40).

Proteolitik enzimlerin yanısıra, lipaz, α -amilaz ve B-glukoronidaz enzimleri de aktivitede kayba neden olmuştur. Kültür sıvıları ile yapılan denemelerde, bu durumun kültür ortamındaki koşullardan kaynaklanabileceği ya da bakteriyosinin yapısında peptid kısmın yanısıra lipid ve karbohidrat da bulunabileceği ne işaret etmektedir. *Lactococcus lactis* MM19 suşu ile yapılan çalışmada, proteolitik enzimlerin yanısıra lipaz (%1) enzimi ile 2 saat 37 °C'de inkübe edilen bakteriyosinin aktivitesinde (%75) kayıp olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, bakteriyosinin, indikatör bakterinin membranına adsorbe olmasında yağ asitlerinin rolü olabileceğini bildirmişlerdir. Aktivite testleri sırasında ortamda bulunan aktif lipaz, indikatör suşun bakteriyosini adsorblayan bölgesini hidrolizlemekte, dolayısıyla aktivite azalmaktadır. Aynı araştırmacılar, bakteriyosinin lipopeptid yapıda olmadığını doğrulamışlardır (Millette, *et al.*, 2006).

Hernandez *et al.* (2005), yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus plantarum* TF711 suşunun ürettiği plantaricin TF711 bakteriyosinin araştırmışlardır. Bakteriyosin aktivitesinin proteolitik enzimlerin yanısıra, lipaz enzimi ile kısmen, α -amilaz ile tamamen inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Plantaricin TF711'in aktivitesinin α -amilaz ve lipazla inaktive olması, biyolojik aktivite için glikozidik ve lipidik bir kısma ihtiyaç duyduğunu düşündürmüştür. Bazı durumlarda ise, ham bakteriyosinde bulunan protein olmayan kısımların, kültür ortamından kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Kültür ortamında bulunan bazı bileşenler, peptid kısım ile kompleks oluşturmakta, saflaştırma aşamasında ise bu kısımlar ayrılmaktadır. Örneğin, Plantaricin S, bakteriyosini, önce lipid ve karbohidrat içeren kompleks bir bakteriyosin olarak tanımlanmış, ancak saflaştırma aşamasından sonra yalnızca iki küçük peptidten oluştuğu bulunmuştur (Jimenez-Diaz *et al.*, 1993; Jimenez-Diaz *et al.*, 1995).

Peynirden izole edilen çeşitli Laktobasil suşlarının hücresiz süpernatantlarıyla yapılan çalışmada, lipaz ve α -amilaz enzimlerinin aktiviteyi engellediği bulunmuştur (Gulahmadov, *et al.*, 2006). Araştırmacılar, bazı durumlarda, bu tür kimyasal kısımların, gerçek bir gliko ve/veya lipopeptid yapıdan ziyade, besiyerinde bulunan çeşitli kontaminatlardan kaynaklanabileceğini savunmuşlardır.

Bakteriyosinlerin, peptid kısımlarına ek olarak karbohidrat bir kısım bulundurmaları daha çok Sınıf IV bakteriyosinlerin bir özelliği (Nes, *et al.*, 1996; Klaenhammer, T.J., 1993) olduğu bildirilmiştir. Ancak, 2005 yılında Cotter tarafından önerilen düzeltilmiş sınıflandırmaya göre, Sınıf IV bakteriyosinler, bakteriyosin gruplarına dahil edilmemiştir. Araştırmacılar, bu grupta yer alan bakteriyosinlerle ilgili henüz kesin ve inandırıcı veriler olmadığı için, sınıflandırmaya alınmadığını belirtmişlerdir (Cotter, *et al.*, 2005).

Çizelge 4.40. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi

ENZİMLER	KALAN AKTİVİTE (%)			
	1 saat inkübasyon		24 saat inkübasyon	
	1 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml
Proteinaz K	0	0	0	0
Proteaz	80	69	0	0
Papain	100	0	100	0
Lipaz	80	0	0	0
α-Amilaz	100	100	100	50
β-Glukuronidaz	100	100	100	50
Laktaz	100	100	100	100
RNAz	100	100	100	100
Katalaz(300IU/mL)	100	100	100	100

4.11.3. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosin, kültür sıvısında denediğinde, pH stabilitesi daha yüksektir. Kültür sıvısında, denenen tüm pH'larda (3-11) hem +4 °C'de, hem de 65 °C'de inkübe edildiğinde, aktivite % 100 korunmaktadır. Oysa, saflaştırılmış

bakteriyosin farklı pH'larda denendiğinde, +4 C'de pH 3-5 arasında; 65 C'de inkübe edildiğinde ise, pH 8-11 arasında aktivitesinde kayıp gözlenmiştir (Çizelge 4.40).

Genelde, Laktobasillerin ürettikleri bakteriyosin benzeri bileşikler, bazik pH'larda konformasyonel değişikliğe uğramaktadırlar ve pH 12.0'de antagonistik aktivite yok olmaktadır. Günümüzde, gıdalarda kullanılan ve lisanslı tek bakteriyosin olan nisin, asidik şartlarda aktiftir. pH 8.0-11.0 arasında, nisin aktivitesi azalmakta ve giderek kaybolmaktadır (Lui,1990). Çalıştığımız bakteriyosinin +4 °C'de denenen tüm pH'larda yine de stabil olması, özellikle soğukta depolamayla ilgili uygulamalarda kullanışlı olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.41 Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	KALAN AKTİVİTE (%)	
	+ 4 °C	65 °C
pH 3	86	100
pH 4	86	100
pH 5	86	100
pH 6	100	100
pH 7	100	100
pH 8	100	79
pH 9	100	71
pH 10	100	71
pH 11	100	57

4.11.4. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi denendiğinde, kloroformun ve TCA'nın aktivitede kayba neden olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.42). Ham bakteriyosinle yapılan denemelerde ise, organik çözücülerle muamele sonucu aktivite tamamen korunmaktadır.

Çizelge 4.42. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

ORGANİK ÇÖZÜCÜ (Final kons.)	KALAN AKTİVİTE (%)
Aseton (%10)	100
DMSO (%10)	100
Methanol (%10)	100
Ethanol (%10)	100
Xylol (%10)	100
Kloroform	87
TCA (100 mg/ml)	0

4.11.5. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine deterjanların etkisi

Deterjanların saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, üre, EDTA (0,1 mM) ve Tween 80 değerlendirilebilmiştir. Denenen deterjanlardan sadece Tween 80 aktivitede kayba neden olmuştur (Çizelge 4.43).

Çizelge 4.43. Saflaştırılmış bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

*Kontrolde de zon var.

