

## ÖZET

Doktora Tezi

### LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN NİTRİK OKSİT (NO) ÜRETİMİNİN VE BUNUN BİYOJEN AMİN OLUŞUMUNA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Arzu KART

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN

NO hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar açısından önemli işlevleri bulunan bir moleküldür. Bu nedenle farklı organizmalar tarafından üretilen NO'nun endüstri ve sağlık koruma açısından biyoteknolojik ve tıbbi uygulama alanlarının aydınlatılması ve geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, nitrik oksit (NO) oluşturma yeteneğine sahip *Lactobacillus plantarum* (S1b, T119, Z1, Z2, Z3), *Pediococcus acidilactici* (S2, S3, S1a) ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (P2, P10) türlerine ait 10 adet laktik asit bakterisi kullanılarak, nitrik oksit sintaz (NOS) enzimiyle NO üretimini sağlayan genlerin belirlenmesi üzerinde durulmuştur. NO üretiminde etkili olan bu mekanizmanın yanı sıra laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen NO aracılığıyla, gıdalarda biyojen amin oluşumunun engellenmesi de irdelenmiştir. Bu hedefe yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmaların ilk aşamasında LAB'nin NO üretim miktarlarına depolamanın etkisi belirlenmiştir. Uzun süre depolamanın etkisiyle tüm suşların NO üretimlerinde azalma meydana gelmiş, NO en yüksek miktarda *Pediococcus acidilactici* S2 (15,058 µM), en düşük miktarda *L. plantarum* Z3 (2,877 µM) tarafından üretilmiştir.

Nitrati substrat olarak kullanarak nitrat redüktaz üzerinden NO üretimi gerçekleştiren suşları, NOS enzimi ile üretim yapan suşlardan ayırabilmek amacıyla NOS engelleme denemeleri gerçekleştirilmiştir. NOS enziminin engellenmesinde N<sup>G</sup>-metil-L- arjinin (L-NMA) kullanılmıştır. Deneme sonucunda, 500 µM'lık L-NMA bileşiğinin 5 suşun (S1b, T119, Z1,

Z2, Z3) NO üretimlerini %40'ın üzerinde azalttığı belirlenmiştir. Buna ilaveten suşların NOS enzim aktiviteleri de incelenmiştir.

NOS gen bölgesinin saptanması amacıyla uygun primer çiftleri (6 adet) kullanılarak, suşlara ait genomik DNA'da PZR gerçekleştirilmiştir. PZR işlemi sonucu elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir. Ancak yapılan denemeler sonucunda genomik DNA'da NOS geni belirlenememiştir. NOS genine ait bilginin plazmit DNA'da bulunabileceği varsayımından hareketle bundan sonraki çalışmalar, bu konu üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda plazmit DNA'da da NOS gen bölgesi belirlenememiştir.

NO'nun biyojen amin oluşumu üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle çeşitli ürünlerden izole edilen LAB'nin biyojen amin oluşturma özellikleri nitel ve nicel olarak belirlenmiştir. Biyojen amin üreten LAB ile NO oluşturma yeteneğine sahip LAB, biyojen aminlerin öncülü olan amino asitleri içeren MRS sıvı besiyerinde bir arada üretilmiştir. İnkübasyondan sonra suşların biyojen amin üretimlerinde meydana gelen değişimler HPLC ile saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda NO üreticisi *Lactobacillus plantarum* T119 suşunun, A-09 suşunun oluşturduğu triptamin,  $\beta$ -fenil etilamin, kadaverin, histamin ve tiramin miktarlarında önemli düzeyde azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Ancak NO, putresin üretimi üzerinde etkili olmamıştır. NO üreticisi *Pediococcus acidilactici* S2 ise A-09'un triptamin, kadaverin, histamin ve tiramin üretimlerini azaltmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Nitrik oksit, laktik asit bakterileri, nitrik oksit sintaz, biyojen amin.

**2010, 100 sayfa**

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### THE DETERMINATION OF NO PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA AND ITS EFFECTS ON FORMING BIOGENIC AMINE

Süleyman Demirel University  
Graduate School of Applied and Natural Sciences  
Food Engineering Department

Supervisor: Prof.Dr. Aynur Gül KARAHAN

Nitric oxide (NO) is a molecule which has important functions for animals, plants and microorganisms. It is very important that NO production from various microorganisms regarding to its industrial and health protective properties should be elucidated and developed for biotechnological and medical application areas.

In this study, 10 NO producing lactic acid bacteria belong to *Lactobacillus plantarum* (S1b, T119, Z1, Z2, Z3), *Pediococcus acidilactici* (S2, S3, S1a) and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (P2, P10) were used to determine the genes that produce NO with nitric oxide synthase enzyme. Inhibition of biogenic amine formation via NO producing lactic acid bacteria (LAB) was also considered as well as the efficient mechanism of NO production. In this concept, the first step of the study was to determine the effects of storage on quantity of NO production by LAB. NO production of all strains decreased after a long term storage; *Pediococcus acidilactici* S2 (15,058  $\mu\text{M}$ ) produced the highest quantity, whereas *L. plantarum* Z3 (2,877  $\mu\text{M}$ ) produced the lowest amount.

NOS inhibition experiments were carried out to differ NO producing strains via nitrate reductase which uses nitrate as substrate, from strains using NOS enzyme.  $N^G$ -methyl-L-arginine (L-NMA) was used for inhibition of NOS enzyme. At the end of the trial, it was determined that 500  $\mu\text{M}$  L-NMA substance caused over 40% reduction in NO production of 5 strain (S1b, T119, Z1, Z2, Z3). Furthermore, NOS enzyme activities of strains were also investigated.

PCR was carried out for genomic DNA of strains using appropriate 6 primer pairs to determine NOS gene region. PCR products obtained from PCR application were investigated using agarose gel electrophoresis. However, after trials NOS gene in genomic DNA was not determined. It was hypothesised that NOS gene could be coded in plasmid DNA, and the research was directed towards plasmid DNA. As a result of the trials NOS gene area was not determined in plasmid DNA.

Biogenic amine formation properties of LAB isolated from various products were determined qualitatively and quantitatively to demonstrate the effects of NO on formation of biogenic amines. Biogenic amine producing LAB and NO producing LAB were grown in MRS broth medium which had precursor amino acids of biogenic amines. After incubation the variations in biogenic amine production of strains were determined using HPLC. As a result of the study the quantities of tryptamine,  $\beta$ -phenyl ethylamine, cadaverine, histamine and tryptamine produced by A-09 strain were significantly lowered by NO producer *Lactobacillus plantarum* T119. However, NO did not show any significant effect on putrescin production. NO producer *Pediococcus acidilactici* S2 reduced tryptamine, cadaverine, histamine and tyramine produced by A-09.

**Key Words:** Nitric oxide, lactic acid bacteria, nitric oxide synthase, biogenic amine.

**2010, 100 pages**

## 1. GİRİŞ

Küçük molekül ağırlıklı, heterodiatomik molekül, değişken ve oldukça reaktif bir gaz olan nitrik oksit (NO), son zamanlara kadar çevre kirliliğine yol açması nedeni ile istenmeyen ve potansiyel karsinojen olarak kabul edilen bir bileşiktir (Aladağ vd., 2000; Karahan vd., 2005). Ancak NO yararlı etkileri ile de büyük önem taşımaktadır. NO'nun insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Burgner et al., 1999). Daha önce endotel kaynaklı gevşeme etkeni olarak bildirilen maddenin NO olduğunun belirlenmesi ile beraber NO, bilimsel çalışmaların odağı haline gelmiştir (Aladağ vd., 2000). NO'nun L-arjininden sentezlendiği belirlenmiş ve NO sentezini gerçekleştiren enzime nitrik oksit sintaz (NOS) adı verilmiştir (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Çekmen vd., 2001). Yine benzer çalışmalarda, damar endotelinden, endotel kaynaklı gevşeme faktörü (James, 1995; Palmer et al., 1987) ve nöronal mesaj molekülü olarak (Garthwaite, 1991) tanımlanması sonucu NO'nun fizyolojik işlemlerdeki önemi anlaşılmıştır. NO, mesaj molekülü olarak ve hücre faaliyetlerinin düzenlenmesindeki önemli rolü nedeniyle 1992 yılında "yılın molekülü" olarak seçilmiştir (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Culotta and Kushland, 1992; Aladağ vd., 2000; Alderton et al., 2001).

NO, hemen hemen her hücre tarafından üretilmekte ve her hücre üzerine etkinlik göstermektedir. Bu nedenle, NO genel aracı bir moleküldür. İnsan vücudunda diğer serbest oksijen radikalleri her konsantrasyonda zararlı iken, NO düşük konsantrasyonlarda kan basıncı ve sindirim sisteminin düzenlenmesinden özgül olmayan immüniteye kadar birçok önemli fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Aladağ vd., 2000). NO, ayrıca, sinyal iletim mekanizmasının moleküler bileşeni olarak, düz kas tonusunun kontrolünde, hücre çoğalması ve birbirine tutunmasında, platelet aktivasyonunda, kalpte ve iskelet kaslarında, güç üretiminde, solunumda, sinir iletiminde, hormon salgılanmasında, iyon aktivasyonunda, programlanmış hücre ölümünde, transkripsiyonel mekanizmalarda, infeksiyonlara karşı konakçı savunmasında (Anonymous, 1993; Burgner et al., 1999; Mancinelli and McKay, 1983; Nathan, 1995; Nathan and Xie, 1994; Schmidt and Walter, 1994; Stamler, 1994; Stamler et al., 1997; Stuehr et al., 2005), solunum

sistemi işlevlerinde (Gümüsel vd., 2001) ve tümör hücrelerine karşı korunma mekanizmasında görev almaktadır (Burgner et al., 1999). Ancak, bazı kaynaklarda uygunsuz yerde ve aşırı miktarda üretildiğinde birçok patolojik durumun ortaya çıkmasına neden olabileceği de belirtilmektedir (Aladağ vd., 2000; Stuehr et al., 2005). Aynı zamanda NO'nin antimikrobiyel etkiye sahip olduğu da ifade edilmektedir (Burgner et al., 1999; Gümüsel vd., 2001). NO'nin fungus, parazitler ve *Mycobacterium tuberculosis*'i içeren çeşitli bakteriler üzerinde öldürücü veya gelişimi engelleyici etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Viral replikasyonu önlemede ve çeşitli patojenlerin yok edilmesinde de benzer etkiye sahiptir (Gümüsel vd., 2001).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, bitkilerin de NO üretimini katalizleyen NOS benzeri enzimler oluşturduğunu göstermiştir (Ninnemann and Maier, 1996). İmmünolojik çalışmalar sonucunda NOS'in bitki sitosollarında (Magalhaes et al., 2000), peroksizomlarında (Barroso et al., 1999) ve kloroplastlarda yer alabildiği belirlenmiştir (Pedroso et al., 2000a). Bunların yanı sıra NO, bitki büyüme ve gelişiminde (Leshem and Harmaty, 1996), programlanmış hücre ölümünde (Pedroso et al., 2000b), sinyal iletim mekanizmasında (Leshem and Harmaty, 1996; Noritake et al., 1996) ve hastalık direncinin oluşumunda da görev almaktadır (Doke et al., 1996; Durner et al., 1999; Hausladen and Stamler, 1998).

NOS'in savunmayla ilişkili olan genlerin indüksiyonunu tetiklediği ve bu şekilde bütün bitkisini viral enfeksiyonlardan koruduğu belirlenmiştir (Durner et al., 1999). Bitkilerde NO'nin sinyal iletim mekanizması memelilerdeki mekanizma ile aynı olmakla birlikte, memeli genleriyle benzerlik gösteren bir bitki NOS geni henüz klonlanmamıştır (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Bunun yanı sıra birkaç bitki ve alg türünün karanlıkta nitrat ya da nitritten NO oluşturduğu da bildirilmiştir. Nitrat redüktaz ile kontrolsüz olarak üretilen NO'nin aynı zamanda hücrel metabolizmanın bozulmasına yol açan sitotoksik bir molekül olarak görev yapabileceği de düşünülmektedir (Sakihama et al., 2002).

Doğal dengenin sağlanmasında önemli görevler üstlenen mikroorganizmalar ise nitrat redüksiyonu iz yolu ile NO üretmektedir. NO, denitrifikasyon, anaerobik amonyak oksidasyonunun (anammoks) bir yan ürünüdür (Ye and Thomas, 2001). Denitrifikasyon iz yolunda meydana gelen reaksiyonlarla enerji kazanılmakta ve bu enerji hücre gelişimi için kullanılmaktadır (Wrage et al., 2001).

Mikroorganizmaların denitrifikasyon ürünleri azot döngüsüne önemli katkılar sağlarken, nitrat redüksiyonu ya da NOS aracılığıyla NO oluşumu da gıda kalitesi ve gıda güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır. Nitrit ve nitratlardan kaynaklanan çevre kirlenmesi sonucunda bazı tarım ürünlerinde nitrat birikimi gerçekleşmektedir. Nitratın gıdalardan uzaklaştırılması amacıyla mikrobiyolojik ve iyon değişimi yöntemleri kullanılabilmesine rağmen, mikrobiyolojik denitrifikasyon seçici nitelik taşıması ve %100'e ulaşan başarılı sonuçlar nedeniyle tercih edilmektedir. Mikrobiyel denitrifikasyonun gıdalarda renk, aroma ve tat gelişimine de katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (Walkowiak-Tomczak, 2002).

Bunun yanı sıra, NO'in et ürünleri üretiminde nitrit ve nitrat kullanımına alternatif olabileceği ifade edilmektedir. Özellikle gıdalarda başlatıcı kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin NO üretim kapasitesine sahip olması gıda güvenliği ve kalitesi açısından önem taşımaktadır. Son zamanlarda, laktik asit bakterilerinin NO üretimlerinin, et ürünlerinde renk gelişimine etkisi üzerinde durulmaktadır. Et ürünleri üretiminde istenilen et rengini oluşturabilmesi ve et kalitesini muhafaza etme açısından faydalı özellikleri nedeni ile yaygın olarak nitrit ve nitrat kullanılmaktadır. Ancak nitrit ve nitrat doğal bileşikler değildir (Arihara et al., 1993; Gökalp vd., 1997). NO üreten bakterilerin kahverengi metmiyoglobini parlak kırmızı renk maddelerine dönüştürdükleri, böylece istenilen et renginin oluşturulması ve muhafazasının sağlanabileceği yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Bunun yanı sıra bu katkıların gıdalarda karsinojenik etkili nitrozaminlere dönüştüğü belirlenmiştir. Tüketici tepkisine yol açan bu durum farklı seçeneklerin aranmasını zorunlu kılmıştır (Arihara et al., 1993). Bu şekilde laktobasillerin ve NO üretim yeteneğine sahip diğer laktik asit bakterilerinin gıdalarda başlatıcı kültür olarak kullanılması ile mikrobiyel kaynaklı NO'dan faydalanılması mümkün olacaktır (Arihara et al., 1993; Karahan vd., 2005; Kart-Gündoğdu vd., 2005). Ancak konu üzerinde yeterli araştırma

bulunmamakta, laktik asit bakterilerinin NO oluşturma özelliklerinin genetik determinantlarının belirlenmesi ve NO retim kapasitelerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların yapılması önem taşımaktadır.

Bunların yanı sıra son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar sonucunda, insan vücudunda tümör oluşumunu teşvik eden biyojen amin sentezinin NO tarafından baskılandığı belirlenmiştir (Baydoun and Morgan 1998; Bauer vd. 1999). Biyojen amin içeriği çoğu gıda ürününde gıda kalitesi ve insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Gıdalarda çeşitli bakteriler tarafından oluşturulan biyojen aminler insan sağlığını olumsuz yönde etkilemekte ve özellikle fermente ürünlerin biyojen amin içerikleri üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Ancak bazı çalışmalarla memeli hücrelerinde ve *in vitro* koşullarda biyojen amin oluşumunun NO tarafından engellendiğinin belirlenmesine rağmen, gıdalarda biyojen amin oluşumu zerine NO'in etkilerini belirleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca sağlıklı gıdalara olan talebin artması gıda sanayisinde yeni keşifleri ve yeni ürün geliştirilmesini teşvik etmektedir. Bu nedenlerle gıdalarda başlatıcı kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin NO retim kapasitesine sahip olması, gıda güvenliği ve kalitesi açısından ayrıca değer taşımaktadır. Dolayısıyla bakteriyel NO-gıda ve gıda-sağlık etkileşiminin farklı boyutlarının incelenmesi önemli bir gereksinimdir ve bakteriyel NO sentezi yoluyla gıda kalitesinin artırılabilme olanakları önem kazanmaktadır.

Bu zellikler dikkate alınarak ileride çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere yüksek lisans tez çalışması esnasında izole edilen laktik asit bakterileri materyal olarak kullanılmıştır. İzole edilen bu bakterilerin nitrik oksit oluşturma yeteneklerinden yararlanabilme olanaklarını belirlemek amacıyla öncelikle LAB'nin NO retim miktarlarına depolamanın etkisi belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise NO retiminde etkili olan mekanizmanın belirlenmesi amacıyla NOS engelleme denemeleri gerçekleştirilmiştir. NOS enziminin engellenmesinde  $N^G$ -methyl-L-arginine (L-NMA) kullanılmıştır. Buna ilaveten suşların NOS enzim aktiviteleri de belirlenmiştir.



Çalışmanın diğler aşamasında ise NOS enzimiyle NO üretimini sağlayan genlerin belirlenmesi üzerinde durulmuştur. NOS gen bölgesinin saptanması amacıyla uygun primer çiftleri (6 adet) kullanılarak, suşlara ait genomik DNA'da PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca NOS genine ait bilginin plazmit DNA'da bulunabileceği düşüncesi ile çalışmalar, bu konu üzerinde yoğunlaştırılmıştır. NO üreticisi LAB'nin plazmit profilleri incelenmiş ve plazmit DNA'da NOS gen bölgesi aranmıştır.

NO üretiminde etkili olan mekanizma ve gen bölgesinin araştırılmasının yanı sıra NO'in biyojen amin oluşumu üzerine etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla, öncelikle çeşitli ürünlerden izole edilen LAB'nin biyojen amin oluşturma özellikleri nitel ve nicel olarak belirlenmiştir. Biyojen amin üreten LAB ile NO oluşturma yeteneğine sahip LAB, biyojen aminlerin öncülü olan amino asitleri içeren MRS sıvı besiyerinde bir arada üretilmiştir. İnkübasyondan sonra suşların biyojen amin üretimlerinde meydana gelen değişimler HPLC ile saptanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Nitrik Oksitin Yapısı ve Özellikleri

NO, nitrik oksit veya azot monoksit olarak da adlandırılmaktadır (Çekmen vd., 2001) ve ortam havasında belli oranda yer alan atmosferik bir gazdır. NO sigara dumanı, egzoz gazı ve kirli havada daha yoğun olarak bulunmaktadır. Atmosferdeki bakteriler, asit yağmurları, jetler, baca gazları, egzoz gazları, tüten sigaralar NO ve diğer reaktif oksijen türlerini üreterek, hava kirliliğine neden olabilmektedirler. Havadaki NO oksijenle oksitlenerek çok kısa sürede  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NO}_3^-$  oluşturmaktadır (Aladağ vd., 2000; Çekmen vd., 2001; Karahan vd., 2005).

Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO, serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. NO lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (Aladağ vd., 2000; Çekmen vd., 2001) ve suda çözünebilmektedir (Moncada et al., 1997; Aladağ vd., 2000). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, reaktif (biyoaktif) memeli hücresi sekresyon ürünüdür. Düşük konsantrasyonlarda iken NO toksik değildir (Çekmen vd., 2001) ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol almaktadır (Moncada et al., 1997; Çekmen vd., 2001; Stuehr et al., 2005).

NO'nin açık formülünde yer alan çiftlenmemiş olan elektronu, azot ve oksijen atomları üzerinde yer değiştirerek 'rezonans stabilitesi' sağlamaktadır. NO, alıcılardan bağımsız olarak membranlardan kolayca diffüze olabilir (Moncada et al., 1997; Çekmen vd., 2001). Tüm bu özellikleri NO'ye ideal bir haberci molekül özelliği kazandırmaktadır (Çekmen vd., 2001). Ayrıca su ve oksijen varlığında, 3- 20 saniye gibi kısa bir yarı ömre sahiptir ve kolayca oksitlenmektedir.

