

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BACILLUS SUBTILIS'İN PEYNİRALTI SUYU İÇERİSİNDE
FERMANTASYONU İLE POLİSAKKARİT VE
SURFAKTİN ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Müh. Seda KUŞAKLI

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU

Ocak 2011

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BACILLUS SUBTILIS'İN PEYNİRALTI SUYU İÇERİSİNDE
FERMANTASYONU İLE POLİSAKKARİT VE
SURFAKTİN ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

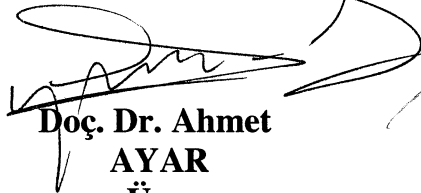
Gıda Müh. Seda KUŞAKLI

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

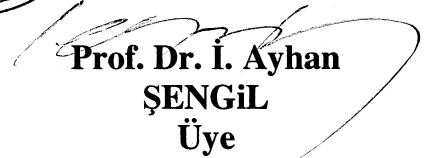
Bu tez 10/01/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.



**Yrd. Doç. Dr. Arzu
ÇAĞRI MEHMETOĞLU
Jüri Başkanı**



**Doç. Dr. Ahmet
AYAR
Üye**



**Prof. Dr. İ. Ayhan
ŞENGİL
Üye**

TEŞEKKÜR

Araştırma konunun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU'na,

Çalışmalarıma yardımcı olan değerli arkadaşım Ruziye ÇAKIR'a ve öğretimim boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli aileme,

Yüksek lisans tez jürimde yer alan Sayın Prof. Dr. İ. Ayhan ŞENGİL'e ve Sayın Doç. Dr. Ahmet AYAR'a katkılarından ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Bacilluslar.....	4
2.1.1. Bacillus cinsi bakteriler ve genel özellikleri.....	4
2.1.2. Bacillus türlerinin besin kaynakları ve üremesi.....	6
2.1.3. Bacillus'ların yüzey yapıları.....	9
2.1.4. S-Katmanları.....	9
2.1.5. Bacillus türlerinde kapsül yapısı.....	10
2.1.6. Bacillus türlerinde hücre duvarları.....	12
2.1.7. Bacillus türlerinde flagella.....	13
2.1.8. Bacillus türlerinde endosporlar.....	14
2.1.9. Bacillus 'larda antimikrobiyal madde üretimi.....	19
2.1.10. Bacillus 'larda antimikrobiyal aktivite.....	20
2.2. Bacillus subtilis.....	22
2.2.1. Bacillus subtilis bakterisinin tarihçesi.....	22

2.2.2. Bacillus subtilis bakterisinin genel özellikleri.....	23
2.2.2. Bacillus subtilis bakterisinin antimikrobiyel madde üretebilme özelliği.....	24
2.2.3.1. Sürfaktin.....	26
2.2.4. Bacillus subtilis bakterisinin polisakkarit üretebilme özelliği.....	27
2.3. Peyniraltı suyu.....	29
2.3.1. Peyniraltı suyunun besin değeri.....	29
2.3.2. Peyniraltı suyunun değerlendirilmesinin ekolojik önemi.....	31
2.3.3. Peyniraltı suyunun besiyeri olarak kullanıldığı çalışmalar...	32

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Materyal ve kimyasallar.....	35
3.1.2. Kullanılan alet ve ekipman.....	35
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	36
3.2. Metod.....	37
3.2.1. B. subtilis kültürünün hazırlanması.....	37
3.2.2. Peyniraltı suyu çözeltisinin hazırlanması ve kültürün eklenmesi.....	37
3.2.3. Vejetatif hücre sayılarının belirlenmesi.....	37
3.2.4. Spor sayısının belirlenmesi.....	38
3.2.5. Viskozite belirlenmesi.....	38
3.2.6. pH ölçümü.....	39
3.2.7. Laktoz miktarının belirlenmesi.....	39
3.2.8. Polisakkarit miktarının belirlenmesi.....	39
3.2.8.1. Standartların hazırlanışı.....	40
3.2.9. Sürfaktin tayini.....	41
3.2.9.1. Sürfaktin izolasyonu	41
3.2.9.2. Standart sürfaktin çözeltilerinin hazırlanması.....	41
3.2.9.3. Solvent hazırlanması.....	41

3.2.9.4. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile surfaktin konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	42
3.2.10. İstatistik metot.....	42
BÖLÜM 4.	
SONUÇLAR.....	43
4.1. Vejetatif Hücre Sayımları.....	43
4.2. Spor Sayımları.....	44
4.3. pH Değerleri.....	45
4.4. Viskozite Değerleri.....	46
4.5. Laktoz Miktarları.....	46
4.6. Polisakkarit Miktarları.....	47
4.7. Surfaktin Miktarları.....	48
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

PAST	: Peyniraltı suyu
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
ppm	: Milyonda bir birim(mg/L)
TSA	: Triptik soy agar
TSB	: Triptik soy broth
L	: Litre
ml	: Mililitre
YPK	: 5 g/l pepton, 2 g/l maya ekstraktı, 20 g/l glukoz, 5 g/lKH ₂ PO ₄ ve 1 mg/l tiamin)
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
G	: Guanin
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
(NH ₄) ₂ HPO ₄	: Diamonyum fosfat
MgSO ₄ 7H ₂ O	: Magnezyum sülfat hepta hidrat
NH ₄ NO ₃	: Amonyum nitrat
FeSO ₄ 7H ₂ O	: Ferrus sülfat hepta hidrat
MnSO ₄ 7H ₂ O	: Manganaz sülfat hepta hidrat
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
H ₂ O	: Su
NaCl	: Sodyum klorür
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
DAP	: Diaminopimelik asit
UV	: Ultraviyole
g	: Gram
mM	: Milimolar
v/v	: Hacim/Hacim

DAD	: Diode-Array Dedektör
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
M	: Molar
NaOH	: Sodyum hidroksit
HCl	: Hidroklorik asit
mN/m	: Yüzey gerilimi birimi
BOG	: Biyolojik oksijen gereksinimi
Fe	: Demir
N	: Normal
Da	: Dalton
Rpm	: Devir/dakika
Nm	: Nanometre
L	: Litre
dk	: Dakika
ppb	: Bir karışımdaki toplam madde miktarının milyarda biri
μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Kapsüllü Bacillus türlerinin J-agarda Mucoïd-tip kolonisi.....	8
Şekil 2.2.	Bacillus'un yapısı.....	9
Şekil 2.3.	Bacillus anthracis FA boyamalı kapsül yapısı.....	11
Şekil 2.4.	Bacillus anthracis'in kapsülünün negatif boyanma hali.....	11
Şekil 2.5.	Bacillus megaterium'nın peptidoglikanındaki muropeptit alt birimi.....	12
Şekil 2.6.	Flagellalı Bacillus türleri.....	13
Şekil 2.7.	Nutrient agarda fotoğraflanmış Bacillus'lara ait özel hücre yapıları.....	13
Şekil 2.8.	Bacillus anthracis ve Bacillus thuringiensis türlerinin mikroskopik görüntüleri.....	14
Şekil 2.9.	Bacillus türlerinin spor boyaması.....	15
Şekil 2.10.	Prokaryotik bir hücrede karmaşık ve yüksek düzenli bir endosporun oluşumu.....	15
Şekil 2.11.	Sporların yapısı.....	17
Şekil 2.12.	B. subtilis hücresinin mikroskopik kesit resmi.....	23
Şekil 3.1.	Oswalt viskozimetresi.....	39
Şekil 4.1.	Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince B.subtilis vejetatif hücre sayısındaki değişim.....	43
Şekil 4.2.	Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince B.subtilis sporu sayısındaki değişim grafiği.....	44
Şekil 4.3.	Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince zaman-pH değişim grafiği.....	45
Şekil 4.4.	Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince zaman-viskozite değişim grafiği.....	46

Şekil 4.5.	Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince laktoz miktarındaki değişim grafiği.....	47
Şekil 4.6.	Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde 72 saat inkübasyon sonundaki polisakkarit miktarları grafiği.....	48

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Bacillus megaterium'un gelişmesi için minimum ortam koşulları	8
Tablo 2.2. Endosporlar ve onu oluşturan vejetatif hücreler arasındaki farklar.....	18
Tablo 2.3. Peyniraltı suyunun bileşimi.....	30
Tablo 3.1. Hazırlanan standart çözeltiler.....	40

ÖZET

Anahtar kelimeler: Peynir altı suyu, *B. subtilis*, Polisakkarit, Sürfaktin

Bu çalışmanın amacı peynir altı suyu tozu ortamında *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakterisinden polisakkarit ve surfaktin üretiminin araştırılmasıdır. *B. subtilis* (9.1 log/ml) %10, 15 ve 20 konsantrasyonlarında peynir altı suyu tozu (PAST) çözeltilisine inoküle edildi. Bu çözeltiler 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Çözeltilerdeki *B. subtilis* vejetatif hücre sayısındaki değişim, spor miktarı, viskozite, pH ölçümleri ve laktoz tayini inkübasyonun 24, 48 ve 72. saatlerinde yapıldı. Polisakkarit ve surfaktin tayini inkübasyonun 72. saatinde gerçekleştirildi. Polisakkarit miktarı fenol-sülfirik asit metoduna göre belirlendi. Standart olarak gellan kullanıldı. Surfaktin miktarı ise yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlendi. Inkübasyon sonunda (72. saat) ise polisakkarit ve surfaktin miktarları belirlendi. PAST çözeltilerinin pH'sı 24 saatin sonunda 6.8' den 5.2'ye ve inkübasyonun Sonunda da (72 saat) 4.99' a düştüğü tespit edilmiştir. *B. subtilis* mikroorganizma sayısı 72 saat inkübasyon sonunda % 10'luk PAST çözeltilisinde 9.1 log kob/ml'den 10.54 log/ml'ye, % 15' likte 9.82 log/ml'ye ve %20'likte de 9.38 log/ml'ye yükselmiştir. 48-72 saatleri arasında %10'luk PAST çözeltilisinde vejetatif hücre sayısı 11.62 log' tan 10.54 log' a düşmüştür ve spor miktarı da 3.91 log' dan 4.72 log' a artış göstermiştir. 72 saat fermentasyonun sonunda %10, %15 ve %20'lik PAST çözeltilerinde polisakkarit miktarları sırasıyla 394.6 ppm, 412 ppm ve 422.5 ppm olarak belirlenmiştir. Çalışmada HPLC ile yapılan surfaktin analizi sonucunda *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun %10, %15 ve %20 PAST çözeltileri ortamında surfaktin üretmediği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada PAST çözeltilisinin *B. subtilis* ATCC 6633 bakterisinin üremesi ve polisakkarit üretmesi için uygun, surfaktin üretmesi için uygun olmayan bir besiyeri olduğu sonucuna varılmıştır.

SURFACTIN AND POLISACCHARIDE DETERMINATION WITH FERMENTATION OF *BACILLUS SUBTILIS* IN WHEY POWDER SOLUTIONS

SUMMARY

Keywords: Whey Powder Solution, *Bacillus subtilis*, Pollysaccharide, Surfactin

The aim of this research was to investigate production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in whey medium. One day cultured *B. subtilis* (9.1 log/ml) was inoculated to 10, 15 or 20% of 100 ml whey powder solutions. Inoculated whey powder solutions (WPS) were incubated at 30°C for 72 hours. Viscosity, pH, the number of vegetative cell and spores and the amount of polysaccharide and surfactin were determined at 0, 24th, 48th or 72nd hours of incubation. Polysaccharide amount was measured according to phenol-sulphric acid method. Surfactin was measured by HPLC. For preparing standard curve gellan standards were used. The results indicated that pH of WPS was decreased from 6.8 to 5.2 in 24 hours and pH was 4.99 at the end of the incubation (72 h). Viscosity of 10% and 20% WPS were increased 1.27 and 1.10 times at 72 hours, respectively. The number of *B. subtilis* increased from 9.09 to 10.54 log/ml in 10%, 9.82 log/ml in 15%, 9.38 log/ml in 20% WPS during 72 hours. Among 48-72 hours in 10% whey solution the amount of microorganisms were decreased from 11.62 log to 10.54 log and spore formation were increased from 3.91 log to 4.72 log. Moreover, at the end of 72 h fermentation, the amount of polysaccharide produced by *B. subtilis* was determined as 394.6 ppm, 412 ppm and 422.5 ppm in 10, 15, 20% WPS, respectively. In this study *B. subtilis* ATCC 6633 could not produce surfactin in 10%, 15% and 20% WPS medium. As a result, the result of this study showed that WPS is not useful for surfactin production, but could be used for fermentation base of *B. subtilis* to produce polysaccharide.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Bir sütçülük atığı olan peynir altı suyu gerek besin değeri ve fonksiyonel özellikleri açısından gerekse çevre kirlenmesine neden olmasından dolayı ülkemizde ve tüm dünyada son yıllarda önem kazanmıştır (Alpkent ve Göncü, 2003).

Çevre kirlenmesinin yanı sıra ekonomik açıdan bakıldığında yapısında süt kurumaddesinin yaklaşık yarısını bulduran bu ara ürünü değerlendirmeden atmanın büyük bir kayıp olduğu ortaya çıkmaktadır. Devlet İstatistik Enstitüsü verilerine göre 2000 yılındaki süt üretimimizin 9.793.962 ton olduğu (Anonim, 2000) ve bunun yaklaşık %20' sinin peynire işlendiği düşünülürse, 1.958.792 ton sütün peynir üretimi için kullanıldığı anlaşılmaktadır. Peynir üretiminde kullanılan sütün de %70-90'lık kısmının peynir suyu olarak ayrıldığı kabul edildiğinde, alt sınırdaki elde edilen peynir suyu bile 1.371.154 tondur. Peynir suyu %93.3 su, kuru madde %6.7, yağ %0.9, protein %0.9, süt şekeri %4.4, kül %0.5 ihtiva etmektedir (Uraz, 1981). Peynir suyunun bileşimi göz önüne alınarak yapılan hesaplamada, belirtilen miktarlardaki peynir suyu ile birlikte, yılda yaklaşık 60.330 ton laktozun, 12.340 ton proteinin, 12.340 ton yağın, 6856 ton mineral maddenin büyük bir kısmının değerlendirilmeden atıldığı ortaya çıkmaktadır. Bu bakımdan ülkemizde peynir suyunun çeşitli şekillerde değerlendirilmesi ekonomik açıdan büyük önem taşıdığı ortaya çıkmaktadır (Alpkent ve Göncü, 2003).

Peynir altı suyu; % 8 protein, % 0.17 yağ, % 4.7 laktoz, 0.5mg/100g mineral içermektedir (Üçüncü, 1996). Yapısında bulunan kalsiyum, fosfor, laktoz ve serum proteinleri peynir altı suyunun besin değerini yükseltmektedir (Gülsün ve Sahan, 1992). Peynir altı suyu gıda sanayinde önemi geç fark edilen, besin ve fonksiyonel değeri açısından büyük önem taşıyan bir sütçülük atığıdır. Taşıdığı yüksek değerli besin maddelerinden dolayı peynir altı suyu özellikle süt teknolojisi gelişmiş bir çok ülkede çok değişik yöntemlerle ve farklı şekillerde değerlendirilmektedir. Özellikle

içerdiği laktoz, protein ve mineral maddeler dolayısıyla çeşitli mikroorganizmalar için besi ortamı olarak kullanılması çalışmaları yapılmaktadır (Dlamini ve Peiris, 1997; Konar ve Kahyaoglu, 2006).

Sudhakar Babu ve ark. (1996) ramnolipit elde edilmesinde bazı yapay maddeler ve peynir altı suyunu besi ortamı olarak kullanmışlar ve mikroorganizmaların peynir altı suyu atık maddelerinde spesifik büyüme oranları ve ürün oluşturma oranlarının yapay besi ortamlarına göre daha iyi sonuçlar verdiğini ve ramnolipit biyosümfektanı elde edilmesinde peynir altı suyu atık maddelerinin kullanılabilceğini bildirmişlerdir (Sudhakar-Babu ve ark., 1996).

Dubey ve Juwarkar (2001) yapmış oldukları bir çalışmada yağlardan izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* BS2 kültürlerinin yapay besi ortamında yüzey gerilimini 57 mN/m'den 27 mN/m'ye düşürdüğü ve 0.97g/l ramnolipit biyosümfektanı üretildiğini, peynir altı suyunda ise 0.92 g/l ramnolipit biyosümfektanı üretildiğini yüzey gerilimi 72 mN/m'den 27 mN/m'ye düştüğü, kritik misel konsantrasyonun 0.028 g/l olduğunu ve peynir altı suyunun ramnolipit biyosümfektanı üretiminde uygun bir besi ortamı olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Çelikol (1975), peynir altı suyunun besi ortamı olarak kullanılmasını araştırmış, agar olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir.

Ayrıca *B. subtilis*'in bir çok çalışmada polisakkarit ve surfaktin gibi antibiyotik maddeler ürettiği kanıtlanmıştır (Desai ve ark., 1997; Mitsud ve ark., 1981). *Bacillus* türleri, geç logaritmik faz veya erken sabit fazda ikincil metabolit olarak antibiyotik üretme kapasitesindedirler ve sporulasyon olayı başladığında, antimikrobiyal üretimine de başlarlar (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). *B. subtilis* ATCC 21332 suşunun en güçlü biyosurfaktanlardan biri olduğu bilinen surfaktin antibiyotiği ürettiği bildirilmiştir (Desai ve ark., 1997). Ayrıca bazı araştırmacılar tarafından *Bacillus* türleri tarafından antibiyotiklerin yanı sıra oldukça viskoz ve üstün pseudoplastik özelliklere sahip ekstraselular polisakkaritlerin üretildiği bildirilmiştir (Mitsud ve ark., 1981).

Bu çalışmada süt endüstrisinin atık maddesi olan peyniraltı suyunun çevreye zarar vermeden değerlendirilmesi ve ekonomiye tekrar kazandırılması amacıyla peynir altı suyundan mikrobiyal yolla polisakkarit ve surfaktin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle çalışmada değişik konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu solüsyonları besi ortamı olarak kullanılarak bu besi ortamında *Bacillus subtilis* bakterisinin polisakkarit ve surfaktin üretimi araştırılmıştır. Ayrıca *B. subtilis* bakterisinin bu besi ortamında inkübasyon süresince vejetatif hücre miktarları, spor miktarları, besi ortamındaki pH, viskozite ve laktoz miktarının değişimi incelenmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Bacilluslar

2.1.1. *Bacillus* cinsi bakteriler ve genel özellikleri

Bacillus cinsi bakteriler *Bacillaceae* familyasına dahil olan, gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Toprak, su ve çeşitli gıdalarda bulunurlar, çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrotrof ve termofilik türleri de olduğu bilinmektedir (Ayhan, 2000).