DETERJANLAR	KALAN AKTİVİTE (%)
Tween 20 (1 mg/mL)	*
Tween 80 (1 mg/mL)	80
Triton X-100 (1 mg/mL)	*
Triton X-114 (1 mg/mL)	*
SDS (1 mg/mL)	*
Üre (1 mg/mL)	100
EDTA (0.1 mM)	100
EDTA (2 mM)	*
EDTA (5 mM)	*

SONUÇ

Bu çalışmada, termofilik bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve saflaştırılması amaçlanmıştır. Yüksek sıcaklıklarda gelişebilen bu tür bakterilerin ürettikleri antibakteriyal maddelerin gıdalarda bozulma etkeni olan ve hastalık yapma potansiyeli taşıyan bakterilere karşı etkinlikleri denenerek, inhibitör maddelerin kullanım olanakları araştırılmıştır.

Son yıllarda, gıdaları koruma stratejileri açısından doğal antimikrobiyal bileşiklere ilgi artmaktadır. Günümüzde, mezofilik bakterilerin ürettikleri bu tür metabolitlere dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak, ekstremofil bakterilerin inhibitör bileşikleriyle ilgili araştırmalar nadirdir ve çalışmamızın bu açıdan literatüre referans sağlayacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, çeşitli sıcak su, birikinti ve toprak örneklerinden toplam 208 adet termofilik bakteri izole edilmiştir ve geniş bir kültür koleksiyonu oluşturulmuştur. Tez çalışmamız sırasında kullanılan HBB-218 ve HBB-247 izolatlarının yanısıra izole edilen diğer bakterilerin moleküler tanımlarının yapılmasına devam edilmektedir. Bu sayede bölgemiz sıcak su kaynaklarının mikrobiyotasının aydınlatılmasına katkı sağlayacağımız düşüncesindeyiz.

İzole edilen suşlar arasında, inhibitör etkinin kültür sıvısında saptanabildiği ve antibakteriyal spektrumu en geniş olan iki tanesi, HBB-218 ve HBB-247 seçilerek çalışmamıza devam edilmiştir. 16S rRNA dizi analizi sonucu her iki bakterininde en yüksek homoloji gösterdiği tür, *Geobacillus toebii* olarak belirlenmiştir. Ancak, izolatların ürettikleri bakteriyosinlerin farklı olduğu bulunmuştur. Literatürde *Geobacillus toebii* suşlarıyla yapılmış bu tür bir çalışma henüz yer almamaktadır.

Çalışmamızda, kullandığımız bakterilerden elde edilen inhibitör maddenin peptid yapıda olduğu çeşitli denemeler ile kanıtlanmıştır. Proteolitik enzimlere hassastırlar, TCA muamelesinden sonra aktivite kaybolmaktadır. Ayrıca, bakteriyosin üretimi açısından seçilen suşlar Gram pozitif izolatlardır ve her iki bakteriyosin de sadece Gram pozitif bakterilere etkili bulunmuştur. HBB-218 izolatının ürettiği

bakteriyosinin, antibakteriyal etki spektrumunun geniş olduğu bulunmuştur ve hem asidik hem bazik pH'larda stabil olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, HBB-218 tarafından üretilen bakteriyosin çeşitli deterjanlar ve organik çözücülerle muamele edildiğinde aktivitesini korumaktadır. HBB-247 izolatının ürettiği bakteriyosin nispeten daha dar bir antibakteriyal spektruma sahiptir, ısıtma işlemine karşı daha dayanıksızdır.

HBB-218 ve HBB-247 izolatlarının ürettikleri bakteriyosinlerin üretim koşulları optimize edilmiştir. Bu sayede izolatların gelişimi ve bakteriyosin üretimi açısından maksimum verimi sağlayan sıcaklık ve pH dereceleri, ayrıca azot ve şeker kaynakları tespit edilmiştir. HBB-218 izolatı için bakteriyosin üretimi açısından en iyi sıcaklık 60 °C, en iyi pH ise 6.5 olarak belirlenmiştir. Maksimum gelişim ve bakteriyosin üretimi soya pepton ve galaktoz bulunan modifiye ortamda gözlenmiştir. HBB-247 izolatı ise, 60 °C'de ve pH 6.0'da maksimum bakteriyosin üretimini gerçekleştirmektedir. Azot kaynağı olarak soya pepton, şeker kaynağı olarak ise fruktoz bakteriyosin üretimi açısından en iyi kaynaklar olarak seçilmiştir.

HBB-218 izolatının ürettiği bakteriyosin, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi ve anyon değiştirici kromatografi metotları kullanılarak homojen bir şekilde saflaştırılmıştır. Elektroferez sonucunda 5.5 kDa molekül ağırlığına sahip tek bir bant belirlenmiştir.

HBB-247 suşunun kültür sıvıları amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve anyon değiştirici kromatografisi sonrasında, iki farklı aktif fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonların elektroforezi yapıldığında, antibakteriyal aktiviteden sorumlu bir tanesi 33 kDa, diğeri 42 kDa molekül ağırlığına sahip iki peptid saptanmıştır. Sonuçta bakteriyosin kısmi olarak saflaştırılmıştır. Ancak, saflaştırma aşamasında, HBB-247 izolatının kültür sıvılarında aktivitenin düşük olduğu gözlenmiştir. Araştırmamızın devamında HBB-247 izolatının bakteriyosin üretiminin çeşitli yollarla indüklenmesi veya izolata ait kolonilerin taranmasıyla tekrar yüksek aktivite elde edilmesine çalışılacaktır. Bu sayede bakteriyosin daha yüksek oranlarda saflaştırılabilecektir.

Çalışmamızda, her iki izolata ait bakteriyosinlerin belirli dozlarda, bakterisidal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sıvı besiortamlarında yapılan denemelerde, indikatör bakterilerdeki bulanıklığın bakteriyosinle işlem gördükten sonra tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Bu durum, hücrelerin lizise uğramış olabileceğini düşündürmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak, çalıştığımız maddelerin, (özellikle termofilik bakterilerden) DNA izole edilmesinde, farklı amaçlarla kullanılabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızın devamında, bakteriyosinlerin bu amaçla kullanım olanakları araştırılacaktır.

Bakteriyosinlerin, genetik determinantlarının saptanması, bakteriyosinin özelliklerinin belirlenmesi ve üretimi düzenleyici faktörlerin anlaşılması açısından önemlidir. Doktora tez çalışmamızın devamında, HBB-218 ve HBB-247 izolatlarının ürettikleri bakteriyosinlerin, genetik belirleyicilerinin kromozomal veya plazmidik kökenli olup olmadıkları ve üretimden sorumlu gen bölgesinin klonlama olanakları araştırılacaktır.

KAYNAKLAR

Aasen, I.M., Moreto, T., Katla, T., Axelsson, L., Storro, I. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocins production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **53** (2): 159-166.

Aktypis, A., Kalantzopoulos, G. 2003. Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001. *Lait* 83: 365-378

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, **17** (6): 454-461.

Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. H., Nissen-Meyer, J. 1998. Antagonistic Activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two New Two-Peptide Bacteriocins, Plantaricins EF and JK, and the Induction Factor Plantaricin A. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64** (6): 2269-2272.