Bunların yanı sıra NO bazı koşullarda, bir dizi azot oksitlerine ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$  vb) dönüşebilmektedir (Moncada et al., 1997; Beckman et al., 1990; Aladağ vd., 2000). NO'nin yanı sıra tekrar NO'ye dönüşebilen azot oksit metabolitleri, güçlü azotlayıcı

etkenlerdir. Birincil ve ikincil aminlerden nitrozaminleri oluştururlar. Nitrozaminler potansiyel karsinojenik bileşiklerdir, çünkü bu bileşikler DNA'da nitrozilasyon, deaminasyon yapabilmektedirler. Düşük konsantrasyonlardaki NO'in hemoglobine bağlanma ilgisi oksijene nazaran oldukça yüksektir. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'ü önce nitrite ardından nitrate oksitler. Dolayısıyla dolaşımdaki oksihemoglobinin NO için kuvvetli bir oksidandır. NO' e karşı engelleyici olarak görev yapması da ayrıca önem taşımaktadır (Çekmen vd., 2001).

## **2.2 Nitrik Oksit'in Genel Etki Mekanizması**

Hücreler arası iletim mekanizmalarında rol oynayan pek çok molekül (hormonlar, nörotransmitterler, büyüme faktörleri vb.) bu etkilerini daha çok sitoplazma membranındaki özel proteinlere bağlanarak, hücre içi cAMP miktarını arttırmaları yolu ile gerçekleştirmektedirler. Buna karşın NO, üretildiği hücreden dışarı çıkarak doğrudan hedef hücreye yönelmektedir. Sonuçta NO, hedef molekülüne bağlanarak doğrudan veya enzim aktivitesini değiştirerek amaçlanan etkiyi oluşturmaktadır. NO'ün karakterize edilmiş en önemli hedef molekülleri; demir, kükürt ve oksijen türevi yapılarıdır. Makrofajlardaki NO, tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak, antimikrobiyal ve antitümoral sitotoksik bir etki göstermektedir. Ayrıca NO'ün tümör hücresindeki ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe ederek DNA sentezini engelleyebildiği de bilinmektedir. NO'ün bir diğer hedefi ise sülfidril grubudur. NO, sülfidril grubu ile tepkimeye girerek S-nitrozilasyon olayında rol alabilmektedir ve plazminojen aktivatörü gibi bazı enzimlerin katalitik işlevlerini arttırabilmektedir. NO'ün önemli bir diğer hedefi de bir oksijen radikali olan süperoksit molekülüdür. NO ile O<sub>2</sub><sup>-</sup>'nin tepkimesiyle oluşan peroksinitritten, azot dioksit ile hidroksil radikali oluşabilmektedir. Yine NO'ün lipidler üzerine olan etkisiyle lipid peroksidasyonunun başlatıldığı ve çeşitli peroksitlerin de üretilebildiği bilinmektedir (Çekmen vd., 2001).

## 2.3 Memeli sistemlerinde NO

NO, memeli sistemlerinde hem sinyal hem de savunma mekanizmasında rol aldığı için büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, membranları kolay geçebilme yeteneği ve yüksek reaktif yapısından dolayı biyolojik olarak da önemli olan serbest bir radikaldir (Marletta, 1993). Pek çok organizmada NO, genellikle nitrik oksit sintaz (NOS) adı verilen enzim grubu tarafından, bir aminoasit olan L- arjinine ait bir guanidin grubunun NO'e çevrilmesiyle üretilmektedir (Marletta, 1993; Stuehr, 2004). Bu konuda günümüze kadar kaydedilen çalışmalar, fizyolojik ve patolojik işlemlerdeki önemlerinden dolayı daha çok memeli NOS (mNOS) enzimleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Marletta, 1993; Alderton et al., 2001). Dolayısıyla, ökaryotik organizmalarda bu enzime ait, enzim yapısı, enzim özellikleri, katalitik mekanizma ve NOS enzimine benzer olan yapılar pek çok çalışmada ortaya konulmuştur (Alderton et al., 2001; Santolini et al., 2006).

### 2. 3. 1 Memeli nitrik oksit sintaz (mNOS) enzimlerinin genel yapısı

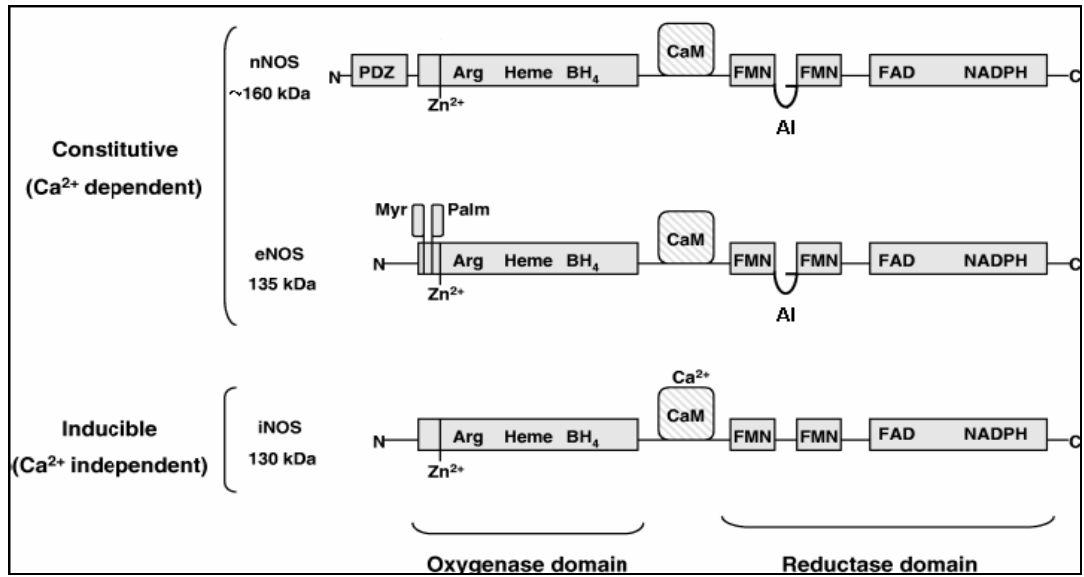
Memeli NOS enzimleri, homodimerik olan ve hem grubu içeren flavoproteinlerdir (Alderton et al., 2001; Stuehr et al., 2001; 2004). Homodimer yapıdaki bu proteinlerin alt birimleri, uçları "u" şeklinde bükülmüş olan ve beta kıvrımı olarak ifade edilen bir yapı içermektedirler (Mungrue et al., 2003). Memeli NOS enzimlerinin bu dimer yapısında, polipeptid yapının hem amino ucu hem de karboksil ucu yer almaktadır. Amino ucunun bulunduğu bölge oksijenaz aktif bölgesi, karboksil ucunun yer aldığı bölge ise redüktaz aktif bölgesi olarak bilinmektedir (Mungrue et al., 2003; Alderton et al., 2001; Mitchell et al., 2005). Genel olarak, oksijenaz aktif bölgesi, hem grubu, L- arjinin bağlanma bölgesi, H<sub>4</sub>B ve çinko bağlanma bölgelerini içermektedir. Redüktaz aktif bölgesi ise FMN (flavin mono nükleotit), FAD (flavin adenin dinükleotit) ve NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit) kofaktörlerine bağlı halde bulunmaktadır (Marletta, 1993; Stuehr et al., 2001; Alderton et al., 2001).

Ayrıca mNOS enzimleri, bu iki aktif bölge arasındaki elektron transferini kontrol eden bir düzenleyici bölgeye sahiptir. Katalitik reaksiyonlar için gerekli olan elektronlar NADPH tarafından sağlanmaktadır ve redüktaz aktif bölgesindeki FMN ve FAD kofaktörleri aracılığıyla hem grubuna doğru aktarılmaktadır (Marletta 1993; Stuehr et al., 2001; Stuehr, 2004; Santolini et al., 2006).

### 2.3.1.1 Memeli Nitrik Oksit Sintaz (mNOS) izoenzimleri

NOS enzimi, memelilerde temel olarak iki izoform halinde oluşturulmaktadır. Bunlar, cNOS (constitutive: yapısal) ve eNOS izoformlarıdır. cNOS izoformu ise, nNOS ve iNOS olarak bilinen iki ayrı izoformdan oluşmaktadır. Genel olarak, iNOS enzimi makrofajlarda, nNOS enzimi nöronlarda ve eNOS enzimi ise endotel hücrelerinde bulunmaktadır (Marletta, 1993; Moncada et al., 1997; Aladağ vd., 2000).

Şekil 2.1’de memeli izoformlarına ait genel enzim yapıları şematik olarak gösterilmektedir. Şekilde enzim kofaktörlerinin bağlanma bölgeleri verilmiştir (Mungrue et al., 2003).



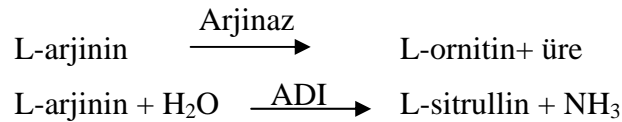
Şekil 2.1. Memeli NOS izoformlarına ait enzim yapıları (Mungrue et al., 2003).

## 2.4 Prokaryotik sistemlerde NO

Memelilerin aksine bakteriler tarafından üretilen NO, genellikle azot döngüsünde bir ara molekül olarak bilinmektedir. Ancak mikroorganizmalarda NO sentezi iki farklı izyol üzerinden gerçekleştirilmektedir. Bunlardan birincisi, oksidatif (nitrifikasyon) ya da redüktif (denitrifikasyon) iz yolları ile gerçekleştirilen NO sentezi, ikincisi ise L-arjinin iz yolu ile gerçekleştirilen NO sentezidir.

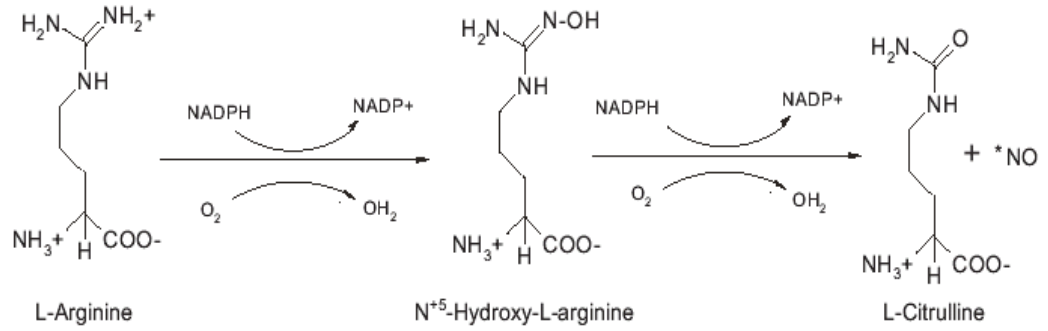
Nitrifikasyon,  $\text{NH}_4^+$  ya da  $\text{NH}_3$ 'ün  $\text{NO}_3^-$  yoluyla  $\text{NO}_2^-$ 'e oksidasyonu işlemidir. Bu tepkimeler Nitrobacteriaceae familyasının üyeleri tarafından gerçekleştirilir. Denitrifikasyon ise  $\text{NO}_3^-$ 'ün  $\text{N}_2$ 'a kadar kademeli olarak indirgenmesi tepkimelerinden oluşur. Bu izyolunda yer alan tepkimeler, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Propionibacterium* ve diğer pek çok bakteri cinsini içeren geniş bir mikroorganizma grubu tarafından gerçekleştirilir (Wrage et al., 2001). Bu mikroorganizmalar denitrifiyerler olarak adlandırılır. Bazı *Lactobacillus* suşlarının da nitrat ve nitriti anaerobik koşullarda indirgeyerek NO oluşturduğu belirlenmiştir (Xu and Verstraete, 2001). Bu reaksiyonları katalizleyen enzimler; nitrat redüktaz, nitrit redüktaz, nitrik oksit redüktaz ve nitroz oksit redüktaz enzimleridir (Hochstein and Tomlinson, 1988).

Mikroorganizmaların oksidatif ya da redüktif izyollarıyla NO biyosentezi pek çok çalışmada ayrıntılı olarak incelenmesine rağmen, L-arjininden NO sentezi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır, çünkü bakteriler L-arjinin metabolizması için üre döngüsü ya da deiminaz izyollarına sahiptir (Şekil 2.2). Bu izyollarında L-arjinin arjinazla L-ornitin ve üreye ya da arjinin deiminazla (ADI) L-sitrullin ve amonyağa dönüştürülür (Chen and Rosazza, 1995).



Şekil 2.2. L-arjinin bozunma yolları (Liu et al., 1995).

Diğer taraftan bakterilerde L-arjininin, NOS enzimi ile L-sitrullin ve NO'ye dönüştürüldüğü belirlenmiştir. Chen ve Rosazza (1994) ilk kez *Nocardia* cinsi bir bakteriden NOS enzimini saflaştırmışlar ve saflaştırılan bu enzim NOS<sub>Noc</sub> olarak adlandırılmıştır. Şekil 2.3'de *Nocardia* sp.'de gerçekleştirilen NO üretim mekanizması verilmiştir.



Şekil 2.3. L-arjininden NOS<sub>Noc</sub> ile NO oluşum iz yolu (Chen and Rosazza, 1995).

Bakteriyal NOS enzimi üzerinde daha sonra yapılan çalışmalarda *Lactobacillus plantarum* DSM 9842'nin de NOS enzimine sahip olduğu belirlenmiş, ancak arjininden NO sentezi araştırılmamıştır (Adawi et al., 1997).

Morita vd., (1997) ise *Lactobacillus fermentum* IFO3956'nın dinlenme halindeki hücrelerinin iz miktarda azot bulunan ortamda L-arjininden NO ürettiklerini belirlemiştir. Nitrobenzende <sup>15</sup>N ile zenginleştirme yoluyla gerçekleştirilen denemelerin sonucunda, L-arjininin bir ya da her iki terminal guanidino azotu bakteri hücreleri tarafından <sup>15</sup>NO'e dönüştürülmüştür. Memelilerde makrofaj NOS enzimi de benzer bir mekanizma ile etkisini göstermektedir. Bu nedenle bakteriyel NOS enzimlerinin memeli NOS enzimlerine benzer olabileceği ileri sürülmüştür. Ancak Xu ve Verstraete (2001) L-arjininden NO oluşumunun direk olarak ölçülmemesi ve NOS inhibitör testinin uygulanmaması nedeniyle <sup>15</sup>N ile zenginleştirme çalışmalarının NOS enzimi ile NO oluşturulduğunun kanıtlanması açısından yeterli olmadığını ileri sürmüştür. Bu hipotezi doğrulamak amacıyla yaptıkları çalışmada, altı adet *L. fermentum* ve *L. plantarum* suşunu NO üretimi açısından incelemiş ve bu

suşlarda NOS enziminin bulunmadığı sonucuna varmışlardır. NO üretiminin MRS sıvı besiyerinde iz miktarda bulunan nitrattan gerçekleştirildiği ve bu suşların nitrat redüktaz aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir. L-arjininden NO oluşumunu ise; L-arjinin deiminaz enzimi tarafından öncelikle L-arjininin  $\text{NH}_4^+$  e dönüştürülmesi ve daha sonra da nitrifikasyon tepkimesi sonucunda TON (total oxidised nitrogen) bileşiğinin açığa çıkarılmasına bağlamışlardır. Ancak her iki çalışmada farklı suşlar kullanılmış olması, laktobasillerde NOS enzimi varlığının araştırılması gerektiği ve elde edilecek bilgilerin bakteriyal sistemlerde gerçekleşen NO üretim mekanizmasının ortaya daha iyi konulması açısından önemli ipuçları verebileceği düşünülmektedir.

#### **2.4.1 Bakteri Nitrik Oksit Sintaz (bNOS) Enzimlerinin Genel Yapısı ve Özellikleri**

Bakterilerde varlığı belirlenen NOS enzimleri işlevsel veya yapısal açıdan memeli NOS (mNOS) enzimlerine benzememektedir (Bird et al., 2002). Ancak son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda bu enzimlerin, oksijenaz aktif bölgelerinin mNOS enzimi oksijenaz aktif bölgelerine benzerlik gösterdiği, bunun yanı sıra mNOS enzimlerinden farklı olarak, redüktaz aktif bölgesinde ve kalmodulin bağlanma kısmında eksik bölgelerin bulunduğu belirlenmiştir (Chen and Rozassa, 1994; 1995). *Nocardia*'nın yanı sıra mNOS enzimlerine, bu proteinler açısından benzerlik gösteren bNOS enzimleri *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus halodurans*, *Staphylococcus aureus*, *Deinococcus radiodurans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Streptomyces turgidiscabies* gibi bazı bakterilerde de tespit edilmiştir (Chartier and Couture, 2004; Midha et al., 2005; Sudhamsu and Crane, 2006). Üstelik, *Streptomyces turgidiscabies* bakterisinde bulunan NOS enziminin bir bitki toksini olan thaxtominin inaktivasyonunda etkili olduğu ve *D. radiodurans* NOS enziminin de triptofan oluşum mekanizmasında rol aldığı belirlenmiştir (Kers et al., 2004; Buddha et al., 2004a).

Bakteriyal NOS proteinleri, memelilerde benzer nitelikteki proteinlerden çok daha küçük proteinlerdir (Pant et al., 2002). mNOS enzimlerinin aksine, amino ucundaki



“u” şeklinde yer alan  $\beta$  kıvrımı ve çinko bağlanma bölgesi bNOS enzimlerinde bulunmamaktadır. Bakterilerdeki bu eksik bölgeler mNOS enzimlerinde pterin bölgesi ve stabil olan NOS oksijenaz dimeri ile etkileşim halinde olan bölgelerdir (Pant et al., 2002). Ayrıca, bNOS enzimlerinin amino ucunda eksik olan sistein kalıntıları, H<sub>4</sub>B ve çinko iyonunun bağlanması ve dimer yapıdaki alt ünitelerin düzenlenmesi açısından önem taşımaktadır (Pant et al., 2002; Mitchell et al., 2005). bNOS enzimlerinde eksik olan bu yapılara rağmen, bNOS enzimlerinin mNOS enzimlerine benzer bir katlanma şekli gösterdikleri açıklanmıştır.

#### 2.4.1.2 bNOS enzimlerinde redüktaz aktif bölgesi

mNOS izoformlarında tam bir aktivite için elektron verici özelliğe sahip olan, redüktaz aktif bölgesine (NOSred) ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. Çünkü elektronların redüktaz aktif bölgesinden, oksijenaz aktif bölgesine doğru aktarılması gerekmektedir. Ancak, bNOS proteinleri yalnızca oksijenaz aktif bölgesi içerdiğinden dolayı, katalitik aktivite için gerekli olan bir redüktaz aktif bölgesine ihtiyaç duyulmaktadır (Adak et al., 2002a; Adak et al., 2002b; Buddha et al., 2004a; Zemojtel et al., 2003; Santoloni et al., 2006; Wang et al., 2007).

Yapılan bazı çalışmalarda, bakteriyal genomların mNOS redüktaz aktif bölgesine benzer dizilimlere sahip olabilecekleri belirtilmektedir (Adak et al., 2002a, Adak et al., 2002b, Zemojtel et al., 2003). Ökaryotik NOS redüktaz aktif bölgesine benzer dizilimlerin, *B. subtilis* ve *S. aureus* bakteri genomlarında mevcut olduğu tespit edilmiştir (Bird et al., 2002; Hong et al., 2003). Diğer taraftan Pant vd., (2002), *B. subtilis* genomunda memeli redüktaz aktif bölgesine benzerlik gösteren flavoprotein dizilerinin bulunduğunu, ancak bu proteinlerin *D. radiodurans* genomunda bulunmadığını belirlemişlerdir (Pant et al., 2002; Zemojtel et al., 2003). Bunun yanı sıra, *in vitro* koşullar altında 1 NOS oksijenaz aktif bölgesinin, mNOS redüktaz aktif bölgesinden sağlanan elektronları kabul etme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Adak et al., 2002a; 2002b).

Bunların yanı sıra, bazı proteinlerin olası bNOS elektron vericileri olarak rol oynayabildikleri ileri sürülmektedir. Bu proteinler, sülfid redüktaz flavoproteinleri (SİR-FP), sitokrom P450 BM-3 (P450 BM-3) ve flavodoksinlerdir (Zemojtel et al.,2003; Wang et al., 2007). Elektron vericiler olarak bu proteinlerin ileri sürülmesinin nedeni, gen dizilimleri bakımından mNOS redüktaz aktif bölgesine benzerlik göstermeleri ve bakteriyal sistemlerde bNOS enzimi ile birlikte bulunmalarıdır (Zemojtel et al., 2003; Wang et al., 2007).