Bacillus cinsinin endospor oluşturabilme yetenekleri vardır (Kalkan ve Halkman, 2006). Vejetatif hücrelerin çapları $0,5 \times 1,2$ μm ile $2,5 \times 10$ μm çapları arasında değişiklik gösterir. *Bacillus* cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır.

Elliye yakın türü ihtiva eden *Bacillus*'larda, endosporların hücre içindeki yerleri farklılık gösterebilir (Kalkan ve Halkman, 2006). Spor hücre merkezinde veya uçta olabilir. Vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir. Şekeri fermente ederler ve gaz oluşumu görülmezsizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşumu altında parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA'larındaki G+C mol oranı %32–62'dir (Çon ve Gökalp, 1997).

Bacillus 'ların bazı türleri güçlü proteolitik özellik gösterir, buna karşın bazı türleri ya zayıf proteolitik özellik gösterir veya hiç göstermez (Metin, 1998). *Bacilluslar*'ın aktif proteolitik türleri genellikle ekşitilmeden pıhtılaştırılan süt ürünlerinde kullanılır. *Bacillus* türleri arasında lipolitik olan bakteriler de bulunmaktadır.

Bacillus türlerinin tanımlanması ve türler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için spor ve sporangium morfolojileri temel alınmıştır. Buna göre *Bacillus* türleri 3 grupta toplanmıştır.

Birinci grup *Bacillus* türleri:

Kendi içlerinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki grupta sporangia şişmemiştir. Sporlar elips veya silindirik şekilli, santral veya terminal konumludur. Gram pozitiflerdir. A grubu ve B grubu arasındaki fark ise A alt grubunda hücre genişliği 1 µm'den küçük, B alt grubunda ise 1 µm'den büyüktür. A alt grubuna örnek olarak *B. megaterium* ve *B. cereus*; B alt grubuna örnek olarak *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus* ve *B. coagulans* verilebilir (Kalaylı ve Beyatlı, 2003) .

İkinci grup *Bacillus* türleri:

Bu grup *Bacillus* türlerinde sporangia şişmiştir. Sporları elips, santral veya terminaldir. Bu grupta yer alan türlere örnek olarak *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. brevis* verilebilir.

Üçüncü grupta *Bacillus* türleri:

Bu grup *Bacillus* türlerinde de sporangia şişmiştir. Sporlar küresel, subterminal ve terminal konumludur. *B. sphaericus* bu gruba örnektir .

Bir çok türü bulunan *Bacillus* 'lar toprak, su ve çeşitli gıdalarda bulunurlar. *Bacillus anthracis* insan ve hayvanlarda şarbon hastalığına neden olur (Kalaylı ve Beyatlı, 2003). *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *B. lentimaorbus*, *B. popilliae* ve *B. sphaericus* 'un bazı türleri böcek patojenidir ve *B. thuringiensis* biyoinsektisit olarak kullanılmaktadır. *B. cereus* 'un bazı suşları insanlarda gıda zehirlenmesine neden olur. *B. coagulans* ve *B. stearothermophilus* 4.2 gibi oldukça düşük pH değerlerinde gelişebilirler ve özellikle konserve gıdalarda bozulmalara neden olurlar. *B. stearothermophilus* sporları, bakteri sporları arasında ısıya en dirençli sporlardır. *B. coagulans* (*B. thermoacidurans*) sıcaklığa daha az, ancak asitliğe daha fazla dayanıklıdır.

B. subtilis, subtilin adlı bir bakteriyosin üretmektedir. *B. licheniformis* basitrasin, *B. polymyxa* ise polimiksin antibiyotiklerinin üretiminde kullanılır. *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* bakteriyel α -amilaz enzim üretiminde kullanılmakta olup, amilaz ve amilodekstrini dekstrinlere parçalar (Ayhan, 2000) .

Birkaç *Bacillus* türü polipeptit sınıfı antibiyotik üretir. Antibiyotikler, kültürlerde spor oluşturma aşaması başladığında gözlenmiştir (Kalaylı ve Beyatlı, 2003) . Ayrıca *Bacillus* cinsine ait türlerin bazılarında ekstrasellüler enzim sentezlediği ve bu enzimlerin, endüstriyel öneme sahip olduğu belirtilmektedir (Topuz ve ark., 2007).

2.1.2. *Bacillus* türlerinin besin kaynakları ve üremesi

Aerobik spor üreticileri değişik kemoheterotrof olup çeşitli basit organik bileşenleri (şekerler, amino asitler, organik asitler) kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Bazı durumlar da karbonhidratları fermente ederek karışık reaksiyonlar sonucu gliserol ve butandiol üretirler. *B. megaterium* gibi bazı türler de, organik büyüme faktörüne gerek duymaz, diğerleri bazen aminoasitlere ve B vitaminlerine ya da her ikisine de gereksinim duyabilirler. *Bacillus* cinsine ait bakteriler çeşitli hidrolitik enzimler üreterek çeşitli protein, karbonhidrat, yağ, glikozid, alkol ve organik asitleri kullanabilirler (Turantaş ve Ünlütürk, 1999; Todar, 2009).

Bacillus bakterileri karbon kaynağı olarak organik asit, şeker, alkol ve nitrojen kaynağı olarak amonyum içeren besiyerlerinde iyi gelişirler. Gelişimleri sıvı ve katı besiyerlerinin üst kısımlarında olmaktadır. Katı besiyerlerinde kenarları ve üzeri pürüzlü, granüller yapıda olan koloniler meydana getirirler (Tunail ve ark., 1986; Taubman, 1992; Arda, 2000).

30 ila 45 °C arasında optimum gelişme gösteren mezofil türleri vardır, bazıları da 65°C üzerinde gelişen termofillerdir. Diğer *Bacillus* türleri de 0°C 'de çoğalan ve spor üreten psikrofillerdir. pH 2 ila 11 arasında gelişme gösterebilirler. Optimum laboratuvar koşullarında *Bacillus* türlerinin jenerasyon süreleri 25 dakika kadardır (Todar, 2009).

Ayrıca *B. subtilis*'in bir çok çalışmada polisakakrit ve surfaktin gibi antibiyotik maddeler ürettiği kanıtlanmıştır (Mitsud, ve ark., 1981; Desai ve ark., 1997). *Bacillus* türleri, geç logaritmik faz veya erken sabit fazda ikincil metabolit olarak antibiyotik üretme kapasitesindedirler ve sporulasyon olayı başladığında, antimikrobiyal üretimine de başlarlar (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Çoğu aerobik spor üreten çeşitleri bakterioloji laboratuvarında kolayca üretilebilir ve izole edilebilir. En basit aerobik spor üreticisi *Bacillus* türünü zenginleştirme tekniği sulandırılarak 80°C'de 15 dakika pastörize edilmiş toprağın nutrient agaraya yayma yöntemi ile 37°C'de 24 saat veya bir kaç gün inkübe edilmesiyle gerçekleştirilebilir. Plaklar 24 saat sonra incelenir ve tipik koloniler katalaz pozitif, gram pozitif, endospor formunda çubuk şeklinde olarak belirlenir. Çoğu tür 24 saat içerisinde sporangia ve spor içerse de bazı kültürler 5-7 gün inkübe edilmelidir, böylece içerisindeki olgun endosporun boyut ve şekli gözlenebilir. Haşere patojenleri *Paenibacillus larvae*, *P. popilliae* and *P. lentimorbus*, ortam şartlarına karşı seçicidirler bu nedenle J-agar kullanılır. Ayrıca bu türler katalaz negatiftirler ve bu türlerin sporulasyonu için özel bir ortam olan haşere konukçuya inokülasyonları gerekir (Todar, 2009).

Bacillus'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunmaktadır. Çok yüksek ısı derecelerinde bile canlı kalabilirler. Genellikle 30- 40°C' de ve pH 7 civarında ürerler (Taubman, 1992).

Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürer. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran yapay ortamlarda çok iyi gelişirler (Altun ve ark., 2002).



Şekil 2.1. Kapsüllü *Bacillus* türlerinin J-agarda Mucoid-tip kolonisi

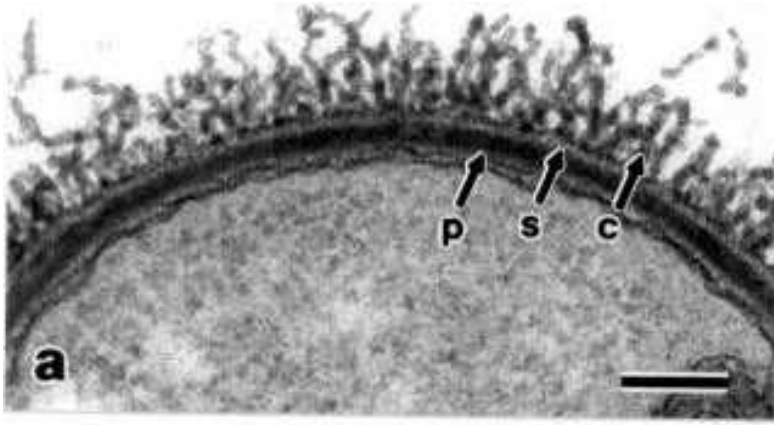
Çoğu *Bacillus* türleri belirli veya göreceli olarak basitten karmaşığa değişik ortamlarda gelişebilirler. Birkaç basil (örneğin, *B. subtilis*, *B. megaterium*) için minimal ortam belirlenmiştir. Başlıca izolatlar hem nutrient agarda (pepton 5g/l, beef ekstrakt 3g/l, agar15g/l, pH 6.8) hem de J-agarda (tripton 5g/l, yeast ekstrakt 15g/l, K_2HPO_4 3g/l, glukoz 2g/l, agar20g/l, pH 7.4) gelişme göstermişlerdir. Stok kültürler toprak ekstraktı veya özel sporulasyon ortamında laboratuarda gelişimini sürdürmüşlerdir (Todar, 2009).

Tablo 2.1. *Bacillus megaterium*'un gelişmesi için minimum ortam koşulları (Todar, 2009)

Bileşen	Miktar
sükroz	10.0 g
K_2HPO_4	2.5 g
KH_2PO_4	2.5 g
$(NH_4)_2HPO_4$	1.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.007 g
su	985 ml
pH	7.0

2.1.3. *Bacillus*'ların yüzey yapıları

Diğer gram pozitif bakteriler gibi *Bacillus* türlerinin de yüzey yapısı komplekstir ve bu karmaşıklık yapışkanlık, direnç ve yanıt şekilleri ile ilişkilidir. Vejetatif hücre yüzeyleri bir kapsül, bir protein yüzey tabakası (S-katmanı) ve peptidoglikan örtüsü katmanları ve plazma membranının dış yüzeyini saran proteinlerden oluşan tabakalı bir yapıya sahiptir (Todar, 2009).



Şekil 2.2. *Bacillus*'un yapısı. C=Kapsül; S=S-katmanı; P=Peptidoglikan (Todar, 2009)

2.1.4. S-katmanları

Bacillus cinsinin üyelerinde protein veya glikoprotein alt birimi S-katmanı olarak isimlendirilen kristal yüzey tabakası bulunmuştur. Diğer bakteri türlerindeki S-tabakaları gibi *Bacilluslar*'daki S-katmanlarının da fonksiyonu bilinmemekle beraber yapışma etkeni oldukları tahmin edilmektedir. Bu da S-katmanlarının bazı gram pozitif bakterilerinin negatif yüklü peptidoglikan kılıfını fiziksel olarak maskeliyebileceğini otoaglitünasyonu önleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca bu tabakanın bakteri-metal etkileşimlerinde de rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (Todar, 2009).

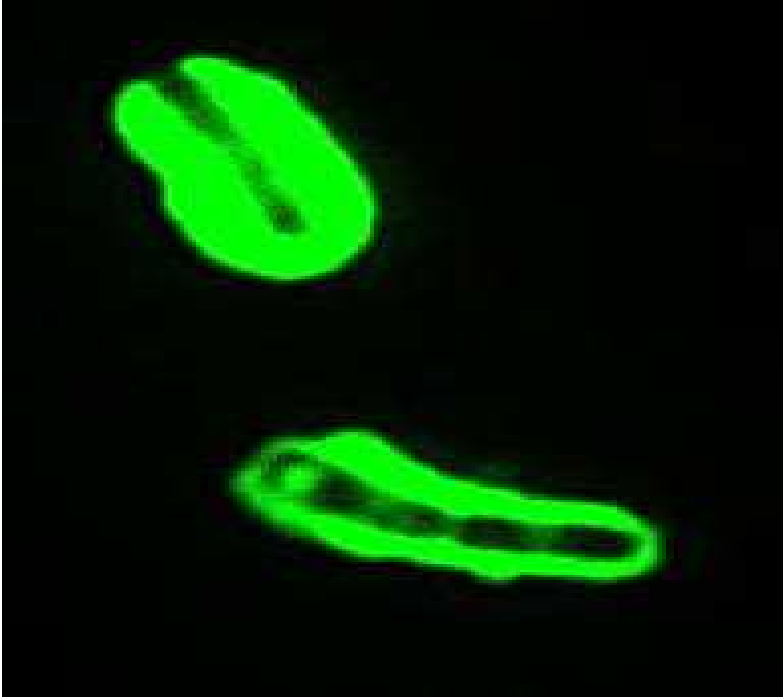
2.1.5. *Bacillus* türlerinde kapsül yapısı

Bir çok *Bacillus* türünün kapsülü, (örneğin *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, and *B. licheniformis*) poli-D- veya L-glutamik asit içerir. Diğer *Bacillus* türleri, örneğin, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. mycoides* ve *B. pumilus* karbonhidrat kapsülü üretirler. Dekstran ve levan yaygın olmakla beraber daha kompleks polisakkaritler de üretebilirler (Todar, 2009).

Bacillus bakterilerinin hücrelerinde genelde sitoplazmik membran üzerinde bir veya birkaç aniyonik polimer ve birkaç peptidoglikan tabaka ile sarılmış hücre duvarı bulunmaktadır. Bazı *Bacillus* türleri hücre duvarından ayrı olarak ve hücre duvarının dışında jelatinöz, viskoz, elastik veya mukoid karakterde kapsül içermektedirler. *Bacillus anthracis*'de bulunan kapsül virülans etkiye sebep olmaktadır (Seneath, 1986; Rosovitz ve ark., 1998; Arda, 2000). *Bacillus megaterium* ise hem polipeptit hem de polisakkarit içeren bir kapsül sentezler. Polipeptit hücre eksenine boyunca yan tarafa yerleşmiştir ve polisakkarit hücre ekvatorunun kutuplarında yer alır (Todar, 2009).

Bazı *Bacillus* türlerinin polisakkaritleri insan patojenlerini de içeren bazı diğer bakteri sınıflarının antiserumları ile pozitif reaksiyon verir (örneğin *B. mycoides*, *Streptococcus pneumoniae* tip III ile; *B. pumilus*, *Neisseria meningitidis* grup A ile). Aynı şekilde, *Paenibacillus alvei*'nin kapsül polisakkariti antijenik olarak *Haemophilus influenzae* tip B'ninkine benzemektedir (Todar, 2009).

Elektron mikroskobu ile incelenen bazı polipeptitlerin ve kompleks polisakkaritlerin kapsülleri hücre yüzeyinde fibriller olarak dizildiği gözlenmiştir. Kapsüller ışın mikroskobu ile kolayca gözlenebilmiştir. Özellikle bakteri besiyerinde geliştikten sonraki zamanda kapsül üretimi artış göstermektedir. Genellikle kapsüllü suşlar agarda mukoid veya sümüksü bir şekilde oluşabilirler (Todar, 2009).



Şekil 2.3. *Bacillus anthracis* FA boyamalı kapsül yapısı (Todar, 2009)



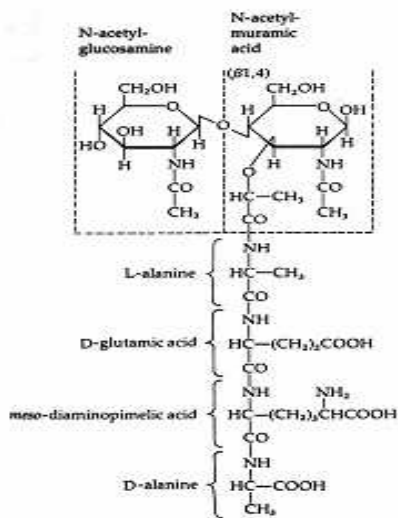
Şekil 2.4. *Bacillus anthracis*'in kapsülünün negatif boyanmış hali (Todar, 2009)

B. anthracis'in kapsülü poli-D-glutamik asitten oluşur. Kapsül antraks virüsünün en büyük belirleyici faktörüdür. Kapsül *B. anthracis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'in yakın akrabaları tarafından sentezlenmez. Bu da türleri ayırt etmekte kullanılabilen bir kriterdir (Todar, 2009).

2.1.6. *Bacillus* türlerinde hücre duvarları

Birçok gram pozitif bakterilerde yaygın olan hücre duvarı yapısı çeşitliliği *Bacillus*'lar için geçerli değildir (Todar, 2009). Yaklaşık olarak tüm *Bacillus* türlerinin vejetatif hücre duvarı yapısı meso-diaminopimelic acid (DAP) içermektedir (*Sporosarcina pasteurii* ve *S. globisporu*' un hücre duvarı yapısı DAP yerine lisin içerir.) Bu tip hücre duvarı yapısı yaklaşık olarak tüm gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapıları ile aynıdır. Bazı durumlarda *Enterobacteriaceae*'larda olduğu gibi DAP direk olarak D-alanin ile çapraz bağlıdır, birçok gram pozitif bakterilerde olduğu gibi peptidoglikanın 2 tetrapeptit yan zinciri DAP ve D-alanin ile interpeptit köprüsü kurmuştur (Todar, 2009).

Hücre duvarındaki peptidoglikana ilaveten tüm muramik asit residüleri ile bağlı *Bacillus* türleri teikoik asit içerir gliserol teikoik asitler *Bacillus* türleri arasında çeşitlilik gösterir (Todar, 2009). Diğer birçok gram pozitif bakteride olduğu gibi *Bacillus* türlerinin de hücre duvarında lipoteikoik asitler bulunur. Hücre duvarındaki bu bileşiklerin otolitik aktivite ile sentezlendikleri düşünülmektedir ve bakterinin 2 değerlikli iyonlarının çöpçüsü gibidirler (Todar, 2009).



