

## Laktik Asit Bakterilerinden Kısmi Saflaştırılan Bakteriyosinlerin Aktivitesi Üzerine pH, Sıcaklık, Kimyasal Maddelerin Etkisi<sup>1\*</sup>

Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI<sup>1\*</sup> Kıvılcım ÇAKTU GÜLER<sup>2</sup> Melis SÜMENGEN ÖZDENEFİ<sup>3</sup>  
Ayşenur ÖZŞAVLI<sup>1</sup> Gülcihan GÜZELDAĞ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kilis, Türkiye.

[ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3388-1153](https://orcid.org/0000-0002-3388-1153), [ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2042-0021](https://orcid.org/0000-0003-2042-0021)

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye. [ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3096-1246](https://orcid.org/0000-0002-3096-1246)

<sup>3</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Lefkoşa, KKTC. [ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0804-9557](https://orcid.org/0000-0003-0804-9557)

<sup>4</sup>Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana, Türkiye. [ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9352-6308](https://orcid.org/0000-0001-9352-6308)

Received date: 02.11.2018

Accepted date: 18.02.2019

Atf yapmak için: Mercimek Takcı, H.A., Çaktu Güler, K., Sümen Gen Özdenefe, M., Özşavlı, A. & Güzeldağ, G. (2019). Laktik asit bakterilerinden kısmi saflaştırılan bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık, kimyasal maddelerin etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 4(1), 16-21. Doi: <https://doi.org/10.35229/jaes.526426>

How to cite: Mercimek Takcı, H.A., Çaktu Güler, K., Sümen Gen Özdenefe, M., Özşavlı, A. & Güzeldağ, G. (2019). Effect of pH, temperature and chemical substances on the activity of bacteriocins partially purified by lactic acid bacteria. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(1), 16-21. Doi: <https://doi.org/10.35229/jaes.526426>

**Öz:** Bakteriler tarafından üretilen ribozomal antimikrobiyal peptidlerin bir çeşidi olan bakteriyosinler, bakterilerin %99'undan fazlası tarafından üretilmektedir. Üretici bakteri ile yakın ilişkili veya ilişkisiz bakteriyel suşların gelişimini inhibe eden bakteriyosinler, insan vücudu için zararsızdır. Patojen bakterilere karşı antibiyotiklere kıyasla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak gıda güvenlik uygulamaları ve gıda korumada potansiyel antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda Kilis yöresel peynirinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretim kapasitesi araştırılmıştır. *Bacillus cereus*, Vankomisin-Dirençli *Enterococci* (VRE) ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktiviteli hücre bağımlı bakteriyosin üreten 3 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Bakteriyosin süspansiyonlarının en etkili olduğu test bakterisi *B. cereus*'tur. Süspansiyonların test bakterileri üzerinde geniş bir pH aralığında (pH 4-12) aktivite gösterdiği belirlenmiş olup, 40°C sıcaklıkta inhibitör etkinin stabilitesini koruduğu gözlenmiştir. Çeşitli kimyasal maddeler ile ön inkübasyonu takiben P2 süspansiyonunun diğer süspansiyonlara karşın aktivitesini sürdürdüğü belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Bakteriyosin, gıda koruma, laktik asit bakterileri

## Effect of pH, Temperature and Chemical Substances on the Activity of Bacteriocins Partially Purified by Lactic Acid Bacteria

**Abstract:** Bacteriocins, one kind of ribosomal antimicrobial peptides, are produced by more than 99% of bacteria. Bacteriocins that are inhibited the growth of bacterial strains closely related or unrelated with producer bacteria, is harmless for human body (Yang vd., 2014). It is not extensively used against pathogenic bacteria in comparison with antibiotics. But, it is evaluated as potential antimicrobial agent in food preservation or food safety applications. In this study, the capability of bacteriocin production of lactic acid bacteria isolated from Kilis local cheese was investigated. 3 lactic acid bacteria producing bacteriocin showed antimicrobial activity against *Bacillus cereus*, Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) and *Staphylococcus aureus* were isolated. All bacteriocin suspensions were effective against *B. cereus*. And bacteriocin suspensions were active a wide range of pH values (pH 4-12) and stable to 40°C heat. Following pre-incubation with the various chemical substances, the activity of P2 suspension was determined to preserve in comparison with other bacteriocin suspensions.