#### **2.4.2 bNOS enzimlerinin işlevleri**

Bakterilerde bulunan NOS enzimlerinin pek çok özelliği belirlenmiş olmasına rağmen, bu enzimlerin işlevleri hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu enzimlerin olası rolleri hakkında bazı fikirler ileri sürülmektedir. bNOS proteinleri tarafından üretilen NO'in sinyal ve savunma mekanizmasında ve biyolojik tepkimelerde işlevlerinin olabileceği ifade edilmektedir (Bird et al., 2002).

Yıllardır mikrorganizmaların birbirinden bağımsız hareket ettikleri düşünülmesine rağmen, yapılan son çalışmalarda bakterilerin iletişimi için kimyasal sinyaller gönderdikleri dolayısıyla da oldukça sosyal organizmalar oldukları ileri sürülmektedir. Buna “quorum-sensing= çevreyi algılama olayı” denilmektedir. Bakteriler bu yolla populasyon şekli, konjugatif plazmit aktarımı, sporulasyon, hücre farklılaşması, biyofilm oluşumu, antibiyotikler ve antimikrobiyal peptid ve toksinlerin üretimini sağlamaktadırlar (Waters and Bassler, 2005). Çevreyi algılama olayı büyük moleküller ve bazı küçük molekül peptidler için kısıtlayıcı olsa da NO gibi küçük moleküllerin çevreyi algılama olayına katkıda bulunabildiği yönünde bazı fikirler ileri sürülmektedir. Bazı bakteriyal sistemler özel bir NO sensörü içermektedir. Bu sensörlere *Vibrio cholerae* ve *Thermoanaerobacter tengcongensis* gibi bazı bakterilerde bulunan proteinler örnek olarak gösterilebilir.

Ökaryotik organizmalarda çözünebilir guanilat siklaz (sGC) enzimi, NO'e duyarlı olan bir hemoprotein olarak bilinmektedir. Hemoproteinlerin en önemli özelliği, diatomik küçük molekül gazlara (O<sub>2</sub>, CO, NO gibi) karşı duyarlı olmalarıdır.

Yapılan genomik analizler sonucunda, sGC enziminin **hem** grubuna oldukça benzeyen bazı bakteriyal proteinleri içerdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, *Vibrio cholerae* ve *Thermoanaerobacter tengcongensis* türü bakterilerden elde edilen bu proteinlerin, NO ve O<sub>2</sub> gibi molekülleri birbirinden ayırt etmede önemli oldukları belirlenmiştir. Bu proteinlerin NO sensörü gibi davranarak, NO ile bağlandıkları belirtilmektedir. Ayrıca ortamda oksijen düzeyinin düşmesi durumunda NO'nun bir elektron alıcısı olarak görev yaptığı belirlenmiştir. Bu bilgilere dayanarak, NO'nun düşük oksijenli stres koşullarında bakteri gelişiminin sağlanması amacıyla bir sinyal molekülü olarak görev yapmakta olduğu ileri sürülmektedir (Karow et al., 2004). Ancak NO'nun aynı zamanda organizma için sitotoksik olma ihtimali de bulunmaktadır. Bu nedenle *in vivo* gerçekleştirilen NO üretiminin düzenlenmesi veya diğer bazı tepkimelerle birlikte üretilmesi gerektiği düşünülmektedir (Bird et al., 2002). Ayrıca NO algılayıcılarının, bakterilerde çevresel uyarıcılara karşı tepkilerin oluşumunu teşvik ederek, bakterilerin bu sitotoksik maddeden korunmasına yardımcı olabilecekleri de düşünülmektedir (Karow et al., 2004).

*S. aureus* ve *B. anthracis* gibi insan patojenlerinin bNOS enzimlerine çok benzeyen proteinler içerdiği tespit edilmiştir. Ancak bu proteinlerin hastalıklarla ilişkisi henüz açıklanamamıştır. Bu enzimlerin patojenite veya canlılık için gerekli olma ihtimali üzerinde de ayrıca durulmaktadır (Pant et al., 2002). Benzer şekilde, patojenik organizmalar tarafından üretilen NO'nun infeksiyon esnasında kritik patofizyolojik bir role sahip olabileceği de ileri sürülmektedir (Choi et al., 1997).

NO'nun mikroorganizmaların stres koşullarına karşı savunma mekanizmasında bir rolü olabileceğine de inanılmaktadır. *S.aureus* ATCC 6538P NOS enzimi endojen bir esteraz enzimi tarafından oluşturulan metanol tarafından indüklenmektedir. Metanol aynı etkiyi *in vitro* koşullarda da göstermektedir. Elde edilen bu bulgular, NOS enziminin stres koşulları altında bakteri tarafından strese tepki olarak üretilen proteinlerden biri olduğunu veya üretilen başka proteinlerle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu şekilde, NOS enziminden bir çeşit savunma mekanizması oluşturmak amacıyla istifade edildiği ileri sürülmektedir (Hong et al., 2003).

bNOS proteinleri için ileri sürülen diğer bir olası işlev ise biyolojik tepkimelerdeki bileşenlerin veya sekonder bazı metabolitlerin nitrasyonunda rol almalarıdır (Kers et al., 2004; Wach et al., 2005).

Bazı *Streptomyces* (*S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S.turgidiscabies*) türleri azot grupları içeren thaxtomin A (ThX A) gibi ikincil metabolitler üretmektedirler. Thaxtominler, siklo- L- triptofanil- L- fenilalanil'in türevleri olan siklik dipeptitlerdir. Bütün thaxtominler, fitotoksisite için gerekli olan bir 4- nitro- triptofanil (nitro indol halkası) parçası içermektedirler ve bitki hücre duvarlarının yıkımına katkıda bulunmaktadırlar (Kers et al., 2004; Wach et al., 2005).

Ayrıca NOS inhibitörü olan bazı kimyasal maddeler kullanılarak bu inhibitör bileşiklerin ThX A üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. 4 NOS inhibitörünün (NAME, NMMA, AG ve 7- NI) bakteriyal gelişimi etkilemeksizin, ThX A üretimini azalttığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular bakterilerin, memelilerde olduğu gibi hücresel sinyal mekanizmasından başka biyolojik amaçlar için de NO ürettikleri yönünde bir fikrin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Kers et al., 2004; Wach et al., 2005).

bNOS enzimlerinin yer aldığı diğer bir biyolojik tepkime ise, *D. radiodurans'* in ürettiği deiNOS ile triptofanil tRNA sintetaz enziminin (dei Trp RSII) etkileşim göstermesidir. Trp RSII enzimi deiNOS enzim aktivitesini teşvik etmekte ve substrata olan ilgisini de arttırmaktadır (Buddha et al., 2004b). Ayrıca bu çalışma sonuçlarına göre Trp RSII enziminin, muhtemelen sonradan gerçekleşecek olan nitrasyon veya nitrozilasyon tepkimelerinde kullanılacak olan deiNOS proteini ve adenillenmiş Trp'ın temin edilmesini sağladığı ileri sürülmektedir (Buddha et al., 2004b; Buddha and Crane, 2005a).

## 2.5 Gıda Kalitesi açısından NO'in önemi

NO, bitki ve hayvan metabolizması ve sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin yanı sıra doğal ürünlere talebin arttığı günümüzde gıda kalitesi ve güvenliği açısından da büyük önem taşımaktadır. Bozulmuş taze fasulye konservelerinde tepe boşluğunda birikmiş gazlar arasında NO'in de bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca NO, kürlenmiş etlerin rengi ve stabilitesinden sorumlu olan bir bileşiktir. Peynirlerde ve kürlenmiş etlerde NO, nitrat ya da nitritin redüksiyonu ile üretilmektedir. Nitratlar antimikrobiyel etkileri nedeni ile bazı peynirlerde geç şişmeyi önlemek üzere kullanılmaktadır. (Arihara et al., 1993; Cornforth, 1996; Yetişmeyen ve Çimer, 1996; Çakmakçı ve Çelik, 1995).

Doğal olarak, et ürünleri üretiminde, kimyasal koruyuculara ilaveten, ürünlerin formülasyonunda çeşitli teknolojik ve duyuşal amaçlara yönelik bazı katkı maddeleri de yer almaktadır. Et ürünlerinde kullanılan bu katkı maddelerinin başında, nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) ve nitritler ( $\text{NO}_2^-$ ) gelmektedir. Bunlar içerisinde de en yaygın kullanılanları  $\text{NaNO}_3$  ve  $\text{NaNO}_2$  bileşikleridir (Göktañ, 1990; Ertugay vd., 1994; Çakmakçı ve Çelik, 1995; Cornforth, 1996).

Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) ve nitritin ( $\text{NO}_2^-$ ) et ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanımı çok eskilere uzanır. 1800'lü yıllarda Polenske, et ürünlerinde iyi bir renk oluşumunu NaCl'ün yalnız başına sağlayamadığını, tuza doğal olarak bulaşmış olan ( $\text{NaNO}_3$ ) ve  $\text{KNO}_3$ 'ün renk oluşumunu çok daha iyi geliştirdiğini gözlemiştir. Bu araştıracının çalışmalarından sonra, "Curing= Kürleme" sözcüğü yenebilir etlerin  $\text{NO}_3^-$  veya  $\text{NO}_2^-$  veya bunların her ikisinin varlığında NaCl ile muamele edilerek; işlenmesi, muhafaza edilmesi ve daha değişik görünüm, tat ve aromada ürünler haline getirilmesi anlamında kullanılmaya başlanmıştır (Cornforth, 1996; Gökalp, 1983).  $\text{NO}_3^-$  ve  $\text{NO}_2^-$  et ürünlerine çeşitli amaçlarla ilave edilmektedir. Antioksidan özelliklerinin bulunması ile beraber tat ve lezzetin oluşumuna da katkıda bulunmaktadırlar (Göktañ, 1990; Çakmakçı ve Çelik, 1995; Cornforth, 1996; Gökalp ve ark., 1997).

Ürünlere nitrit ilavesi belirli ölçülerde *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Streptococcus* ve *Staphylococcus* cinslerinin bazı türlerinin çoğalmasını da inhibe edebilmektedir. (Göktan, 1990; Ertugay vd., 1994; Çakmakçı ve Çelik, 1995; Cornforth, 1996; Gökalp vd., 1997; Toksoy ve Beyatlı, 1999). Ayrıca,  $\text{NO}_3$  ve  $\text{NO}_2$ 'in indirgenmesi sonucu oluşan  $\text{NO}$ , gıda zehirlenmesine neden olan *Clostridium botulinum*'un çoğalması ve toksin salgılamasını engellemektedir. Araştırmacılar, nitrat ve nitritin yani  $\text{NO}$ 'in etkili olduğu ve inhibe ettiği mikroorganizmaların *C. botulinum*, *C. putrificum* ve *C. sporogenes* olduğunu bildirmektedirler (Göktan, 1990; Çakmakçı ve Çelik, 1995; Cornforth, 1996; Gökalp, 1997).

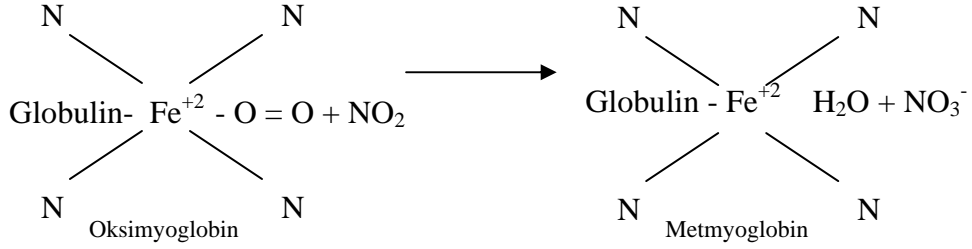
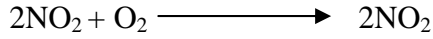
Günümüzde, *C. botulinum*'un gıdalarda gelişme ve toksin oluşturmasını önleyen daha üstün vasıflı ve kullanılmasında sakınca olmayan bir madde bulunmadığı için, bazı sakıncaları olmasına rağmen, (Gökalp, 1983; Öztan ve Vural, 1991; Arihara et al., 1993; Cornforth, 1996), çeşitli gıdaların üretiminde nitrat veya nitritlerin kullanımı zorunlu olmaktadır (Gökalp, 1984; Cornforth, 1996; Gökalp vd., 1997; Altuğ vd., 2000).

Bunların yanı sıra taze et veya et ürününün pazarlanması açısından en başta gelen özelliği ürünün rengidir. Çünkü bütün dünyada alıcı, eti satın almadan önce ürünün kalitesine, etin rengine bakarak karar vermektedir. Yeni kesilmiş bir hayvan etinin renginden, bir kas pigmenti olan miyoglobinin sorumludur. Miyoglobinin **ferro** ( $\text{Fe}^{+2}$ ) demir içerir. Bu yapı erguvanli veya morumsu kırmızı renkte olan taze et renginin oluşumunu sağlar. Miyoglobinin oksijenlenip oksimiyoglobine dönüşmesi ile parlak kiraz kırmızısı renk oluşur. Eğer et kürlenebilirse, özellikle nitritin ilavesi ile et rengi olgunlaşma, kurutma veya ısı işlemi sonrasında arzu edilen tipik renkler almaya devam eder.

Satışa sunulan etlerde; Mb.  $\text{Fe}^{+2}$  havanın oksijeni ile birleşerek, etin yüzeyinde görülen parlak kiraz kırmızısı renkteki oksimiyoglobini (Omb.  $\text{Fe}^{+2}$ ) oluşturur. İyi kalite, taze bir et görünümünü Omb.  $\text{Fe}^{+2}$  sağlar. Günlerce süren bir süreçten sonra, muhafaza koşullarına bağlı olarak taze et yüzeyi hoşça gitmeyen, kahverengimsi bir

görünüm alır. Buna neden, yüzeydeki Mb. Fe<sup>+2</sup> ve OMb. Fe<sup>+2</sup>, nin düşük basınçlı O<sub>2</sub> koşulları altında devamlı oksidasyona uğrayarak Metmiyoglobine (MetMb. Fe<sup>+3</sup>) dönüşmesidir. Dolayısıyla ette MetMb.Fe<sup>+3</sup> oluşumu istenmez.

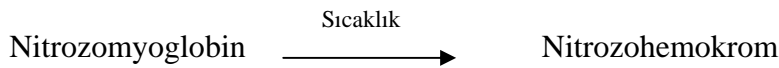
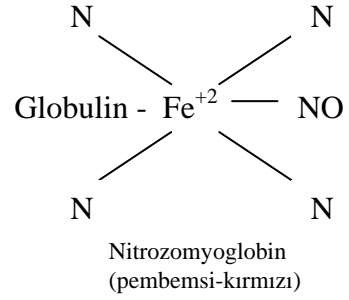
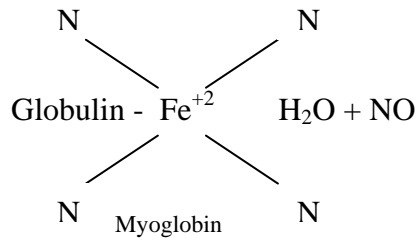
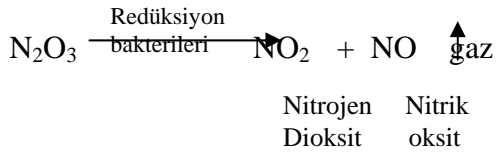
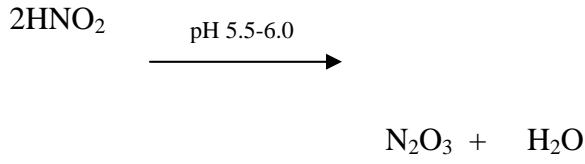
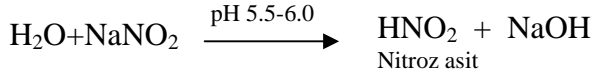
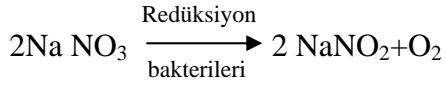
Kürleme işlemi ve depolama sırasında ürün ile O<sub>2</sub> temasının yüksek düzeyde olması durumunda gerçekleşen ve ürünün görünümünün bozulmasına neden olan tepkimeler aşağıda verilmiştir.



NO ile miyoglobinin tepkimeye girmesi sonucu, kürleme işlemi sırasında diğer tipik renk bileşenleri de (örn; nitrik oksit miyoglobin) meydana gelmektedir. Bazı etlerin karakteristik pembe rengi ısıl işlemde nitrik oksit miyoglobinin nitrozomiyoglobine (NOMB.Fe<sup>+2</sup>) dönüşümü sonucunda oluşmaktadır (Fennema, 1985; Hunt et al., 1999; Arihara et al., 1993).

Meydana gelen NOMB. Fe<sup>+2</sup>, de ürünün tütsülenmesi ve pişirilmesi sırasında pek çok tepkime gerçekleşmektedir. Nitrosomiyoglobin pigmentinin sıcaklık etkisi ile parlak koyu pembe- kırmızı renkli nitrosohemokroma dönüşümü, kürlenmiş ve sıcaklık muamelesine tabi tutulmuş tipik bir et ürününün göze çok hoş görünen tipik rengini oluşturur (Fennema, 1985; Hunt et al., 1999). Kürlenmiş et ürünlerinde nitrosohemokrom pigmentini mümkün olduğunca uzun süre koruyabilmek önemlidir.

Et ürünlerine katılan NaNO<sub>3</sub> ve NaNO<sub>2</sub>'den NO meydana gelişi, nitrozomiyoglobin ve nitrosohemokrom oluşum tepkimeleri aşağıda gösterilmiştir (Gökalp vd., 1997).

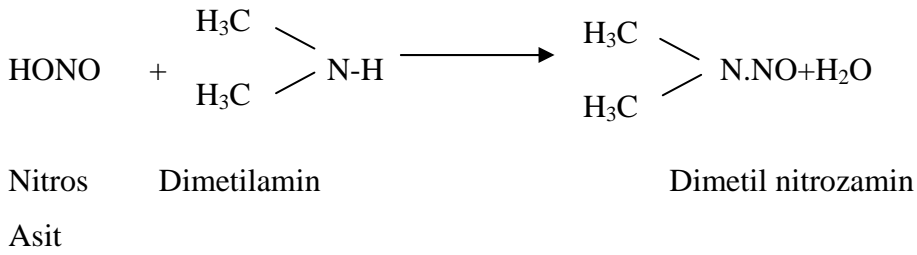


Parlak-koyu pembe kırmızı  
(kürlenmiş et rengi)



Ancak et ve et ürünlerinde bu amaçlarla kullanılan dolayısıyla vücuda alınan nitritin bir kısmı kandaki hemoglobuline etki ederek hemiglobuline dönüştürmektedir. Demir hemoglobulinde  $Fe^{+2}$ , hemiglobulinde ise  $Fe^{+3}$  değerdedir.  $Fe^{+3}$  içeren hemiglobulin dokulara oksijen taşıyamaz ve methaemoglobinemia (Cyanose) olarak adlandırılan zehirlenme meydana gelir (Gökalp, 1983).

Ayrıca, nitrat ve nitritin  $NO$ 'i, gıdanın içinde bulunan veya midedeki aminlerle veya diğer bazı azotlu bileşenler ile, özellikle düşük pH'lı koşullarda birleşerek N- nitroso bileşikleri meydana getirmektedir (Gökalp, 1984; Cornforth, 1996; Gökalp vd., 1997; Altuğ vd., 2000). Bu bileşiklerin, laboratuvar hayvanlarında, özellikle sindirim sisteminde, karsinojenik tümörlere neden olduğu belirlenmiştir. Örnek tepkime aşağıda verilmiştir (Gökalp vd., 1997).



Tüketici tepkisine yol açan bu durum gıda ürünlerinde nitrat ve nitrit kullanımına yönelik farklı alternatiflerin aranmasını zorunlu kılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda, LAB tarafından üretilen  $NO$ 'in, et ürünleri üretiminde nitrat ve nitrit kullanımına alternatif olabileceği düşünülmüştür. Gıdalarda başlatıcı kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin  $NO$  üretim kapasitesine sahip olması gıda güvenliği ve kalitesi açısından büyük önem taşımaktadır. Son zamanlarda, LAB  $NO$  üretimlerinin, et ürünlerinde renk gelişimine etkisi üzerinde durulmaktadır.  $NO$  üreten bakterilerin kahverengi metmiyoglobini parlak kırmızı renk maddelerine dönüştürdükleri, böylece istenilen et renginin oluşturulması ve muhafazasının sağlanabileceği yönünde çalışmalar yapılmaktadır (Arihara et al., 1993; Morita et al., 1997).