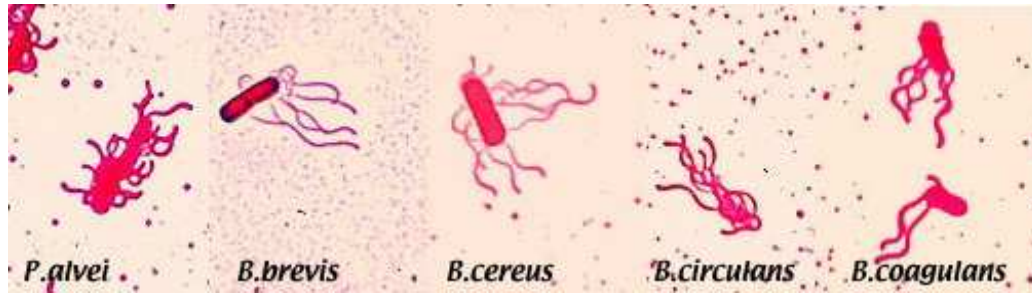
Şekil 2.5. *Bacillus megaterium*'nın peptidoglikanındaki muropeptit alt birimi

Bir çok *Bacillus* türünde D-alanini meso- diaminopimelik aside (DAP) bağlayan bir interpeptit köprüsü yoktur. İlâveten tüm *Bacillus* sporları spor korteksinde Şekil 2.5'deki muramik asit alt birimi içerir (Todar, 2009).

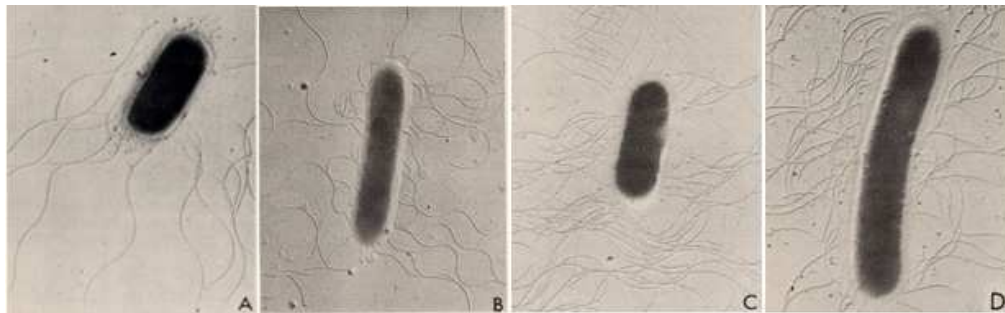
2.1.7. *Bacillus* türlerinde flagella

Bazı *Bacillus* türünde ince, uzun, dalgalı, esnekliği fazla, sarmal yapıda ve hareketi sağlayan “flagella” organeli bulunmaktadır. *B. anthracis*'de hiç flagella bulunmazken *B. cereus* ve *B. subtilis* bakterilerinde fazlaca flagella bulunmaktadır (Rosovitz ve ark., 1998; Seneath, 1986; Arda, 2000).

Birçok aerobik spor üreticisi flegallalarla hareketlerini sağlarlar. Kemotaksis yaygın olarak *B. subtilis*'te çalışılmıştır. *B. firmus*'un flagella filamentleri düşük aminoasit içerikli alkalifildir ve bu yapının onu 11 gibi yüksek pH'lara kadar çevresel şartlarda stabil kalmasını sağladığı düşünülür (Todar, 2009).



Şekil 2.6. Flagellalı *Bacillus* türleri



Şekil 2.7. Nutrient agarda fotoğraflanmış *Bacillus*'lara ait özel hücre yapıları (Todar, 2009)

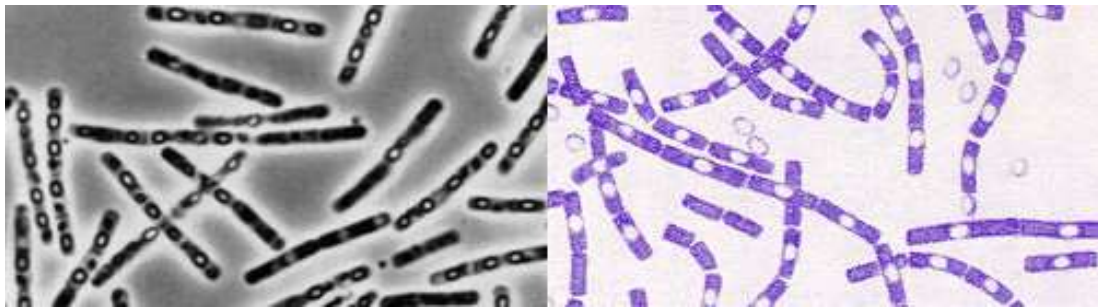
Bazı *Bacillus* türlerine ait özel hücre yapıları Şekil 2.7’de gösterilmiştir. (A: *B. subtilis*; B: *P. polymyxa*; C: *B. laterosporus*; D: *P. alvei*.)

2.1.8. *Bacillus* türlerinde endosporlar

Bacillus’ların spor formasyonu 70°C’ de 10 dakika pastörizasyon işlemi ile tanınması kolaylaşmaktadır. *Bacillus* sporları toprak, su ve gıda gibi birçok ortamdan izole edilirler. İzolasyon işleminde sporların ısıya dirençli olma özelliğinden yararlanılır (Seneath, 1986).

Endosporlar ilk olarak *Bacillus subtilis* te Cohn (1972) ile, daha sonra da Koch (1976) tarafından bir patojen olan *Bacillus anthracis*’da tanımlanmıştır. Cohn *B. subtilis* endosporunun ısıya karşı stabilitesini, Koch’da *B. anthracis*’de spor oluşum devrelerini tanımlamıştır. Bu yapılar hücre içinde oluştuklarından ve ana hücreden veya sporangiumdan serbest olduklarından endospor olarak isimlendirilmiştir. Endosporların doğada en uzun süre dayanabilen hücre tipi olduğu kanıtlanmıştır. Endosporların uyku halindeki kriptobiyotik durumu milyonlarca yıl dayanabilmektedir (Todar, 2009).

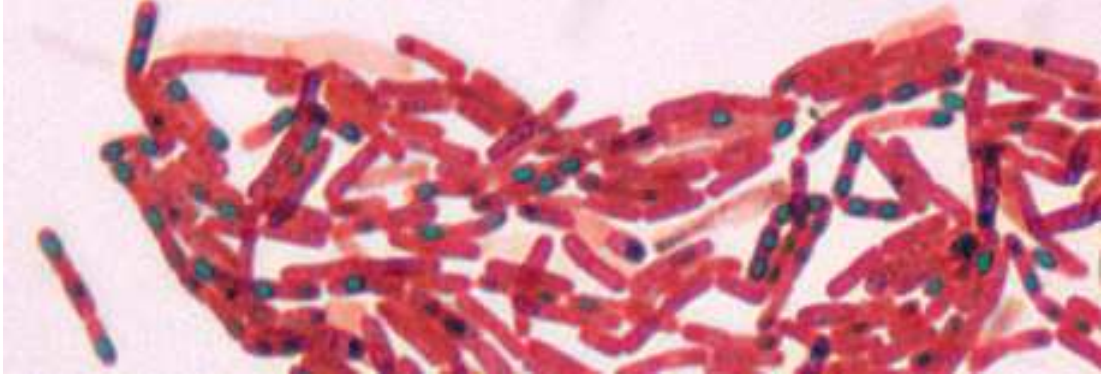
Boyama yapılmadan bakıldığında yaşayan basillerin endosporları siyah ve parlaktır. Endosporlar basit boyamaya veya boyalara direnç gösterirler. Boyama yapıldığında da dekolorizasyona aşırı direnç gösterirler (Todar, 2009).



Şekil 2.8. *Bacillus anthracis* ve *Bacillus thuringiensis* türlerinin mikroskopik görüntüleri

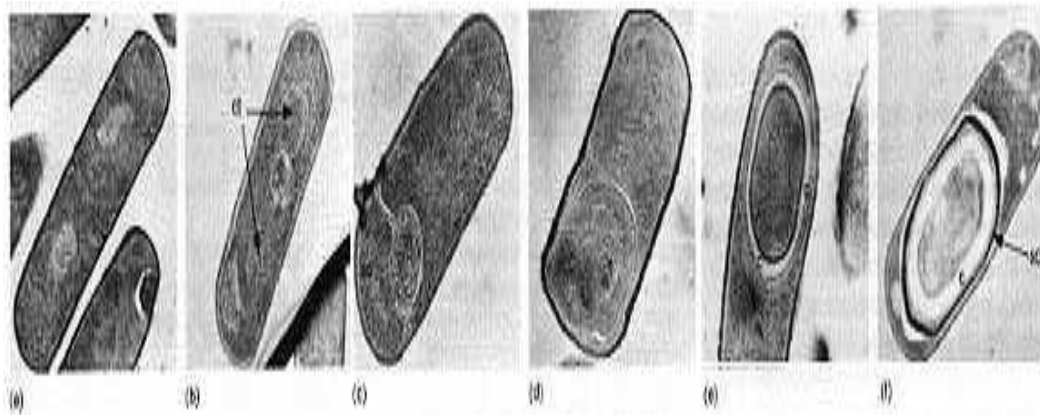
Şekil 2.8’de solda *B. thuringiensis*’in mikroskopik resmi gösterilmiştir. Endosporlar kolayca fark edilmektedir. Sağda ise *B. anthracis*’in kristal viole boyaması ve ışın

mikroskopundaki görüntüsü gösterilmiştir. Şekil 2.9'da *Bacillus* türlerinin spor boyaması gösterilmiştir.



Şekil 2.9. *Bacillus* türlerinin spor boyaması

Endosporlar büyüme ve hücre bölünmesi esnasında normalde aktif değildir. Endosporlar bunun aksine vejetatif hücrelerin gelişiminin eksponansiyel faza geçmesi (genelde ortamda besin azaldığında gerçekleşir) ile aktif hale geçerler. Tipik olarak bir vejetatif hücrede bir tane endospor oluşur. Ana hücre de endospor oluştuğunda lize olur (Todar, 2009).



Şekil 2.10. Prokaryotik bir hücrede karmaşık ve yüksek düzenli bir endosporun oluşumu.

Çalışılan tüm *Bacillus* türlerinde spor oluşum formları aynıdır ve 7 safhaya (0-VI) bölünür (Todar, 2009);

(a). Vejetatif hücre

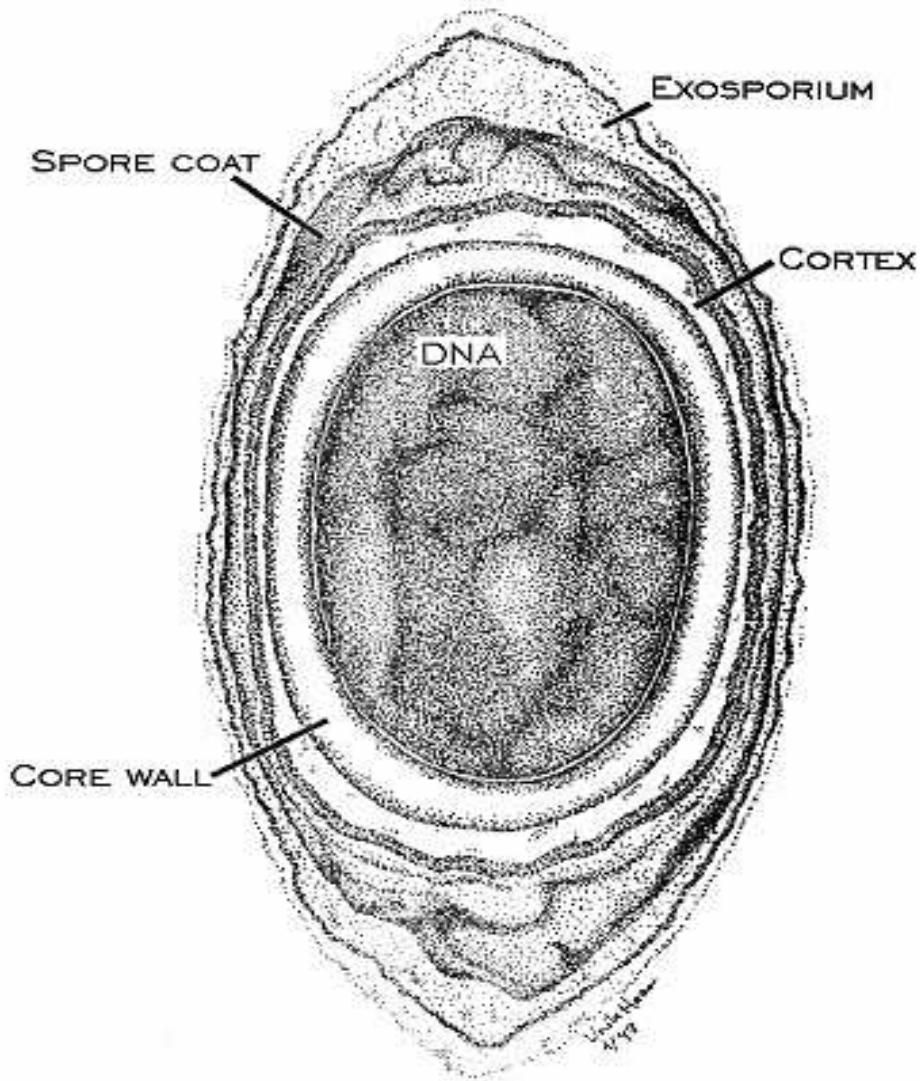
- (b). DNA aksiyal filamen gibi hücrenin merkez eksenini sardığı zaman spor gelişimi başlar.
- (c). DNA ayrılır, bir kromozom protoplast oluşturarak plazma membranını çevreler.
- (d). Protoplast ana hücre membranı tarafından yutulur ve orta yapılı forespor adı verilen yapıya dönüşür.
- (e). İki membran arasında, çekirdek zarı, korteks ve spor tabakası sentezlenir.
- (f). Spordan su uzaklaşırken ve spor olgunlaşırken ısıya direnci artar ve daha refraktil bir hale gelir.
- (g). Olgun spor ana hücrenin lize olmasıyla serbest kalır.

Tüm bu sporulasyon prosesi 6-7 saatlik bir periyotta gerçekleşir ve 50 tane genin geçici olarak düzenlenmesini gerektirir (Todar, 2009).

Olgun sporların keşfedilmiş bir metabolizması yoktur ve kriptobiyotik olarak belirtilen bir tanımı vardır. Yüksek sıcaklık, radyasyon, güçlü asitler, dezenfektanlar gibi çevresel strese karşı yüksek direnç gösterirler. Bazı endosporlar kaynar suda birkaç saat bile dayanabilir ve canlılıklarını korurlar. Uygun koşullarda da kriptobiyotik halden vejetatif forma dönüşme yeteneğine sahiptirler. Endosporlar besin eksikliği gibi vejetatif büyümeyi sınırlandıran koşullarda çevresel sinyallere bir yanıt olarak oluşturulurlar. Çevresel stres ortadan kalktığında tekrar vejetatif hale dönüşerek gelişmeye başlarlar. Yani endospor oluşumu bir üreme mekanizması olmayıp, canlılığı koruma mekanizmasıdır (Todar, 2009).

Sporulasyon işlemi bakteri üremesinin duraklama fazında gerçekleşmektedir. Sporlar genellikle oval veya yuvarlak şekilde olup, hücrenin çeşitli yerlerinde bulunabilirler. Normal fiziksel faktörlere (ısı, ışık, donma, kuruma, radyasyon, vs), kimyasal maddelere (dezenfektanlar, vs) ve mekanik tesirlere karşı vejetatif formlarından çok daha fazla dayanıklıdır (Rozovitz ve ark., 1998; Arda, 2000).

Bacillus sporları vejetatif hücrelerine göre daha kompleks bir ultra yapıya sahiptir. Spor protoplastı (çekirdek) bir zar, tabaka (korteks) ve bir spor katmanı ile çevrilidir. Çeşide bağlı olarak eksosporium da bulunur. Çekirdek duvarı vejetatif hücre duvarlarında olduğu gibi bazı tip peptidoglikan yapısından oluşur. Korteks DAP içeren üç tekrarlı altbirim içeren peptidoglikandan oluşur. Dış spor katmanı sporun kuru ağırlığının % 30-60'ını oluşturur (Todar,2009).



Şekil 2.11. Sporların yapısı (Todar, 2009).

Tablo 2.2. Endosporlar ve onu oluşturan vejetatif hücreler arasındaki farklar (Todar, 2009)

Özellik	Vejetatif Hücre	Endospor
Yüzey tabakası	Tipik gram-positif murein hücre duvarı polimer; kristal S-tabakası	Kalın spor tabakası, korteks, ve peptidoglikan çekirdek duvarı, S-tabakası yok
Mikroskopik görünüş	Refraktif değil	Refraktif
Kalsiyum dipicolinic asit	Yok	Çekirdekte var
Sitoplazmik su aktivitesi	Yüksek	Çok düşük
Enzimatik aktivite	Var	Yok
Makromolekül sentezi	Var	Yok
Isı direnci	Düşük	Yüksek
Kimyasallara ve aside direnç	Düşük	Yüksek
Radyasyon direnci	Düşük	Yüksek
Lizozim hassasiyeti	Bazıları duyarlı, bazıları dirençli	Dirençli
Boyama ve boyalara hassasiyet	Hassas	Dirençli

2.1.9. *Bacillus* 'larda antimikrobiyal madde üretimi

Basillerde, spor oluşumun polipeptid antibiyotik üretimi ile doğrudan veya dolaylı olarak ilgili olduğu tespit edilmiştir. Sporulasyon sırasında serin proteazları oluşumunun antibiyotik üretimi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Birçok araştırma, peptid antibiyotikler üreten *Bacillus* suşlarında sporulasyon sırasında meydana gelen fizyolojik değişikliklerin antibiyotik üretimini düzenlediğini göstermektedir (Nam ve Ryu, 1985). Bazı çalışmalar, *Bacillus* 'larda bazı peptid antibiyotik biyosentez genlerinin, endospor oluşumu olayını aktive eden operonda yer aldığını göstermektedir (Marahiel, 1992).

Bacillus türlerinin, geç logaritmik faz veya erken sabit fazda ikincil metabolit olarak antibiyotik üretebildiği ve sporulasyon başladığında, antimikrobiyal üretime de başladıkları bilinmektedir (Galvez ve ark.,1994; Milner ve ark.,1995).