Aranha, C., Gupta, S., Reddy, K. V. 2004. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide nisin: *in vitro* and *in vivo* studies. **Contraception**, **69**: 333-338.

Banat, I.M., Marchant, R., Rahman, T.J. 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. **Int. J. Sys. Evol. Microbiol** **54**: 2197-2201

Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Micr.**, **45** (6): 1808-1815.

Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R. 1984. Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** **45**: 1808-1815

Barefoot, S.F., Nettles, C.G. 1993. Antibiosis revised: Bacteriocins produced by dairy starter cultures. **Journal of Dairy Science**, **76** (8): 2366-2379.

Bauer, R., Chikindas, M.L., Dicks, L.M.T. 2005. Purification, partial aminoacid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. **International Journal of Food Microbiology** **101**: 17-27

Becker, R.J., Becker, D.A., Starzyk, M.J. 1986. Bacteriocin like activity within the Genus *Thermus*. **Applied and Environmental Microbiology**, **52** (5): 1203-1205.

Bezares-Rojo, B., Saenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Larrea, F.R., Torres, C. 2006. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. **Food Microbiology**, **24** (5): 482-491.

Bismas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilacti* H. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1265-1267.

Bizani, D., Dominguez ,A.P.M., Brandelli, A. 2005. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. **Letters in Applied Microbiology** **41**: 269-273

Bonade, A., Murelli, F., Vescovo, M., Scolari, G. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. **Letters in Applied Microbiology**, **33** (2): 153-158.

Bores, J., Horak, J., Fixa, B., Komarkova, O., Zaydlar, K., Lonsky, V., Masurka, V. 1989. Colicinogeny in colorectal cancer. **Neoplasma**, **33**: 233-237.

Boziaris, I. S., Adams, M. R. 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. **Int. J. Food Microbiol.**, **53** (2-3): 105-113.

Boziaris, I. S., Humpheson, L., Adams, M. R. 1998 . Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. **Int. J. Food Microbiol.**, **43** (1-2): 7-13.

Bradley, D. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. **Bacteriol. Rev.**, **31** (4): 230-314.

Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H., de Kruijff, B. 1999. Could an old compound become a new antimicrobial contender? **Science**, **286**: 2361- 2364.

Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E., Sahl, H. G. 1998. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting Lipid II **Antimicrob. Agents Chemother.**, **42** (1): 154-160.

Brotz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Gotz, F., Bierbaum, G., Sahl, H. G. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. **Mol. Microbiol.**, **30** (2): 317-327.

Callewaert, R., DeVuyst, L. 2000. Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, **66** (2): 606-613.

Campos, C.A., Rodriguez, O., Carlo-Mata, P., Prado, M., Velazquez, J.B. 2006. Preliminary characterizaiton of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International**, **39** (3): 356-364.

Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., Hastings, J. W. 1997. Purification of bacteriocins of lactic bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology** **34**: 1-16

Cheigh, C.I., Choi, H.J., Park, H., Kim, S.B., Kook, M.C., Kim, T.S., Hwang, J.K, Pyun, Y.R. 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology**, **95** (3): 225-235.

Chen, Y., Ludescher, R. D., Montville, T. J. 1997. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospho lipid vesicles. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63** (12): 4770–4777.

Chinachoti, N., Matsusaki, H., Sonomoto, K., Ishikazi, A. 1997. Utilization of xylose as an alternative carbon source for nisin Z production by *Lactococcus lactis* I0-1. **J. Fac. Agric. Kyushu Univ.**, **42** (1-2): 171-181.

Chumchalova, J., Smarda, J. 2003. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. **Folia Microbiol.**, **48** (1): 111-115.

Chung., H.J., Yousef, A.E. 2005. *Lactobacillus curvatus* produces a bacteriocin-like agent active against Gram negative pathogenic bacteria. **Journal of Food Safety**, **25**: 59-79.

Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., Motta, A., Souto, A.A., Brandelli, A. 2006. Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*. **Can. J. Microbiol.**, **52**: 533-539.

Cladera-Oliviera F., Caron, G.R., Brandelli, A. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Letters in Applied Microbiology**, **38**: 251-256.

Cladera-Oliviera F., Caron, G.R., Brandelli, A., 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Letters in Applied Microbiology**, **38**: 251-256

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology** **71** (1): 1-20

Coakley, M., Fitzgerald, G., Ros, R. P. 1997. Application and evaluation of the phage resistance- and bacteriocin encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63** (4): 1434–1440.

Corvey, C., Stein, T., Dusterhus, S., Karas, M., Entian, K. D. 2003. Activation of subtilin precursors by *Bacillus subtilis* extracellular serine proteases subtilisin (AprE), WprA, and Vpr. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **304** (1): 48–54.

Cotter, P.D., Hill C., Ross R.P. 2005. Bacterial lantibiotics: strategies to improve theurapotic potential. **Curr. Prot. Pept. Sci.**, **6** (1): 61-75.

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews, Microbiology**, **3**: 777-788.

Cox, O.R., Coburn, P.S., Gilmore, M.S. 2005. Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. **Curr. Prot. Ppt. Sci.**, **6** (1): 77-84.

Cutter, C.N., Siragusa, G.R. 1995b. Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. **Journal of Food Protection**, **58**: 1028-1030.

Daeschel, M.A., Mcguire, J., Almakhla, H. 1992. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. **Journal of Food Protection**, **55** (9): 731-735.

Dalet, K., Briand, C., Cenatiempo, Y., Hechard, Y. 2000. The *rpoN* Gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. **Curr. Microbiol.**, **41** (6): 441-443.

Datta, V., Myskowski, S.M., Kwinn, L.A., Chiem, D.N., Varki, N., Kansal, R.G., Malak, K., Nizet, V. 2005. Mutational analysis of the group A streptococcal operon encoding streptolysin S and its virulence role in invasive infection. **Mol. Microbiol.**, **56** (3): 681-695.

Daw, M.A., Falkiner, F.R. 1996. Bacteriocins: Nature, Function and Structure. **Micron**, **27** (6): 467-479.

De Klerk, H.C., Smit J.A. 1967. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. **J. Gen. Micr**, **48** (2): 309-316.

De Vuyst, L., Vandamme, E.J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and application. In: De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.), Bacteriocins of Lactic acid bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. Chapman and Hall, London, pp. 151-221.

Deraz, S.F., Karlssoni E.N., Hedstorm, M, Andersson, M.M., Mattiasson, B. 2005. Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Biotechnology** **117**: 343-354

Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. 2004. New preservation technologies. **International Dairy Journal**, **14** (4): 273-285.

DeVuyst, L., Callewaert, R., Crabbe, K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. **Microbiology** **142** (4): 817-827.

DeVuyst, L., VanDamme E.J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentation. **J.Gen.Microbiol.**, **138** (3): 571-578.

Diaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Soler-González, A.S., Ramírez-Rodrigo, H., Maqueda, M. 2003. Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. **Appl. Environ. Microbiol.**, **69** (2): 1229–1236.