Bu amaçla yapılan çalışmalarda LAB ve çeşitli bakteriler izole edilmiş ve bu bakterilerin kahverengi metmiyoglobini parlak kırmızı renk maddelerine dönüştürme

yeteneği incelenmiştir (Arihara et al., 1993). 1550 izolattan 2 adedinin (*Kurthia* sp. K-22 ve *Chromabacterium violaceum* K-28) bu özelliği taşıdığı saptanmıştır. İncelenen 347 laktik asit bakterisinden ise sadece 1 adedinin (*L. fermentum* JCM1173) nitrik oksit miyoglobini oluşturduğu belirlenmiştir. Bazı anaerobik bakteriler et yüzeyinde oksijeni indirgeyerek metmiyoglobini oluşumuna neden olurlar, laktobasiller gibi fakültatif anaeroblar ise renk bozulmasına neden olmazlar. Yapılan alışmalar sonucunda, vakum paketlenmiş et ürünlerinde kullanılan laktobasillerin renk üzerinde az da olsa olumlu bir etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. sake*, *L. farciminis*, *L. brevis*, *L. buchneri* ve *L. suebicus* gibi bazı laktobasillerin nitriti NO'e indirgedikleri bildirilmiştir (Arihara et al., 1993). Ancak *L. fermentum* JCM 1173'ün metmiyoglobini nitrik oksit miyoglobine dönüştürme mekanizması açıklanamamıştır. Ayrıca *L. fermentum* JCM 1173'ün nitrit bulunmayan bir ortamda nitrik oksit miyoglobini oluşturma mekanizması da açıklığa kavuşturulamamıştır.

Morita vd., (1997)' in yaptığı çalışmada ise farklı kaynaklardan metmiyoglobini nitrozomiyoglobine eviren 10 adet *L. fermentum* suşu izole edilmiştir. Bu 10 suş içinde *L. fermentum* IFO 3956'nın en yüksek üretim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu suş NO üretimini L-arjini azotlarından enzimatik olarak gerçekleştirmektedir. Bakterinin NOS enzimi sentezlediği de elde edilen bulgulardandır.

*L. fermentum* IFO 3956'nın yanı sıra JCM 1173'ün sıvı besiyerinde ve fermente sosiste miyoglobinin nitrozillenmiş derivatlarının oluşumu değerlendirilmiştir. Kıyaslama amacıyla aynı deneme ticari bir başlatıcı kùltürle de gerçekleştirilmiştir. Tüm bakteriler sıvı besiyerinde ayrı olarak inkübe edildiğinde kahverengi metmiyoglobini kırmızı miyoglobini derivatlarına dönüştürmüştür, fakat sadece 2 laktobasil suşu elektron spin rezonans spektroskopisi ile yapılan ölçümlerde nitrozilmiyoglobine ait sinyali vermiştir. *L. fermentumun* başlatıcı kùltür olarak kullanıldığı tütsülenmiş sosislerde de nitrozilmiyoglobini belirlenmiş, nitrit katkısıyla üretilen sosisle kıyaslanabilir bir renk oluşmuştur. Böylece NO üretim kabiliyetine

sahip bakteriler kürlenmiş et ürünlerinin üretiminde nitrit/nitrat kullanımına alternatif olarak önerilmiştir (Møller et al., 2003).

Yapılan bir diğer çalışmada ise NO oluşturan farklı laktik asit bakterilerinin belirlenmesi amacıyla, çiğ süt, tuzsuz mutfak tereyağı, Beyaz peynir, yoğurt, turşu ve silaj örneklerinden laktik asit bakterileri izole edilmiştir. İzole edilen 1534 adet bakterinin NO oluşturma yeteneği MRS-Mb agarda incelenmiştir. Bu besiyerinde metmyoglobini nitrosomiyoglobine dönüştürerek renk değişimi ve zon oluşturan 10 adet bakterinin tanısı yapılmıştır. Tanı testleri sonucunda 10 adet bakteriden 5 adedinin *Lactobacillus plantarum* (S1b, T119, Z1, Z2, Z3), 3 adedinin *Pediococcus acidilactici* (S2, S3, S1a), 2 adedinin *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (P2, P10) olduğu tespit edilmiştir. Laktobasillerin nitrosomiyoglobini oluşturma yeteneklerinin ispatlandığı farklı çalışmalar bulunmakla birlikte, leuconostoc ve pediyokokların NO oluşturma yeteneklerinin varlığı saptanmıştır. Bu açıdan elde edilen bulgular orijinal nitelik taşımaktadır (Kart, 2002; Kart-Gündoğdu vd. 2005).

Fermente sosis ve salam üretiminde laktobasiller ve pediokokların yanı sıra stafilokoklar da starter kültür olarak kullanılmaktadır. *Staphylococcus xylosus* FAX-1'in MRS sıvı besiyerinde metmyoglobini, Fe(II) miyoglobinin heksakoordinate nitrik oksit bileşiğine dönüştürdüğü belirlenmiştir. Besiyerinin pH'sı 5.8'den 4.0'e düştüğünde ise Fe(II) miyoglobinin heksakoordinate NO kompleksi pentakoordinate bileşiğine dönüştürülmektedir. *S. xylosus* FAX-1 inoküle edilerek, nitrit ya da nitrat kullanılmadan üretilen salamda da Fe(II) miyoglobinin pentakoordinate NO kompleksinin oluştuğu belirlenmiştir (Morita et al., 1998).

Ayrıca, laktobasillerin, et teknolojisinde GRAS organizma olmaları da dikkate değer bir özelliktir (Arihara et al., 1993). Gıda maddeleri üretiminde kullanılacak katkı maddelerinin belirli özellikleri taşıması gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinin nitrit veya nitrat gibi katkı maddelerine alternatif olarak kullanımları bu açıdan da önemlidir. Doğal ve ucuz olup toksik etkilerinin bulunmaması da ayrı bir önem taşımaktadırlar.

Laktik asit bakterileri, starter kültür olarak fermente ürünlerin oluşumunu ve koruyucu özellikleri ile raf ömrünün uzatılmasını sağlamaktadır. Patojenlerin ve gıdayı bozan mikroorganizmaların gelişimini asit oluşturarak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve bakteriyosin gibi antibakteriyel maddeler üreterek inhibe etmektedir (Barefoot and Klaenhammer, 1983; McCormick and Savage, 1983; Lindgren and Dobrogosz, 1990; Jimenez- Diaz et al., 1993; Chateau et al., 1993; Vignolo et al., 1993; Çön ve Gökalp, 1998). NO üreten LAB'nin, NO üretebilme yeteneklerinin yanı sıra bu yönleriyle de gıda ürünlerinde kullanımı ayrıca önem taşımaktadır.

LAB probiyotik mikroorganizmalar olarak da önemlidir. Bu bakteriler probiyotik olarak da insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkiye sahiptir (Fuller, 1989; Havenaar and Huis In't Veld, 1995; Karahan ve Çakmakçı, 1996; Sanders, 2000).

## **2.6 Biyojen Amin ve NO ilişkisi**

BA' ler, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda metabolik işlemler sonucunda miktarları artan (Karahan, 2003) ve genel olarak amino asitlerin dekarboksilasyonu yoluyla veya aldehit ve ketonların aminasyon ve transaminasyonu ile oluşan azotlu bileşiklerdir. Bu aminler, kimyasal olarak alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, b-feniletilamin) veya heterosiklik (histamin, triptamin) yapıda olabilmektedirler (Çolak ve Aksu, 2002). Biyojen aminler, insan ve hayvanlarda fizyolojik işlevlerin yerine getirilmesinde büyük önem taşımaktadırlar. DNA, RNA ve protein sentezinin hemen hemen bütün basamaklarında görev almakta ve bu nedenle hücre büyüme ve çoğalmasında gerekmektedir. İnsan ve hayvan vücudunda pek çok kritik işlevin yerine getirilmesinde biyojen aminlere ihtiyaç duyulmasına rağmen, yüksek miktarlarda biyojen amin içeren gıdaların tüketimi sonucu toksik etkiler görülebilmektedir (Yeğin ve Üren, 2008) Genel olarak biyojen aminlerin neden olduğu en sık görülen toksik etkiler; ciddi baş ağrıları, hipertansiyon ve çeşitli alerjik tepkimelerdir (Çolak ve Aksu, 2002).

Gıdalardaki biyojen aminler ayrıca gıdaların bozulması ve gıda güvenliği ile de yakından ilişkilidir. Bu aminler, hammaddeye özgü dekarboksilaz aktivitesi

sonucunda üretilebildikleri gibi, dekarboksilaz pozitif mikroorganizmaların uygun koşullar altında gerçekleştirdikleri enzim aktivitesi ile de üretilebilmektedir (Karahan, 2003). Gıdaların mikrobiyel bozulması sırasında dekarboksilaz aktivitesi arttığından, biyojen aminlerin varlığı gıda bozulmasının göstergesi olması açısından büyük önem taşımaktadır (Karahan, 2003; Vatansever, 2004). Ayrıca gıdalardaki biyojen aminlerin belirlenmesi ile gıda kalitesi hakkında bilgi edinilmesi mümkün olmaktadır. Gıda kalitesi açısından önemli biyojen aminler, diaminlerden putresin ve kadaverin, poliaminlerden spermin ve spermidin, aromatik aminlerden tiramin ve heterosiklik aminlerden triptamin, histamin ve 2-feniletilamindir (Karahan, 2003).

Biyoejn aminler gıdalarda düşük derişimlerde bulunmasına rağmen, olgunlaştırma veya fermantasyon işlemleri ile üretilen gıdalarda daha yüksek derişimlere ulaşmaktadır. Fermantasyonda etkin mikroorganizmalar, gıdanın doğal yapısında bulunandan daha fazla biyojen amin üretebilmektedirler. Başlıca *Pseudomonas*, enterokok ve diğer bazı LAB gibi birkaç mikroorganizma grubunun biyojen amin oluşturma yeteneğinin olduğu belirlenmiştir (Karahan, 2003; Vatansever, 2004). Fermente gıdaların üretiminde doğal mikrobiyel flora, biyojen amin üretiminde etkili olduğundan, uygun başlatıcı kültürlerin özellikle biyojen amin üretmeyenlerin kullanılması, biyojen amin oluşumunu engellemek açısından büyük önem taşımaktadır.

Başlatıcı kültürler arasında LAB en önemli grubu oluşturmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar, biyojen amin miktarlarının başlatıcı kültür olarak kullanılan LAB aracılığıyla düşürülebileceğini göstermektedir. LAB'nin et ürünlerinde amin üretiminden sorumlu olduğu belirtilmekle birlikte, yapılan bir çalışmada sosis fermantasyonu sırasında biyojen amin oluşumunun, başlatıcı kültür olarak LAB'nin kullanılmasıyla engellenebildiği belirlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise fermente sucuk üretiminde kullanılan başlatıcı kültürlerin, sucuktaki doğal LAB florası ile rekabet etmesi sonucu biyojen amin seviyelerinin düşürülebildiği belirtilmektedir (Karahan, 2003).

Aynı zamanda biyojen aminler insan vücudunda hücre gelişimi için gerekli olan, ancak fazla üretildiği zaman olumsuz etkilere yol açabilen önemli bileşiklerdir. Vücutta biyojen amin düzeylerinin dengelenmesinde NO'nin önemli bir işlevi bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, insan vücudunda üretilen ornitin dekarboksilaz (ODK) enziminin, NO tarafından inhibe edilerek tümör oluşumunu teşvik eden poliaminlerin üretilmesinin engellendiği belirlenmiştir (Baydoun and Morgan, 1998; Bauer et al., 1999).

ODK enzimi, poliamin sentezinde görev alan önemli enzimlerden biridir. L-arjinin substratı, arjinaz enzimi tarafından ornitin ve üreye, ornitin ise ODK enzimi tarafından putresine dönüştürülmektedir. Putresinden ise spermidin, spermin ve diğer poliaminler oluşturulmaktadır. L-arjinin substratı üzerinden gerçekleşen 2. metabolik izyolda ise, arjinin dekarboksilaz enzimi tarafından agmatin oluşumu katalizlenmektedir. Daha sonra agmatin üzerinden yine putresin, spermidin, spermin ve diğer poliaminlerin üretimi gerçekleştirilmektedir. L-arjinin substratı üzerinden gerçekleşen 3. metabolik izyol ise, sitrullin ve NO üretiminin gerçekleştiği mekanizmadır. Yapılan çalışmalarda ODK enziminin aktif bölgesinde yer alan sistein kalıntılarının NO ile bağlanması sonucu aktivitesini kaybettiği ileri sürülmektedir (Baydoun and Morgan, 1998; Bauer et al., 1999; 2001; Hillary and Pegga, 2003). Ayrıca insan vücudundaki bazı sitokinlerin (TNF- $\alpha$  ve INF- $\gamma$ ) iNOS enzimini indükleyerek NO üretimini teşvik ettikleri ve bu şekilde poliamin sentezinin baskılandığı belirlenmiştir. NO'nin sadece poliamin sentezi değil, poliamin taşıyıcıları üzerinde de baskılayıcı özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. Antizim olarak ifade edilen bir proteinin ise vücutta poliamin sentezini ve taşınmasını otomatik olarak düzenlediği ifade edilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda NO'nin poliamin sentezi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, bazı NO verici bileşikler kullanılmış ve üretilen NO'nin poliamin oluşumunu baskıladığı gözlenmiştir (Baydoun and Morgan, 1998; Bauer et al., 1999; Satriano et al., 1999).

Yapılan bu çalışmalardan yola çıkılarak LAB tarafından üretilen NO aracılığıyla gıdalarda söz konusu olan biyojen aminlerin baskılanabileceği düşünülmüştür. Ancak, memeli hücrelerinde ve *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda biyojen amin

oluşumunun NO tarafından engellenebildiği belirlenmesine rağmen, gıdalarda biyojen amin oluşumu üzerine NO'in etkilerini belirleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle başlatıcı kültür olarak kullanılabilme özelliğine sahip LAB'nin NO oluşturma yeteneklerinin araştırılması bu açıdan da önem taşımaktadır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Bu çalışmada, Kart (2002) tarafından gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışması sırasında NO oluşturma yeteneği belirlenen ve tanı testler yapılan *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* türlerine ait 10 adet laktik asit bakterisi (LAB) materyal olarak kullanılmıştır. Bakteri üremesi MRS sıvı ve katı besiyerlerinde (Merck) gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. NO üreten suşların muhafazası ve aktifleştirilmesi**

Yüksek lisans tez çalışmasını takiben NO üreticisi LAB %20 gliserol içeren MRS sıvı besiyerinde üretilerek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de 4 yıl boyunca muhafaza edilmiştir. Stoktan alınan suşlar MRS sıvı besiyerinde  $30^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilerek 2 kez aktifleştirilmiş ve denemelerde kullanılmıştır.

##### **3.2.2. NO miktarının belirlenmesi**

Aktifleştirilmiş kültürlerden 100 µl alınarak, 0,5–2 mg/ml metmiyoglobin içeren 10 ml MRS sıvı besiyerine (glikoz içeriği %0,2) inoküle edilmiş ve  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler argon gazı (Nakamura and Nakamura, 1996) altında  $4^{\circ}\text{C}$ 'de, 10 000 x g'de 20 dakika santrifüj edilerek ayrılmış ve pelet atılmıştır. Elde edilen süpernatanta argon gazı altında Griess ayıracı eklenerek, NO miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla, 100 µl kültür süpernatantı 100 µl Griess ayıracı ile karıştırılmış, 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede (Shimadzu UV–1601) 550 nm'de optik yoğunluğu ölçülmüştür. Sonuçlar nitrit standardına göre hesaplanarak, nitrit cinsinden değerlendirilmiştir.



### Metmiyoglobin çözeltisi

Horse heart miyoglobin (Sigma M1882-5G), 20 mg/ml olacak şekilde 50 mM'lik sodyum fosfat tamponunda (pH 6,5) çözülmüş ve 50°C'de 30 dakika ısıtılmıştır. Daha sonra çözelti 4°C'de 10 dakika 10 000 g'de santrifüjlenmiş (Hettich 2R) ve süpernatant 0,45 µm'lik steril şırınga ucu filtreden (Schleicher&Schuell) geçirilerek sterilize edilmiştir.

Miyoglobin çözeltisinin met formundaki miyoglobin içeriğinin belirlenmesi amacıyla spektrofotometrede 572, 565, 545, 525 nm dalga boyundaki absorpsiyonları 1 cm ışık yolu olan küvetler kullanılarak belirlenmiştir. Okuma sonuçları önce aşağıda verildiği şekilde birbirine oranlanmış, daha sonra formül kullanılarak met formunda miyoglobin değeri hesaplanmıştır (Arihara et al., 1993; Kart, 2002).

$$R_1: A^{572}/A^{525}$$

$$R_2: A^{565}/A^{525}$$

$$R_3: A^{545}/A^{525}$$

$$[\text{Met}] = -2,514R_1 + 0,777R_2 + 0,800R_3 + 1,098$$

### Griess ayıracı

Ayıracı, %0,1 (a/h) naftil etilendiamin ve %1 (a/h) sülfanilamid, %5 (h/h) fosforik asit içinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

### Sodyum Nitrit (NaNO<sub>2</sub>) Standardı

Sodyum nitrit 0–200 µM aralığında hazırlanmıştır. Yukarıda verilen işlemler uygulanarak standart kurve oluşturulmuştur (Park et al., 1999).

### **3.2.3. NOS enzim aktivitesinin engellenmesi**

LAB'nin NO üretimini gerçekleştirdiği iz yolunun saptanması amacıyla NOS enzim engelleyicisi olan N<sup>G</sup>-metil-L-argininden (L-NMA) yararlanılmıştır. Metmiyoglobin (0,5-2 mg/ml) içeren 10 ml MRS sıvı besiyerine (glikoz içeriği %0,2) 500 µM

L-NMA ilave edilmiş, LAB bu şekilde hazırlanan besiyerine inoküle edilmiştir (Wach et al., 2005). Bakteriler 30°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler argon gazı (Nakamura and Nakamura, 1996) altında 4°C’de, 10 000xg’de 20 dakika santrifüj edilerek ayrılmış ve pelet atılmıştır. Elde edilen süpernatanta argon gazı altında Griess reaksiyonu uygulanarak NO miktarı belirlenmiştir.

L-NMA’nın LAB’nin gelişimini engelleyici etkisini belirlemek amacıyla 100 ml’lik erlenler içerisinde 20 ml’lik MRS agar besiyeri hazırlanarak 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilize edilen besiyerlerinin sıcaklığı 45–50°C’ye düştüğünde, aktifleştirilmiş NO üreticisi LAB’dan (%1) aşılama yapılarak besiyeri aseptik koşullarda steril petrilere dökülmüştür. Besiyerlerinin katılaşması sağlandıktan sonra petri kutuları 30°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petri kutuları 1 saat süre ile buzdolabında bekletilmiştir. Petri kutularına daha sonra aseptik koşullarda 6 mm’lik kuyucuklar açılmıştır. Bu kuyucuklara 75 µl L-NMA (500 µM) pipetlenmiştir. Petriler 30°C’de 18–24 saat süre ile inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra oluşan zonların çapı ölçülmüştür (Schillinger and Lücke, 1987; 1989).

#### **3.2.4. NOS spesifik aktivitesinin belirlenmesi**

NOS spesifik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla bakteri hücreleri parçalandıktan sonra toplam enzim aktivitesi ve protein miktarları belirlenmiştir.

##### **3.2.4.1. Bakterilerin parçalanması**

MRS sıvı besiyerinde bir gece (1,5 ml) geliştirilen durma fazındaki bakteriler santrifüjle besiyerinden ayrılmıştır. Elde edilen pelet 50 mM’lık Tris-HCl (pH 8,0) ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra pelet 2 mg lizozim/ml içerikli aynı tampon içerisinde yeniden çözülerek, üzerine 0,15–0,22 mm çapındaki cam boncuklar ilave edilmiştir. Tüpler yüksek hızda 3 dakika süreyle karıştırılmıştır. Hücre

süspansiyonları 37°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra sonikatörde (Sonorex Super 10P, Bandelin, Berlin, Almanya) %10 güç kullanılarak 10 dakikalık süreyle 3 kez muamele edilmiştir. İnkübasyondan sonra cam boncuklar ve hücre kalıntıları santrifüjle (Sigma 1–14) uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Zotta et al., 2007).