**Keywords:** Bacteriocin, food preservation, lactic acid bacteria.

## GİRİŞ

Uzun raf ömrüne, güzel tat ve kokuya sahip besinlerin hazırlanması ve tüketiciye sunulması gıda endüstrisinin en temel işlevlerindedir. Gıdaların fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik olarak uzun süre dayanıklılığa sahip olması için gıdalara çeşitli katkı maddeleri eklenmektedir. Bu katkı maddelerinin insan sağlığına karşı kanserojen ve toksik etkiye sahip olma gibi olumsuz özelliklerinin keşfi, gıda kalitesinin artırılması konusunda doğal ürünlere olan ilginin artmasına neden olmuştur (Kurt & Zorba, 2005).

Katkısız ve doğal gıda ürünlere olan talep, biyokoruma yöntemiyle hazırlanan gıdaların tüketimine hız vermiştir. Günümüzde gıda endüstrisinde en çok tercih edilen biyokoruma yöntemlerinden birisi laktik asit bakterilerinin (LAB) fermantasyon ürünleridir. Homofermentatif ve heterofermentatif LAB'leri; hidrojen peroksit, organik asitler, antimikrobiyal enzimler, alkol, diasetil, hidrojen sülfür, reuterin, karbondioksit ve bakteriyosinler gibi metabolitlerden birini veya birkaçını sentezlemektedir. Bu metabolitler etki mekanizmalarına bağlı olarak patojenler üzerinde statik ve/veya sidal etkiye sahiptir. Özellikle gıda patojenleri üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. (Yang & Clausen, 2004; Rosslund vd., 2005; Yang vd., 2014).

LAB'lerinin fermente ürünlerinden biri olan bakteriyosinlerin gıda üretiminde kullanılması peynir üretimi kadar eskiye dayanmaktadır (Akkoç vd., 2009). Bakteriyosinler ilk kez 1925 yılında Gratia tarafından *E.coli* S'e karşı gözlenen inhibisyon ile keşfedilmiştir. Kolisin olarak adlandırılan bu bakteriyosinin aktivitesi, duyarlı hücrelerin yüzeyindeki özel proteinlerin varlığına bağlı olduğu 1946 yılında Frederic tarafından ifade edilmiştir (Güllüce vd., 2013). Yeni Zellenda'da 1933 yılında protein yapılı bir antimikrobiyal madde tanımlandı ve 1947 yılında bu bakteriyosin nisin olarak adlandırılmıştır. İngiltere'de ilk kez 1953 yılında pazarlanan nisin o zamandan beri 48'den fazla ülkede kullanılması için onaylanmıştır. Bakteriyosinlerin gıda endüstrisinde kullanımı için 1969 yılında büyük bir adım atılmış ve Ortak Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi tarafından gıdalarda kullanımı güvenli olarak değerlendirilmiştir. Avrupa'da 1983 yılında gıda katkı maddesi listesine E234 numarası ile eklenmiş ve 1988'de pastörize edilmiş peynir çeşitlerinde kullanılması ABD Gıda ve İlaç Ajansı (FDA) tarafından onaylanmıştır (Cotter vd., 2005; Parada vd., 2007).

Gıdalarda sağladığı antimikrobiyal etki sayesinde kimyasal hatta çoğu zaman zararlı sayılan katkı maddelerinin yerini alan bakteriyosinler, gram pozitif ve gram negatif bakteriler tarafından üretilmektedir. Protein yapıdaki bakteriyosinler gıdalar ile insan vücuduna alındığında, proteazlarla kolaylıkla sindirilebilmektedir (Yang vd., 2014). Bu önemli ayrıcalığının yanı sıra tatsız, kokusuz, renksiz olmaları ve aynı zamanda da pH ve sıcaklık toleransına sahip olmaları kullanım alanlarını da arttırmıştır (Kurt & Zorba 2005; Seçkin, 2010; Güllüce vd., 2013). Bakteriyosinlerin