Diep, D. B., Myhre, R., Johnsborg, O., Aakra, A., Nes, I. F. 2003. Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the *pln* operons and by two antagonizing response regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. **Mol. Microbiol.**, **47** (2): 483–494.

Diep, D. B., Nes, I. F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. **Curr. Drug Targets**, **3** (2): 107–122.

Drosinos, E.H., Mataragas, M., Metaxopoulos, J. 2006. Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, **74**: 690-696.

Eijsink, V. G., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B., Nes, I. F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64** (9): 3275–3281.

Ercolini, D., La Stora, A., Villani, F., Mauriello, G. 2006. Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescens microscopy. **Journal of Applied Microbiology**, **100** (4): 765-772.

Farkas, H.H., Cheung, R. 1976. Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agent of neoplasia. **Cancer Res.**, **36**: 3561-3567.

Farkas, H.H., Hill, R., Rosen, B., Arab, S., Lingwood, C., 1995. The bacterial colicin active against tumor cells in vitro and in vivo is verotoxin1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **92** (15): 6996-7000

Farkas, H.H., Kuzniak, S., in W. Siegenthaler, R. Luthy (Eds). Current chemotherapy, American Society for Microbiology, Washington DC, 1978, 1188-1191.

Fimland, G., Blingsmo, O. R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I. F., Nissen-Meyer, J. 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62** (9): 3313-3318.

Fimland, G., Jack, R., Jung, G., Nes, I. F., Nissen-Meyer, J. 1998. The bactericidal activity of Pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64** (12): 5057-5060.

Fuska, J., Fuskova, A., Smarda, J., Mach, J. 1978. Effect of colicin E3 on leukemia cells p388 in vitro. **Experianta**, **35** (3): 406-407.

Gajic, O., Buist Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O.P., Kok, J. 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. **J. Biol. Chem.**, **278** (36): 34291–34298.

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Omar, N.B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, **120** (1-2): 51-70

Galvin, M., Hill, C., Ross, R. P. 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. **Lett. Appl. Microbiol.**, **28** (5): 355–358.

Ganzle, M. G., Hertel, C., Hammes, W. P. 1999. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. **Int. J. Food Microbiol.**, **48 (1)**: 37-50.

Gao, Y., Van Belkum, M.J., Stiles, M.E. 1999. The outer membrane of Gram negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. **Applied and Environmental Microbiology**, **65 (10)**: 4329-4333.

Garneau, S., Martin, N. I., Vederas, J. C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, **84 (5-6)**: 577–592.

Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J.M., Manai, M. 2007. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, **19**: 162-169.

Gilbert, S.E., Somkuti, G.A. 2005. Thermophilin 110: A bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST 110. **Current Microbiology**, **51 (3)**: 175-182

Goldstein, B. P., Wei, J., Greenberg, K., Novick, R. 1998. Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae*, *in vitro*, and in a mouse infection model. **J. Antimicrob. Chemother.**, **42 (2)**: 277–278.

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B., Suarez, J.E. 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**: 2158-2163

Gratia, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. **C. R. Seances Soc. Biol. Fil.**, **93**:1040–1041.

Gravesen, A., Jydegaard Axelsen, A. M., Mendes da Silva, J., Hansen, T. B., Knochel, S. 2002. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **68 (2)**: 756–764.

Gray, E.J., Lee, K.D., Souilemanov, A.M., Di Falco, M.R., Zhou, X., Ly, A., Charles, T.C., Driscoll, B.T., Smith, D.L. 2004. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. **Journal of Applied Microbiology**, **100 (3)**: 545-554

Guder, A., Schmitter, T., Wiedemann, I., Sahl, H. G., Bierbaum, G. 2002. Role of the single regulator MrsR1 and the two-component system MrsR2/K2 in the regulation of mersacidin production and immunity. **Appl. Environ. Microbiol.**, **68 (1)**: 106–113.

Guerra, N.P., Macias, C.L., Agrasar, A.T., Castro, L.P. 2005. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin as biopreservative agent. **Letters in Applied Microbiology**, **40 (2)**: 106-1610.

Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **Journal of Applied Bacteriology**, **98 (6)**: 1316-1325.

Gulahmadov, S.G., Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Kuliev, A.A., Haertle, T. 2006. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani cheeses. **Eur. Food Res. Technol**, **224 (2)**: 229-235.

Hancock, R.E., Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiol.**, **8 (9)**: 402-410.

Havarstein, L. S., Diep, D. B., Nes, I. F. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. **Mol. Microbiol.**, **16 (2)**: 229–240.

He, L., Chen, W., Liu, Y. 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis*. **ZJU12**, **161 (4)** :321-326.

Hechard, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., Frere, J. 2001. Analysis of σ^{54} -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII^{Man}) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. **Microbiology**, **147**: 1575-1580.

Hechard, Y., Sahl, H. G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**, **84 (5-6)**: 545-557.

Hernandez, D., Cardell, E., Zarate, V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, **99 (1)**: 77-84.

Heu, S., Oh, J., Kang, Y., Ryu, S., Cho, K., Cho, Y., Cho, M. 2001. Gly gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *Glycines* 8ra. **Appl. Environ. Microbiol.** **67 (9)**: 4105-4110.

Hosoda K., Ohya, M., Kohno, T., Maeda, K., Endo, S. Wakamatsu, K. 1996. Structure determination of an immunopotentiator peptide cinnamycine, complexed with lysophosphatidylethanolamine by 1H-NMR1. **J. Biochem**, **119**: 226-230.

Hsu, S.T., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M.A.G., Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M.J., Nuland, N.A.J. 2004. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. **Nature Struct. Mol. Biol.**, **11**: 963-967.

Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T., Pantev, T., Budakov, I., Danova, S., Moncheva, P., Nikolova, I. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **Int. J. Food. Microbiol.**, **42 (3)**: 147-158.

Jabrane, A., Sabri, A., Compere, P., Jacques, P., Vandenberghe, I., Beeumen, J., Thonart, P. 2002. Characterization of Serracin P, phage tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. **Appl. Environ. Microbiol.**, **68** (11): 5704-5710.

Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Microbiological Reviews** **59** (2): 171-200

Jenssen, H., Hamil, P., Hancock, R.E.W. 2006. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, **19** (3): 491-511.

Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, M., Desmezeaud, M., Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C., 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010 isolated from a green olive fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, **59** (5): 1416-1424.

Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H., Warner, P.H. 1995. Purification and partial aminoacid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. **Applied Environmental Microbiology**, **61** (12): 4459-4463.

Joerger, M.C., Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. Bacter.** **167**: 439-446

Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. 2004. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. **J. Biol. Chem.**, **280** (10): 9243–9250.

Jung, G. 1991. Lantibiotics-ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α , β -didehydroaminoacids. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, **30** (9): 1051-1192.