#### **3.2.4.2. Enzim aktivitesinin belirlenmesi**

Hücre lizatı (100 µg), 100 µl tepkime karışımı (30 mM Tris-HCl (pH 7,9), 2 mM L-arjinin, 2 mM NADPH, 4 µM FAD, 4 µM FMN, 4 µM H<sub>4</sub>B, ve 3 mM DTT) ile karıştırılmıştır. 37°C’de 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda 10 µl laktat dehidrogenaz enzimi ilave edilmiştir. Laktat dehidrogenaz enzimi ise 1/25 oranında seyreltilmiş olan 500 mM’lık sodyum piruvat çözeltisi içinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Daha sonra tüplere Griess ayıracı eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örneklerin optik yoğunluğu spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri sodyum nitrit ile hazırlanan standart kurve yardımıyla nitrit cinsinden hesaplanmıştır (Eissa et al., 1998).

#### **3.2.4.3. Protein tayini**

Hücrelerin parçalanması işlemlerini takiben elde edilen süpernatanttan 0,5 ml alınmıştır. Üzerine 0,15 ml 3 M’lık trikloro asetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Karışım destile su ile 1 ml’ye tamamlandıktan sonra 4000 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj (Sigma 3K30) edilmiştir. Santrifüjden sonra tüpler ters çevrilerek 5 dakika süreyle tüp içerisindeki suyun iyice akması beklenmiştir. Daha sonra pelete 4,9 ml saf su ve 5 ml biüret çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. 30 dakika beklendikten sonra tüpler spektrofotometrede 546 nm dalga boyunda şahite karşı okunmuştur. Spektrofotometrede okunan absorbans değerleri sığır serum albumini ile hazırlanan

protein standart kurvesindeki değerlere göre hesaplanarak, hücrelerin protein miktarları belirlenmiştir.

#### Biret zeltisi

0,2 N NaOH	400 ml
K-Na tartarat	9 g
KI	5 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	3 g

0,2 N NaOH ile 1000 ml'ye tamamlanır. Ağzı kapaklı koyu renk şişede muhafaza edilir (Karahana, 1986).

### **3.2.5. NOS gen bölgesinin belirlenmesi**

NOS geni kromozomal ve plazmit DNA'da araştırılmıştır.

#### **3.2.5.1. Kromozomal DNA'da gen bölgesinin belirlenmesi**

##### Genomik DNA izolasyonu

NOS gen bölgesi belirlenecek suşlar MRS agar besiyerine ekilerek, 30°C'de 48 saat sonunda oluşan kolonilerden steril krdan yardımı ile bir miktar alınmıştır. Alınan hücreler 50 µl steril lizis tamponu içine aktarılmıştır. Ağzıları parafilmle kapatılan eppendorf tüpleri 20 dakika sıcak su banyosunda kaynatılmıştır. Kaynatma işlemi sonunda soğuması beklenen tüpler 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj (mini spin plus) edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantın 3 µl'si PZR denemelerinde kullanılmıştır (Boşgelmez- Tınaz ve Ulusoy, 2008).

##### Lizis Tamponu

Triton X 100	% 1,0
EDTA	1 mM
Tris HCl	10 mM
NaCl	100 mM

### PZR primerleri ve çözeltileri

Suşların NOS geni genomik DNA'dan PZR ile çoğaltılmıştır. Bu amaçla 6 farklı primer kullanılmıştır. *Staphylococcus aureus* NOS genine ait primer Bird vd., (2002) tarafından önerilen şekilde hazırlanmıştır. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)'da bir bölümü verilen *L. reuteri* NOS geni esas alınarak, 2 nolu primer düzenlenmiştir. Yine aynı program kullanılarak farklı bakteri türlerinde bulunan NOS genlerine ait nükleotit dizileri birbirleriyle kıyaslanmış ve en çok benzerlik gösteren bölgeler belirlenmiştir. Bu bölgeler esas alınarak da 4 primer tasarlanmıştır. Tasarlanan 6 farklı primer ticari olarak (Biogen-İstanbul, İontek-İstanbul) sentezletirilmiştir.

#### 1. Primer çifti (*Staphylococcus aureus* primeri, Bird et al., 2002)

F 5'- TAAAGAGGCTCAAGCTTTCATAGAAACATG - 3'  
R 5'- CGTCTAGATTAATGATGGAAAGGGCACTGG - 3'

#### 2. Primer çifti (*L.reuteri* primeri)

F 5'- ATGAACACTTTAATCCTTTACG - 3'  
R 5'- TTAGTGATTAGAATCTCTTCCT - 3'

#### 3. Primer çifti

F 5'-CTCAATATYGCAGAAGTGGARGCTGCATCTG - 3'  
R 5'-ACCTTTCTGYGGCAGWGTTTCAAATGCTGAAACTG - 3'

#### 4. Primer çifti

F 5'-ACTGGAAGTGKCTGGAGTATGCRCTTGCTTTCAC - 3'  
R 5'-ACAGATGCAGCYTCCACTTCTGC - 3'

#### 5. Primer çifti

F 5'-ACTGGAAGTGKCTGGAGTATGCRCTTGCTTTCAC - 3'  
R 5'-CTTTCTGYGGCAGWGTTTCAAATGCTGAAACTGTG - 3'

#### 6. Primer çifti

F 5'-ATGGAGTGCTGCRCCCAARACAGGCTTCATTG - 3'  
R 5'-ACAGATGCAGCYTCCACTTCTGC - 3'

### PZR karışımı

<i>f</i> 5' primeri I	1 µl
<i>r</i> 5' primeri II	1 µl
Genomik DNA	3 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
dNTP karışımı	4 µl
PZR Tamponu x 10	6 µl
Steril saf su	32 µl
Toplam hacim	50 µl

PZR karışımı hazırlanıp, termal cycler cihazına (Techne, Genius) yerleştirilmiş ve program başlatılmıştır. PZR koşulları Bird vd., (2002) ve Dupont (2006)'un kullandıkları yönteme göre modifiye edilerek belirlenmiştir. İşlem başlatıldıktan 5 dakika sonra ara verilip, yukarıdaki bileşenlere 0,7 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (Fermentas) ilave edilmiştir.

### PZR Koşulları

95°C'de 5 dakika (denatürasyon)	} 1 döngü
80°C'de 1 dakika (taq DNA polimeraz ilavesi)	
50°C'de 45 saniye (primerlerin bağlanması)	
72°C'de 1 dakika (polimerizasyon)	

95°C'de 1 dakika	} 30 döngü
51°C'de 1 dakika	
72°C'de 1 dakika	

72°C'de 5 dakika 1 döngü gerçekleştirilmiş ve PZR sona ermiştir. PZR işlemi sonucu elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir.

### Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünleri ve plazmit DNA'nın incelenmesi amacıyla agaroz jel elektroforezi yönteminden yararlanılmıştır. Agaroz jelin hazırlanmasında, 0,4 g agaroz 40 ml 10xTBE içine alınarak kaynatılmış ve oda sıcaklığında 45–50°C'ye kadar soğutulmuştur. Daha sonra agar tablasına dökülmüştür. Jelin bir tarafına elektroforez tarağı yerleştirilmiş ve boşlukları jelle doldurulmuştur. Jel katılaştıkça tarak yavaşça çıkarılmıştır. Jel daha sonra içinde 10xTBE bulunan tanka yerleştirilmiştir. PZR'dan çıkarılan her bir PZR ürününün 15 µl'si 3 µl jel yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Ayrıca molekül büyüklükleri bilinen marker DNA da (1 kb ladder – Gene Ruler, Fermentas) PZR ürünleriyle karşılaştırma yapabilmek için jelin bir kuyucuğuna pipetlenmiştir. PZR ürünlerinin ve markerın jelle yüklenmesinden sonra elektroforez tankı güç kaynağına (Biolab Power PAC 300) bağlanmıştır. 100 volt akım şiddetiyle 1,5–2 saat süresince verilen elektrik akımından sonra jel tanktan alınıp, 15 dakika etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile muamele edilmiştir. Etidyum bromür ile muamelenin ardından DNA bantları görüntülenmek üzere jel görüntülenme sisteminde (Biorad power pac-300) incelenmiştir.

### 10xTBE

Tris Base	108,0 g
Borik asit	55,0 g
EDTA	9,3 g

### Jel Yükleme Tamponu

Fikol	%25,0
Bromfenol mavisi	%0,25
Sakkaroz (a/h)	%8,0

### **3.2.5.2. Plazmit DNA'da NOS geninin belirlenmesi**

Bakteriler laboratuvar ortamında uzun süre depolama sırasında plazmit DNA kaybına uğramış olabileceklerinden, plazmitlerin yeniden kazandırılması amacıyla bakterilerin doğal yaşam ortamı olan turşuda üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra

turşu örneklerinden izole edilen NO üreticisi LAB'nin plazmit profilleri incelenmiş ve plazmit DNA'da NOS gen bölgesinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.5.2.1. Turşu denemesi**

Turşu yapımı için eşit miktarda domates ve hıyar kullanılmıştır. Hıyar ve domatesler yıkandıktan sonra kavanoz hacminin %80'ini dolduracak şekilde temiz cam kavanozlara doldurulmuştur. Daha sonra üzerlerine %8 tuz ve %2 asit içeren salamura ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler 2 gruba ayrılmıştır. Gruplardan birine 85 °C'de 20 dakikalık pastörizasyon işlemi uygulanmış, diğerine ise ısı işlem uygulanmamıştır. Daha sonra her iki turşu grubuna stok kültürden aktifleştirilen NO üreticisi LAB (T119, Z1, Z2, Z3) %1 düzeyinde ayrı ayrı inoküle edilmiştir. Tüm örnekler oda sıcaklığında 10 gün süreyle fermantasyona bırakılmıştır (Aktan vd., 1998).

### **3.2.5.2.2. NO üreten suşların izolasyonu**

Turşulardan MRS agar besiyerine yapılan ekimler sonucunda izole edilen bakterilerin NO oluşturma yeteneği MRS-Mb agarda incelenmiştir. MRS-Mb agarın hazırlanması amacıyla MRS agar sterilize edildikten sonra 50°C'ye soğutulmuş ve steril metmiyogloblin çözeltisi (0,5–2 mg/ml) eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan besiyeri aseptik koşullarda steril petri kutularına 13–15 ml'lik kısımlar halinde bölündükten sonra katılaşması beklenmiştir. MRS agar üzerinde üretilmiş kolonilerden bu besiyerine, iğne uçlu öze ile aşılama yapılmıştır. Petri kutuları 28–30°C'de 48–72 saat inkübe edilmiştir. NO üretimi, kolonilerin etrafında parlak kırmızı renk oluşumu (Arihara et al., 1993), koyu renkli halka ve şeffaf zon oluşumuna göre değerlendirilmiştir (Kart, 2002). Bunun yanı sıra tekrarlanan aktifleştirme işlemlerinin plazmit varlığına etkisini belirlemek amacıyla turşudan izole edilen NO üreticisi suşlar MRS agar besiyerine sürme yöntemiyle ekilerek, 6 kez üretilmiştir.



Turşudan izole edilen suşların, plazmit giderimi gerçekleştirilen bakterilerin ve stoktaki kültürlerin NO üretim miktarları spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Böylece NO üretim miktarları kıyaslanmıştır. Daha sonra bu bakterilerin plazmit profillerinin belirlenmesi amacıyla plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.5.2.3. Plazmit profilinin belirlenmesi**

NO üreticisi LAB'lerinin plazmit profillerinin belirlenmesi amacıyla Lee ve O'Sullivan (2006) tarafından geliştirilen yöntemden yararlanılmıştır. MRS sıvı besiyeri içinde 16–18 saat geliştirilen 1,5 ml'lik laktobasil kültürleri 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj (mini spin plus) edilerek, pelet alınmıştır. Daha sonra pelet 100 µl 30 mg/ml lizozim içeren %25'lik sakkaroz çözeltisi (Çözelti I) ile karıştırılmıştır. Sıvı, eppendorf tüpüne aktararak 37°C'de 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 200 µl Çözelti II ilave edilmiş ve eppendorf tüpleri hemen karıştırılarak buza gömülmüştür. Daha sonra 150 µl Çözelti III eklenmiş ve eppendorf tüpleri yaklaşık 1 saat buzda gömülü olarak bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler 4°C'de 14 000 rpm'de 30 dakika santrifüj (Nüve NF 800R) edilerek süpernatanttan 400 µl alınmıştır. Santrifüj işlemi tekrarlandıktan sonra süpernatant temiz eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Alınan süpernatant hacmi kadar fenol-kloroform/izoamil alkol ilave edilerek 2 dakika boyunca hafifçe karıştırılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, üst faz temiz eppendorf tüplerine alınmıştır. Alınan üst faz hacmi kadar kloroform/izoamil alkol ilave edilmiştir. Daha sonra santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Üst faz tekrar temiz eppendorf tüplerine alınmıştır. Sıvı faz üzerine 2 hacim kadar %95'lik etanol ilave edilerek –20°C'de 1 gün bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler 4°C'de 14 000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Eppendorf tüplerindeki alkol temiz eppendorf tüplerine aktarılmış ve alınan alkol miktarının yaklaşık ¾'ü kadar olacak miktarda %70'lik etanol ilave edilerek, 10 saniye karıştırılmıştır. Tüpler 4°C'de 14 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Alkol temiz eppendorf tüplerine alınmış ve tüplerin ağızları açık bırakılarak, alkolün tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra pelet kurutulmuş ve üzerine 15 µl TE+RNaz (TER) çözeltisinden ilave edilmiştir. Karışım 37°C'de 15 dakika bekletildikten sonra TAE

çözeltisinde hazırlanmış, agaroz jelde 100 voltta yaklaşık 1–1,5 saat süreyle yürütüldükten sonra, jel tanktan alınıp 15 dakika etidyum bromür (0,5 µg /ml) ile muamele edilmiştir.

#### Çözelti I

Sakkaroz	25 g
TES	70 ml
Lizozim	30 mg/ml
Mutanolisin	70 U/ml

#### Çözelti II

Steril çift destile su	8,8 ml
NaOH (10 N)	200 µl
SDS (%20)	100 µl

#### Çözelti III

5 M Potasyum asetat	60 ml
Asetik asit	11,5 ml
Destile su	28,5 ml

#### TER çözeltisi

RNaz 10 mg/ml olacak şekilde Tris-EDTA tampon çözelti içinde çözülmüştür. Çözelti 100°C’de 15 dakika kaynatılmış ve oda sıcaklığına soğutularak –20°C’de saklanmıştır.

#### Tris-EDTA (TE) Tampon Çözeltisi (pH 7,4)

10 mM Tris Cl (pH 7,4)  
1 mM EDTA (pH 8,0)

#### TAE Tampon Çözeltisi

50x 242 g Tris  
57,1 ml asetik asit  
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

### 3.2.6. NO'nun biyojen amin oluşumu üzerine etkilerinin belirlenmesi

NO'nun biyojen amin oluşumu üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla çeşitli ürünlerden izole edilen LAB'nin biyojen amin oluşturma özellikleri nitel ve nicel olarak belirlenmiştir. Daha sonra biyojen amin oluşumu üzerine NO'nun etkisi incelenmiştir.

#### 3.2.6.1. Agarlı besiyerinde biyojen amin oluşumunun belirlenmesi

Biyojen amin oluşturan suşların belirlenmesi amacıyla; daha önce gerçekleştirilmiş çeşitli projeler kapsamında süt ve süt ürünlerinden izole edilen LAB'ne ilaveten bu çalışmada, 11 adet sucuk örneğinden LAB izole edilmiştir. Bakterilerin tümü dekarboksilaz besiyerine ekilmiştir. Petri kutularının 30°C'de 4 gün inkübasyonundan sonra mor renkli koloniler biyojen amin üreticisi olarak seçilmiştir. Aynı zamanda NO üreticisi olan 10 adet LAB'sinin de biyojen amin üretim yetenekleri incelenmiştir. Kontrol olarak kullanılacak besiyerlerine biyojen aminlerin öncülleri olan amino asitler katılmamıştır. Tüm denemeler paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

#### Dekarboksilaz besiyeri

Tripton	0,5 g
Yeast ekstrakt	0,5 g
NaCl	0,5 g
Glukoz	0,1 g
Tween 80	0,05 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,005 g
CaCO <sub>3</sub>	0,01 g
Brom krezol purple	0,006 g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,004 g
Agar	2,0 g
Amino asit	2,0 g

Besiyerinin pH'sı 5,3'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Besiyeri sıcaklığı 45–50°C'ye düştüğü zaman steril petri kutularına aseptik şartlarda dökülerek katılaşması sağlanmıştır (Bover-Cid and Holzapfel, 1999).

### **3.2.6.2. HPLC ile biyojen amin tayini**

Biyogen amin tayinleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır. Analizlerin gerçekleştirildiği HPLC'nin (Shimadzu) özellikleri, analiz parametreleri ve işlem basamakları aşağıda verilmiştir.

#### Cihaz özellikleri ve analiz parametreleri

Cihaz, sistem kontrol ünitesi (SCL-10A vp), pompa (LC-10 AD vp), dedektör DAD (Diode array dedector), oto enjektör (SIL-10AD vp), kolon fırını (CTO 10 A vp) ve gaz giderme birimi (DGU- 14A) içermektedir. Çalışmada, YMC-ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Akış hızı; 0,8 ml / dakika, dedektör (DAD); 215 nm, kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi 20 µl olarak belirlenmiştir.

#### Çözeltilerin ve stok standartların hazırlanması

Çalışmada kullanılan tüm biyojen amin standartları (triptamin, feniletilamin, putresin, kadaverin, histamine, tirozin) ve kimyasallar (asetonitril, Tris-(hidroksimetil)-aminometan, sodyum glutaminat, (L(+)-glutamik asit monosodyum tuzu monohidrat %99), sodyum karbonat, Dns-Cl) HPLC saflıktadır. Mobil faz tamponu Tris-(hidroksimetil)-aminometan (pH 8; 0,1M) olarak seçilmiştir. pH, analitik saflıkta asetik asit ile ayarlanmıştır. Mobil faz çözeltileri aşağıda verildiği şekilde ve kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır.

#### Mobil faz A

Tris tampon	30 ml
Asetonitril	550 ml
HPLC saflıkta destile su	420 ml

### Mobil faz B

Tris tampon	2 ml
Asetonitril	900 ml
HPLC saflıkta destile su	100 ml

Biyojen amin standart çözeltileri 0,4 M perklorik asit içerisinde ve her bir biyojen amin için son konsantrasyon 10 mg/50 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Analizler için her bir stok çözeltiden 5 ml alınarak 0,4 M perklorik asit ile 50 ml'ye tamamlanmıştır (Anlı vd., 2004).

Gradient programı; 0-10. dakikada %95 A + %5 B, 2. dakikada %90 A + %10 B, 10. dakikada %75 A + %25 B, 15. dakikada %35 A + %65 B, 20. dakikada %20 A + %80 B, 30. dakikada %10 A + %90 B, 40. dakikada %95 A + %5 B şeklinde uygulanmıştır.