Bacillus hücreleri, bir kaç esansiyel besin maddesini tükettikten sonra durgun faz başlar (Marahiel ve ark., 1993). Bu aşamada sporulasyondaki fonksiyonların düzenlenmesi, gelişme yeteneği, hücre dışı parçalayıcı enzimler ve antimikrobiyaller uyarılırlar (Losick ve ark., 1986). Bu çeşit olaylar *Bacillus* hücrelerinin beslenme stresine kompleks yanıtları olarak yansır ve çevresel değişikliklere hızla adapte olurlar (Zuber ve ark., 1993). Antimikrobiyal madde üretimi, sınırlı kaynakları olan bir ortamda yaşayan organizma için rekabet şansını arttıran önemli bir etkidir. Araştırmalar, özel metabolitlerin, çevresel uyarıları cevaplama, bakteri popülasyonunu harekete geçiren hücre içi sinyaller olarak hizmet edebileceğini göstermiştir (Marahiel ve ark., 1993).

Yapılan araştırmalarda, antimikrobiyal aktivitenin ve üretilen maddelerin profillerinin, kültür şartlarına bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Örneğin basitrasin antibiyotiğini üreten *B. licheniformis* 'in besiyerine glukoz yerine süt asidi konulursa, bu bakteri kültürünün basitrasin yerine licheniformis antibiyotiğini ürettiği belirtilmiştir (Tunç, 1995).

Bacillus'ların antibiyotik üretimi birçok faktöre bağlı olup yapılan çalışmalarda bazı *Bacillus* suşlarının antibiyotik aktivitesinin pH ve besiyerindeki besin maddelerine bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Leifert ve ark., 1995).

Yine bazı araştırmacılar, *B. cereus* UW85 kültürünün, Gln, Arg, Met, Phe, ile aminoasitlerini içeren besiyerinde, Zwittermicin A üretimini arttırdığını bildirmişlerdir (Milner ve ark., 1995).

Yapılan diğer bir çalışmada ise *B. subtilis* MIR 15'de antibiyotiklerin üretiminin kültivasyon sıcaklığı ile değişiklik gösterebileceğini belirtmişlerdir (Perez ve ark., 1993).

Bacillus' da peptid antibiyotiklerin biyosentezi için, ribozomal ve ribozomal olmayan iki sentez yolu vardır (Marahiel, 1992). *Bacillus* türleri, tıoşablon mekanizma adı verilen ve çoklu enzim kompleksiyle gerçekleştirilen ribosomal olmayan sentez yolu ile linear ve siklik peptid antibiyotikler üretir. Gramisidin S, tirosidin, basitrasin ve surfaktin'in biyosentezi ribozomal olmayan sentez için iyi birer örnektir. Buna karşılık, yine bir peptid antibiyotiği olan subtilin, gen kodludur ve ribozomal olarak sentez edilir (Marahiel, 1992).

Bacillus türlerinin oluşturduğu antimikrobiyallerin yapıları farklı olduğu gibi etki mekanizmaları da birbirinden farklı olabilir. Hücre duvarı sentezini bozan ya da hücre membranına zarar veren etkileri olan antimikrobiyallerin yanı sıra protein sentezini önleyen antimikrobiyaller de sentezlenmektedir (Patel ve ark., 1995).

Bir çalışmada *Bacillus subtilis*' in bir suşunun ürettiği, protein sentezine etki eden poliyen yapısında Bacillaene adı verilen bir antimikrobiyalin, *E. coli* 'de denemiş ve prokaryotik protein sentezini engellediği tespit edilmiştir (Patel ve ark., 1995).

2.1.10. *Bacillus* 'larda antimikrobiyal aktivite

Bacillus cinsi bakteriler, geniş metabolik aktiviteye sahip oluşu, izolasyonunun kolaylığı, üretiminde kompleks besi ortamına ihtiyaç duymaması ve kısa sürede

gelişimi vb. nedenlerden dolayı araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Rosovitz ve ark., 1998; Wipat ve Harwood, 1999).

Yapılan çalışmalar sonucunda *Bacillus* cinsinin antimikrobiyal madde üretim potansiyelinin yüksek olduğu, antibiyotik üretimiyle biyoteknoloji endüstrisine katkı sağlayabildikleri bildirilmiştir (Cash, 1998; Eltem ve Uçar, 1998).

Bacillus suşları sekonder metabolit olarak çeşitli maddeler üretirler ve bu maddelerinde farklı mikroorganizmalar üzerinde inhibitör aktivitesi vardır. *B. subtilis* 'ten izole edilen botrycidin AJ 1316 ve alirin B-1 antifungal aktiviteye sahiptir. Yine *B. subtilis* 'ten elde edilen subtilin ve subtilosin A gram pozitif bakterilerin çoğu suşu üzerinde etkilidir (Zhenk ve Slavik, 1999).

Bacillus 'lar, genellikle peptid yapılı antimikrobiyaller (Marahiel, 1992; Galvez ve ark., 1997) üretmekle birlikte, bunların yanı sıra biyosurfaktant (Desai ve ark., 1997), polyene (Patel ve ark., 1998), aminoglikozid (Ota ve ark., 2000) ve fosfolipid yapıda (Tamehiro ve ark., 2002) antimikrobiyaller de üretmektedirler.

Bazı *Bacillus* türleri Basitrasin, Polimiksin ve Subtilin gibi peptid antibiyotikler üretmektedirler. Ayrıca siklik lipoproteinlerden olan İturin ve Zivittermisin gibi antibiyotikler ise birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır (Rosovitz ve ark.,1998).

Son zamanlarda *Bacillus* 'ların, antibiyotik üretebilmeleri nedeniyle probiyotik türler arasında yer aldığı da bildirilmektedir. Yapılan araştırmada, probiyotik *B. subtilis* 3 suşunun *Enterobacteriaceae* ailesinin bazı türlerine karşı antagonistik etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Özellikle, *B. subtilis* 3 'den elde edilen ve Amicoumacin A ve Nonamicoumacin adı verilen antibiyotiklerin kronik gastrit ve ülser hastalığına sebep olan *Helicobacter pylori* üzerinde etkin olması, oldukça önemli bir sonuç olarak değerlendirilmektedir (Pinchuk ve ark., 2001)

Bacillus suşları tarafından üretilen antimikrobiyallerin çoğu Gram pozitif bakteri ve funguslara karşı aktiftir. Bununla beraber Gram negatif bakterilere karşı duyarlı bir kaç peptid antimikrobiyal de üretebilirler (Perez ve ark., 1992).

Bazı araştırmacılar *B. subtilis* ATCC 39320'den aerobik ve anaerobik organizmalara karşı antibakteriyel etkide bulunabilen, Difficidin ve Oxydifficidin antibiyotiklerini izole ettiklerini bildirmişlerdir (Wilson ve ark., 1987). Diğer bir çalışmada ise, bu antibiyotiklerin *E. coli* 'de protein sentezi inhibitörü olarak görev aldığını rapor etmişlerdir (Zweerink ve Edison, 1987).

Bacillus suşlarından elde edilen yeni bir peptid antimikrobiyal olan mersacidinin ise, methicillin dirençli Staphylococ'lar başta olmak üzere bazı gram pozitif bakterilere karşı aktif olduğu bildirilmiştir (Chatterjee ve ark., 1992).

Parker ve arkadaşlarının çalışmasında (1990) *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* ve *B. cereus* gibi suşların bakteriyosin gibi maddeleri sentezlediği rapor edilmiştir. Bakteriyosinler çeşitli bakteriler tarafından ribozomal yolla sentezlenen antimikrobiyal peptitlerdir (Aslım ve ark., 2002).

2.2. *Bacillus subtilis*

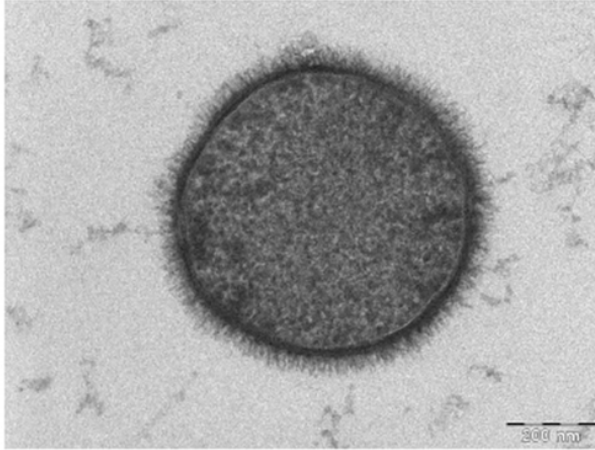
2.2.1. *Bacillus subtilis* bakterisinin tarihçesi

B. subtilis ilk olarak 1835 yılında Alman bilim adamı Christian Gottfried Ehrenberg tarafından *Vibrio subtilis* olarak tanımlanmıştır (Ehrenberg, 1835). Diğer bir Alman bilim adamı Ferdinand Julius Cohn, 1872 de, bu bakteriyi *Bacillus subtilis* olarak tekrar isimlendirmiştir (Cohn, 1872). Cohn 1876 yılında ilk kez *B. subtilis*'in endospor üretebilme yeteneği olduğunu ve böylelikle vejetatif olarak üreme şansının olmadığı çevre şartlarında hayatta kalabildiğini göstermiştir (Cohn, 1976).

Amerikalı bakteriolojist Harold Joel Conn, 1930 yılında, *B. subtilis* Marburg suşunun (American Type Culture Collection No. 6051) tanımı yayınlanmıştır (Conn, 1930;

Teas, 1949) ve 1974'de bu suş X-ray ve UV ışığına tabi tutulmuştur. Charles Yanofsky bu deneyler sonucunda John Spizizen'e birkaç kararlı oksotrofu sağlamıştır (Burkholder ve Giles, 1947; Teas, 1949)

2.2.2. *Bacillus subtilis* bakterisinin genel özellikleri



Şekil 2.12. *B. subtilis* hücresinin mikroskopik kesit resmi (ölçekleme çubuğu = 200 nm).

B. subtilis, *Bacillaceae* familyasına ait bir bakteri olup gram pozitif (bazı türleri gram değişken), peritrik flagellalı ve flagellaları hareketlidir, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob, oksidaz pozitif veya negatif, çoğu türü katalaz pozitif, çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücrelerdir şeklinde bakterilerdir. Toprak, su ve çeşitli gıdalarda bulunur. Değişen çevre şartları *B. subtilis*'in vejetatif büyümesi için uygun değildir bu yüzden endospor formuna dönüşebilme yeteneğiyle değişen çevre şartlarında hayatta kalabilir (Cohn, 1876).

Vejetatif hücreler $0.5 \times 1.2 \mu\text{m}$ ile $2.5 \times 10 \mu\text{m}$ çapındadır. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır (Buchanan ve Gibbons, 1974; Ünlütürk, ve ark., 1998).

Bugün *B. subtilis* endüstriyel uygulamalarda sıklıkla kullanılmakta olan bir suştur hatta probiyotik özellikleri de olduğu bildirilmiştir (Rasmussen ve ark.; 2009).

2.2.3. *Bacillus subtilis* bakterisinin antimikrobiyel madde üretebilme özelliği

Bacillus subtilis bakterisinin antibiyotik üretebilme yeteneği olduğu yaklaşık 50 yıldır bilinmektedir (Katz ve Demain, 1977). *Bacillus* genusu antibiyotik üretici kaynak olarak gösterilmiştir (Eltem ve Uçar, 1988)

Bacillus subtilis yapılarının ilginç çeşitliliği olan 2 düzineden fazla antibiyotik üretebilme yeteneğine sahip olmasıyla gram pozitif organizmalar için bir model sistemdir (Stein, 2005).

B. subtilis bakterileri genomlarının yaklaşık %4-5' lik bölümünü antibiyotik üretmeye kodlamış olup ürettiği antibiyotiklerin çoğu peptid yapısındadır (Patel ve ark., 1995). Üretilen antimikrobiyal aktif bileşenler ribozomal olarak sentezlenip sonradan dönüştürülerek modifiye edilen (lantibiyotikler ve lantibiyotik benzerleri) veya nonribozomal olarak peptid olmayan bileşenler, bir aminoşeker olan polypeptitler ve fosfolipit, şeklinde oluşturulurlar (Patel ve ark., 1995).

Ayrıca son bulgular *B. subtilis* antibiyotiklerinin saf antimikrobiyel etkisi dışında şu rolleri de üstlendiğini göstermektedir; nonribozomal olarak üretilen lipopeptitler biyofilm ve kümeleşmeyi geliştirici özellikleri de içerir (Stein, 2005). Lantibiotik fonksiyonları yeterli çoğunluk algılanması (quorum-sensing) gibi feromonları ve öldürme faktörü kardeş hücrelerin ölümünün programlanmasını gerçekleştirir. *B. subtilis* 168 suşunun 3 ribozomal antibiyotik, TasA, subtilosin, sublansin, ve 2 nonribozomal antibiyotik, surfaktin ve basilsin ürettiği bilinmektedir (Tamehiro ve ark., 2002).

B. subtilis' den elde edilen subtilin adı verilen maddenin bazı bakterilere karşı inhibitor etki gösterdiği belirlenmiştir (Bilgehan, 1995). *B. subtilis* 'ten izole edilen botrisidin AJ 1316 ve alirin B – 1 antifungal aktiviteye sahiptir. Yine *B.subtilis* 'ten elde edilen subtilin ve subtilosin A gram pozitif bakterilerin çoğu suşu üzerinde etkilidir (Zheng ve Slavik, 1999).

Perez ve ark. (1992)'nin yaptığı bir araştırmada antimikrobiyal madde üreten *B. subtilis* MIR 15 suşunun *E. coli* ve *P. aeruginosa* gibi bakterilerin de dahil olduğu gram negatiflere karşı etkili olduğu fakat mantarları inhibe etmediği ortaya koyulmuştur (Aslım ve ark., 2002).

B. subtilis ATCC 39374 ve ATCC 39320 suşları ile yapılan bir çalışmada, suşların polienlakton fostat esterleri olan diffisidin ve oksidiffisidin antibiyotiklerini ürettiği bildirilmiştir. Ayrıca bu iki suşdan bacillin antibiyotiği de izole edilmiştir. Diffisidin ve oksidiffisidinin bir veya birden çok antibiyotiğe dirençli olan insan patojenlerinin çoğuna, anaerob ve aerob bakterilere karşı geniş ve çok güçlü bir aktiviteye sahip olduğu açıklanmıştır. Diffisidin ve oksidiffisidin antimikrobial maddelerinin protein sentezini etkilediği ve bakterisidal etkisinin olduğu belirtilmiştir (Zimmerman ve ark., 1986).

B. subtilis ile yapılan bir araştırmada bakterinin antifungal etkisi *Penicillium* ve *Aspergillus* suşları üzerinde denenmiştir. *B. subtilis*' in *Penicillium* üzerinde daha fazla antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

B. subtilis FHC 402 tarafından üretilen antibakteriyal faktörün bir glikopeptit olabileceği bildirilmiştir. Antibakteriyal faktörün moleküler ağırlığının jel filtrasyonu ile 3200 olarak tahmin edilmiştir. Diğer araştırmacılar *Bacillus* türlerinin basitrasin, polimiksin, brebistin ve peptit antibiyotik gibi bir kaç peptit antibakteriyal faktör ürettikleri bildirilmiştir. Bu antibakteriyal faktörlerin moleküler ağırlıklarının *B. subtilis* FHC 402 nin antibakteriyal faktöründen daha az olduğu gösterilmiştir (Miyamoto, 1986).

B. subtilis ATCC 6633 suşu antifungal peptit antibiyotik potansiyeli içeren mycosubtilin üreticisi olarak teşhis edilmiştir (Duitman ve ark., 1999).

B. subtilis siklik peptit antibiyotik mycobacillin, iturin A, bacillomysin, mycosubtilin, fungustatin, subsporin, bacillisin ve fengimisin ürettiği bulunmuştur (Marahiel, 1993).

B. subtilis FS 94 ile yapılan çalışmada, filtratlarının fungusidal ve fungustatik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Hussain ve ark.,1994).

2.2.3.1. Sürfaktin

Sürfaktin *B. subtilis* tarafından üretilen moleküler ağırlığı 1036 Da olan biosürfaktant yapısında bir halkalı lipopeptit antibiyotiktir. Bu antibiyotik yapısında 13-15 karbon zincirli β -hidroksi yağ asidi karışımını içerir ve ana bileşeni 3-hidroksi-13-metilmiristik asittir. Sürfaktin bakterinin kültürasyonu ile elde edilir ve antimikrobiyal, antiviral, antitümör, hemolitik ve kan antikoagülant ve fibrinolitik gibi biyolojik aktivitelere sahiptir. Ayrıca surfaktinin yüksek yüzey aktivitesi ile çok güçlü bir biosurfektan olarak yüzey tansiyonunu 72'den 27,9 mN/m değerine düşürdüğü bildirilmektedir (Marahiel ve ark., 1993; Desai ve Banat, 1997; Vollenbroich ve ark., 1997).

B. subtilis ATCC 21332 bakterisinin peptit yapısında sürfaktan, antibakteriyel, antitümöral özelliği olan surfaktin ürettiği ve bu maddenin tiyoşablon adı verilen mekanizma ile ribozom dışı yolla sentezlendiği bildirilmiştir (Kluge ve ark., 1988; Maraihel, 1992)

Sürfaktinin önemli düzeyde antibakteriyel özelliği bulunmaktadır. Bu özellik surfaktinin bütün bakterilerin membranlarına penetre olabilme yeteneği ile ilişkilidir (Bergey ve ark., 1994). Bu penetrasyon yeteneği ile surfaktin deterjan benzeri aktivite gösterir, hücrenin membranının bütünlüğünü bozarak lipid tabakasına geçirgen bir ortam sağlar (Heerklotz ve ark., 2001).

Sürfaktin, fibrin pıhtılaşmasını engelleyici ve bazı bakterilerin protoplastlarını, sferoplastlarını ve eritrositleri liziz edici olarak da kullanılmaktadır (Robinson ve ark., 2001).

Sürfaktin'in farklı virüsler üzerinde (SFV, HSV-1, SHV-1,VSV, SIV, FCV EMCV gibi) geniş antiviral aktivitesinin olduğu bilinmektedir. Virüs lipid membranı ve kapsidi üzerinde yıkıcı etkileri bulunan surfaktin'in, biyoteknolojik ve farmakolojik

ürünlerin virüsten korunma uygulamalarında kullanılabileceği belirtilmektedir (Vollenbroich ve ark., 1997).

B. subtilis tarafından üretilen surfaktinin *Salmonella enterica*, *E. coli*, and *Proteus mirabilis*' in biyofilm formasyonunu inhibe edici özelliği olduğu belirtilmiştir (Mireles ve ark., 2001).