nispeten geniş antimikrobiyal spekturuma sahip olmaları ve gıda kaynaklı bozulmalara karşı dirençli yapısı gıda endüstrisinde kullanılma nedenleri arasında gelmektedir (Güllüce vd., 2013). Hayvan yemlerinde de antibiyotik yerine bakteriyosinlerin kullanımının, hem enfeksiyonların durdurulmasını sağladığı hem de hayvanlarda çoklu ilaç direncinin gelişmesini engellediği gözlenmiştir (Üstündağ & Özdoğan, 2011; Yang vd., 2014). Bazı araştırmacılar kanser tedavisinde de bakteriyosinlerin tümör hücrelerine karşı aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Yang vd., 2014).

Bu çalışmanın amacı, Kilis yöresinden elde edilen geleneksel üretilmiş beyaz peynirlerden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bu bakterilerden antimikrobiyal aktiviteye sahip bakteriyosinlerin üretimi ve gıda endüstrisinde kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır.

## MATERYAL ve METOT

**Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu:** Kilis bölgesinde geleneksel yöntemlerle üretilmiş beyaz peynir örnekleri laktik asit bakterilerini izole etmek için kullanılmıştır. Steril fizyolojik tuzlu (%0.9 NaCl) dilüsyonlarından ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-7}$ ) 100 µL örnek Neutral Red Chalk Lactose Agar'a (NRCLA: et peptonu 3.00 g/L; et özütü 3.00 g/L; maya özütü 3.00 g/L; laktoz 10.00 g/L; kalsiyum karbonat 15.00 g/L; nötral kırmızısı 0.05 g/L; agar agar 15.00 g/L; pH 6.8±0.2) inoküle edilmiştir. GasPak anaerobik sistem kullanılarak plaklar 30°C'de inkübe edilmiştir (Ogunbanwo vd., 2003).

**Bakteriyosin Üreten LAB'ların Seçimi:** Nutrient agar plaklarında geliştirilen bakterilerin, bakteriyosin üretilmediğinin belirlenebilmesi için seçilen izolatlar Mueller-Hinton (MHA) agar plaklarına nokta şeklinde inoküle edilerek 24 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben Luria Bertani (LB) buyyonda 24 saat geliştirilen test bakteri kültürlerinin (*Bacillus cereus*, Vankomisin-Dirençli Enterococci (VRE) ve *Staphylococcus aureus*) 100 µL'si %0.7 agar içeren 5 mL'lik LB buyyona aktarılmıştır. Karışım Mueller Hinton plaklar üzerine dökülerek 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda etrafında test bakterilerinin üremediği şeffaf zonlar görülen laktik asit bakterileri seçilerek stoklanmıştır (van Belkum vd., 1989). LAB'lar Nutrient agar içeren eğik katı şeklinde hazırlanmış besi ortamlarında karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

**Bakteriyosinin Kısmi Saflaştırılması:** Kültürler santrifüj (5500 rpm 60 dak +4°C) edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Süpernatantın pH değeri NaOH ile 7'ye ayarlanmıştır. %50 oranında amonyum sülfat eklenerek 4°C'de 24 saat karıştırılmıştır. Karışım aynı koşullarda santrifüj edildikten sonra pelletler toplanarak 25 mL (pH 7) 0.05 M potasyum fosfat tamponunda süspanse edilmiştir. 15 mL metanol/kloroform (1:2 v/v) karışımı ilave edilerek 4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Kısmi saflaştırılmış bakteriyosin süspansiyonu aktivite testlerinde kullanılmıştır (Moreno vd., 2003).

**Bakteriyosin Aktivite Testi:** Nutrient Broth (NB) buyyonda geliştirilmiş kültürlerin 100 µL'si 4 mL %0.6 agar içeren yumuşak nutrient agar ile karıştırılarak daha önceden hazırlanan MHA plaklarına inkübe edilmiştir. Yarı katı agar donduktan sonra kaba bakteriyosin süspansiyonun 10 µL'si inoküle edilmiştir. 37°C'de 24-48 saatlik inkübasyon sonrası bakteriyosinlere yönelik 2 mm ve daha fazla şeffaf zon çapları pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Ivanova vd., 2000).