### Örneklerin hazırlanması

Biyojen amin üretimi belirlenecek LAB, MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir. Daha sonra tirozin (%0,020), histidin, fenilalanin, triptofan, lizin ve ornitin (%0,1) içeren MRS sıvı besiyerine (10 ml) iki kez %1 düzeyinde aşıl原因arak üretim sağlanmıştır. Bu şekilde gerçekleştirilen ön hazırlıktan sonra kültürler %0,040 tirozin, %0,25 histidin, fenilalanin, triptofan, lizin ve ornitin (Merck) içeren MRS sıvı besiyerine tekrar %1 düzeyinde aşıl原因mıştır. Biyojen amin üretim düzeyleri 30°C'de 4 gün inkübasyondan sonra belirlenmiştir. İnkübasyonu tamamlanan bakteri kültüründen 5 ml alınarak 12 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Elde edilen süpernatanttan 1 ml alınarak, 1 ml 0,1 N HCl ile muammele edilmiştir. Bundan sonra tekrar 12 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Örnek özütleri alınarak 0,45 µm'lik filtreden (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) geçirilmiş ve biyojen amin analizine kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Anlı vd., 2004). Tüm denemeler 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

### Örneklerin ve standartların türevlendirilmesi

400 µl örneğe 400 µl sodyum karbonat ve 400 µl dansil klorür çözeltisi ilave edilerek, karıştırılmıştır. Bu karışım 40°C'de su banyosunda 30 dakika inkübe

edilmiştir. Üzerine 200 µl glutamik asit eklenmiş ve 1 saat daha aynı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra karışıma 1 ml asetonitril ilave edilmiş ve 10 dakika 25 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak 0,45 µm'lik filtreden süzülerek, HPLC'ye paralel olarak enjekte edilmiştir. Türevlendirme işleminde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

#### Dns-Cl çözeltisi

Aseton	1 ml
Dns-Cl	10 mg

#### Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 g
HPLC saflıkta destile su	10 ml

#### Sodyum glutaminat çözeltisi

Sodyum glutaminat	200 mg
HPLC saflıkta destile su	4 ml

### **3.2.6.3. Biyojen amin miktarlarına NO etkisi**

NO oluşumunun biyojen amin üretimini engelleyici etkisinin belirlenmesi amacıyla biyojen amin üreten LAB ile NO oluşturma yeteneğine sahip LAB sıvı besiyerinde bir arada üretilmiştir. Sıvı besiyeri (MRS) biyojen aminlerin öncülü olan amino asitlerini içerecek şekilde hazırlanmıştır. 3.2.6.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen işlemlerden sonra suşların biyojen amin üretimlerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesinde HPLC'den yararlanılmıştır. Biyojen amin üreten LAB aynı besiyerine aşılansak kontrol grubu oluşturulmuştur. NO'nun biyojen amin üretimine etkisini ortaya koymak amacıyla, NO verici bir bileşik olan S-nitrosoglutation (GSNO) biyojen amin üreten LAB içeren besiyerine çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10 ve 100 µM) ilave edilmiştir. Bakterinin daha önce belirtilen şartlarda inkübasyonundan sonra biyojen amin miktarları HPLC ile saptanmıştır. LAB suşları ve NO verici bileşik tarafından oluşturulan NO miktarları ise spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. MRS sıvı besiyerindeki her 2 örnek argon gazı (Nakamura and Nakamura, 1996) altında 4°C'de, 10 000 x g'de 20 dakika

santrifüj edilerek pelet ayrılmıştır. Elde edilen süpernatanta argon gazı altında Griess reaksiyonu uygulanarak NO miktarı belirlenmiştir.

#### **3.2.6.4. NO üreticisi LAB'nin ve biyojen amin üreten bakterilere antagonistik etkilerinin belirlenmesi**

NO üreticisi olan bakterilerin biyojen amin üretimi yüksek olan LAB'ne karşı olası antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi amacıyla agar difüzyon yönteminden yararlanılmıştır. 100 ml'lik erlenlerde MRS ve M17 agar (25 ml) besiyerleri hazırlanarak 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan alınan besiyerlerinin sıcaklığı 45–50°C'ye düştüğünde, biyojen amin üreten bakterilerin aktif kültürlerinden ekim (%1) yapılmıştır. Besiyeri ile bakterinin iyice karışması sağlandıktan sonra aseptik şartlarda steril petri kutularına dökülmüştür. Katılaştıran besiyerleri 30°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petri kutuları 1 saat süre ile buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra Petri kutularına sonda ile 8 mm'lik kuyucuklar açılmıştır. Bu kuyucuklara NO üreticisi bakteri kültürlerinin aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmış süpernatantlarından aseptik koşullarda 100 µl pipetlenmiştir. Petriler 30°C'de 18–24 saat süre ile inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra zon oluşumu incelenmiştir (Schillinger and Lücke, 1987; 1989).

#### **Bakteri süpernatantlarının hazırlanması**

LAB 10 ml'lik MRS ve M17 sıvı besiyerinde iki kez aktifleştirilmiştir. Daha sonra aynı besiyerlerine %1 düzeyinde ekilen kültürler 30°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 2 adet steril eppendorf tüpüne aktif sıvı kültürden 1,5 ml alınmıştır. Eppendorf tüpleri 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar steril eppendorf tüplerine alınmıştır. Süpernatantlardan birinin pH'sı steril NaOH çözeltisi (1 N) ile 6,0–6,5'e ayarlanırken, diğer süpernatanta herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Laktik Asit Bakterileri ve NO Üretim Düzeyleri

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan NO üretim yeteneğine sahip LAB Kart (2002) tarafından gerçekleştirilen Yüksek Lisans tez çalışması sırasında elde edilmiştir. Bu amaçla çiğ süt, tuzsuz mutfak tereyağı, Beyaz peynir, yoğurt, turşu ve silaj örneklerinden LAB izole edilmiştir. İzole edilen 1534 adet bakterinin NO oluşturma yeteneği MRS-Mb agarda incelenmiştir. Bu besiyerinde metmiyoglobini nitrosomiyoglobine dönüştürerek renk değişimi ve zon oluşturan 10 adet bakterinin tanısı yapılmıştır. Tanı testleri sonucunda 10 adet bakteriden 5 adedinin *Lactobacillus plantarum* (S1b, T119, Z1, Z2, Z3), 3 adedinin *Pediococcus acidilactici* (S2, S3, S1a), 2 adedinin *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (P2, P10) olduğu tespit edilmiştir. Beyaz peynir, hıyar turşusu, karışık silaj ve ot silajı örneklerinden izole edilen suşların türlere göre dağılımı ve izolasyon kaynakları Çizelge 4.1’de verilmiştir (Kart, 2002).

Çizelge 4.1. Kültürlerin türlere ve izolasyon kaynaklarına göre dağılımı

Suşlar	Tür Adı	İzole Edildiği Kaynak
P2	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	Beyaz Peynir
P10	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	Beyaz Peynir
S1a	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Karışık Silaj
S1b	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Karışık Silaj
S2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Karışık Silaj
S3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Karışık Silaj
T119	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Hıyar Turşusu
Z1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ot Silajı
Z2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ot Silajı
Z3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ot Silajı

NO üretme yeteneğine sahip 10 adet laktik asit bakterisi % 20 gliserol içeren MRS besiyerinde -80°C’ de 4 yıl boyunca muhafaza edilmiştir. LAB’nin laboratuvar koşullarında muhafaza edilmesi sırasında sahip olduğu önemli özelliklerin stabil kalmadığı ya da geri dönüşsüz olarak kaybedildiği bilinmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda LAB’nin laktoz kullanımı, proteinaz aktivitesi ve sitrat kullanımı gibi



önemli teknolojik özellikler açısından incelenmiş ve özellik kayıplarının genetik mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır (McKay et al., 1976; McKay, 1983; Kondo, 1989; Wright et al., 1986; Karahan, 1992). Bu nedenle çalışmanın temelini oluşturan LAB'nin NO üretim yetenekleri spektrofotometrik yöntemle tekrar belirlenmiş ve nitrit standardı ( $R^2=0,999$ ) kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular Kart (2002) tarafından belirlenen değerlerle kıyaslanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. LAB'nin ürettiği NO miktarlarına depolamanın etkisi

Suşlar	İzolasyon sonrası nitrit miktarı ( $\mu\text{M}$ )	Depolama sonrası nitrit miktarı ( $\mu\text{M}$ )
<i>Leu. dextranicum</i> P2	46,805 $\pm$ 1,017	15,039 $\pm$ 0,016
<i>Leu. dextranicum</i> P10	47,112 $\pm$ 1,106	11,524 $\pm$ 0,015
<i>P. acidilactici</i> S1a	42,872 $\pm$ 4,315	11,931 $\pm$ 0,043
<i>L. plantarum</i> S1b	44,172 $\pm$ 0,740	14,198 $\pm$ 0,015
<i>P. acidilactici</i> S2	51,479 $\pm$ 1,523	15,058 $\pm$ 0,054
<i>P. acidilactici</i> S3	50,237 $\pm$ 1,027	14,912 $\pm$ 0,012
<i>L. plantarum</i> T119	46,251 $\pm$ 6,843	6,395 $\pm$ 0,016
<i>L. plantarum</i> Z1	26,314 $\pm$ 1,047	4,680 $\pm$ 0,018
<i>L. plantarum</i> Z2	25,650 $\pm$ 2,780	3,459 $\pm$ 0,013
<i>L. plantarum</i> Z3	37,171 $\pm$ 4,020	2,877 $\pm$ 0,014

Çizelge 4.2'de görüleceği gibi başlangıçta 25,65–51,479  $\mu\text{M}$  arasında değişen düzeylerde NO üretimi belirlenen suşlar 4 yıllık depolama sürecinde önemli ölçüde özellik kaybetmiştir. Kart (2002) tarafından yapılan çalışmada en yüksek NO üretimi *L. plantarum* T119, en düşük üretim ise *L. plantarum* Z2' ye aittir. Bu çalışma kapsamında yapılan analizlerde ise en yüksek NO üretimi 15,058  $\mu\text{M}$  ile *Pediococcus acidilactici* S2, en düşük üretimi 2,877  $\mu\text{M}$  ile *L. plantarum* Z3 gerçekleştirmiştir.

## 4.2. NOS üreten suşların belirlenmesi

LAB'nin NO üretimini 2 farklı izyolu üzerinden gerçekleştirdiği bilinmektedir (Chen and Rosazza 1994; Xu and Verstraete, 2001). Bengmark (1998), özellikle L-arjininden NO üreten probiyotik laktobasillerin insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu ileri sürmüştür. Bazı laktobasillerin NOS enzimine sahip olduğu bildirilmesine rağmen (Morita et al., 1997), bunun aksini iddia eden araştırmacılar da bulunmaktadır (Xu and Verstraete, 2001). NOS enzimi varlığının belirlenmesinde engelleme çalışmaları önem taşımaktadır (Xu and Verstraete, 2001). Bu nedenle NO üretimini, nitratı substrat olarak kullanarak nitrat redüktaz üzerinden gerçekleştiren suşları, NOS enzimi ile üretim yapan suşlardan ayırabilmek amacıyla NOS engelleme denemelerinden yararlanılmıştır.

Özellikle mNOS enzimlerine yönelik olarak gerçekleştirilen engelleme çalışmalarında arjinin analogları, amidin içeren bileşikler ve hem bağlayan engelleyicilerden yararlanılmaktadır (Wach et al., 2005). Yaygın eğilim ise arjinin analoglarından L-NMA, L-NNA vb. nin kullanılmasıdır (Mayer et al., 1993; Schmidt et al., 1994; Klatt et al., 1994; Boucher, 1999; Tulic et al., 2000). L-NMA ve L-NNA L-arjininle sadece rekabete girmekle kalmaz, zamana bağlı olarak enzim inaktivasyonundan da sorumludur. L-NMA gerçekleştirdiği geri dönüşsüz engelleme ile insana özgü NOS izoformlarının tümüne son derece etkili bir engelleyici olarak kabul edilmektedir. Aynı zamanda insan NOS enzimlerine benzer olduğu düşünüldüğünde, mikrobiyel NOS üzerinde de denenmiş ve etkili olduğu bulunmuştur (Wach et al., 2005) Bu nedenle çalışmada NOS engellenmesinde L-NMA kullanılmıştır. Buna bağlı olarak NO miktarında meydana gelen değişimler spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve nitrit standardından ( $R^2=0,9901$ ) yararlanılarak hesaplanmıştır. Deneme sonucunda elde edilen bulgular ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Bu değerler bakımından bakteriler arası farklılığa ilişkin varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. L-NMA'nın NO üretimine etkisi

Suşlar	Kontrol grubu nitrit miktarı (µM)	L-NMA grubu nitrit miktarı (µM)	NO üretiminde düşüş (%)
<i>Leu. dextranicum</i> P2	15,116±0,058a*	12,849±0,058a	14,0
<i>Leu.dextranicum</i> P10	11,482±0,087d	9,07±0,058±d	21,0
<i>P. acidilactici</i> S1a	15,000±0,000a	11,453±0,058b	18,4
<b><i>L. plantarum</i> S1b</b>	<b>6,366±0,029e</b>	<b>1,918±0,116g</b>	<b>46,7</b>
<i>P. acidilactici</i> S2	14,855±0,029b	11,450±0,029c	23,6
<i>P. acidilactici</i> S3	4,012±0,000f	2,209±0,000f	24,2
<b><i>L. plantarum</i> T119</b>	<b>3,343±0,029g</b>	<b>1,802±0,058h</b>	<b>69,8</b>
<b><i>L. plantarum</i> Z1</b>	<b>2,674±0,058h</b>	<b>1,105±0,000k</b>	<b>44,9</b>
<b><i>L. plantarum</i> Z2</b>	<b>1,889±0,029ı</b>	<b>1,541±0,029ı</b>	<b>18,4</b>
<b><i>L. plantarum</i> Z3</b>	<b>14,186±0,174c</b>	<b>7,558±0,058e</b>	<b>58,6</b>

\*Aynı sütunda aynı harfle işaretlenen ortalama değerler, istatistik olarak birbirinden farklı değildir (p<0,01).

Çizelge 4.4. İnhibitör madde ilave edilen ve edilmeyen besi ortamlarında bakterilerin ürettikleri NO (nitrit) miktarları bakımından farklılığa ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-oranı
Kontrol	885,059	9	98,340	2,044E4**
L-NMA grubu	625,503	9	69,500	2,163E4**

\*\* p<0,01 seviyesinde önemli, \* p<0,05 seviyesinde önemli.

İnhibitör madde ilave edilmemiş olan MRS sıvı besiyerinde, çalışmada kullanılan bakteriler tarafından 1,889–15,116 µM arasında değişen miktarlarda NO üretiminin gerçekleştirildiği belirlenmiştir. İnhibitör madde ilave edilmeyen grupta en yüksek NO üretimin 15,116 µM düzeyinde ve P2 suşu tarafından oluşturulduğu gözlenmiştir. En düşük NO üretim miktarlarının ise Z2 suşunda ve 1,889 µM düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. İnhibitör madde ilave edilmeyen besiyerinde üretilen NO miktarları bakımından bakteriler arasında istatistiksel olarak p<0,01

seviyesinde önemli farklılıklar olduğu ve farklı gruplar içerisinde yer aldıkları görülmüştür. Ancak P2 ve S1a suşları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ( $p<0,01$ ) gözlenmemiştir.

L-NMA ilave edilen besiyerinde 1,105-12,849  $\mu\text{M}$  arasında değişen miktarlarda NO üretimi gerçekleşmiştir. Bu grupta en yüksek NO üretimi P2 suşunun 12,849  $\mu\text{M}$ 'lık üretimidir. En düşük NO üretim miktarlarının ise Z1 suşunda ve 1,105  $\mu\text{M}$  düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. İnhibitör madde ilave edilen besiyerinde üretilen NO miktarları bakımından bakteriler arasında  $p<0,01$  seviyesinde önemli farklılıklar olduğu ve farklı gruplar içerisinde yer aldıkları görülmüştür. Her iki uygulamada da en yüksek NO üretiminin P2 suşu tarafından gerçekleştirildiği gözlenmiştir. İnhibitör ilave edilen besiyerinde bütün bakteriler tarafından üretilen NO miktarlarında bir azalma olduğu belirlenmiştir.

L-NMA (500  $\mu\text{M}$ ) 4 suşun (S1b, T119, Z1, Z3) NO üretimlerini %40'ın üzerinde azaltmıştır. Z1 suşunda %44,9 olan engelleme, T119'da %69,8'e kadar yükselmiştir. Diğer 6 suşun nitrit cinsinden NO üretimleri ise %14–24,2 düzeyinde düşmüştür. Engelleyicinin NO üretimini bakteri hücrelerine zehir etkisi yaparak azaltabileceği olasılığını ortadan kaldırmak amacıyla 3.2.3'de belirtildiği şekilde denemeler yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda L-NMA'nın bakteri gelişimi üzerinde hiçbir olumsuz etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Wach et al. (2005) tarafından elde edilen bulgular da bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir. Söz konusu çalışmada *Streptomyces* spp. suşlarının NOS üretimi üzerine etkili L-NMA miktarları incelenmiş, 500  $\mu\text{M}$ 'lık uygulamanın takstomin üretimini %60'ın üzerinde azalttığı, ancak bakteri gelişimi üzerinde etkili olmadığı bulunmuştur.

NO üretimleri %40'ın üzerinde azalan suşların NOS enzimine sahip olduğu düşüncesi ile bundan sonraki çalışmalara bu 4 suşla devam edilmiştir. Ayrıca Z2 suşunun da *Lactobacillus plantarum* olması sebebiyle bu suşta denemelerde kullanılmıştır. Ancak *Lactobacillus plantarum* S1b aktiveştirmeler sırasında canlılığını yitirdiğinden, deneme dışı kalmıştır.

### 4.3. NOS enzim aktivite sonuçları

NOS engelleyicisi L-NMA tarafından enzim aktiviteleri düşürülmüş 4 suşun NOS enzim aktiviteleri belirlenmiştir. NOS hücre içi enzim olması nedeniyle bakteri hücrelerinin parçalanarak, enzimin hücre dışına alınması gerekmiştir. Enzim aktivite tayinlerinde bakteri hücre duvarı sonikatörle kırılmıştır. Bu işlem öncesinde santrifüj edilerek besiyerinden ayrılan hücre peleti soğutulmuş fosfat ya da Tris tamponda süspanse edilmiştir. Kullanılan tampon çözeltilere hücre duvarının kırılmasını kolaylaştırmak amacıyla ditiotritol (DTT) bileşiği ilave edilmiştir (Choi et al., 1998; Bird et al., 2002). Bu çalışmada ise gram pozitif bakterilerin hücre duvarının etkili şekilde kırılmasını sağlayan lizozimden ve takiben sonikasyon işleminden yararlanılmıştır. NOS enziminin hücre dışına alınmasından sonra ise spesifik aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Her suş için 3 paralel olarak hazırlanan örnekler analize alınmıştır. Enzim aktivitesi, protein ve spesifik aktivite miktarları bakımından bakteriler arası farklılığa ilişkin ortalama değerler ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.5’de ve bu değerler bakımından bakteriler arası farklılığa ilişkin varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Enzim spesifik aktivitesi, toplam aktivite ve protein tayinlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Toplam aktivitenin nitrit cinsinden hesaplanabilmesi amacıyla nitrit standart kurvesinden ( $R^2=0,9982$ ), protein miktarlarının belirlenmesi için ise sığır serum albümini ile hazırlanan protein standart kurvesinden ( $R^2=0,9997$ ) yararlanılmıştır. Enzim aktivitesi (spesifik aktivite) nmol nitrit/dakika/mg protein olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.5. Suşların NOS enzim aktiviteleri ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları\* (n=3)

Suşlar	Nitrit (nmol)	Protein (mg/ml)	Toplam aktivite (nmol/dakika)	NOS spesifik aktivitesi (nmol/dakika/mg)
T119	3081,00±125,00a	60,69±0,33a	17,12±0,69a	0,28±0,01a
Z1	2622,33±157,02b	55,81±1,06b	14,57±0,87a	0,26±0,02a
Z2	2601,67±201,01b	56,54±0,44b	14,45±1,12a	0,26±0,02a
Z3	2664,00±219,26ab	56,90±0,33b	14,80±1,22a	0,26±0,02a

\*Aynı sütunda aynı harfle işaretlenen ortalama değerler, istatistik olarak birbirinden farklı değildir (p<0,01).

T119 suşunun toplam aktivite değeri (17,12 nmol/dakika) diğer 3 suştan yüksek olmasına karşılık, istatistikî açıdan farkın önemli olmadığı (p<0,01) belirlenmiştir. Z1, Z2 ve Z3 suşlarının toplam aktivite değerleri birbirine yakındır. Protein miktarları ise 55,81–60,69 mg/ml değerleri arasında değişmiştir. En yüksek protein miktarı T119 suşunda gözlenirken, bu değeri sırasıyla Z3, Z2 ve Z1 suşlarına ait değerler takip etmektedir. Protein değerleri bakımından T119 diğer 3 suştan önemli düzeyde farklı (p<0,01) bulunmuştur. T119 suşunda 60,69 mg/ml olarak tespit edilen protein miktarını, istatistiksel olarak ikinci grupta yer alan Z3 suşuna ait değerler (56,90 mg/ml) takip etmektedir. Z1, Z2 ve Z3 suşları aynı grupta yer almıştır. Suşlar spesifik aktiviteler açısından birbirine yakın değerler vermiştir. Z1, Z2 ve Z3 suşları 0,26±0,02 nmol/dakika/mg spesifik aktivite ile *Lactobacillus plantarum* T119'un 0,28±0,01 nmol/dakika/mg olan enzim aktivitesine yakın aktivite göstermiştir. Spesifik aktivite değerleri bakımından bakteriler arasında önemli bir fark (p<0,01) belirlenmemiştir. Enzim aktivite tayinleri, L-NMA uygulaması sonucunda 4 suşun NOS enzimi ile NO ürettiğini gösteren bulguları da doğrulamıştır.