B. subtilis' in özellikle bitki hastalıklarına neden olan *Fusarium oxysporum*'un büyümesini engelleyici surfaktin ürettiği bilinmektedir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Yapılan bir araştırmada *B. subtilis*'ten çeşitli besi ortamlarında surfaktin üretimi incelenmiştir. Surfaktin üretimi brain heart infusion ortamında 280 mg/L, pharmamedia ortamında 220 mg/L, Fe⁺ (4.0 mM) ve sükröz (2 g/L) besin ilaveli pharmamedia ortamında 300 mg/L surfaktin üretimi gerçekleşmiştir (Ajlanı ve ark., 2007).

Cooper ve ark. (1981)'nin yaptığı çalışmada *B. subtilis*' ten maksimum surfaktin üretiminin %4 glukoz içeren mineral tuzlu ortamda gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Surfaktinin izolasyonu için besi ortamı santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılır ve ardından surfaktin dikloro metan ile ekstrakte edilir. Solvent düşük basınç altında uçurularak ham surfaktin elde edilir. Surfaktini saflaştırılmak için ise ekstrakt saf suda çözülmüş ve pH 7' ye ayarlanır. Bu solüsyon Whatman no. 4 filtre kağıdından geçirilerek pH konsantre HCl ile 2'ye ayarlanır. Bu solüsyon santrifüj ile pelet haline getirilir (Cooper ve ark., 1981).

2.2.4. *Bacillus subtilis* bakterisinin polisakkarit üretebilme özelliği

Polisakkaritler, bakteri şuşlarının çoğalmaları sırasında suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişen koşullarda sentezlenebilirler. Mikroorganizmalar intraselüler (depo), ekstraselüler, ve yapısal formdaki polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı polisakkarit türü sentezlemektedirler Polisakkarit sentezi hem hücre dışında hem de membranda meydana gelebilir (Sutherland, 1998).

Bazı bakteriler mikroorganizmayı fagosite edilmekten, fagosite edilirse de öldürülmekten koruyan kapsül oluştururlar. Bu kapsüller polisakkarit veya polipeptit yapıda olabilirler (Erkoç, 2008).

Bakteriyel polisakkaritler genellikle immunojeniktirler. *In vitro* çalışmalarda polisakkaritlerin varlığı katı besiyeri ortamlarında mukoid koloni, sıvı besiyeri ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir (Gugliandola ve ark., 2003).

Bakterinin dış yüzeyini kaplayan ekzopolisakkaritler (EPS) kapsül veya slim formda olabilmektedir. Kapsüller EPS bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipit veya lipit-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır. EPS'ler suda çözünen polimerlerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilmektedirler. Bakteriyel EPS'lerin çoğu düzenli oligosakkaritlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarit yapıda, bazı bakteriyel EPS'ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarit yapıdadır. EPS'yi oluşturan homopolisakkaritlerin çoğunluğu nötr olmasına rağmen bir çok bakteriyel EPS negatif yük taşır ve yüksek kütleye sahiptir. Ayrıca polisakkaritler hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir (Gugliandola ve ark., 2003; Kenne ve ark., 1983).

EPS'deki yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi kromozomal veya plasmid DNA kodlu olabilmektedir. EPS üretimini düzenlenmesi oldukça komplekstir ve hem pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir. Ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarıların etkisiyle EPS üretimi etkilenmektedir (Shankar ve Ye, 1995).

EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırırlar (Moriello ve ark., 2003).

Bazı araştırmacılar tarafından *Bacillus* türleri tarafından oldukça viskoz ve üstün pseudoplastik özelliklere sahip EPS'lerin üretildiği bildirilmiştir (Mitsud ve ark., 1981).

Maugeri ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sudan izole ettikleri halofilik termotolerant *Bacillus* suşunun (B3-15) ortamda % 0.6 glikoz varlığında 165 mg/lt EPS ürettiği bildirmiştir (Maugeri ve ark., 2002).

2.3. Peyniraltı Suyu

Peyniraltı suyu, peynir yapımı sırasında pıhtı süzme işlemi sonrasında geriye kalan bir yan ürün olup, süt bileşenlerinden laktoalbumin ve laktoglobülin gibi serum proteinleri ile laktoz, yağ, mineral madde ve vitaminleri içerir (Gülsün ve Sahan, 1992). Peynire işlenen sütteki yağ miktarının % 17.2'si, proteinin % 19'u, laktozun %87.4'ü, mineral maddelerin % 64.3'ü peynir suyuna geçtiği bildirilmiştir (Yöney, 1962).

Bazı kimyasallar ve materyaller mikroorganizmaların peyniraltı suyu ortamında gelişmesine bağlı olarak üretilmektedir. Fermentasyon yolu ile *E. coli* türlerinin poly(3-hydroxybutyrate) sentezlemesi (Lee ve ark., 1997), *Propionibacterium shermanii* bakterisinden B12 vitamini üretimi (Bullerman ve Berry, 1965), *Pseudomonas spp.*'den biyopolimer üretimi (Dlamini ve Peiris, 1997) peyniraltı suyunun besiyeri olarak kullanıldığı çalışmalara örnek gösterilebilir.

2.3.1. Peyniraltı suyunun besin değeri

Peynire işlenen süütün bileşimine ve kalitesine, peynir yapım tekniğine, pıhtılaştırmada kullanılan maya veya asit miktarı ile kalitesine, pıhtılaştırma sıcaklığı ve süresine, pıhtının parçalanma biçimi gibi birçok değişik faktörlere bağlı olarak, elde edilen peynir suyunun bileşimi de değişim göstermektedir. Peynir suyu, süt kurumaddesinin yaklaşık yarısını, süt şekerinin hemen hemen tamamını, proteinlerin yaklaşık 1/5'ini ve B vitaminlerinin ise büyük bir bölümünü içermektedir (Demirci ve Arıcı, 1989).

Kurultay ve ark. (2000) yaptığı bir araştırmada işlenen sütün yaklaşık % 70-90'ını oluşturan peyniraltı suyunda laktoz, azotlu maddeler ve mineral maddelerin yer aldığını belirtmiştir (Yağcı ve ark., 2006). Tablo 2.3.'de peyniraltı suyunun bileşimi gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Peyniraltı Suyunun Bileşimi (Ksikowski, 1978).

Bileşim	Tatlı peyniraltı suyu	Asit peyniraltı suyu	Kondense asit peyniraltı suyu	Kurutulmuş tatlı peyniraltı suyu	Kurutulmuş asit peyniraltı suyu
Toplam kurumadde	6,35	6,5	64,0	96,5	96,0
Nem	93,7	93,5	33,5	3,5	4,0
Yağ	0,5	0,04	0,6	0,8	0,6
Toplam protein	0,8	0,75	7,6	13,1	12,5
Laktoz	4,85	4,9	34,9	75,0	67,4
Kül	0,5	0,8	8,2	7,3	11,8
Laktik asit	0,05	0,4	12,0	0,2	4,3

Peyniraltı suyunun kurumaddede % 92-94'ü su, % 70-75 oranında laktoz (kurumaddede), % 11-13'ü azotlu madde ve % 7-12 kadar da mineral madde içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir (Şimşek ve Sağdıç, 2006). Harper 2000 ve German ve ark. 2001' de peyniraltı suyunun, laktoz, mineraller (örneğin kalsiyum, magnezyum, fosfor), vitaminler, protein olmayan kazein (glikomakropeptit dışında) ve süt yağını iz miktarda içerdiğini ve proteinlerinin sadece biyolojik değerinin diğer proteinlerden farklı olmadığı gibi, özellikle sülfür içeren amino asitleri de (örneğin; sistein, metiyonin) içerdiğini ayrıca diğer protein kaynakları ile karşılaştırıldığında, kısa zincirli amino asitleri, L-isolösin, L-lösin ve L-valin'i yüksek konsantrasyonlarda içerdiği belirtilmiştir (Karagözlü ve Bayarer, 2004).

2.3.2. Peyniraltı suyunun değerlendirilmesinin ekolojik önemi

Devlet İstatistik Enstitüsü'nün verilerine göre ülkemizde 2004 yılında yıllık süt üretim miktarının 8.408.566 ton olduğu bildirilmiştir (DİE, 2004). Bunun yaklaşık %20'sinin peynire işlendiği kabul edilirse (Alpkent ve Göncü, 2003; aktaran Sözer ve Yıldız, 2006) peynire işlenen süt yaklaşık olarak 1.681.732 tondur. Peynir yapımında kullanılan sütün yaklaşık olarak %70-90'lık kısmı peyniraltı suyu olarak elde kalır. Bu da 1,17-1,51 milyon ton peyniraltı suyu olduğu anlamına gelir (Sözer ve Yıldız, 2006).

Çevre kirlenmesinde ölçü olarak Biyolojik Oksijen Gereksinimi (BOG) olarak ifade edilen bir değer kullanılmaktadır. Bu değer, kirli sulardaki organik maddeleri parçalamak için mikroorganizmalar tarafından kullanılan oksijen miktarını gösterir. Bir insanın günlük atıklarının parçalanabilmesi için bu değer 60 g/l, 1 litre peynir suyu için ise bu değer 40 g/l olduğu saptanmıştır (Metin, 1983; Şimşek ve Sağdıç, 2006).

Peynir suyunun değerlendirilmeksizin fabrikadan uzaklaştırılması için özel kanalizasyon sistemine ihtiyaç duyulmakta veya kanalizasyon sisteminin bulunmadığı durumlarda bu maddenin tanklarla taşınması gerekmektedir. Fakat bu işlem çok masraflı olup, uzun zaman almaktadır. Eğer değerlendirilmeyecekse, peynir suyunun atıldığı yerler yerleşim alanlarından uzak olmalı ve peynir suyu kesinlikle akarsu ya da durgun sulara bırakılmamalıdır. Çünkü hiçbir işleme tabi tutulmadan atılan peynir suyundaki organik maddeler su içinde fermantasyona uğrayarak önemli düzeyde çevre kirlenmesine yol açmakta ve atıkların döküldüğü sulardaki canlılar ciddi bir tehlike altında kalmaktadırlar (Royal, 1974; Knopp, 1988; Kurt, 1990). Dünyada her yıl yaklaşık olarak üretilen 115 milyon ton peyniraltı suyunun % 47'si nehlere, göllere ve diğer su kaynaklarına, atıksu arıtma tesislerine veya yüklü arazi içine dökülmektedir (Canlı, 2005).

2.3.3. Peyniraltı suyunun besiyeri olarak kullanıldığı çalışmalar

Peyniraltı suyunun besiyeri olarak kullanılışı birçok araştırmacı tarafından araştırılmış ve mikroorganizmaların gelişimini sağlayabilecek bir agar olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir (Çelikol, 1975; Gera, 1992; Lee ve ark., 1997). Örneğin, değişik konsantrasyonlarda peyniraltı suyu, karbon kaynağı olarak kullanılarak rekombinant *E. coli* türlerinin poly(3-hydroxybutyrate) sentezlemesi karşılaştırılmıştır. En yüksek polihidroksi bütirik asit (PHB) konsantrasyonu 5.2 g /l ve PHB içeriği kuru hücre ağırlığının % 81'i olarak gözlenmiştir (Lee ve ark., 1997).

Karbon kaynağı olarak peyniraltı suyu kullanılarak *Bacillus* türlerinden α -amylase (EC 3.2.1.1;1,4- α -D-glucanohydrolase) üretilmiştir. Besi ortamı optimum enzim üretimi için kombine (peynir suyuna kombine edilen maddeler: %2 patates nişastası, %3 gluten, %0.1 MgSO₄·7H₂O, %0.1 KH₂PO₄, %0.2 NaCl, ve %0.02 CaCl₂). edilmiş ve pH 7' ye ayarlanmıştır. 72 saat sonra peyniraltı suyunda yaklaşık 2,690 DUN ml-1 α -amilaz enzimi gözlenmiştir (Gera, 1992). Benzeri bir çalışmada *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 ve CBS 6556 mayalarının hidrolize peyniraltı suyunda β -galaktosidaz üretimi araştırılmıştır. Konsantre peyniraltı suyunda CBS 6556 suşu daha fazla β -galaktosidaz üretimi gerçekleştirmiştir. Enzimin aktivitesi -4°C ve -18°C'de 9 gün boyunca devam etmiştir (Rech ve ark., 1999).

Pseudomonas sp. ATCC 31461 (Pseudomonas elodea) bakterisinin kellanıldığı bir araştırmada peyniraltı suyunda biopolimer üretimi incelenmiştir. Maksimum viskozite ve biopolimer konsantrasyonu %25 (v/v) konsantrasyonundaki peyniraltı suyunda gözlenmiştir (Dlamini ve Peiris, 1997).

Beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilen ligninolitik enzimlerden biri olan manganaz peroksit (MnP) inatçı bileşiklerin ayrıştırılmasında ve göllere deşarj edilen boyaların giderilmesinde etkilidir. Bir çalışmada *Bjerkanderasp* BOS55 fungusu tarafından MnP üretimi için daha ucuz bir besiyeri olan peyniraltı suyu kullanılmıştır. Uygulamaya yakınlığı değerlendirilmiştir. Bu besiyerinde MnP üretiminin önemli ölçüde (190 U/L) arttığı gözlenmiştir. Böylece peyniraltı suyunun MnP üretimi için uygun bir alternatif olabileceği bildirilmiştir (Feijoo ve ark., 1999).

Yapılan bir çalışmada *A. gossypii* ile sallamalı erlenmayer ve laboratuvar fermentörü kullanılarak katkısız peyniraltı suyu ve katkılı peyniraltı suyunda riboflavin üretimi incelenmiştir. Katkılı peyniraltı suyu ve katkısız peyniraltı suyunda *A.gossypii* tarafından fermentörde 8 gün sonra üretilen riboflavin miktarı sallamalı erlenmayer flask çalışmalarına göre 4 kat daha yüksek bulunmuştur (Yağcı ve ark., 2006).

Novel fibröz yatak bioreaktör'e *Propionibacterium acidipropionici* bakterisi immobilize edilerek peyniraltı suyu laktozundan propiyonatın sürekli üretiminin araştırıldığı bir çalışmada, fibröz yatak bioreaktörle sade peyniraltı suyu permeatı ve d-laktoz peyniraltı suyu permeatı ve yüksek fermentasyon oranı ve yüksek dönüşüm elde edilmiştir (Yang ve ark., 1993).

Propionibacterium shermanii bakterisinin B12 vitamini üretmek üzere yararlanıldığı bir çalışmada ise peyniraltı suyu besi ortamı olarak kullanıldığında fermentasyonun ileri safhalarında B12 vitamininin oluşmaya başladığı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda fermente edilmiş peyniraltı suyunda, fermente edilmemiş peyniraltı suyuna göre B12 vitamini miktarında büyük bir artış saptanmıştır (Bullerman ve Berry, 1965).

Diğer bir çalışmada ise *Phycomyces blakesleeanus* NRRL 1465, *Blakesleea trispora* NRRL 2456, *Phycomyces nites* NRRL 2245 ve *Mucor mucedo* NRRL 3654 fungusları ile şeker fabrikası atık maddesi olan melas, şilempe ve süt fabrikasının atık maddesi olan peyniraltı suyu ile sentetik besi ortamı olarak YPK ve malt ekstrakt ortamında A vitamininin ön maddesi olan beta karoten sentezi gerçekleştirilmiştir. Beta karotenin YPK ortamında 1.8-12.1 mg/l, malt ekstrakt ortamında 7.9-27mg/l, melas ortamında 6.1-43.3 mg/l, şilempe ortamında 3-9.9 mg/l ve peyniraltı suyu ortamında 4.4-12.5 mg/l arasında değişen miktarlarda üretildiği tespit edilmiştir (Kahyaoğlu ve Kıvanç, 2007).

Başka bir araştırmada *Klebsiella oxytoca*'nın peyniraltı suyundaki laktozu tamamen kullanabilen (3.5%, w/v) ve biyopolimer üretebilen bir suşu izole edilmiştir. İzolat ile 5% (w/v) laktoz içeren peyniraltı suyunda 72 saatte 6.1 g/l ekstraselular biopolimer üretimi gerçekleştirilmiştir (Dlamini ve Peiris, 1997) .

Peyniraltı suyundan 2,3-bütülen glikol üretimi için altı tane mikroorganizma denemesi yapılan bir çalışmada ise *Bacillus polymyxa* ve *Streptococcus faecalis* pozitif sonuçlar vermiştir ve daha sonra modifiye edilmemiş peyniraltı suyu denenmiştir. *Bacillus polymyxa* tatlı peyniraltı suyunda 30°C'de 7 günde (pH:6) diğer mikroorganizmalardan çok daha büyük miktarlarda-her 100 mmol laktozdan 61 mmol- glikol üretmiştir (Speckman ve Collins, 1982).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal ve kimyasallar

Peyniraltı suyu tozu (PAST): Bu çalışmada araştırma materyali olarak Adapazarı Milkon Süt Ürünleri ve Gıda Maddeleri Sanayinden sağlanan ve bileşimi sırasıyla laktoz %83-85, protein %5.5-6.5, kül %5.5, nem %2 ve yağ %0 olan peyniraltı suyu tozu kullanılmıştır.