#### **Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine, Sıcaklık, pH, Kimyasal Maddelerinin Etkisinin Araştırılması:**

**Isıl İşlemin Etkisi:** Kaba bakteriyosinin ısı stabilitesini belirlemek amacıyla bakteriyosin örneğinin 100 µL'si 40, 50, 60, 70 ve 80°C'de 15 dak bekletilerek oda sıcaklığına soğutulduktan sonra bakteriyosin örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir (Ivanova vd., 2000; Sarika vd., 2010).

**Kimyasal Maddelerin Etkisi:** Bu amaçla, 10 µL bakteriyosin 10 µL organik çözücüyle (formaldehit, kloroform, aseton, metanol, etanol, hekzan ve etil eter) eppendorf tüpte karıştırılarak oda sıcaklığında 1-4 saat bekletilmiştir. Farklı organik çözücülere maruz bırakılan bakteriyosin örneği ile aktivite testi yapılmıştır (Ivanova vd, 2000; Sarika vd, 2010). Bakteriyosin süspansiyonuna SDS ve Triton X-100 deterjanları %1, 5.0 mM konsantrasyonda EDTA ilave edilerek 37°C'de 5 saat inkübe edilmiştir. Ve bu sürenin sonunda bakteriyosin örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir (Ivanova vd., 2000; Sarika vd., 2010).

**pH Etkisi:** Kaba bakteriyosin solüsyonu, 1N'lik NaOH ve 5 M'lük fosforik asit kullanılarak son hacimler eşit olacak şekilde pH'ları 4'den 12'ye kadar ayarlanarak oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra örneklerin pH'sı 7'ye ayarlanıp aktiviteleri belirlenmiştir (Ivanova vd., 2000; Sarika vd., 2010).

## **BULGULAR ve TARTIŞMA**

Yöresel beyaz peynir örneklerinden Neutral Red Chalk Lactose Agar (NRCLA) besi ortamında inokülasyonu takiben kolonilerinin etrafında şeffaf zonlar gözlenen suşlar laktik asit bakterileri olarak belirlenmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Peynirden izole edilen laktik asit bakterilerinin NRCLA agardaki karakteristik davranışı

Bu karakteristik özelliği gösteren sadece 3 adet bakteri kolonisi seçilmiştir. P2, P3 ve P4 olarak isimlendirilen bu suşların gram davranışı ve biyokimyasal aktiviteleri temel alınarak tiplendirilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Laktik asit bakterilerinin biyokimyasal testlerle tanımlanması.

Biyokimyasal testler	Mikroorganizma		
	P2	P2	P2
Gr davranışı	+	+	+
Morfolojisi	Kok	Kok	Kok
Katalaz	-	-	-
30°C'de gelişme	+	+	+
%6.5 NaCl ve 30°C'de gelişme	-	-	-
%4 NaCl ve 30°C'de gelişme	-	-	-
pH 9.6 30°C'de gelişme	-	-	-
45°C/40°C de gelişme	-/-	-/-	-/-
Sitrat fermentasyon	-	-	-
Arjinin hidrolizi	-	-	-

Peynirden izole edilen P2, P3 ve P4 laktik asit bakterilerinin Tablo 1'de verilen mikroskopik ve biyokimyasal testlerin sonuçlarına göre, gram pozitif laktik asit bakterilerini içeren Lactobacillales takımına ait olduğu söylenebilmektedir. Ancak çalışmamızda devam edilecek moleküler teknikler ile bakterilerin tiplendirilmesine tamamlanacaktır.

P2, P3 ve P4 suşlarındaki hücre bağımlı bakteriyosinlerin test bakterilerine karşı (*Bacillus cereus*, Vankomisin-Dirençli *Enterococci* (VRE) ve *Staphylococcus aureus*) inhibitör aktivitesi "sandwich yöntemi" ile incelenmiştir (Şekil 2).