Kabuki, T., Uenishi, H., Watanebe, M., Seto, Y., Nakajima, H. 2007. Characterization of a bacteriocin thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. **Journal of Applied Microbiology**, **102** (4): 971-980.

Kaewsrichan, J., Douglas, C.W.I., Nissen-Meyer, J., Fimland, G., Teanpaisan, R. 2004. Characterization of a bacteriocin produced by *Prevotella nigrescens* ATCC 25261. **Letters in Applied Microbiology** **39**: 451-458

Kaferstein, F., Abdussalam, M. 1999. Food Safety in the 21st century. **Bulletin of the World Health Organization**, **77**: 347-351.

Kaiser, A.L., Montville, T.J. 1993. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, **75** (6): 536-540.

Kaiser, A.L., Montville, T.J. 1996. Purification of the bacteriocin Bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Appl. Environ. Microbiol.**: 4529-4535

Kanatani, K., Oshimura, M., Sano, K. 1995. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** **61**: 1061—1067

Kang, J.H., Lee, M.S. 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. **Journal of Applied Microbiology**, **98** (5): 1169-1176.

Kato, F., Eguchi, Y., Nakano, M., Oshima T., Murata, A. 1991. Purification and characterization of Linecin A, a bacteriocin of *Brevibacterium linens*. **Agric. Biol. Chem.**, **55** (1): 161-166.

Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Itoh, T., Saito, T. 2004. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.**, **70** (5): 2906–2911.

Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., Saito, T. 2004. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. **Curr. Protein Pept. Sci.**, **5** (5): 393–398.

Kazazic, M., Nissen-Meyer, J., Fimland, G. 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. **Microbiology**, **148**: 2019–2027.

Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H, Nauta, A., Kuipers, O., Kok, J. 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A, and closticin 574. **Applied Environmental Microbiology**, **69** (3): 1589-1597.

Kerr, A., Tate, M.E. 1984. Agrocins and the biological control of crown gall. **Microbiol. Sci.**, **1**:1-4.

Kim, M.H., Kong, Y.J., Baek, H., Hyun, H.H. 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin G05 by *Micrococcus* sp. G05. **Journal of Biotechnology**, **121** (1): 54-61.

Kim, W.S., Hall, R.J., Dunn, N.W. 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechn.**, **48** (4): 449-453.

Kim, W.S., Hall, R.J., Dunn, N.W. 1998. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 50 (4): 429-433.

Klaenhammer T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria, **Biochimie** 70, 337-349.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev**, 12 (1-3): 39-86.

Klostermaier, P., Heiko-Scheyhing, C., Ehrmann, M., Vogel, R.F. 1999. Mathematical evaluation of plantaricin formation supports an auto-induced production mechanism. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 51 (4) : 462-469.

Kreth, J., Merritt, J., Bordador, C., Shi, W., Qi, F. 2004. Transcriptional analysis of mutacin I (*mutA*) gene expression in planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans* using fluorescent protein and glucuronidase reporters. **Oral Microbiol. Immunol.**, 19 (4): 252–256.

Krier, F., Junelles-Revol, A.M., Germain, P. 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 50 (3): 359-363.

Kruszewska, D., Sahl, H.G., Bierbaum, G., Pag, U., Hynes, S.O., Ljungh, A.S. 2004. Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. **J. Antimicrob. Chemother.**, 54 (3): 648–653

Kuisiene, N., Raugalas, J., Chitavichius, D. 2004. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. **Int. J. Sys. Evol. Microbiol** 54: 1991-1995

Lai, A. C., Tran, S., Simmonds, R. S. 2002. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 215 (1): 133–138.

Larsen, A.G., Vogensen, F.K., Josephsen, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1410. **J. Appl. Bacteriol.** **75**, 113-122

Lash, B.W., Gouroma, H., Mysliwec, T.H. 2002. Microscale assay for screening of inhibitory activity of lactobacillus. **Biotechniques**, **33** (6): 1224-1228.

Lash, B.W., Mysliwec, T.H., Gourama, H. 2005. Detection and partial characterization of a broad range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). **Food Microbiology**, **22** (2-3): 199-204.

Lavermicocca, P., Lonigro, S.L., Valerio, F., Evidente, A, Aisconti, A. 2002. Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. Ciccارنةi. **Appl. Environ. Microbiol.**, **68** (3): 1403-1407.

Lejeune, R., Callewaert, R., Crabbe, K., DeVuyst L. 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. **Journal of Applied Microbiology**, **84** (2): 159-168.

Leroy, F., DeVuyst, L. 2001. Growth of the bacteriocin producing *Lactobacillus sakei* strain CTC494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient depletion: model for the growth of lactic acid bacteria. **Appl. Environm. Microbiol.**, **67** (10): 4407-4413.

Luchansky, J.B. 1999. Overview on applications for bacteriocin-producing lactic acid bacteria and their bacteriocins. **Antonie van Leeuwenhoek**, **76**: 335.

Lyon, W.J., Glatz, B.A. 1991. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionobacterium thoenii*. **Appl. Environ. Micr.**, **57** (3): 701-706.

Maqueda, M., Galvez, A., Bueno, M.M., Sanchez-Barrena, M.J., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M., Valdivia, E. 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. **Curr. Protein Pept. Sci.**, **5** (5): 399–416.

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B., Poolman, B. 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. **J. Biol. Chem.**, **272** (22): 14277–14284.

Marekova, M., Laukova, A., Skaugen, M. 2007. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. **J Ind. Microbiol. Biotechnol.** **34**: 533-537

Martin, N.I., Sprules, T., Carpenter, M.R., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., Vederas, J.C. 2004. Structural characterization of lacticin 3147, a two peptide lantibiotic with synergistic activity. **Biochemistry**, **43**: 3049-3056.

Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G., Felice, M.D. 2002. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial cell factories** **1** (1): 1-5

Mauriello, G., De Luca, E., La Storia, A., Villani, F., Ercolini, D. 2005. Antimicrobial activity of a nisin activated plastic film for food packaging. **Letters in Applied Microbiology**, **41** (6): 464-469.

Mauriello, G., Ercolini, D., La Storia, A., Casaburi, A., Villani, F. 2004. Development of polythene films for food packaging acitivated with an anlisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. **Journal of Applied Microbiology**, **97** (2): 314-322.

McAuliffe, O., O’Keeffe, T., Hill, C., Ross, R. P. 2001. Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lacticin 3147, by the transcriptional repressor LtnR. **Mol. Microbiol.**, **39** (4): 982–993. .

Milette, M., Dupont, C., Scharek, F., Ruiz, M.T., Archambault, D., Lacroix, M. 2007. Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. **Journal of Applied Microbiology**, 104 (1): 269-275

Miller, K. W., Schamber, R., Osmanagaoglu, O., Ray, B. 1998. Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64** (6): 1997–2005.

Ming, X., Weber, G.H., Ayres, J.W., Sandine, W.E. 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. **Journal of Food Science**, **62** (2): 413-415.