Bacillus subtilis ATCC 6633: Çalışmada Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığından temin edilen *Bacillus subtilis* ATCC 6633 liyofilize suşu kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan alet ve ekipman

UV-VIS spektrofotometre; Shimadzu UV mini- 1240

Soğutmalı Santrifüj cihazı; Hettich Universal 320R

Otoklav; WiseClave®, Daihan

İnkübatör; Elektro-mag® marka M 420 p model

Ultrasonik su banyosu; Elektro-mag® marka M 96 kpk model

Laktoz ölçüm cihazı; Foss marka MilkoScan FT-120 cihazı

Oswalt viskozimetresi; Schott Geräte marka kapiler viskozimetre

pH-metre; Hanna Marka pH 211 model

Ultrafiltrasyon cihazı; Millipore, 8010 Stirred Cell

Filtre; Ultracel YM-30 Ultrafiltrasyon Filtre

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi); Agilent 1100 Serisi

UV-DAD dedektör; Agilent

Pompa, pH metre, Sartorius ultra saf su cihazı
HPLC C18 Kolon, ACE 5 µm, 4,6 x 250 mm
0.22 µm gözenekli teflon filtre
Vial, Agilent, 2 ml
Wattman filtre kağıdı
Kapilar viskozimetre; Schott Gerate
Magnetik karıştırıcı; Biosan MSH 300
Vortex Mikser; LabTech® LVM- 202
Genel laboratuvar araç ve gereçleri.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Analizlerde, aşağıda belirtilen analitik saflıktaki kimyasallar ve distile saf su kullanılmıştır;

Triptic Soy Broth (TSB), Merck
Peptonlu dilüsyon sıvısı, Merck
Triptik Soy Agar (TSA), Merck
Dextrose Casein-Peptide agara, Merck
Ethanol Absolüt, Sigma- Aldrich
NaCl, Sigma- Aldrich
Sülfirik asit, Sigma- Aldrich
Fenol, Sigma- Aldrich
Metanol, Sigma- Aldrich
Diklorometan, Sigma- Aldrich
NaOH, Sigma- Aldrich
HCl, Sigma- Aldrich
Asetonitril, Sigma- Aldrich
Trifloroasetik, Sigma- Aldrich
Aktif kömür, Sigma- Aldrich
Surfaktin standartı, Sigma- Aldrich
Gellan™ CM , Sigma- Aldrich

3.2. Metot

3.2.1. *B. subtilis* kültürünün hazırlanması

Çalışmada Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edilen *Bacillus subtilis* ATCC 6633 liyofilize suşu kullanılmıştır. Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck) ile *B. subtilis* bakterilerine Elektro-mag® marka M 420 p model inkübatör ile 30°C' de 24 saat ön zenginleştirme yapıldı. 24 saat ara ile TSB'ye 2 kez transfer işlemi gerçekleştirildi. Zenginleştirilmiş 3 tüp kültür soğutmalı santrifüjde (Hettich Universal 320R) 4C°'de 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Süpernatant atılarak geriye kalan 3 tüpün peleti birleştirilerek 12 ml % 0.1'lik peptonlu dilüsyon sıvısı (Merck) ile seyreltildi. Hazırlanan bu kültür süspansiyonundaki mikroorganizma sayısı Tryptik Soy Agar (TSA) (Merck) kullanılarak yayma yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.2. Peyniraltı suyu çözeltisinin hazırlanması ve kültürün eklenmesi

Peyniraltı suyu tozundan %10, %15 ve %20'lik çözeltiler hazırlandı. Çözeltiler 121°C'de 15 dakika otoklavda (Daihan) steril hale getirildi. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığına soğutuldu. Peyniraltı suyu tozu çözeltilerine hazırlanmış *B. subtilis* kültür süspansiyonundan steril şartlarda %1 oranında ilave yapıldıktan sonra 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak kültür süspansiyonu ilavesi yapılmamış %10, %15 ve %20'lik çözeltiler hazırlandı.

3.2.3. Vejetatif hücre sayılarının belirlenmesi

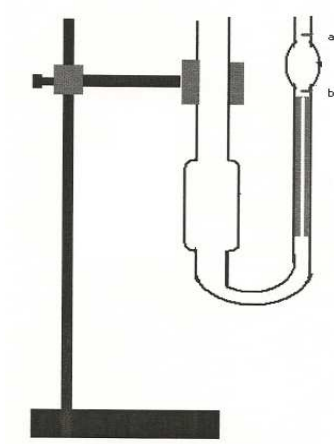
TSB ile yapılan aktifleştirmelerin sonunda başlangıç mikroorganizma miktarı % 0.1 peptonlu su kullanılarak yapılan seyreltmelerden sonra TSA'ya yayma plak yöntemi uygulanarak belirlenmiştir. Peyniraltı suyu tozundan 250 ml'lik erlenlere %10, 15 ve 20'lik 100 ml hazırlanan ve *B.subtilis* inoküle edilen çözeltiler 30°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra 24, 48 ve 72. saatin sonlarında %0.1' lik peptonlu su ile uygun seyreltmeler hazırlandıktan sonra TSA'da yayma plak yöntemi ile vejetatif hücre miktarları belirlenmiştir.

3.2.4. Spor sayısının belirlenmesi

B. subtilis inoküle edilen %10, 15 ve 20'lik PAST çözeltileri 30°C'de inkübasyonun 24, 48 ve 72. saatinin sonunda katı besiyeri ile rop sporu sayım metoduna göre spor miktarları belirlenmiştir (Halkman, 2005). Su banyosuna (Elektro-mag® M96 kpk) konan çözeltiler 80°C'de 5 dakika ısı işlem uygulanarak vejetatif hücrelerin ölmesi sağlandıktan sonra buzlu su banyosunda hızla soğutularak % 0.1 peptonlu suyla seyreltmeler yapıldı. Bu seyreltme sıvılarından her bir dilüsyondan 0.1 ml alınarak Dextrose Casein-Peptide Agara (Merck) yayma plak yöntemi uygulandı. Besiyerleri 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra gelişme gösteren besiyerlerindeki mikroorganizma sayımı yapılarak spor miktarı belirlendi.

3.2.5. Viskozite belirlenmesi

Viskozite ölçümü kapiler viskozimetre (Schott Gerate) kullanılarak belirlendi (Şekil 3.1). PAST çözeltilerinden 3'er ml pipetlenerek viskozimetrenin kılcal borusuna aktarıldı. Viskozimetre su dolu ölçü silindire konularak 22°C'deki su ile viskozimetredeki çözeltinin sıcaklıkları dengelendi. Çözelti kapilerden a üst çizgi seviyesinin üzerine kadar çekildi. Çözelti akmaya bırakıldı, kapilerdeki üst çizgiden geçtiği anda kronometre çalıştırıldı ve b alt çizgisine geldiği zaman durdurularak geçen süre kaydedildi. Her bir çözeltinin viskozitesi 3 ml'nin Oswald viskozimetrenin a çizgisinden b çizgisine geçiş süresi ile orantılı olarak süre bazında hesaplama yapıldı.



Şekil 3.1. Ostwald viskozimetresi

3.2.6. pH ölçümü

pH değişiminin belirlenmesinde (Hanna Marka pH 211) pH-metre kullanıldı. *B. subtilis* inoküle edilmeden önce ve inoküle edildikten sonra 24, 48 ve 72. saatin sonlarında PAST çözeltilerinin pH' ları belirlenmiştir.

3.2.7. Laktoz miktarının belirlenmesi

B. subtilis inoküle edilmiş ve 30°C'de inkübasyona bırakılmış olan % 10, 15 ve 20'lik PAST çözeltilerindeki laktoz miktarları infrared spektrometri metoduna göre MilkoScan FT-120 (Foss) cihazı ile belirlenmiştir (AOAC 2007). MilkoScan FT-120 FTIR ölçüm prensibine göre çalışmaktadır.

3.2.8. Polisakkarit miktarının belirlenmesi

B. subtilis inoküle edilmiş ve 30°C'de inkübasyona bırakılmış olan % 10, 15 ve 20'lik PAST çözeltilerindeki polisakkarit miktarları 72. saatin sonunda fenol-sülfirik asit metoduna göre ölçülmüştür (Masuko ve ark., 2005). İnkübe edilen (72 saat) % 10, 15 ve 20'lik 100 ml PAST çözeltileri soğutmalı santrifüjde 4°C ve 5000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Pelete 10 mM NaCl solüsyonu eklenerek elle 15 saniye çalkalandı ve tekrar santrifüjlenerek (5000 rpm, 15 dk, 4°C) pelet haline getirildi. Pelete 3 hacim absülüt etanol (9 ml) eklenerek 4°C'de 24 saat bekletildi. 24 saatin

sonunda solüsyonlar santrifüjlendi (5000 rpm, 30 dk, 4°C). Pelet 10 ml saf su ile çözülerek rejenere selüloz membran kullanılarak karıştırılmalı modül (Model 8010, Millipore Corp. Bedford, MA) ultrafiltrasyondan geçirilerek etanol ve diğer kalıntılar uzaklaştırılmış oldu. Filtrattan tüplere 2'şer ml alındı. Her bir tüpe 6'şar ml sülfirik asit ve 1200'er µL %5 lik fenol ilave edildi. Tüpler 80°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletildi. 5 dakika içerisinde oda sıcaklığına getirecek şekilde soğuk su banyosuna tabi tutuldu. Kuru ve temiz kuartz küvete konularak gellan standartlarına karşı 490 nm de UV mini-1240 model UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu) okuma yapıldı.

3.2.8.1. Standartların hazırlanışı

Standart olarak Gellan™ CM (Sigma- Aldrich) kullanıldı. 20 mg gellan gum tartıp 10 ml saf su ile tamamlandı. Bu solüsyondan 4 µL pipetlendi ve 996 µL saf su ilave edildi. Bu hazırlanan stok solüsyon Tablo 4'de görüldüğü gibi 6 tane standart çözelti hazırlandı. Tablo 3.4'de elde edilen verilerden standart eğri çizildi.

Tablo 3.1. Hazırlanan Standart Çözeltiler

µL std.	µL su
0	50
1.25	48.75
6.25	43.75
12.5	37.5
25	25
50	0

3.2.9. Surfaktin Tayini

3.2.9.1. Surfaktin izolasyonu

Surfaktin izolasyonu Hsieh ve ark. (2004)'nin kullandığı metot referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu metoda göre, *B. subtilis* inoküle edilen ve 72 saat 30°C'de inkübe edilen %10, 15 ve 20'lik PAST çözeltilerinden hücreleri uzaklaştırmak için soğutmalı santrifüjde (Hettich) santrifüj işlemi (5000 rpm, 4°C) uygulandı. Süpernatantın pH'sı konsantre HCl çözeltisi kullanılarak pH 2'ye ayarlandı. Daha sonra süpernatant tekrar 15 dakika santrifüj işlemine (5000 rpm, 4°C) tabi tutuldu. Pelet süpernatanttan ayrılarak oda sıcaklığına kurutuldu. Diklorometan ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra solvent uçurularak peletin kristalizasyonu sağlandı. Diklorometan ekstraktı pH'sı 1 Normal NaOH ile 8'e ayarlanan distile suyla çözüldürüldü, bu çözelti Wattman filtre kağıdından süzüldü. Süzüntünün pH'sı konsantre HCl kullanılarak pH 2'ye ayarlandıktan sonra santrifüj edildi (5000 rpm, 4°C). Santrifüjleme işleminin sonunda ise beyaz katı pelet elde edildi. Pelet 1 ml metanolde (Sigma-Aldrich) çözüldürüldükten sonra aktif kömür (Sigma-Aldrich) uygulanarak berraklaştırıldı. Daha sonra ise 0.22 µm gözenekli teflon filtreden geçirildi.

3.2.9.2. Standart surfaktin çözeltilerinin hazırlanması

Sigma'dan sağlanan *B. subtilis* kaynaklı surfaktin standardı ile hazırlanmış standart eğriye göre surfaktin konsantrasyonları belirlenmiştir. Standart eğri için 40 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2.5 ppm, 1 ppm, 0.5 ppm ve 0.1 ppm konsantrasyonlarında metanolde surfaktin çözeltileri hazırlandı.

3.2.9.3. Solvent hazırlanması

Solvent olarak Sigma'dan sağlanan asetonitril ve trifloroasetik asit kullanıldı. % 80 asetonitril ve % 20 trifloroasetik asit karışımı hazırlandı (3.8 mM; 80:20, v/v).

3.2.9.4. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile surfaktin konsantrasyonlarının belirlenmesi

Süzüntü ters faz kolondan geçirildi (RP-18, 5 μ m, 4 x 250mm). Kolon 1.0 mL/dk asetonitril-trifloroasetik asitten (3,8 mM; 80:20, v/v) geçirilerek elute edildi ve HPLC'de 210 nm'de okuma yapıldı.

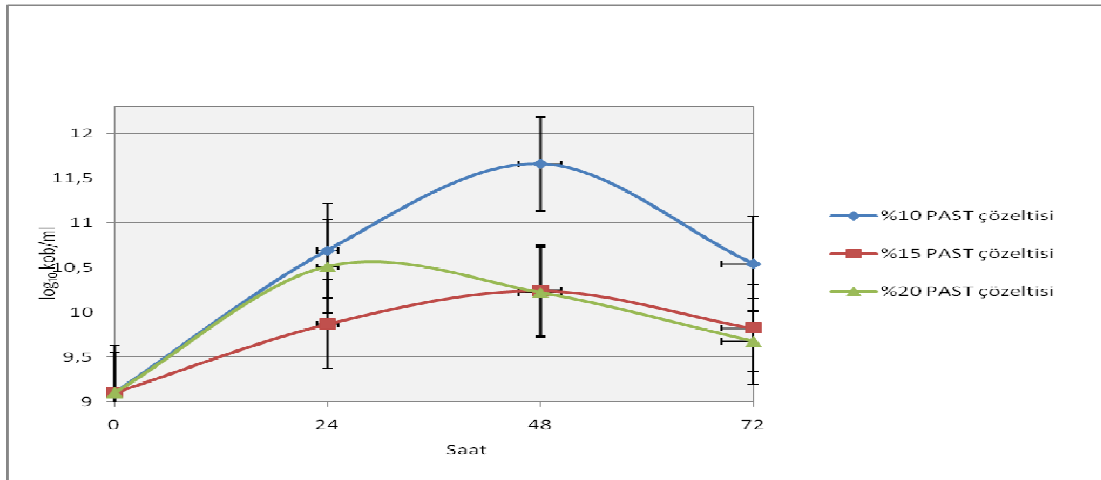
3.2.10. İstatistik metot

Elde edilen verilerin istatistiksel olarak yorumlanmasında tek yönlü varyans analizi ANOVA uygulanmıştır

BÖLÜM 4. SONUÇLAR

4.1. Vejetatif Hücre Sayımları

Zenginleştirme ve transfer işlemi sonrasında kültürdeki başlangıç *B. subtilis* sayısı 9.1 log olarak belirlenmiştir. Bu mikroorganizmalar %1 oranında %10'luk PAST çözeltilisine ilave edildikten sonra 30°C'de 24 saat inkübasyonu sonrası 10.69 log kob/ml'ye, 48. saatte ise 11.62 log'a arttığı gözlenmiştir ve bu artış ilk güne oranla istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.05$) (Şekil 4.14). *B. subtilis* vejetatif mikroorganizma sayısında 72 saat sonunda ise 10.54 kob/ml'ye düşüş tespit edilmiştir ve bu azalma istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Şekil 4.1'te görüldüğü gibi %15'lik PAST çözeltilisine inokülasyon ve 48 saat inkübasyonu sonrası, hücre sayısı 8 log dan 10.28 log'a kadar artış ve 72 saatin sonunda ise hücre sayısı 9.82 log'a düşmüştür. Benzeri şekilde %20' lik PAST çözeltilisine ilave edildikten 48 saat sonra hücre sayısı 10.27 log olarak sayılmış fakat 72 saatin sonunda istatistiksel olarak önemli (9.38 log/ml'ye) düşüş tespit edilmiştir ($p<0.05$).

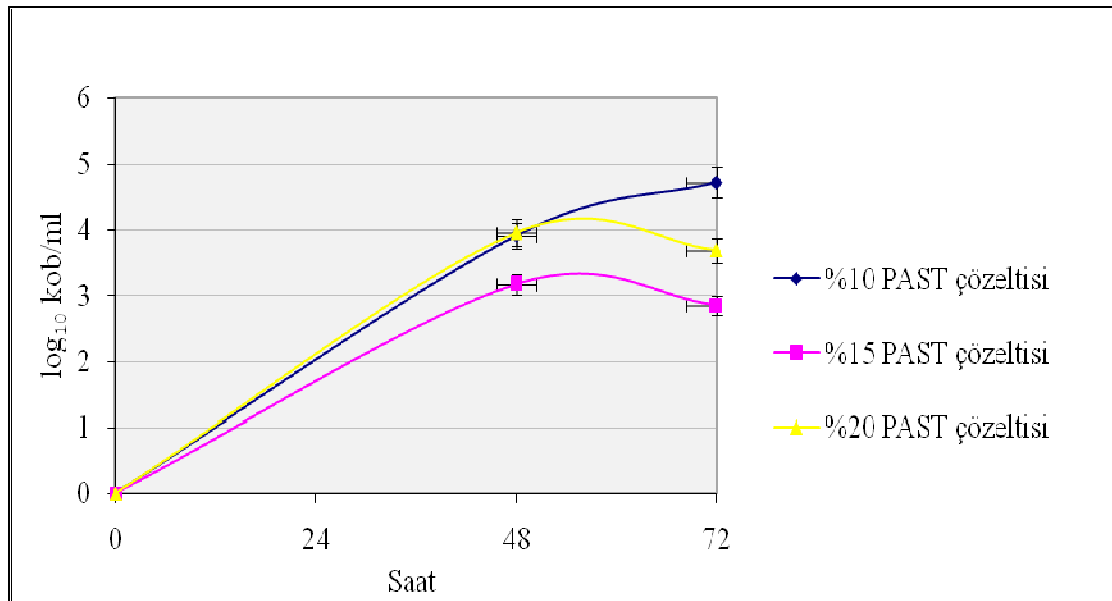


Şekil 4.1. Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince *B.subtilis* vejetatif hücre sayısındaki değişim

4.2. Spor Sayımları

PAST çözeltilerinin inkübasyon süresince *B. subtilis*'in spor sayısında meydana gelen değişim Şekil 4.2'de gösterilmiştir. PAST %10'luk çözeltisinde *B. subtilis* inokülasyonu ve 30°C'de 48 saat inkübasyonu sonrası spor miktarı 3.91 log olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). İnkübasyonun 72. saatinde ise spor miktarının 4.72 log'a yükseldiği tespit edilmiştir ($p<0.05$).

PAST konsantrasyonu %15 olan çözeltide 30°C'de 48 saat inkübasyon sonrası spor miktarı 3.16 log olarak ve %20'lik PAST çözeltisinde 48 saat inkübasyon sonrası spor miktarı 3.96 log olarak belirlenmiştir. Bu artışların inkübasyon öncesine göre istatistiksel açıdan önem taşıdığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). İnkübasyonun 72. saatinde spor miktarında ise istatistiksel açıdan önemli değişim görülmemiştir ($p>0,05$).