**Şekil 2.** Hücre bağımlı bakteriyosinlerin test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibitör etkisi

Bu izolatlar tarafından üretilen hücre bağımlı bakteriyosinlerin test bakterilerine karşı gösterdiği aktivite, mm cinsinden inhibisyon zon çapı olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Diyarel ve emetik olmak üzere iki gıda kaynaklı hastalık tablosu gösteren *B. cereus* için et, süt, pirinç, pudingler, pastalar, sebzeler, balıklar, makarnalar ve peynir riskli gıdalar arasında yer almaktadır. Mide bulantısı, kusma ve sulu diyare ile karakterize edilen *B. cereus* kaynaklı bu hastalıkların çoğu kendiliğinden geçen, kısa süreli ve orta şiddetlidir (İncili vd., 2015). Söz konusu bu bakteriye karşı P2 ve P3 hücre bağımlı bakteriyosinlerin 21 ve 20 mm inhibisyon zonlu antibakteriyel aktivite P4 suşunda gözlenenenden daha aktiftir (14 mm).

**Tablo 2.** Hücre bağımlı bakteriyosinlerin test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi.

Test bakterileri	İnhibisyon zon çapları (mm)		
	P2	P2	P2
<i>B. cereus</i>	21	21	21
VRE	20	20	20
<i>S. aureus</i>	19	19	19

VRE klinik olarak önemli van A tip vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* gibi direnç genlerini içeren

bakteriyel türlerin çeşitli kombinasyonlarını içermektedir. Gelişim desteği için avoparsin analogu vankomisin geniş kullanımı ile çiftlik hayvanları arasında VRE bulunma sıklığı artmaktadır (Nilsson vd., 2012). Bu hayvanlardan elde edilen ve halk sağlığını olumsuz etkileyen gıda ürünleri ile VRE'nin insanlara ulaşması söz konusudur. Gıda kaynaklı hastalıkların yanı sıra beta-laktamlara ve aminoglikozidlere yüksek düzeyde direnç gösteren Vankomisin-dirençli *Enterococci* hastane kaynaklı enfeksiyonlarda da potansiyel bir fırsatçı patojendir. Bu nedenle çalışmamızda ortalama 20-23 mm inhibisyon zon çapı aralığında belirlenen antimikrobiyal aktivite ile hücre bağımlı bakteriyosinlerin Vankomisin-dirençli *Enterococci* üzerindeki gözlenen inhibitör etkisi önem arz etmektedir.

Gıda pastörizasyonu sırasındaki ısıl işlemlere dayanıklı enterotoksin üreten *S. aureus*; et ve süt ürünleri, balık, patates, salata sosları, mayonez, puding ve makarna gibi yiyeceklerde yaygın olarak görülmektedir (Küçükçetin & Milci, 2007). Ürettiği sitotoksinler ve yoğun antibiyotik direnci sebebi ile 3. dereceden bakteriyemi sebebi olup, pnömoni ve endokardit gibi ciddi hastane enfeksiyonlarına da neden olmaktadır. Bakteriyosin üretici suşlarımızda 13-19 mm zon çapı ile en düşük inhibitör etki *Staphylococcus aureus*'a karşı rastlanmış olsa da gözlenen inhibisyon farklı ajanlar ile kombine edilerek geliştirilebilir potansiyele sahiptir.

Kısmi saflaştırılmış bakteriyosin süspansiyonlarının çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanlar ile etkileşimi sonucu test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkisi Tablo 3, 4 ve 5'te verilmiştir. Sonuçlarımıza göre kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin inhibitör etkisi, bakteri süspansiyonun elde edildiği laktik asit bakterilerine, ön muamele koşullarına ve test edilen bakteri türlerine göre değişiklik göstermiştir.