Mishra, C., Lambert, J. 1996. Production of anti-microbial substances by probiotics, **Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition**, **5** (1): 20-24.

Moll, G. N., van den Akker, E., Hauge, H. H., Nissen- Meyer, J., Nes, I. F., Konings, W. N., Driessen, A. J. 1999. Complementary and Overlapping Selectivity of the Two-Peptide Bacteriocins Plantaricin EF and JK. **J. Bacteriol.**, **181** (16): 4848-4852.

Moll, G., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Konings, W. N., Driessen, A. J. 1998. Mechanistic Properties of the Two-Component Bacteriocin Lactococcin G. **J. Bacteriol.**, **180** (1): 96-99.

Montville, T. J., Chen, Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **50** (5): 511–519.

Mordvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Nes, I.F. 1991. Purification and aminoacid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. **Appl. Environ. Microbiol.** **57**: 1829-1834

Mordvedt-Abildgaard C., Nissen-Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M., Nes, I.F. 1995. Production of pH-dependent bactericidal activity of Lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. **Appl. Environm. Microbiol.**, **61** (1)175-179.

Moretro, T., Aasen, I.M., Storro, I., Axelsson, L. 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. **Journal of Applied Microbiology**, **88** (3): 536-545.

Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P., Hill, C. 1999. Development of a lactacin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, **62** (9): 1011-1016.

Motta A.S., Lorenzini, D.M., Brandelli, A. 2007. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp., isolated from the Amazon basin. **Current Microbiology** **54**: 282-286

Motta, A.S., Brandelli, A. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, **92** (1): 63-70.

Munoz, A., Maqueda, M., Galvez, A., Martinez-Bueno, M., Rodriguez, A., Valdivia, E. 2004. Biocontrol of phychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a non fat hard type cheese by an enterococcal strain producing enterocin AS-48. **Journal of Food Protection**, **67** (7): 1517-1521.

Muriana, P.M., Klaenhammer, T.R. 1991. Purification and partial characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. **App. Environ. Micr.** 114-121

Muriana, P.M., Klaenhammer, T.R. 1991. Purification and partial characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. **App. Environ. Micr.** 114-121

Nel, H.A., Bauer, R., VanDamme, E.J., Dicks, L.M.T. 2001. Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. **Journal of Applied Microbiology**, **91** (6): 1131-1138.

Nes, I. F., Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. **Biopolymers**, **55** (1): 50-61.

Nes, I.F., Diep, B.D., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Anton. Leeuw. Int. J.**, **70** (2-4): 113-128.

Nieto Lozano, J. C., Meyer, J. N., Sletten, K., Pelaz, C., Nes, I. F. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **J. Gen.Microbiol.**, **138** (9): 1985–1990.

Niu, W. W., Neu, H. C. 1991. Activity of mersacidin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **35** (5): 998–1000.

Noonpakdee, W., Santivarangka, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, **81** (2): 137-145.

Novotny, J.F., Perry, J.J. 1992. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, **58** (8): 2393-2396.

O'Mahony, T., Rekhif, N., Cavadini, C., Fitzgerald, G.F. 2001. The application of a fermented food ingredient containing 'variacin', a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy foods. **Journal of Applied Microbiology**, **90** (1): 106-114.

Ocana, V., Ruiz Holdago, A., Nader-Macias, M.E. 1999. Characterization of a Bacteriocin-Like Substance Produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain. **Appl. Environm. Micr.**, **65** (12): 5631-5635.

Oscariz, J.C., Pisabarro, A.G. 2001. Classification and mode of action of membrane active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. **Int. Microbiol.**, **4**: 13-19

Oscariz, J.C., Pisabarro, A.G. 2000. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **Journal of Applied Microbiology** **89**, 361-369

Otto, M., Peschel, A., Gotz, F. 1998. Producer self-protection against the lantibiotic epidermin by the ABC transporter EpiFEG of *Staphylococcus epidermidis* Tu3298. **FEMS Microbiol. Lett.**, **166** (2): 203–211.

Pag, U., Sahl, H.G. 2002. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics? **Curr. Pharm. Des.**, **8** (9): 815-833.

Parente, E., Ricciardi, A. 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, **19** (1): 12-15.

Parente, E., Ricciardi, A., Addario, G. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **41** (4): 388-394.

Peschel, A., Gotz, F. 1996. Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes *epiF*, -*E*, and -*G* involved in epidermin immunity. **J. Bacteriol.**, **178** (2): 531–536.

Platas G., Meseguer I., Amils R. (2002). Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediteranei* M2a. **Int Microbiology**, **5**: 15-19

Powell, J.E., Witthun, R.C., Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2007. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. **International Dairy Journal**, **17** (3): 190-198

Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J.K., Zillig, W. 2000. Sulfolobocins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. **Journal of Bacteriology**, **182** (10): 2985-2988.

Prema, P., Bharathy, S., Palavesam, A., Sivasubramanian, M., Immanuel, G. 2006. Detection, purification and efficacy of warnerin produced by *Staphylococcus warneri*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **22** (8): 865-872.

Price, L.B., Shand, R. 2000. Halocin S8: a 36 Aminoacid Microhalocin from the Haloarchaeal Strain S8a. **Journal of Bacteriology**, **182** (17): 4951-4958.

Rasch, M., Knochel, S. 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. **Letters in Applied Microbiology**, **27** (5): 275-278.

Reddy, K. V., Aranha, C., Gupta, S. M., Yedery, R. D. 2004. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. **Reproduction**, **128**: 117–126.

Reeves, P. 1965. The bacteriocins. **Bacteriol. Rev.**, 29: 24-45.

Riley, M.A., Wertz, J. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. **Ann. Rev. Microbiol**, **56**: 117-137.

Riosen, P.A., Ronning, P., Hegna, I.K., Kolsto, A.B. 2005. Characterization of a broad range antimicrobial substance from *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, **96** (4): 648-655.

Ronimus, R.S., Parker, L.E., Morgan, H.W. 1997. The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, **147** (1): 75-79.

Ruhr, E., Sahl, H. G. 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **27** (5): 841-845.

Ryan, M. P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R. P., Meaney, W. J. 1999. The natural food grade inhibitor, lactacin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, **82** (10): 2625–2631.

Sacchi, C.T., Whitney, A. M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R. S., Popovic, T. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. **Emerg. Infect. Dis.**, **8** (10): 1117–23.

Saeed, S., Rasool, S.A., Ahmed, S., Khanum, T., Khan, M.B., Abbasi, A., Ali, S.A. 2006. New insight in staphylococcal research: bacteriocin and/or bacteriocin-like inhibitory substances produced by *S. aureus* AB188. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **22**: 713-732.

Saucier, L., Poon A., Stiles M.E. 1995. Induction of bacteriocin in *Carnobacterium pisciola* LV17. **Journal of Applied Bacteriology**, **78** (6): 684-690.