Çizelge 4.6. Enzim spesifik aktivitesine yönelik varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-oranı
Nitrit	4697125,3	4	1174281,3	43,827**
Protein	52,345	4	13,086	37,287**
Toplam aktivite	14,863	4	3,716	3,396
Spesifik aktivite	0,001	4	0,000	1,219

\*\* p<0,01 seviyesinde önemli, \* p<0,05 seviyesinde önemli.

NOS enzim aktivitesine yönelik çalışmalarda, çoğunlukla radyoaktif işaretlenmiş substrattan oluşan radyoaktif nitelikli ürünlerde radyoaktivitenin ölçülmesi esas alınmıştır. Bulgular NOS enziminin substratı olan L-arjinin <sup>14</sup>C ve <sup>3</sup>H (Klatt et al., 1994; Choi et al., 1998; Hong et al., 2003) ile işaretlenerek elde edilmiştir. Radyoaktivitenin esas alındığı çalışmaların yanı sıra spektrofotometrik yöntemlerle (Eissa et al., 1998; Bird et al., 2002) ya da HPLC ile enzim aktivitesinin belirlendiği çalışmalar da bulunmaktadır (Choi et al., 1997; Adak et al., 2002). Enzimatik tepkime sonucunda meydana gelen radyoaktif ürünler (L-sitrullin) yoluyla enzim aktivitesinin belirlenmesi yöntemi daha hassas ve güvenilir olmasına karşılık, özel ekipman ve laboratuvar koşulları gerektirmesi nedeniyle bu çalışmada uygulanamamıştır.

NOS enzim aktivitesinin belirlenmesine yönelik spektrofotometrik yöntemler de farklılıklar göstermektedir. Bird vd., (2002) tarafından yapılan çalışmada; metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'dan elde edilen NOS enziminin kristal yapısının saptanmasının yanı sıra ökaryotik NOS enzimlerine benzerliği, sıçan iNOS ve sığır eNOS ile kıyaslanarak incelenmiştir. mNOS enzimlerinde bulunan oksijenaz bölgesinin prokaryotik NOS enzimlerinde de bulunabileceğini ispatlamak amacıyla da oksijenaz bölgesinin aktivitesi belirlenmiştir. Bu aktivitenin tayini, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in de katıldığı bir tepkimeyle N-hidroksi-L-arjininden oluşan nitrit miktarının doğrudan ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Elde edilen bulgular, SANOS tarafından dakikada üretilen nitrit miktarının 0,15±0,01 nmol düzeyinde olduğunu göstermiştir. Ayrıca SANOS enzim aktivitesi için ökaryotik NOS enzimlerinin gereksinim duyduğu kofaktör tetrahidrobiopterinin (H<sub>4</sub>B) gerekli olmadığı vurgulanmıştır. Bu nedenle

enzim aktivitesinin tayininde bu kofaktöre yer verilmemiştir. Oysa *Deinococcus radiodurans* NOS enzim aktivitesi için H<sub>4</sub>B'nin gerekliliği üzerinde durulmaktadır (Adak et al., 2002a; Buddha et al., 2004a). Yapılan kaynak taramasında LAB'nin NOS enzim aktivitesi için gerekli kofaktörlerin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmadığından, bu araştırmada yararlanılan enzim aktivitesi tayin yöntemi; iNOS enzimine yönelik bir çalışmadan alınmıştır (Eissa et al., 1998). Söz konusu araştırmada, insan bronşiyal epitelinden izole edilen iNOS enziminde kofaktörler ya da substratların bağlanmasından sorumlu bölgede meydana gelen mutasyonların enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla iNOS enzimine ait genlerin klonlanması ve klonlardan elde edilen enzimin özelliklerinin belirlenmesi üzerinde durulmuştur. Mutasyona uğramamış hücrelerde nitrit miktarı ~100 nmol/mg civarında, enzim aktivitesi ise ~20 nmol/mg/3 saat olarak belirlenmiştir. Chen and Rosazza (1995) tarafından yapılan çalışmada da enzim aktivitesi benzer bir yöntemle belirlenmiştir. *Nocardia* sp. NRRL 5646'dan elde edilen enzim (NOS<sub>noc</sub>) kısmen saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. Bakteriyel NOS enziminin ilk kez incelendiği bu çalışmada, spesifik enzim aktivitesi 0,15 nmol/dakika/mg olarak saptanmıştır.

Spektrofotometrik olarak belirlenen SANOS ve NOS<sub>noc</sub> aktiviteleri ile bu çalışmada elde edilen bulgular kıyaslandığında, *L. plantarum* suşlarının (T119, Z1, Z2 ve Z3) daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

#### **4. 4. NOS gen bölgesinin belirlenmesine ait sonuçlar**

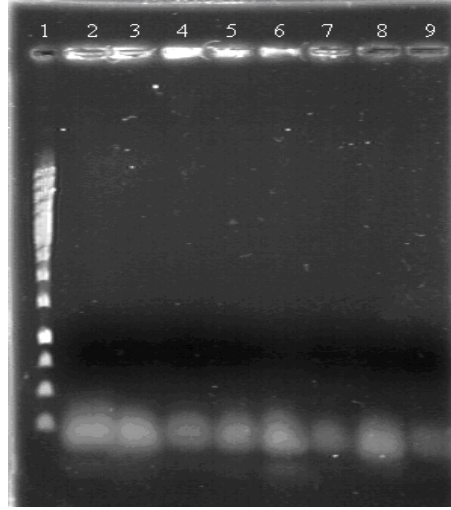
Enzim aktivitesinin engellenmesi ve spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi denemeleri ile L-arjinin substratı üzerinden NO ürettiğine inanılan 4 suşda NOS gen bölgesinin belirlenmesi çalışmalarına geçilmiştir. NOS geni genomik ve plazmit DNA'da aranmıştır.



#### 4.4.1. Kromozomal DNA’da NOS gen bölgesinin aranması

NOS enzimleri böcekler, yumuşakçalar, parazitler, funguslar, akışkan küfler ve bakteriler gibi birçok canlıda bulunmaktadır. Bu enzimlerin amino asit dizileri ve aktiviterleri mNOS enzimlerine benzer olduğundan, memeli genlerinin az gelişmiş türlerden evrim yoluyla kazanıldığı ileri sürülmektedir. Moleküler Biyoloji’deki gelişime bağlı olarak *Deinococcus radiodurans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus anthracis* ve *Staphylococcus aureus*’un sahip olduğu NOS benzeri proteinlere ait gen dizileri belirlenmiş, klonlanmış, üretimi sağlanmış ve mNOS enzimleri ile kıyaslanmıştır (Adak et al., 2002). NOS gen bölgesinin belirlenmesi amacıyla çeşitli yöntemlerden yararlanılabilmekle birlikte yaygın eğilim uygun primerler kullanılarak, genin genomik DNA’dan PZR ile çoğaltılmasıdır (Adak et al., 2002a; 2002b; Bird et al., 2002; Sudhamsu and Crane, 2006). Bu çalışmada da NO üreticisi LAB’nde NOS geni varlığı aynı yöntemle araştırılmıştır. Farklı bakterilerde NOS gen bölgesine ait dizilim verilmiş olmasına rağmen, sadece bir araştırmada (Bird et al., 2002) primer çiftinin diziliminden bahsedilmektedir.

NOS enzim aktivitesi gösteren 4 suşdan (T119, Z1, Z2, Z3) DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra uygun PZR koşullarında NOS geni tespit edilmeye çalışılmıştır. Denemelerin başlangıcında 1 ve 2 nolu primer çiftleri kullanılarak gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla 10 kez PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Ancak denemelerin hiçbirinde agaroz jelde PZR ürünü gözlenememiştir. PZR ürünlerinin incelenmesi amacıyla yapılan jel elektroforeze ait sonuçlar Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. İlk 2 primerle gerçekleştirilen PZR sonucunda elde edilen jel görünümü (1; marker, 2; T119-1. primer, 3; T119-2. primer, 4; Z1-1. primer, 5; Z1-2. primer, 6; Z2-1. primer, 7; Z2-2. primer, 8; Z3-1. primer, 9; Z3-2. primer)

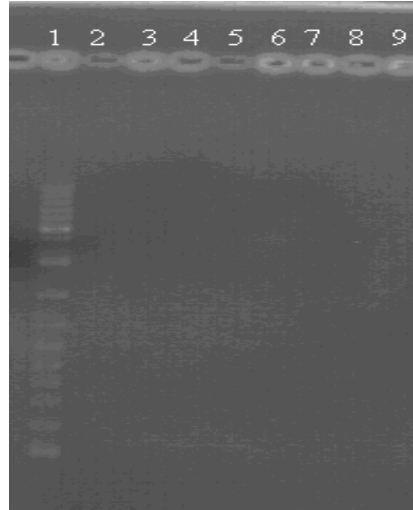
Gen bölgelerinin çoğaltılabilmesi açısından uygun primerlerin seçimi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle uygun primerlerin tasarlanabilmesi için öncelikle genomları üzerinde NOS enzimine ait gen bölgesini taşıyan diğer bakteri türleri Brenda The Comprehensive Enzyme Information System internet sitesinden (<http://www.brenda-enzymes.org>) belirlenmiştir. Daha sonra söz konusu bakterilerde bulunan NOS enzimine ait nükleotit dizileri DOE Joint Genome Institute (<http://img.jgi.doe.gov/>) internet sitesindeki gen bankasından elde edilmiştir. Bakterilerin (23 adet) NOS enzimine ait genlerinin korunmuş bölgeleri BLAST programı kullanılarak birbirleriyle kıyaslanmıştır. Şekil 4.2’de *Staphylococcus aureus* RF122:SAB1851 ve *Bacillus anthracis* Ames: BA5695 bakterilerine ait NOS gen bölgelerinin kıyaslanmasına ait sonuçlar örnek olarak verilmiştir.



Çizelge 4.7. Blast search programı ile tasarımı yapılan primerlerin özellikleri

Primerler	Primer çiftlerinin erime sıcaklıkları (°C)	Primer Uzunlukları (baz)
3.primere çifti	67.8/66.4	31/35
4.primere çifti	68.2/66.3	35/23
5.primere çifti	68.2/66.3	35/35
6.primere çifti	68.0/66.3	32/23

Bu 4 farklı primer çiftiyle 5 kez gerçekleştirilen PZR denemeleri sonucunda da NOS gen bölgesine ait herhangi bir ürün belirlenememiştir. Laktobasillerde NOS gen bölgesinin belirlenmesine yönelik yeterli düzeyde çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada kullanılan primerlerin seçiminde ve tasarlanmasında uygun yöntemlerden yararlanılmasına rağmen genomik DNA üzerinde NOS geninin varlığı belirlenememiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 3. ve 4. primer çiftleri ile yapılan PZR'a ait jel görüntüsü (1; marker, 2; T119-3.primere, 3; T119-4. primere, 4; Z1-3. primere, 5; Z1-4. primere, 6; Z2-3. primere, 7; Z2-4. primere, 8; Z3-3. primere, 9; Z3-4. primere)

#### 4.4.2. Plazmit DNA'da NOS gen bölgesinin aranması

Tüm çabalara rağmen genomik DNA'da NOS gen bölgesinin belirlenememesi ve LAB'nin depolama sürecinde NO üretim düzeylerinde meydana gelen azalmalar, bu özelliğin plazmit DNA'da kodlanmış olabileceğini düşündürmüştür. LAB'inde proteinazlar, laktoz metabolizması, sitrat taşınması, faja dirençlilik, bakteriyosin üretimi gibi birçok önemli özelliğin plazmitlerde kodlandığı bilinmektedir. Yine LAB'nin sahip olduğu plazmitlerin kararsız olduğu, bu nedenle de depolama sürecinde ve kültür koşullarına bağlı olarak kaybedilebileceği de birçok çalışma ile gösterilmiştir (Wang and Lee, 1997; van Kranenburg et al., 2005). Depolamanın uzunluğu plazmitlerin stabilitesini etkilemektedir. *L. plantarum* DSM1959 6 adet plazmit içerdiği halde 7 yıl süren bir depolama sürecinden sonra 2 adet plazmidini (pN12 ve pN13) kaybetmiştir. Bu çalışmaya ait ilginç bir sonuç ise yeni bir plazmidin (pN15) belirlenmesidir. Diğer 4 plazmit ise 9 yıla kadar uzatılan depolama sürecinde varlıklarını korumuştur. Bunun yanı sıra besiyeri bileşimi ve inkübasyon sıcaklıkları da plazmit kayıplarına yol açabilmektedir. *L. plantarum* caTC2'ye ait 6,5-, 8,5- ve 10,6 kb'lık plazmitlerin stabilitesi, şeker bileşimi farklı olan [glüköz (%2), maltoz (%2) ve laktoz (%2)] besiyerlerinde ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında (30°C ve 21°C) 7 gün inkübasyon sonrasında incelenmiştir. Konakçı hücreler laktoz içeren besiyerinde 21°C'de inkübasyon sonucunda 8,5 kb'lık plazmidini önemli ölçüde kaybetmiştir. Aynı plazmit yüksek sıcaklıkta (40°C) inkübasyon nedeniyle her jenerasyonda %25 düzeyinde kaybedilmiştir (Wang and Lee, 1997). Özellikle molekül ağırlığı 25 MDa'dan daha küçük olan plazmitlerin genellikle kendi aktarımlarını olanaklı kılacak genleri taşımadıkları, bu nedenle nakeldilmelerinin bir başka aktarılabılır büyük plazmitle mümkün olabildiği bilinmektedir (Kempler and McKay, 1981; Karahan, 1992). Bu durum küçük plazmitlerin çok daha kolay kaybedilmesine neden olmaktadır.

NO üretim özelliği LAB arasında yaygın bir özellik değildir. Bu özelliğin genetik mekanizmasına ait bilgilerin son derece kısıtlı olmasının yanı sıra plazmitlerle ilişkisine dair bir çalışmaya da rastlanmamıştır. *L. plantarum* suşlarına (T119, Z1, Z2, Z3) NOS gen bölgelerini içerdiği tahmin edilen plazmitlerin geri kazandırılması

amacıyla  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen kùltürleri içeren turşular 3.2.5.2.1'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Deneme turşularının görünümü Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. NO üreticisi 4 suşla hazırlanan turşular

Her turşu örneğinden ortalama 200 adet koloni seçilerek, toplam 1600 koloninin MRS-Mb agar besiyerinde NO üretimleri incelenmiştir. Bu denemeler sonucunda T119 suşu ile fermente edilen turşulardan 3 adet, Z1 turşularından 2 adet, Z2 ve Z3 turşularından 1'er adet olmak üzere toplam 7 adet NO üreticisi bakteri izole edilmiştir. T119 içeren turşudan izole edilen 3 NO üreticisi bakterinin MRS-Mb agardaki görünümleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Turşudan izole edilen NO üreticisi T119 varyantları

Daha sonra bu bakteriler MRS-Mb sıvı besylerinde geliştirilerek (Şekil 4.6), NO üretim miktarları spektrofotometrik yöntemle belirlenmiş ve nitrit standardı kullanılarak hesaplanmıştır ( $R^2=0,995$ ). Tüm denemeler 3 paralel halinde gerçekleştirilmiştir. NO üreten bu 7 suşun agarlı besiyerinde 6 kez yapılan sürme işlemleri ile plazmitlerin giderimi sağlanmaya çalışılmıştır.



Şekil 4.6. MRS-Mb sıvı besiyerinde kırmızı renk oluşumu

Uzun süre depolanan suşların NO üretim düzeyleri ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.8’de, turşudan izole edilen ve plazmit giderimi çalışmaları yapılan bakterilerin NO üretim miktarları Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.9’da verilmiştir. Bu değerler bakımından bakteriler arası farklılığa ilişkin varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.8. Orijinal suşların NO üretimleri

Suşlar	Depolama sonrasında NO üretimi ( $\mu\text{M}$ )
T119	5,523 $\pm$ 0,129a
Z1	3,480 $\pm$ 0,099a
Z2	2,834 $\pm$ 0,074a
Z3	2,146 $\pm$ 0,037a

\*Aynı sütunda aynı harfle işaretlenen ortalama değerler, istatistik olarak birbirinden farklı değildir ( $p<0,01$ ).



Çizelge 4.9. Turşudan izole edilen ve plazmit giderimi yapılan suşların NO üretimleri

Suşlar	Turşu izolatlarının NO üretimi ( $\mu\text{M}$ )	Plazmit giderim çalışması sonrasında NO üretimi ( $\mu\text{M}$ )
T119 (1)	5,501 $\pm$ 0,037a*	5,544 $\pm$ 0,074a
T119 (2)	5,415 $\pm$ 0,037a	5,415 $\pm$ 0,074a
T119 (3)	5,523 $\pm$ 0,065a	5,523 $\pm$ 0,000a
Z1 (1)	3,372 $\pm$ 0,037a	3,437 $\pm$ 0,037a
Z1 (2)	3,480 $\pm$ 0,037a	3,523 $\pm$ 0,065a
Z2 (1)	2,834 $\pm$ 0,037a	2,834 $\pm$ 0,099a
Z3 (1)	2,146 $\pm$ 0,074a	2,189 $\pm$ 0,037a

\*Aynı sütunda aynı harfle işaretlenen ortalama değerler, istatistik olarak birbirinden farklı değildir ( $p<0,01$ ).

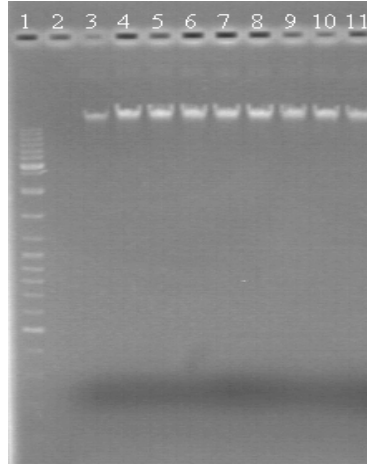
Çizelge 4.10. NO üretimi açısından bakteriler arası farklılığa ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-oranı
T119 (1)	0,003	2	0,001	0,176
T119 (2)	0,023	2	0,012	1,471
T119 (3)	0,000	2	0,000	0,000
Z1 (1)	0,018	2	0,009	2,111
Z1 (2)	0,004	2	0,002	0,364
Z2 (1)	0,000	2	0,000	0,000
Z3 (1)	0,004	2	0,002	0,667

Her üç uygulamada da üretilen NO miktarlarının en yüksek T119 suşlarında ve 5,523–5,544  $\mu\text{M}$  arasında değişen düzeylerde olduğu gözlenmiştir. En düşük NO üretim miktarlarının ise her üç uygulamada Z3 suşlarında ve 2,146–2,189  $\mu\text{M}$  arasında değişen miktarlarda olduğu tespit edilmiştir. Bu 3 bakteri grubunun ürettiği NO (nitrit) miktarları bakımından istatistiksel bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,01$ ). Bu durum bakterilerin doğal ortamı olan turşuda çoğalmaları sırasında da NO üretimi açısından bir kazanıma sahip olamadıklarını düşündürmüştür. Elde

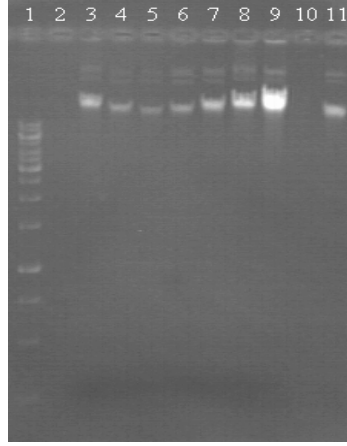
edilen verilere rağmen, suşların plazmit profilleri belirlenmiş ve plazmitlerde mevcut 6 primer ile NOS gen bölgesi aranmıştır.