**Tablo 3.** *B. cereus* üzerinde kısmi saflaştırılan bakteriyosinin mm cinsinden inhibitör etkisi.

Kimyasal Maddeler	Bakteriyosin süspansiyonları		
	P2	P3	P4
Triton X-100	11	13	8
SDS	12	8	7
EDTA	9	6	3
Formaldehit	.*	.*	.*
Aseton	.*	4	7
Kloroform	.*	.*	3
Metanol	8	6	.*
Etanol	.*	11	9
Hekzan	3	.*	.*
Etil eter	.*	.*	.*
<b>pH</b>			
pH 4	.*	.*	.*
pH 6	5	5	6
pH 8	13	10	12
pH 10	9	8	8
pH 12	11	11	13
<b>Sıcaklık</b>			
40°C	11	5	.*
50°C	.*	.*	.*
60°C	.*	.*	.*
70°C	.*	.*	.*
80°C	.*	.*	.*

.\*: İnhibisyon zonu gözlenmemiştir.

Bakteriyosinlerin 50 ve 80°C arasındaki sıcaklıklar ile ön muamele sonucunda test bakterileri üzerinde inhibitör etkisini kaybettiği, ancak 50°C'de ön inkübasyon sonucu sadece P3 laktik asit bakterisinden elde edilen bakteriyosinin 5 mm zon çapı ile *B. cereus*'a karşı aktivite göstermiştir (Tablo 3). Bakteriyosinlerin test bakterileri üzerinde etkili olduğu sıcaklık 40°C'dir. Bu sıcaklıkta P4 bakteriyosin süspansiyonu *B. cereus* bakterisine karşı inhibitör aktivitesini kaybederken, süspansiyonların 12-15 mm zon çapı ile en etkili olduğu suş VRE'dir. Protein yapıdaki bakteriyosinlerin 40°C üzerindeki sıcaklıklarda moleküler yapısının bozulmasına bağlı olarak aktivitesini kaybettiği ifade edilebilmektedir.

**Tablo 4.** *S. aureus* üzerinde kısmi saflaştırılan bakteriyosinin mm cinsinden inhibitör etkisi

Kimyasal Maddeler	Bakteriyosin süspansiyonları		
	P2	P3	P4
Triton X-100	6	7	6
SDS	6	6	6
EDTA	6	5	.*
Formaldehit	.*	.*	.*
Aseton	4	6	3
Kloroform	.*	.*	.*
Metanol	10	2	8
Etanol	.*	.*	.*
Hekzan	.*	.*	.*
Etil eter	.*	.*	.*
<b>pH</b>			
pH 4	.*	.*	.*
pH 6	10	11	10
pH 8	7	6	.*
pH 10	.*	.*	.*
pH 12	.*	.*	.*
<b>Sıcaklık</b>			
40°C	2	5	5
50°C	.*	5	.*
60°C	.*	.*	.*
70°C	.*	.*	.*
80°C	.*	.*	.*

.\*: İnhibisyon zonu gözlenmemiştir

pH'sı 10-12'ye ayarlanmış bakteriyosin süspansiyonları VRE ve *S. aureus*, pH'sı 4'e ayarlanmış bakteriyosin süspansiyonları ise *B. cereus* ve *S. aureus*'a karşı aktivite gösterememiştir. VRE'ye karşı gözlenen en yüksek inhibitör etki 17 mm zon çapı ile pH'sı 8'e ayarlanmış P2 bakteriyosin süspansiyonunda belirlenmiştir. P3 ve P4 süspansiyonun gösterdiği inhibisyon etki 10 ve 15 mm'dir (Tablo 3 ve 4). Diğer kimyasal maddeler ile kıyaslandığında sadece aseton ile ön muamele sonucu bakteriyosin süspansiyonlarının VRE üzerinde etkisini 7-9 mm zon çapı ile koruduğu belirlenmiştir (Tablo 5).

*S. aureus*'a karşı pH'sı 6'ya ayarlanmış bakteriyosin süspansiyonlarının aktiviteleri (10-11 mm) diğer pH değerlerine göre yüksektir. Triton X-100, SDS ve EDTA gibi deterjanlar ile ön muameleyi takiben, sadece P4 süspansiyonu EDTA ile biyolojik aktivitesini kaybederken diğer süspansiyonların 5-6 mm zon çapı ile stabilitesini koruduğu saptanmıştır. Metanol ile ön inkübasyon sonucu

aynı test bakterisine karşı P3 süspansiyonun inhibisyon aktivitesi 2 mm olarak gözlenirken, P2 ve P4 süspansiyonu sırasıyla 10 ve 8 mm'dir.