Schved, F., Lalazar, A., Henls, Y., Juven, B.J. 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1 , a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **Journal of Applied Bacteriology** **74**, 67-77

Severina, E., Severin, A., Tomasz, A. 1998. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **J. Antimicrob. Chemother.**, **41** (3): 341–347.

Shafia, F. 1966. Thermocins of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, **92** (2): 524-525.

Smarda J., Obdrzalek, V. 1977. The lethal effect of colicin E3 on HeLa cells in tissue cultures. **IRCS, J. Med. Sci.**, **5**: 524.

Smarda, J., Fialova, M., Smarda, J. 2001. Cytotoxic effect of colicins E1 and E3 on v-myb-transformed chicken monoblasts. **Folia Microbiol.**, **47** (1): 11-13.

Smarda, J., Oravec, J. 1989. Cytocidal effect of bacteriocin on lymphoma cells,. **Akt. Klin. Onkol.**, **21** : 209-212.

Sobiczewski, P., Deckers, T., Pulavska, J. 1997. Fire blight (*Erwinia amylovora*): some aspects of epidemiology and control. Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, **25** (1): 120-127.

Stein, T., Entian, K. D. 2002. Maturation of the lantibiotic subtilin: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to monitor precursors and their proteolytic processing in crude bacterial cultures. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **16** (2): 103–110.

Stein, T., Heinzmann, S., Dusterhus, S., Borchert, S., Entian, K. D. 2005. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes *spaIFEG* in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. **J. Bacteriol.**, **187** (3): 822–828.

Stoyonova, L.G., Levina, N.A. 2006. Components of fermentation medium regulate bacteriocin synthesis by the recombinant strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116. **Microbiology.**, **75** (3): 286-291.

Suarez, A.M., Azcona, J.I., Rodriguez, J.M., Sanz, B., Hernandez, P. 1997. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**: 4990-4992

Sung, M.H., Kim, H., Bae, J.W., Rhee, S-K., Jeon, C.O., Kim, K., Kim, K-K., Hong S-P., Lee, S-G., Yoon, J-H., Park, Y.H., Baek, D.H. 2002. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **52** : 2251-2255.

Tagg, J. R. 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. **Indian J. Med. Res.**, **119**: 13–16.

Tagg, J.R. 1992. Bacteriocins of Gram-positive bacteria: an opinion regarding their nature, nomenclature, and numbers. In: Bacteriocins, microcins and lantibiotics. **NATO ASI Series**, 33-36.

Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, W.L. 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Bacteriological Reviews**, **40** (3): 722-756.

Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R. 1989. Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, 3. Baskı, **Ege Üniv. Fen Fak. Teksirler Serisi**, No: 55, İzmir.

Todorov, S.D. 2000. Purification and characterization of bacteriocins isolated from *Lactobacillus plantarum* ST31. PhD thesis, Sofia University, Sofia, Bulgaria.

Todorov, S.D., Danova, S.T., Van Reenen, C.A., Meincken, M., Dinkova, G., Ivanova, I.V., Dicks, L.M.T. 2006. Characterization of bacteriocin HV219 produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions. **J. Basic Microbiol.**, **46** (3): 226-238.

Todorov, S.D., Dicks, L.M. 2005. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. **J. Basic Microbiol.**, **45** (4): 312-322.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2004b. Partial characterization of bacteriocins produced by four lactic acid bacteria isolated from regional South African barley beer. **Ann. Microbiol.**, **54** (4): 403-413.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, **36** (2-3): 318-326.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2006. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. **Microbiological Research**, **161** (2): 102-108.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2006. Medium components effecting bacteriocin production by two strains of *Lactobacillus plantarum* ST414BZ and ST664BZ isolated from boza. **Biologia, Bratislava (Section Cellular and Molecular Biology)**, **61** (3): 269-274.

Todorov, S.D., Nyati, H., Meincken, M., Dicks, L.M.T. 2007. Partial Characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. **Food Control**, **18** (6): 656-664.

Tomas, J.M.S., Bru, E., Wiese, B., Hplgado A.A.P., Nader-Macias, M.E. 2002. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. **J. Appl. Microbiol.**, **93**: (4) 714-724.

Tunail, N. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, ANKARA.

Ünlütürk, A., Turantaş, F. 1999. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi, 73-74, 188

Vadyvaloo, V., Arous, S., Gravesen, A., Héchar, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J.V., Rautenbach, M. 2004. Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. **Microbiology**, **150**: 3025–3033.

Vadyvaloo, V., Hastings, J. W., van der Merwe, M. J., Rautenbach, M. 2002. Membranes of class IIa bacteriocin resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. **Appl. Environ. Microbiol.**, **68** (11): 5223–5230.

Vah Heusden, H.E., de Kruijf, B., Breukink, E. 2002. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. **Biochemistry** **41**, 12171-12178.

Valdes-Stauber, N., Scherer, S. 1994. Isolation and characterization of linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. **Applied and Environmental Microbiology** **60**, 3809-3814

Van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N., Abee, T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. **J. Bacteriol.**, **173** (24): 7934-7941.

Van Den Hooven, H. W., Spronk, C. A., Van De Kamp, M., Konings, R. N., Hilbers, C. W. and Van De Van, F. J. 1996. Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. **Eur. J. Biochem.**, **235** (1-2): 394-403.

Van der Meer, J. R., Polman, J., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P., De Vos, V.M. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. **J. Bacteriol.**, **175** (9): 2578–2588.

Van Der Zwet, T., Beer, S.V. 1995. Fire blight-its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. USDA Agriculture Information Bulletin no 631. U.S. Department of Agriculture, Washington D.C.

Van Kraaij, C., Breukink, E., Noordermeer, M. A., Demel, R. A., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., de Kruijff, B. 1998. Pore formation by nisin involves translocation of its C-Terminal part across the membrane. **Biochemistry**, **37**: 16033-16040.

Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., Chikindas, M.L. 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **J. Appl. Microbiol.**, **84** (6): 311-317.

Van Schaik, W., Gahan, C.G.M., Hill, C. 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147. **Journal of Food Protection**, **62** (5): 536-539.

Venema, K., Chikindas, M.I., Seegers, JFML, Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Venema, G., Kok, J. 1997. Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**: 305-309

Venema, K., Jan, K., Joey, M.D., Marjolein Y., Ledebøer, A.M., Gerard, V. Chikindas, M.L. 1995. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. **Mol. Microbiol.**, **17** (3): 515-522.

Vignolo, G.M., Kaluz, M.N., Ruiz Holgado, A.A.P., Oliver, G. 1995. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. **Journal of Applied Bacteriology**, **78** (1): 5-10.

Villani, F., Pepe, O., Mauriello, G., Salzano, G., Moschetti, G., Coppola, S. 1995. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. **Int. J. Food Microbiol.**, **25** (2): 179-190.

Villani, F., Sannino, G., Moschetti, G., Mauriello, G., Pepe, O., Amodio- Cocchieri, R. 1997. Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages. **Food Microbiology**, **14** (6): 143-147.

Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., P. Kuipers, O., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H.G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor Lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. **J. Biol. Chem.**, **276** (3): 1772-1779.

Williams, R. A. D., Da Costa, M.S. 1991. The genus *Thermus* and related microorganisms. **Thermophilic bacteria.**, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 51–62.

Xie, L., van der Donk, W.A. 2004. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, **8**: 498-507.

Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., Drosinos, E.H. 2008. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science** **80** (2): 194-203

Xiraphi, N., Georgalaki, M., Van Driessche, G., Devreese, B., Van Beeumen, J., Ttsakalidou, E., Metaxopoulos, J., Drosinos, E. 2005. Purification and characterization of curvaticin L442, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* L442. **Antonie van Leeuwenhoek**

Yang, R., Johnson, M.C., Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** **58**: 3355-3359

Zhu, W.M, Liu, W., Wu, D.Q.2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. **Journal of Applied Bacteriology** **88**: 877-886

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gamze BAŞBÜLBÜL
Doğum Yeri ve Tarihi :Turgutlu/1978

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Böl.
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar
-SCI

1) K. Metin, Z.B.B. Ateşlier, G. Basbulbul, H.H. Bıyık. Characterization of esterase activity in *Geobacillus* sp. HBB-4. Journal of Basic Microbiology. Vol. 46, No. 5 (2006)

2) A.Ozmen, G. Basbulbul, T. Aydin. Antimitotic and antibacterial effects of the *Nigella sativa* L. seed. Caryologia, 2007. Vol 60: 270-272

3) H. Unsal, M.Balkaya, C.Unsal, H.Bıyık, G.Basbulbul, E.Poyrazoğlu. The Short-Term Effects of Different Doses of Dexamethasone on the Numbers of some Bacteria in the Ileum. Digestive Diseases and Sciences. 2008. 53: 1842-1845

4) G. Basbulbul, A. Ozmen, H. Halil BIYIK, Ozge Sen. Antimitotic and antibacterial effects of the *Primula veris* L. flower extracts. Caryologia, 2008. Vol 61: 88-91
-Diğer

b) Bildiriler
-Uluslararası
-Ulusal

1) Toprakta izole edilen bazı fungal organizmaların tekstil boyalarında renk giderimi potansiyellerinin araştırılması. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, TRABZON 2008. Özetler kitabı, Sayfa:36

2) Termofilik *Geobacillus toebii* HBB-218 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, TRABZON 2008. Özetler Kitabı: 115

3) Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Termofilik Bakterilerin 16S rRNA Analizi İle Tanılanması. Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, MALATYA 03/05/2007

- 4) Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Termofilik Bakterilerin 16S rRNA Analizi İle Tanılanması. Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, MALATYA 03/05/2007
- 5) Lipolitik Aktiviteye Sahip Termofilik Bakterilerin 16S rRNA Analizi İle Tanılanması. Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, MALATYA 03/05/2007
- 6) Çevresel enterokoklarda makrolidlere ve linkozamidlere direnç mekanizmaları 4. Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi ANKARA 2006/ Poster Özet Kitapçığı-209
- 7) Alangüllü (Aydın) jeotermal kaynağından izole edilen termofilik bakterilerin 16S rRNA analizi ile tanımlanması 4. Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi ANKARA 2006/Poster Özet Kitapçığı- 218
- 8) Aydın ili jeotermal sularındaki termofilik bakterilerin incelenmesi 13. Biyoteknoloji Kongresi, ÇANAKKALE. 2003 Posterler kitapçığı- 45
- 9) Çeşitli çevresel örneklerden izole edilen Enterokokların antibiyotiklere karşı dirençlerinin tespiti 18.Ulusal Biyoloji Kongresi Kuşadası/AYDIN Özet Kitapçığı: 235
- 10) Menderes nehrine deşarj edilen bazı fabrika arıtım tesislerinin çıkış sularının mevsime bağılı olarak mutajentilerinin AMES/Salmonella test sistemiyle belirlenmesi 18.Ulusal Biyoloji Kongresi Kuşadası/AYDIN Özet Kitapçığı- 227
- 11) Hidrazonların Di,Tri,Tetra Oksimli Türevlerinin Sentezi ve Antibakteriyel Aktivitelerinin İncelenmesi. 18.Ulusal Biyoloji Kongresi Kuşadası/AYDIN Özet Kitapçığı-178
- 12) Aydın yöresinden toplanan kapari (*Capparis spinosa* L.) ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi 18.Ulusal Biyoloji Kongresi Kuşadası/AYDIN 2006 Özet Kitapçığı- 157
- 13) Aydın yöresinden toplanan zeytin yaprağı (*Olea europea*) ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi 18.Ulusal Biyoloji Kongresi Kuşadası/AYDIN 2006 Özet Kitapçığı-157
- 14) Semikarbazonların ve tiyosemikarbazonların vic-dioksimli türevlerinin sentezi ve antibakteriyel aktivitelerinin incelenmesi 18. Ulusal Biyoloji Kongresi Kuşadası/AYDIN 2006 Özet Kitapçığı-153

c) Katıldığı Projeler

- 1) Çörek otu (*Nigella sativa*) bitkisinin antimikrobial ve antimitotik etkileri TÜBİTAK ÖĞRENCİ PROJESİ, PROJE DANIŞMANI, (2005).
- 2) Aydın İli Evsel Ve Endüstriyel Atık Sularının Mutajenik Etkilerinin Ames Testi İle Belirlenmesi, A.D.Ü-FEF-3012, Yardımcı araştırmacı, (2003).

- 3) Aydın Yöresi Jeotermal Sularındaki Termofilik Bakterilerin İncelenmesi A.D.Ü- FEF-01003, Yardımcı araştırmacı, Yüksek Lisans Tezi (2001).
- 4) Doğal kaynaklardan izole edilen termofilik bakterilerin bakteriyosin ve bazı endüstriyel enzimler açısından taranması: Bakteriyosinlerin ve en iyi lipolitik aktivite gösteren izolattan enzim karakterizasyonu. TÜBİTAK-106T581, Yardımcı araştırmacı, (2007).
- 5) Antibiyotiklere direncin yayılmasında çevre bakterilerinin önemi. Çevre örneklerinden izole edilen enterokokların antibiyotik dirençleri ve direnç mekanizmalarının tespiti ve moleküler epidemiyolojik analizlerinin yapılması TÜBİTAK, Yardımcı Araştırmacı, (2007).
- 6) Çeşitli doğal kaynaklardan izole edilen termofilik bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması ADÜ-BAP-6009, Yardımcı araştırmacı, Doktora tezi (2006).
- 7) Toprakta izole edilen bazı fungal organizmaların tekstil boyalarında renk giderim potansiyellerinin araştırılması TÜBİTAK 104Y393, Yardımcı araştırmacı, (2006)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2000-

İLETİŞİM

E-posta Adresi : gbasbulbul@adu.edu.tr

Tarih: 15.01.2009