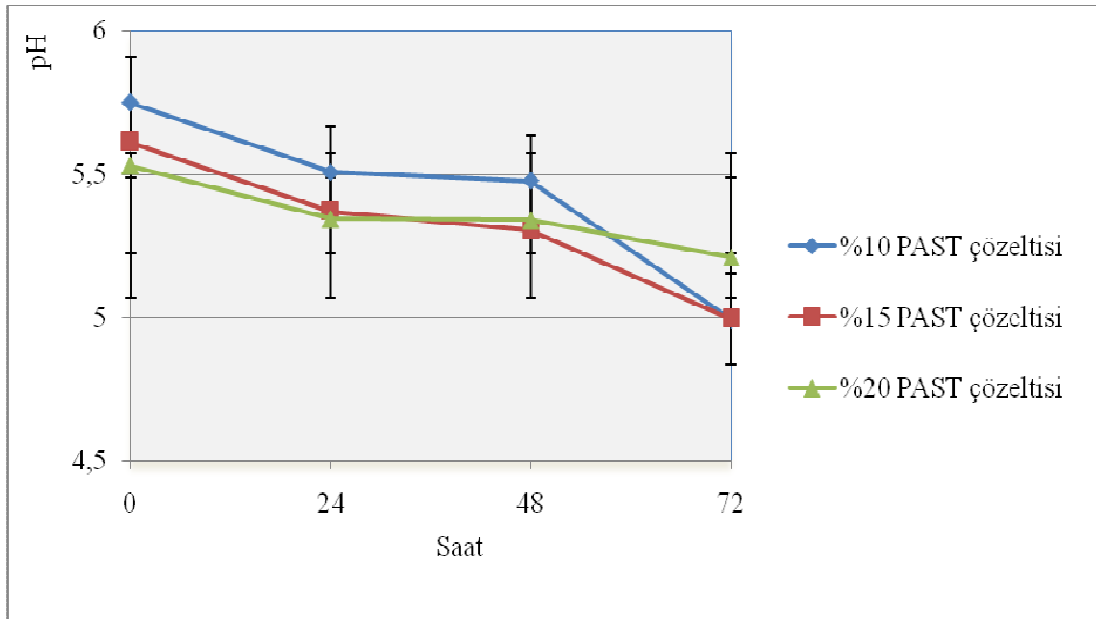


Şekil 4.2. Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince *B.subtilis* sporu sayısındaki değişim grafiği

4.3. pH Değerleri

Konsantrasyonları %10, 15 ve 20 olan PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince pH değerlerinde meydana gelen değişim Şekil 4.3' de gösterilmiştir. %10' luk PAST çözeltisinin *B. subtilis* inokülasyonu ve inkübasyonu öncesi pH'sı 5.75 iken bu değer *B. subtilis* inokülasyonu ve 30°C'de 72 saat inkübasyonu sonrası 4.99 olarak tespit edilmiştir ($p<0.05$).

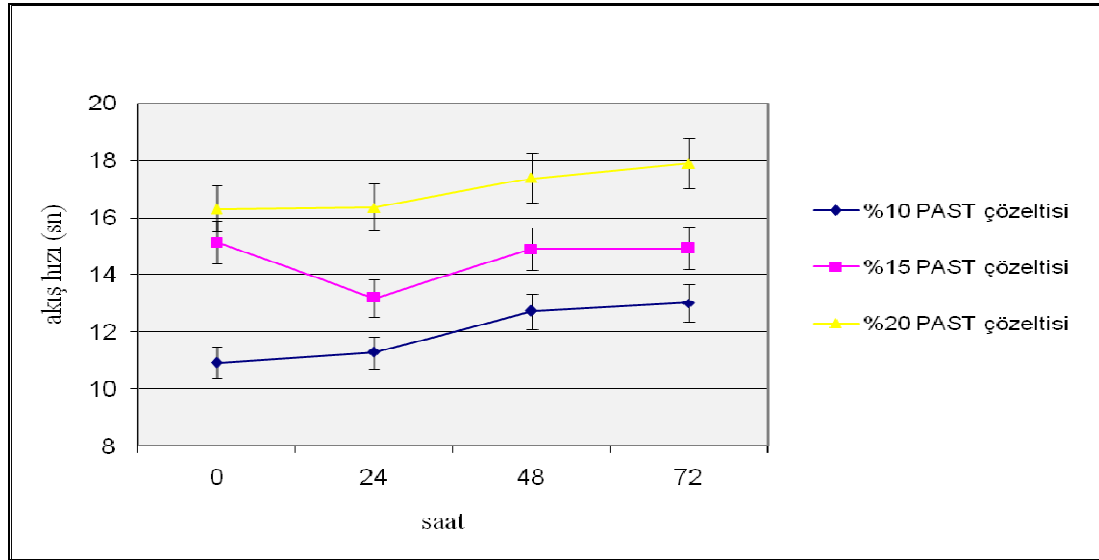
Aynı şekilde %15'lik ve 20' lik PAST çözeltisinin inkübasyon öncesi pH'ları 5.61 ve 5.53 iken bu değer 30°C'de 72 saat inkübasyon sonrası sırası ile 4.99 ve 5.21' e düşmüştür ($p<0.05$).



Şekil 4.3. Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince zaman-pH değişim grafiği

4.4. Viskozite Değerleri

%10, %15 ve %20' lik PAST çözeltilerinde *B. subtilis* inokülasyonu ve 72 saat inkübasyon sonrasında, inokülasyon öncesi viskoziteye göre sırası ile 1.27 ve 1.10 kat artış saptanmıştır.



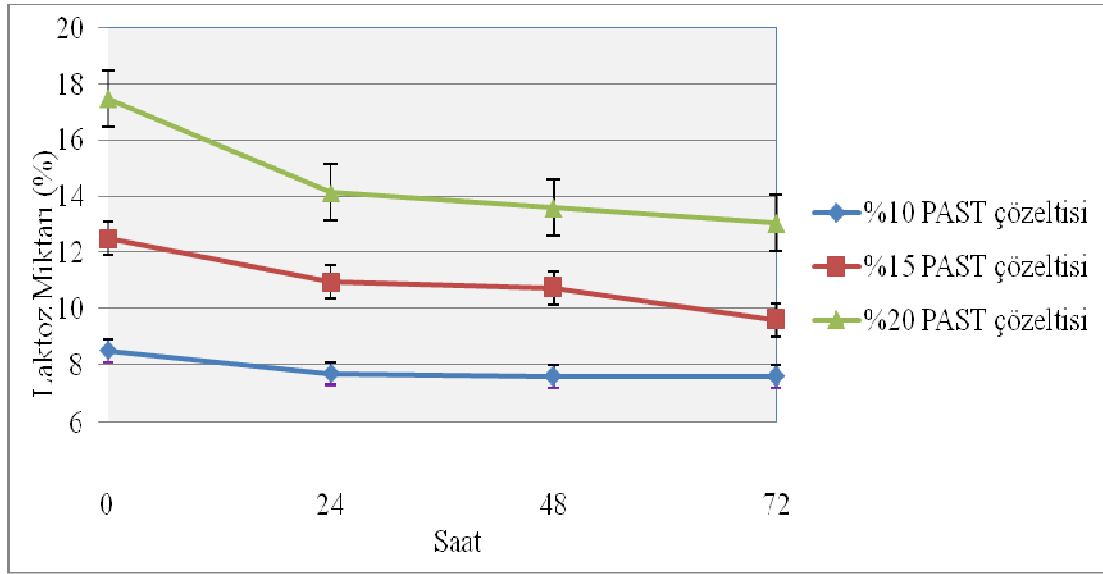
Şekil 4.4. Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince zaman-viskozite değişim grafiği

4.5. Laktoz Miktarları

B. subtilis inokülasyonu öncesi laktoz miktarı %8.5 olan %10'luk PAST çözeltisine *B. subtilis* inokülasyonu ve 30°C'de 24 saat inkübasyonu sonucu laktoz miktarı %7,70 olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). Laktoz miktarının 48. saatte %7.60'a düştüğü, 72. saatte sonrasında ise istatistiksel olarak önemli bir değişim olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

B. subtilis inokülasyonu öncesi laktoz miktarı %12.75 olan %15'lik PAST çözeltisinin laktoz miktarı *B. subtilis* inokülasyonu ve 30°C'de 24 saat inkübasyonu sonucu laktoz miktarı %10.95 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). Laktoz miktarı inkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde önemli azalma göstermiştir ($p < 0,05$).

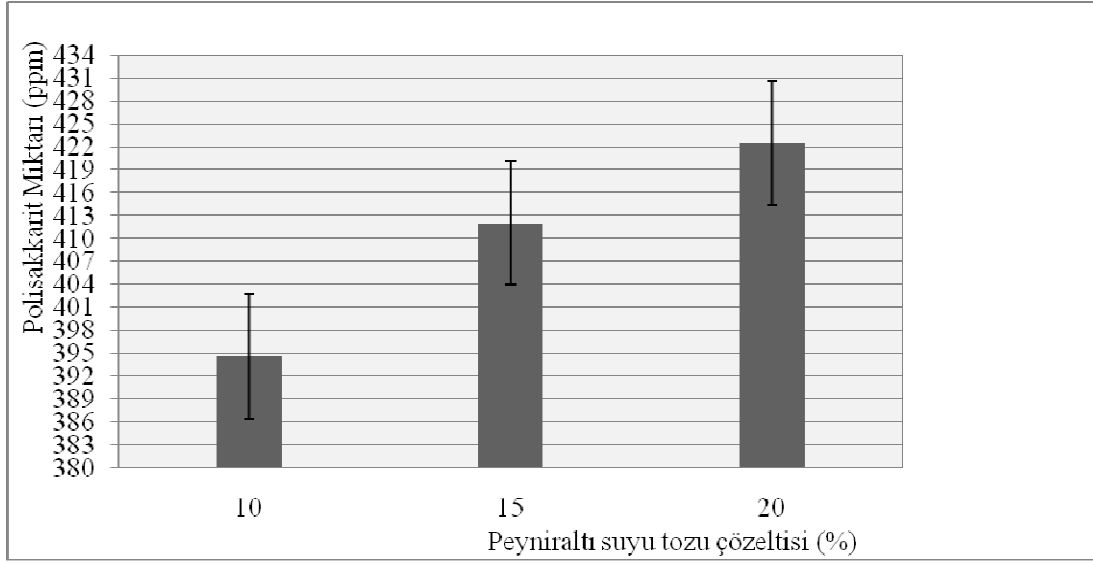
B. subtilis inokülasyonu öncesi laktoz miktarı %17 olan %20'lik PAST çözeltisinin inokülasyon ve 30°C'de 24 saat inkübasyonu sonucu laktoz miktarı %14.15 olarak önemli azalma göstermiştir ($p<0.05$). Laktoz miktarının 48. saatte %13,6'ya ve 72. saatte ise %13.05'e azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). %20' lik PAST çözeltisindeki 24. saatteki laktoz miktarına göre 48. saatteki düşüşün ve aynı şekilde 48. saatteki laktoz miktarına göre 72. saatteki düşüşün istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4.5. Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde inkübasyon süresince laktoz miktarındaki değişim grafiği

4.6. Polisakkarit Miktarları

Konsantrasyonları %10, %15 ve %20 olan PAST çözeltilerine *B. subtilis* inokülasyonu ve 30°C'de 72 saat inkübasyonu sonucu polisakkarit miktarları sırası ile 394.6 ppm, 412 ppm ve 422.5 ppm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Değişik konsantrasyonlardaki bu çözeltilerdeki polisakkarit miktarlarındaki artışların istatistiki açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4.6. Değişik konsantrasyonlardaki PAST çözeltilerinde 72 saat inkübasyon sonundaki polisakkarit miktarları grafiği

4.7. Surfaktin Miktarları

HPLC ile yapılan analiz sonucunda *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun %10, %15, %20 PAST çözeltisi ortamında surfaktin üretimini gerçekleştirmediği tespit edilmiştir.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalarda %2 laktoz içeren besiyerinde 130 *B. subtilis* suşundan 60'ının laktozu kullanabildiği ve glukonat ürettiğini bildirilmiştir (Nakamura, 1987). Analiz edilen %10, %15 ve %20 konsantrasyonlarındaki PAST çözeltilerinde vejetatif *B. subtilis* ATCC 6633 hücrelerindeki en iyi gelişim %10' luk PAST çözeltisinde 30°C 48 saat inkübasyon sonucu görülmüştür. %10'luk PAST çözeltisinde laktoz miktarı % 8.5 olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan %15 ve %20' lik PAST çözeltilerinin içerdiği laktoz miktarları sırası ile %12.5 ve %17.5'dir. Bu da PAST çözeltilerindeki laktoz miktarının *B. subtilis* üreme koşulları için fazla gelebileceğini düşündürmüştür.

B. subtilis spor oluşumu grafiği ile pH grafiği karşılaştırıldığında ilk 48 saat spor miktarında artış gözlenirken pH'da bir düşüş söz konusudur. pH' daki bu düşüş ile *B. subtilis*' in laktozu kullanarak laktik aside dönüşmesi arasında bir korelasyon olması mümkündür.

Ayrıca *B. subtilis* vejetatif hücre sayısında inkübasyonun 48. saatine kadar %10 ve %20' lik PAST çözeltilerinde %15' lik PAST çözeltisine göre daha fazla artış olmaktadır. Keza spor miktarı da 48. saate kadar %15' lik PAST çözeltisine göre daha fazla artış göstermiştir.

İnkübasyonun 48. saatinde spor miktarındaki en fazla artış %20' lik PAST çözeltisinde gerçekleşmiştir. Bu da %20' lik çözeltideki laktoz miktarının (%17.5) *B. subtilis* için fazla gelebileceğinden dolayı vejetatif hücrelerin kendileri için uygun olmayan bir çevre şartı olarak bu çevre şartına yanıt olarak sporulasyona başlayabileceğini düşündürmektedir.

Aynı şekilde PAST çözeltilerinin viskozitelerindeki düşüş de *B. subtilis* ATCC 6633 bakterisinin bileşiminde polisakkarit içeren spor oluşturmasından kaynaklanabileceği

düşünülmektedir. Bazı araştırmacılar da *Bacillus* türleri tarafından oldukça viskoz ekstraselular polisakkaritlerin üretildiğini bildirilmiştir (Mitsud ve ark., 1981). Bu çalışmada *B. subtilis* ATCC suşundan peyniraltı suyu ortamında polisakkarit üretilebileceği ortaya koyulmuştur. En yüksek polisakkarit miktarı 422.5 ppm olup % 20 PAST çözeltilisinde tespit edilmiştir.

Bacillus'ların antibiyotik üretimi birçok faktöre bağlı olup yapılan çalışmalarda bazı *Bacillus* suşlarının antibiyotik üretimi pH ve besiyerindeki besin maddelerine bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Leifert ve ark., 1995). *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun PAST çözeltilisi ortamında surfaktin üretmemesi ortam şartlarının surfaktin üretimini baskılayabilecek nitelikte olmasından veya seçilen bu *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan kaynaklanacağı sonucuna varılmıştır.

Abushady ve ark. (2005)'nin yaptığı bir çalışmada *B. subtilis* suşlarının en iyi surfaktin üretebildiği pH aralığının 6.5 ila 7 arasında olduğu belirtilmiştir (Abushady ve ark., 2005). Yine aynı araştırmacılar *B. subtilis*'in en yüksek surfaktin üretmesi için optimum besin ortamının 40 g/L glukoz, 4.5 g/L NH₄NO₃, 40 mg/L MnSO₄ ve 6 mM FeSO₄ ihtiva ettiğini bildirmişlerdir. Oysa ki bu çalışmada besin ortamı olarak kullanılan PAST çözeltileri karbonhidrat olarak sadece %8.5-17.5 laktoz ihtiva etmektedir. Ayrıca bu çalışmada besin ortamına hiçbir besin maddesi ilavesi yapılmamıştır. Bu da *B. subtilis* ATCC suşunun surfaktin üretimini baskılamış olabilir.

Yapılan çalışmalarda bazı *Bacillus* suşlarının antibiyotik aktivitesinin pH' ya bağlı olarak da değiştiği tespit edilmiştir (Leifert ve ark., 1995). Bu çalışmada ortam pH'sının da *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan surfaktin üretimi için uygun olmayabileceği düşünülmektedir.

Perez ve arkadaşları ise, *B. subtilis* MIR 15'de antibiyotiklerin üretiminin kültürasyon sıcaklığı ile çeşitlilik gösterebileceğini belirtmişlerdir (Perez ve ark., 1992). Aynı şekilde bu çalışmada *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan surfaktin üretimi için inkübasyon sıcaklığının uygun olmayabileceği düşünülmektedir.

Besin öğelerinin bu suşun surfaktin üretmesini baskılamasının dışında *B. subtilis* ATCC suşunun da surfaktin üretmek için uygun olmayabileceği düşünülmüştür. Bazı

araştırmacılar 14 ayı *B. subtilis* izolatının sadece 2 tanesinin surfaktin üretme genine sahip olduğunu bildirmiştir (Abushady ve ark., 2005).

Dünyadaki peynir üretimi sonucu yan ürün olarak ortaya çıkan peyniraltı suyunun yaklaşık yarısı kullanılmamaktadır (Gonzales, 1996). Sütteki besin öğelerinin yaklaşık olarak %55 kadarını içeren bu süt endüstrisi yan ürününün değerlendirilmeden akarsulara, göllere ve hatta denizlere atıldığında, ortamın oksijenini tükettiği için yaşamı olumsuz etkilemekte ve çevre kirlenmesine yol açmaktadır Bu yüzden peyniraltı suyunun atık olarak değerlendirilmesi çözülmesi gereken ciddi bir çevre sorunudur (Konar ve Arıoğlu, 1987; Sienkiewicz ve Riedel, 1990).

Oldukça zengin besin içeriğine sahip bu sütçülük artığı herhangi bir yolla değerlendirilmeden direkt olarak atık olarak kullanıldığında çevre üzerinde olumsuz etkileri olmasının yanı sıra peyniraltı suyunun değerlendirilmemesi ülke ekonomisi açısından da büyük kayıp anlamına gelmektedir (Özrenk ve ark., 2003). Oysa peyniraltı suyunun bazı mikrobiyolojik araştırmalarda hem dolgu maddesi olarak hem de besi ortamlarında katkı maddesi olarak kullanıldığđı bildirilmiştir (Sienkiewicz ve Riedel, 1990). Ayrıca peyniraltı suyu içerdii besin maddelerinden dolayı mikroorganizmalar için iyi bir besi ortamı olup çeşitli araştırmalarda bu besi ortamında mikroorganizmaların çeşitli maddeler üretebileceği ortaya koyulmuştur (Dlamini ve Peiris, 1997; Konar ve Kahyaoğlu, 2006).

Bu çalışmada da *B. subtilis*'ten polisakkarit üretimi gerçekleştirilmiştir. Eğer bu besin ortamına surfaktin üretimi için optimum besin öğeleri ilave edilirse ve ortam pH sı optimum hale getirilirse PAST çözeltisi diğer çalışmalarda da *B. subtilis*' ten surfaktin veya diğer metabolitleri üretmek için besi ortamı olarak kullanılabilir.

Bazı araştırmacılar *in vitro* çalışmalarda ekstraselüler polisakkaritlerin varlığının katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edildiğini bildirmiştir (Gugliandola, 2003). Bu çalışmada PAST çözeltisi ortamında polisakkarit üretimi olup olmadığının tahmin edilmesi amacıyla polisakkarit miktarının belirlenmesinden önce viskozite tayini yapılmıştır.