**Tablo 5.** VRE üzerinde kısmi saflaştırılan bakteriyosinin mm cinsinden inhibitör etkisi

Kimyasal Maddeler	Bakteriyosin süspansiyonları		
	P2	P3	P4
Triton X-100	.*	.*	.*
SDS	.*	.*	.*
EDTA	.*	.*	.*
Formaldehit	.*	.*	.*
Aseton	9	7	8
Kloroform	.*	.*	.*
Metanol	.*	.*	.*
Etanol	.*	.*	.*
Hekzan	.*	.*	.*
Etil eter	.*	.*	.*
<b>pH</b>			
pH 4	5	4	6
pH 6	5	6	4
pH 8	17	10	15
pH 10	.*	.*	.*
pH 12	.*	.*	.*
<b>Sıcaklık</b>			
40°C	15	13	12
50°C	.*	.*	.*
60°C	.*	.*	.*
70°C	.*	.*	.*
80°C	.*	.*	.*

.\*: İnhibisyon zonu gözlenmemiştir

Diğer test bakterilerine kıyasla *B. cereus*'a karşı bakteriyosin süspansiyonlarını geniş bir pH aralığında (pH 6-12) aktivitelerini koruduğu belirlenmiştir. 13 mm zon çapı ile en yüksek inhibisyon pH'sı 8 ayarlanmış P2 ve pH'sı 12'ye ayarlanmış P4 süspansiyonlarında gözlenmiştir. Triton X-100 deterjanı ile ön muamele sonucunda P3 süspansiyonu 13 mm zon çapı ile en yüksek inhibitör etkiye sahiptir.

pH sonuçlarımızı destekler nitelikte, *E. faecium* P21 tarafından üretilen enterosin A ve B'nin pH 2-11 aralığında; *E. faecium* JCM 5804T tarafından üretilen bakteriyosin ise geniş pH aralığında (pH 2-10) aktivitesini sürdürmüştür (Bilgin, 2008). Bayram ve Yıldırım, (2016) beyaz peynirden elde edilen *Enterococcus faecium*'dan elde edilen bakteriyosinin de pH 2-10 aralığında biyolojik aktivitesini sürdürdüğünü belirtmişlerdir.

Deterjanlar (SDS ve Triton X-100) ile ön muamele sonucunda bakteriyosin süspansiyonlarının diğer test bakterilerine karşın en yüksek antibakteriyel aktivitesi *B. cereus*'a karşı ortaya konmuştur. Hekzan ile ön muamele sonucunda sadece P2 süspansiyonun aktivitesini *B. cereus*'a karşı koruduğu belirlenmiştir. Karakterizasyon verilerine dayanarak kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin en etkili olduğu test bakterisi *B. cereus*'tur.

Ancak bakteriyosinlerin özellikle de nisinin endosporların germinasyonunu engellediği bilgisi (Kurt ve Zorba, 2005) en yüksek inhibitör etkinin *B. cereus*'a karşı gözlendiğini açıklamaktadır. *S. aureus* ve *B. cereus*'a karşı gözlenen sonuçlarımıza benzer şekilde *E. mundtii* ST15'den elde edilen bakteriyosinin Triton X-100, SDS ve EDTA tarafından inaktive olmadığı rapor edilmiştir (Bilgin, 2008).

Konsantrasyona bağlı olarak kimyasal maddelerin etkisinin incelendiği çalışmada ise Bayram ve Yıldırım, (2016) %25'lik etanol, metanol, etil eter, kloroform, hekzan ve %40 formaldehit ile ön muamele sonucunda çalışmamızı destekler nitelikte bakteriyosin süspansiyonlarının bazılarının stabilitesini koruduğu ortaya konmuştur.