Vizkozitenin giderek artış göstermesi *B. subtilis*' in PAST çözeltisi ortamında polisakkarit oluşturduğunun tahmin edilmesine yardımcı olmuştur. Nitekim polisakkarit sonuçları da bunu destekler nitelikte olmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada *B. Subtilis* ATCC 6633 suşunun değişik konsantrasyonlarda PAST çözeltilerinde fermantasyonu ile polisakkarit üretimi gerçekleştirilmiş fakat surfaktin üretimi sağlanamamıştır. Ortam parametreleri değiştirilerek veya ortama besin maddeleri ilavesi ile bu ortamda surfaktin üretimi de sağlanabileceği düşünülmektedir. Çünkü bu ortamda *B. Subtilis* ATCC 6633 suşunun üreme gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Bu suşun üreme sağlaması demek gerekli şartlar sağlandığında istenen metabolitlerin üretilebileceği anlamına gelmektedir.

KAYNAKLAR

ABUSHADY1, H.M., BASHANDYI, A.S., AZIZI, N.H. and IBRAHIM, H.M.M., Molecular Characterization of Bacillus subtilis Surfactin Producing Strain and the Factors Affecting its Production, Egypt, 2005.

ALPKENT ve Z., GÖNCÜ, A., Peynir suyu ve peynir suyu proteinlerinin gıda, kozmetik ve tıp alanlarında kullanılması. Gıda Mühendisliği Dergisi / Sayı:15 / 26-30 s., 2003.

ALTUN, B., BESLER; T. ve ÜNAL, S., Ankara'da Satılan Sütlerin Değerlendirilmesi. www.ttb.org/STED/sted0202/sut.pdf Erişim tarihi: 31.10.2010, 2010.

ANONİM, Tarım İstatistikleri Özeti 1981-2000, T.C Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, ISSN 1300-1213, 2000.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 18th ed., Current Through Revision 2, AOAC, Arlington, Washington DC, 2007.

ARDA, M., Temel mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, Ankara, 2000.

TAUBMAN, S., Genus Bacillus, Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 355-356, 1992.

AYHAN, K., Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 43- 44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara, 2000.

BERGEY, JOHN G., HOLT, NOEL R. and KRIEG, PETER, H.A., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., ISBN 0-683-00603, Sneath 1994.

BİLGEHAN, H., Bacillus Genusu: Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 529-532s, İzmir, 1995.

BRANDA, SS., CHU, F., KEARNS, DB., LOSICK, R. and KOLTER, R., A major protein component of the Bacillus subtilis biofilm matrix, Mol Microbiol., 59(4):1229-38, USA, 2006.

BUCHANAN, R., E., AND GIBBONS, N., E., "Bergeys manual of determinative bacteriology, 8th edition" , The Williams Company, Baltimore, 12146, 1974.

BULLERMAN, L. B. AND BERRY E. C., Use of Cheese Whey for Vitamin B12 Production. Department of Bacteriology, South Dakota State University, Brookings, South Dakota, 1965.

BURKHOLDER, P. R., GILES, N. H., Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am. J. Botany* , 34: 345–348, 1947.

CANLI, Ö., Physicochemical Treatment of Cheese Whey Effluent. Dokuz Eylül University, Graduate School of Natural and Applied Science, İzmir, 2005.

CASH, P., Characterisation of bacterial proteomes by two-dimensional lectrophoresis, *Analytica Chimica Acta*, 372, 121-145, 1998.

CHAI, Y., CHU,F., KOLTER,R., LOSICK, R., Bistability and Biofilm Formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 67(2): 254–263, 2008.

CHATTERJEE, S., CHATTERJEE, D. K.,JANI, R. H., BLUMBACH, J., GANGULI, B. N., KLESEL, N., LIMBERT, M., SEIBERT, G., Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. In vitro and in vivo antibacterial activity, *The Journal of Antibiotics*,45, 6, 839-845, 1992.

COHN, F., Untersuchungen über Bakterien, *Beitr Biol Pflanzen* 1: 127–224, 1872.

COHN, F., Untersuchungen über Bakterien, IV. Beiträge zur Biologie der Bacillen. *Beitr Biol Pflanzen* 2: 249–277, 1876.

CONN, H. J., The Identity of *Bacillus subtilis*. *J Infect Dis.*, 46:341–350, 1930.

COOPER, D. G., MACDONALD, C. R., DUFF, S. J. B., ve KOSARIC, N., Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions, *Applied And Environmental Microbiology*, p. 408-412 Vol. 42, No. 3, Canada, 1981.

ÇON, A. H. ve GÖKALP, H. Y., Gıda Mikrobiyolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Notları Yayın No: 007, 23. Mühendislik Fakültesi Basım Ünitesi. Denizli. 1997.

DEMİRCİ, M., ARICI, M., Peyniraltı Suyunun Önemi, *Hasad Dergisi* 5 (4): 26-29, 1989.

DEMİRKAN, E., *Bacillus subtilis* α -amilaz Enziminin Nisasta Granüllerine Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi, *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, Cilt 23, Sayı 1, 13-19, 2009.

DESAI, J. D. AND BANAT, I. M., Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61,1, 47-64, 1997.

DIE, Tarımsal Yapı (Üretim, Fiyat, Değer) 2002. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Yayınları, 2004.

DLAMINI, A. M. AND PEIRIS, P. S. , Applied Microbiology and Biotechnology, School of Applied and Environmental Science, University of Western Sydney–Hawkesbury, Bourke Street, Richmond, NSW 2753, Australia, 1997.

DLAMINI, A. M. AND PEIRIS, P. S. , Biopolymer production by a Klebsiella oxytoca isolate using whey as fermentation substrate. Biotechnology Letters , pp. 127-130, 1997.

EHRENBERG, C.G., Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. In Physikalische Abhandlungen der Koeniglichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833–1835, pp. 145–336, 1835.

ELTEM, R., UÇAR, F., Bir soda gölü olan Denizli Acıgöl'den izole edilmiş 23 Bacillus suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması, KÜKEM Dergisi, 21, 1, s. 57-64, 1998.

ERKOÇ, F., Enfeksiyon Evreleri. Mikrobiyoloji dersi takviye notu, Ankara, 2008.

FEIJOO, G., MOREIRA, M. T., ROCA, E., LEMA, J. M., Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by Bjerkandera sp BOS55. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 23,86-90, 1999.

GALVEZ, A., MAQUEDA, M., CORDOVILLA, P., MARTINEZ-BUENO, M., LEBBADI, M., VALDIVIA, E., Characterization and biological activity against Naegleria fowleri of amonebicins produced by Bacillus licheniformis D-13, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38, 6, 1314-1319, 1994.

GALVEZ, A., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M., LEBBADI, M., VALDIVIA, E., Isolation and physico-chemical characterisation of an antifungal and antibacterial peptide produced by Bacillus licheniformis A-12, Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 438-442, 1993.

GUGLIANDOLA C., MAUGERI TL., CACAMO D., STACKEBRANDT E., Bacillusaeolius sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine Bacillus Species from Eolian Islands (Italy), Systematic and Applied Microbiology, 26/2, 172-176, 2003.

GÜLSÜN, M., SAHAN, A., Peynir altı Suyunun Özellikleri. Gıda (GTD)13(4): 12-14, 1992.

HEERKLOTZ, H., SEELIG, J., Detergent-like Action of The Antibiotic Peptide Surfactin on Lipid Membranes. Biophysical J., 81(3): 1547-54, 2001.

J. N. DE WIT., Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. Centre for Protein Technology Wageningen Agricultural University, PO Box 8129, 6700 EV Wageningen, The Netherlands, 1998.

KAHYAOĞLU, M., KIVANÇ, M., Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.), 17(2): 61-66, 2007.

KALAYLI, E. ve BEYATLI, Y., Bacillus Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA' ları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 01(12), 24-35, 2003.

KALKAN, S., HALKMAN, K., Bacillus cereus ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2006.

KARAGÖZLÜ, C., BAYERER M., Peyniraltı Suyu Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 41 (2):197-207, 2004.

KENNE, L., LINDBERG, B., In The Polysaccharides; Aspinall, G. O., Ed.; Academic Press: Vol. 2, pp 287-363, New York, 1995.

KLUGE, B., VATER, J., SALNIKOW, J., ECKART, K., Studies on the Biosynthesis of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from Bacillus subtilis ATCC 21332. FEBS Letter; 231:107-10, 1988.

KNOPP, T.K., Whey Utilization in Cheese, Cultured Dairy Product Journal, 23, 14-18, 1988.

KONAR, V., KAHYAOĞLU, M., The Utilize of Industrial Waste Substrate for Rhamnolipid Biosurfactants Production and Application Potential. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, ISSN-1302-3055, 2006.

KONAR, A., H. ARIOĞLU, Peynir suyunun soya üretiminde gübre olarak kullanılma olanakları üzerinde bir ön araştırma. Çukurova Üniv., Zir. Fak. Derg., 2(2):1-13, 1987.

KSIKOWSKI, F. V., Cheese and fermented milk foods. 2.nd ed. Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor, MI, Page 668, 1978.

KURT, A., 1990. Süt Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Yayınları No 573, 398.

LEE, S.Y., MIDDELBERG, A.P.J., LEE, Y.K., Poly (3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant Escherichia coli. Biotechnology Letters, 0141-5492, 1573-6776, 1997.

LEIFERT, C., LI, H., CHIDBUREE, S., HAMPSON, S., WORKMAN, S., SIGEE, D., EPTON, H. A. S., HARBOUR A., Antibiotic production and biocontrol activity

by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45, *Journal of Applied Microbiology* 78, 2, 97-108, 1995.

MARAHIEL, M. A., *Molekular biologie und regulationmechanismen der antibiotika produktion in Bacillus*, *Naturwissenschaften*, 79, 202-212, 1992.

MARAHIEL, M. A., NAKANO, M. M. ve ZUBER, P., Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*, *Molecular Microbiology*, 7, 5, 6331-636, 1993.

MASUKO, T., MINAMI, A., IWASAKI, N., Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem.* 339:69-72, 2005.

METİN, M., Süt Sanayiinde Peynir Suyunun Değerlendirilmesi. E. Ü. Müh. Fak. Gıda Müh. Bölümü Dergisi 1(1), 151-169, 1983.

METİN, M., Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları No: 33 , 388; 632-654. İzmir, 1998.

MILNER, J. L., RAFFEL, S.J., LETHBRIDGE, B. J.; HANDELSMAN, J., Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin a by *Bacillus cereus* UW85, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 4, 685-691, 1995.

MIRELES, J. R., II, A. TOGUCHI and R. M. HARSHEY, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183:5848-5854, 2001.

MITSUDA, S., MIYATA, N., HIROTA, T., KIKUCHI, T., High viscosity polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa*. *Hakkokogaku*, 59, 303-309, 1981.

MORIELLO, VS., LAMA, L., POLI, A., GUGLIANDOLO, C., MAUGERI, TL., GAMBACORTA, A., NICOLAUS, B., Production of Exopolysaccharides from a Thermophilic Microorganism Isolated from a Marine Hot Spring in Flegrean Areas, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30/2, 95-101, 2003.

NAKAMURA, L. K., Deoxyribonucleic Acid Relatedness of Lactose-Positive *Bacillus subtilis* Strains and *Bacillus amyloliquefaciens*, 1987.

NAM, D. H., ve RYU, D. D. Y., Relationship between butirosin biosynthesis and sporulation in *Bacillus circulans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, 5, 798-801, 1985.

OTA, Y., TAMEGAI, H., KUDO, F., KURIKI, H., KOIKE-TAGESHITA, A., EGUCHI, T., KAKINUMA, K., Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans*, *Journal of Antibiotics*, 53, 10, 1158-1167, 2000.

ÖZRENK, E., DEMİR, S., TUFENKÇİ, S., The Effects of Whey Application and Inoculations of *Glomus intraradices* and *Rhizobium cicer* on the Some Growth Parameters of Chickpea. *J. Agric. Sci. Yuzuncu Yil Univ.*, 13(2): 127-132, 2003.

PEREZ, C., SUAREZ, C. and CASTRO, G: R., Antimicrobial Activity Determined in Strains of *Bacillus circulans* Cluster, *Folia Microbiol.* 38, 1, 25-28, 1993.

PEREZ, C., SUAREZ, C., CASTRO, G: R., Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15, *Journal of Biotechnology*, 26, 331-336, 1992.

PRATIMA BAJPAI, GERA, R. K., BAJPAI, P. K., Optimization studies for the production of α -amylase using cheese whey medium. Thapar Corp. Research, development cent., chemical & biochemical eng. div., Patiala 147001, 1992.

RASMUSSEN, S., NIELSEN, H. B., AND JARMER, H., The transcriptionally active regions in the genome of *Bacillus subtilis*, *Molecular Microbiology*, 73(6), 1043–1057, Denmark, 2009.

RECH, R. , CASSINI, C. F., SECCHI, A., VE AYUB, M. A. Z., Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, no. 2, p. 91-96, August, 1999.

ROBINSON, T., SINGH, D., NIGAM, P., Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 284-289, 2001.

ROSOVITZ, M., J., VOSKUIL, M., I., CHAMBLISS, G., H., *Bacillus*, Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology*, by edited L. Collier, A. Balows and M. Sussman, Oxford University Press, Ninth Edition, Volume 2, New York, 1998.

ROYAL, L., Prevention Pollution-Avoidance of Milk and Milk Product Wastage and Its Role in Effluent Control, *Journal of The Society DairyTechnology*, 27, 66-70, 1974.

SHANKAR S, YE RW., SCHLICHTMAN D., CHAKRABARTY AM., Exopolysaccharide Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and Regulation of Gene Expression, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, 70, 221–255, 1995.

SIENKIEWICZ, T., C.L. RIEDEL, *Whey and Whey utilization*. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, 1990.

SNEATH, P. H. A., “Endospore-forming gram positive rods, and cocci, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, edited by P. H. A. Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt”, Williams and Wilkins, Baltimore, 2:1104-1139, 1986.

SÖZER, S. VE YALDIZ, O., Sığır Gübresi Ve Peynir Altı Suyu Karışımlarından Biyogaz Üretimi Üzerine Bir Araştırma. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(2),179-183, 2006.

SPECKMAN, R., A., and COLLINS, E., B., Microbial Production of 2,3-Butylene Glycol from Cheese Whey. Department of Food Science and Technology, University of California at Davis, Davis, California 95616. Applied And Environmental Microbiology, p. 1216-1218, 1982.

STEIN, T., Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions, Mol. Microbiol. 56 (2005), pp. 845–857, 2005.

SUTHERLAND I. W., Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides, Tibtech., 38, 41-47, 1998.

ŞİMŞEK, B., SAĞDIÇ, O., Isparta ve Yöresinde Üretilen Dolaz (Tort) Peynirinin Bazı Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10-3, 346-351, 2006.

TAMEHIRO, N., OKAMOTO-HOSOYA, Y., OKAMOTO, S., UBUKATA, M., HAMADA, M., NAGANAWA, H. AND OCHĪ, K., Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by Bacillus subtilis, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 168, 46, 2, 315-320, 2002.

TEAS, H. J., Mutants of Bacillus subtilis That Require Threonine or Threonine Plus Methionine, J Bacteriol; 59:93–104, 1949.

TODAR, K., Todar's Online Textbook of Bacteriology, The Genus Bacillus, 2009.

TOPUZ, U., KIRAN, E. Ö., ÇÖMLEKÇİOĞLU, U., Selülaz Üreticisi Bacillus Suslarının Enzimatik Özelliklerinin Arastırılması, 13 10(2), Kahramanmaraş, 2007.

TUNÇ, K., Biyoteknoloji, Gazi Üniversitesi İletişim Fakültesi Basımevi, Ankara, s. 80-86, 1995.

URAZ, T., Peynir Suyu ve Değerlendirme Şekilleri. Süt ve Mamulleri Teknolojisi, SEGEM, Yayın No:103, Çankırı 1982. 208-215, Ankara, 1981.

ULLRICH, C., KLUGE B., PALACZ Z., AND VATER J., Cell-Free Biosynthesis of Surfactin, a Cyclic Lipopeptide Produced by Bacillus subtilis, Germany, 1991.

ÜÇÜNCÜ, M., Süt Teknolojisi . Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 77, 274-279 İzmir, 1996.

ÜNLÜTÜRK, A., TURANTAŞ, F., Gıda Mikrobiyolojisi. 2. Baskı, 598s, İzmir, 1999.

ÜNLÜTÜRK, A.; TURANTAŞ, F.; ACAR, J.; KARAPINAR, M.; TEMİZ , A.; AKTUĞ-GÖNÜL, Ş. VE TUNÇEL, G., Gıda Mikrobiyolojisi. ed. Ünlütürk, A.ve Turantaş, f., 1. Baskı. Mengi Tan Basımevi, Çınarlı, İzmir, 605s, 1998.

VOLLENBROICH, D., OZEL, M., VATER, J., KAMP, R. M. and PAULI, G., Mechanism of Inactivation of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from Bacillus subtilis, Biologicals, 25, 289-297, 1997.

VOLLENBROICH, D., PAULI, G., OZEL, M., and VATER, J., Antimycoplasma Properties and Application in Cell Culture of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.*; 63(1): 44-49, 1997.

WILSON, K. E., FLOR, J. E., SCHWARTZ, R. E., JOSHUA, H., SMITH, J. L., PELAK, B. A., LIESCH, J. M. and HENSENS, O. D., Difficidin and Oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*, *J. Antibiotics*, XL, 12, 1682-1690, 1987.

WIPAT, A., HARWOOD, C. R., The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium, *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 1-9, 1999.

YAĞCI, S., ALTAN, A., GÖĞÜS, F. ve MASKAN, M., Gıda Atıklarının Alternatif Kullanım Alanları. Gaziantep Üniversitesi, Türkiye 9. Gıda Kongresi; Bolu, 2006.

YANG, S.T., ZHU, H., LIY., HONG, G., Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. Department of Chemical Engineering, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210, 1993.

YONEDA, Y., MARVA, B., Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of a amylase and protease and its synergistic effects. *J. Bacteriol.* 124: 48-54, 1975.

YÖNEY, Z., Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metotları. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları 189, Ankara, 1962.

ZHENG, G., SLAVIK, M. F., Isolation, Partial Purification and Characterization of A Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus Subtilis* Strain, *Lett. in Appl. Microbiol.*, 28, 363-367, 1999.

ZWEERINK, M. M. and EDISON, A., Difficidin and Oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*, *J. Antibiotics*, XL, 12, 1692-1691, 1987.

ÖZGEÇMİŞ

Seda KUŞAKLI, 1985 yılında Kocaeli’de doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Kocaeli’de tamamladı. 2009 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ve Kimya bölümünden mezun oldu. Halen CP Standart Gıda ve Tic. A.Ş.’de Kalite Güvence Şefi olarak çalışmaktadır.