## SONUÇ

Sonuç olarak hücre bağımlı bakteriyosinlerin kısmi saflaştırılma ve fiziksel/kimyasal ön muameleler sonucunda aktivitelerinin azaldığı gözlenmektedir. Bu sebeple kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin doğrudan gıda katkı maddesi olarak kullanımına nazaran bakteriyosin sentezleyen P2, P3 ve P4 laktik asit bakterilerinin rekabetçi kültür olarak gıdaya aktarılması ve/veya gıdanın koruyucu ambalaj materyali ile kombine antimikrobiyal biyofilmlerde kullanımı önerilebilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma makalesi Kilis 7 Aralık Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2012/1/MAP02 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Akkoç, N., Şanlıbaba, P. & Akçelik, M. (2009).** Bakteriyosinler: Alternatif gıda koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(1-2), 59-70.
- Bayram, M. & Yıldırım, Z. (2016).** Beyaz peynirden bakteriyosin üreten bakterinin (*Enterococcus faecium*) izolasyonu ve bakteriyosinin karakterizasyonu. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 13, 103-115.
- Bilgin, H. (2008).** Fermente süt ürününden izole edilen bakteriyosinjenik bir bakterinin antimikrobiyal aktivitesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Osman Paşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, Türkiye.
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P. (2005).** Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. *Microbiology*, 3, 777-788.
- Güllüce, M., Karadayı, M. & Barış, Ö. (2013).** Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials. *Formatex*, 1016-1027.
- Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S. & Dousset, X. (2000).** Detection, Purification and Partial Characterization of A Novel Bacteriocin Substance Produced By *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* B14 Isolated From Boza Bulgarian Traditional

- Cereal Beverage. *Biocatalysis-2000: Fundamentals & Applications*, 41(6), 47-53.
- İncili, G.K., Dikici, A. & Çalıcıoğlu, M. (2015).** *Bacillus cereus*. *Türkiye Klinikleri Food Hygiene and Technology - Special Topics*, 1(3), 87-91.
- Kurt, Ş. & Zorba, Ö., (2005).** Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. *YYÜ Vet Fak Derg.*, 16(1), 77-83.
- Küçükçetin, A. & Milci, S. (2008).** *Staphylococcus aureus* ile Kontamine Olan Peynirlerden Kaynaklanan Gıda Zehirlenmeleri. *Gıda*, 33(3), 129-135.
- Moreno, F.M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J. & De Vuyst, L. (2003).** Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by *Enterococci* from different sources. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 214-229.
- Nilsson, O. (2012).** Vancomycin resistant enterococci in farm animals occurrence and importance. *Infection Ecology and Epidemiology*, 2, 1-8.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. & Onilude, A.A. (2003).** Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis*. *African Journal of Biotechnology*, 2(8), 219-227.
- Parada, J.L., Carolina, R.C., Adriane, B.P.M. & Carlos, R.S. (2007).** Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 521-542.
- Rosslund, E., Langsruda, T., Granumb, P.E. & Sbrhaug, T. (2005).** Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 193-200.
- Sarika, A.R., Lipton, A.P. & Aishwarya, MS. (2010).** Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(5), 291-297.
- Seçkin, A.K., Tosun, H. & Arıtürk, R. (2010).** Biyokorumanın Süt Endüstrisinde Kullanım Olanakları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(3), 36-46.
- Üstündağ, A.Ö. & Özdoğan, M. (2011).** Kanatlı Hayvan Beslemede Bakteriyosinlerin Kullanım Olanakları. *Hayvansal Üretim*, 52(2), 69-73.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. & Venema, G. (1989).** Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl Environ Microbiol*, 55, 1187-1191.
- Yang, V.A. & Clausen, C.A. (2004).** Antifungal Metabolites of *Lactobacilli*. *Proceedings from the Woodframe Housing Durability and Disaster Issues Conferences*, October 4-6, 2004, Las Vegas, Nevada, USA, 307-311.
- Yang, S.J., Lin, C.H., Sung, C.T. & Fang, J. (2014).** Antibacterial Activities of Bacteriocins: Application in Foods and Pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5(241), 1-10.

**\*Corresponding author's:**

Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI

Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kilis, 79000, Türkiye.

**E-mail:** aysunmercimek@kilis.edu.tr

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3388-1153>