Laktobasillerin plazmit profilleri 3.2.5.2.3’de verilen yöntemle incelenmiştir. Şekil 4.7’de T119 ve turşudan izole edilen varyantlarına, 4.8’de ise Z1, Z2, Z3 ve varyantlarına ait plazmit profilleri verilmiştir.



Şekil 4.7. T119 ve varyantlarının plazmit profilleri (1; marker, 3; T119 (1) turşudan, 4; T119 (1) plazmit gideriminden, 5; T119 -80°C’den, 6; T119 (2) turşudan, 7; T119 (2) plazmit gideriminden, 8; T119 -80°C’den, 9; T119 (3) turşudan, 10; T119 (3) plazmit gideriminden, 11; T119 -80°C’den)

*L. plantarum* T119 ve varyantlarında plazmit içerikleri açısından bir farklılık gözlenmemiştir. Plazmidlerin jelde görüntülenmesi esnasında 1kb’lık DNA ladder marker kullanılmıştır. Plazmit büyüklüklerini tespit etmek amacıyla kullanılan markerda en büyük molekül 10 000 baz çifti içermektedir. Şekil 4.7 ve 4.8’de görüleceği gibi bakterilerin plazmitleri en büyük marker bandının üzerinde yer aldığından moleküler ağırlıkları belirlenememiştir. T119 ve varyantlarının 2 plazmide sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Z1, Z2, Z3 ve varyantlarının plazmit profilleri (1; marker, 3; Z1 turşudan, 4; Z1 plazmit gideriminden, 5; Z1 -80°C'den, 6; Z2 turşudan, 7; Z2 plazmit gideriminden, 8; Z2 -80°C'den, 9; Z3 turşudan, 10; Z3 plazmit gideriminden, 11; Z3 -80°C'den)

Şekil 4.8'de Z1, Z2, Z3 suşları ve varyantlarının 3'er plazmide sahip oldukları görülmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda *Lactobacillus* türlerinin bir ya da daha fazla sayıda çoğunlukla 1–10 kadar farklı plazmide sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak 16 plazmit içeren *L. plantarum* LPC25 gibi bu durumun istisnaları da bulunmaktadır. *L. plantarum* LL31 ve LL2'nin plazmitlerinin 1,2–169 kb büyüklükte olduğu bildirilmiştir. *Lactobacillus* plazmitlerinin çoğu 10 kb'dan küçük olmasına rağmen, *L. acidophilus*'dan izole edilen pPM68 (110 kb) gibi 100 kb'dan büyük plazmitler de bulunmaktadır (Wang and Lee, 1997).

Bu çalışmada elde edilen *L. plantarum* suşlarının plazmitlerine ait bulgular diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Ruiz-Barba vd., (1991) farklı yeşil zeytin fermantasyon tanklarından izole ettikleri 35 adet *L. plantarum* suşunun 2,0–68 kb büyüklüğünde 5–16 plazmit içerdiğini saptamıştır. Xanthopoulos vd., (2000) Feta peynirinden izole ettikleri *L. plantarum* suşlarında farklı plazmitlerin varlığını ispatlamıştır. Benzer bulgular fermente sosis (Kanatani and Oshimura, 1994) ve zeytinden izole edilen (Mourad, 2007) *L. plantarum* suşları için de verilmiştir. Ancak plazmit sayılarındaki farklılığın LAB'nde plazmitlerin belirlenmesindeki zorlukla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Bakterilerin gelişme sıcaklığı, plazmitlerin kopya

sayısı ve izolasyon işlemi gerçek plazmit sayılarının saptanmasında belirleyici etken olmaktadır (Casey and Jimeno, 1989).

Her suşa ait plazmitlerin varlığı jelde gözlemlendikten sonra plazmit örneklerinden 5'er µl alınarak, 3.2.5.1'de belirtildiği şekilde PZR denemeleri gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA'da gen bölgesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan 6 primer çifti bu denemelerde de kullanılmıştır. Ancak 2 kez tekrarlanan PZR işlemleri sonucunda plazmit DNA üzerinde NOS enzimine ait gen bölgesinin bulunduğu dair bir bulguya ulaşılamamıştır. Bu çalışmada kullanılan primerlerin gen bölgesinin belirlenmesi açısından yetersiz olduğu sonucuna varılmış ve denemelerin bu aşamasına son verilmiştir. Herhangi bir özelliğe ait genlerin belirlenmesi amacıyla genomik DNA ve cDNA kütüphanelerinin hazırlanması gibi yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Ancak bunlar emek yoğun ve pahalı işlemlerdir. Aynı zamanda ekip çalışmasını gerektirmektedir. Söz konusu nedenlerle NOS gen bölgesinin belirlenmesi çalışmalarına daha sonra gerçekleştirilecek projelerle kaynak yaratılarak ve ekip oluşturularak devam edilecektir.

#### **4.5. Biyojen amin üretiminin NO üretimi ile önlenmesi**

##### **4.5.1. Biyojen amin üreten LAB izolasyonu sonuçları**

Mikroorganizmaların biyojen amin oluşturma yeteneklerinin nitel ve nicel olarak belirlenmesi amacıyla çeşitli yöntemlerden yararlanılmaktadır. Nitel olarak biyojen amin oluşturan suşların taranmasında çoğunlukla bromkrezol purple gibi bir pH belirteci içeren seçici besiyerleri kullanılmaktadır. Pepton, maya ya da et özütü, tuz ve/veya glikoz içeren temel besiyerine biyojen aminlerin öncülleri olan amino asitler ilave edilmektedir. Bu besiyerlerinde pH'daki değişime bağlı olarak mor renk meydana gelmesi biyojen amin oluşumunun belirteci olarak kabul edilmektedir. pH değişimi, besiyerinde bulunan amino asitlerden alkali nitelikteki biyojen aminlerin oluşumundan kaynaklanmaktadır (Santos, 1998; Bover-Cid and Holzapfel, 1999).

Bu çalışmada, biyojen amin üreten LAB'nin nitel olarak belirlenmesi amacıyla söz konusu özellikleri taşıyan Dekarboksilaz Agar besiyeri kullanılmıştır. Denemeler 2 aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak daha önce gerçekleştirilen projelerde izole edilmiş ve tanısı yapılmış 226 adet LAB, biyojen aminlerin öncül bileşikleri olan amino asitleri (tirozin, histidin, fenilalanin, triptofan, lizin ve ornitin) ayrı ayrı içeren Dekarboksilaz Agar besiyerlerinde geliştirilerek, biyojen amin oluşturan suşların varlığı incelenmiştir. Ancak söz konusu bakterilerde biyojen amin üretim yeteneğine rastlanmamıştır. Bu bakterilerle sonuç alınamaması nedeniyle ikinci aşamaya geçilmiş ve NO üreticisi LAB'nin daha çok et ürünlerinde başlatıcı kültür olarak kullanılması hedeflendiğinden, geleneksel fermente et ürünümüz olan sucuktan LAB izole edilmiştir. İzolasyon çalışmalarında 11 adet sucuk örneği izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. Sucuk örnekleri, Konya ve Isparta'da bulunan çeşitli kasapların kendi üretimleri olan sucuklardan seçilmiştir. Piyasada satışı yapılan ve fabrikalarda üretilen sucuklar, başlatıcı kültür kullanılıyor olması ihtimali nedeniyle deneme dışı tutulmuştur. Sucuk örneklerinden izole edilen 286 adet LAB'nin de Dekarboksilaz Agar besiyerinde biyojen amin oluşturma yetenekleri incelenmiştir. Şekil 4.9'da izolasyon plağının görünümü verilmiştir.



Şekil 4.9. İzolasyon plağında biyojen amin oluşturan izolatın görünümü

İzolatlardan sadece 1 adedinin (A-09) ornitin amino asidi içeren Dekarboksilaz Agar besiyerinde mor renk oluşturduğu gözlenmiştir. Yapılan anahtar nitelikli birkaç analiz sonucunda A-09'un Gram pozitif ve kısa çubuk şeklinde LAB olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda NO üreticisi 9 adet LAB de biyojen amin üretimi açısından incelenmiş ve bu yönde bir aktivite belirlenmemiştir. Elde edilen bulgular, biyojen amin oluşumunun LAB arasında yaygın bir özellik olarak görülmemesini (Santos, 1998; Bover-Cid and Holzapfel, 1999; Leitão et al., 2000; Moreno-Arribas et al., 2003) destekler niteliktedir. Bu durum, biyojen amin oluşturma özelliğinin türe değil suşa özgü olmasından kaynaklanmaktadır (Bover-Cid and Holzapfel, 1999).

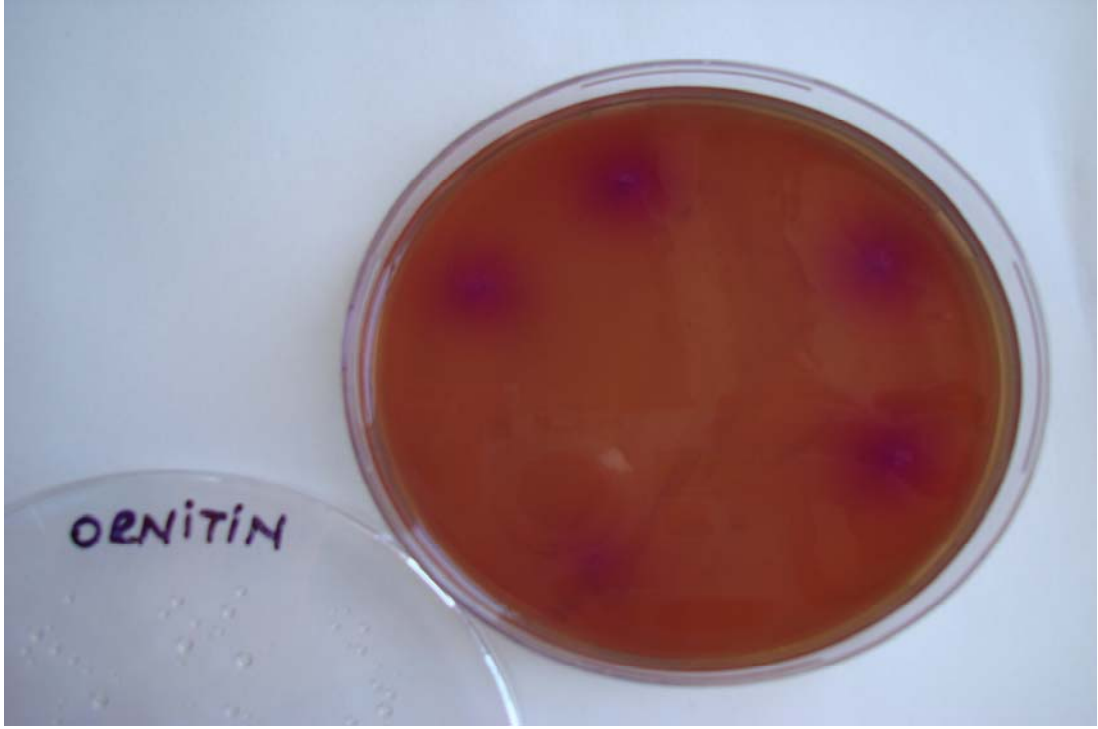
Çeşitli çalışmalarda, farklı gıdalardan izole edilen LAB'nin biyojen amin oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla Dekarboksilaz Agar besiyeri ve sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Ancak bu besiyerlerinin kullanılmasında karşılaşılan ana sorun yanlış pozitif ve negatif sonuçların alınmasıdır. Bazı çalışmalarda biyojen aminler dışında alkali bileşiklerin oluşumu nedeniyle yanlış pozitif sonuçların alındığı bildirilmektedir (Roig-Sagués et al., 1997; Durlu-Özkaya, 2001). Yanlış negatif sonuçlar ise LAB gibi besin istekleri fazla mikroorganizmaların nispeten basit besiyerlerinde gelişmelerinin yetersiz kalmasından kaynaklanmaktadır (Bover-Cid and Holzapfel, 1999). Bu sorunları gidermek amacıyla dekarboksilaz aktivitesini belirlemeye yönelik besiyerlerinin yeniden tasarlanması amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bover-Cid ve Holzapfel (1999) tarafından yapılan çalışmada, besiyeri bileşimi değiştirilmiş ve agarlı besiyerinde alınan sonuçların kimyasal analizlerle iyi bir korelasyon gösterdiği ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada başlatıcı kültürleri ve çeşitli gıdaları da içeren farklı kaynaklardan köken alan çok sayıda LAB'nin yanı sıra Enterobacteriaceae familyasından birkaç suşun tiramin, histamin, putresin ve kadaverin oluşturma özellikleri her 2 yöntemle de incelenmiştir.

Maijala (1993), ticari başlatıcı kültürlerden (4 adet) ve kurutulmuş sosislerden (10 adet) LAB izole etmiştir. İzolatların amin oluşturma yetenekleri dekarboksilasyon sıvı besiyerinde incelenmiştir. Ekmek ürünlerinin üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılan *Lactobacillus brevis*'in amin ürettiği belirlenmiş ve elde edilen sonuç HPLC ile de doğrulanmıştır. Santos (1998) ise İspanyollara özgü et ürünlerinden

enterobakter, LAB ve Gram pozitif kokları izole etmiştir. İzolatların *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus* varyantları, *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter amnigenes* ve *Enterobacter aerogenes* olarak tanısı gerçekleştirilmiştir. En yüksek amino asit dekarboksilaz aktivitesini enterobakterler göstermiş, buna karşılık LAB'nin önemli düzeyde amino asit dekarboksilaz aktivitesine sahip olmadığı ileri sürülmüştür.

Durlu-Özkaya (2001) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanmış Beyaz peynir örneklerinden LAB izole edilerek, tanısı gerçekleştirilmiş ve biyojen amin oluşturma özellikleri irdelenmiştir. Dekarboksilaz Agar'a yapılan ekimler sonucunda *Lactococcus lactis*'in 2 suşu triptofan dekarboksilaz, enterokok suşlarının çoğunluğu tirozin dekarboksilaz aktivitesi göstermiş ve laktobasillerde herhangi bir aktivite saptanmamıştır. Ancak HPLC ile yapılan biyojen amin analizleri sonucunda, dekarboksilaz testinin biyojen amin oluşturan suşları belirlemede bir gösterge olmadığı, yanlış pozitif ve negatif sonuçlar verebildiği ileri sürülmüştür. Benzer bulgular Moreno-Arribas vd., (2003) tarafından da elde edilmiştir. Çeşitli kaynaklardan elde edilmiş LAB'nin tiramin, histamin ve putresin oluşturma özellikleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan dekarboksilaz aktivitesini belirlemeye yönelik sıvı besiyerinin basitliği, mor renk oluşumuna bağlı olarak kolay değerlendirilebilmesi ve kromatografik analizlerle korelasyonunun yüksek olması üstünlük olarak kabul edilmiştir. Ancak bu besiyerinde putresin ve agmatin varlığı, yanlış pozitif sonuçlar nedeniyle doğru şekilde değerlendirilememiştir. İncelenen LAB'nin düşük düzeylerde biyojen amin ürettiği bildirilmiştir.

Çeşitli araştırmalarda elde edilen çelişkili bulgulara rağmen, biyojen amin oluşturan suşların belirlenmesinde dekarboksilaz aktivitesini nitel olarak belirlemeyi sağlayan sıvı ve katı besiyerlerinin kullanılması yaygın bir eğilimdir. A-09 suşunun ornitin amino asidi içeren dekarboksilaz besiyerinde pozitif sonuç vermesi çalışmanın önemli bulgularından biridir. A-09'un Dekarboksilaz Agar besiyerindeki görünümü Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. A-09 suşunun ornitin içeren Dekarboksilaz agarda görüntüsü

Memeli sistemlerinde yapılan çalışmalarda ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi aracılığıyla ornitin amino asidinden putresin, spermin, spermidin ve diğer poliaminlerin üretildiği ifade edilmektedir. Ayrıca NOS enzimi aracılığıyla üretilen NO bileşiğinin ODC aktivitesi üzerinde baskılayıcı bir role sahip olduğu belirlenmiştir (Joshi, 1997; Buga et al., 1998; Bauer et al., 2001; Hillary and Pegg, 2003). Bu nedenle ornitinden biyojen amin oluşturan bir izolatın elde edilmesi çalışmanın bir sonraki aşaması açısından büyük önem taşımaktadır.

#### 4.5.2. NO'in biyojen aminler üzerine etkisine ait sonuçlar

Çalışmanın bu aşamasında, LAB'nin oluşturduğu NO'in biyojen aminler üzerine engelleyici etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Öncelikle denemelerde kullanılacak NO üreten T119 ve S2 suşlarının biyojen amin oluşturan A-09'un gelişimine etkisini belirlemek amacıyla kuyucuk difüzyon yöntemiyle antagonistik etki çalışması yapılmıştır, çünkü *L. plantarum* suşları kendilerine yakın akraba olan bakterilere karşı antagonizm gösterebilmektedir. Her 2 NO üreticisi LAB'nin de A-09 üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Böylece gelişimin baskılanması yoluyla



biyojen amin üretiminin azaltılması olasılığı kalmamıştır. Bu özellik, başlatıcı kültürlerin oluşturulması açısından da büyük önem taşımaktadır (Holzapfel, 2002; Oguntoyinbo, 2007). Aynı yöntem kullanılarak NO verici bileşik olan GSNO'nun da A-09'un gelişimi üzerindeki etkisi incelenmiş ve bakteri gelişimini engellemediği belirlenmiştir.

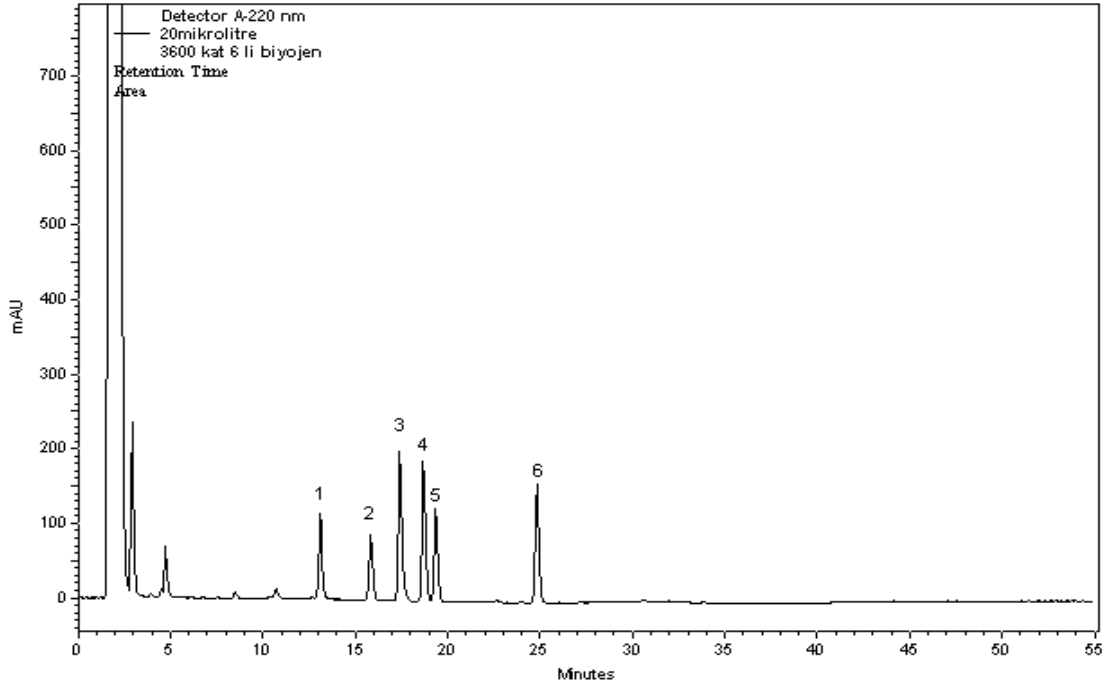
Gıdalarda çeşitli bakteriler tarafından oluşturulan biyojen aminler insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle fermente ürünlerin biyojen amin içerikleri üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Biyojen aminler hücre gelişimi için gerekli, ancak fazla üretildiği zaman insan vücudu için olumsuz etkilere sebep olabilen önemli bileşiklerdir. Memeli hücreleri kullanılarak *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarla biyojen amin oluşumunun NO tarafından engellendiğinin belirlenmesine rağmen, gıdalarda biyojen amin oluşumu üzerine NO'nin etkilerini belirlemeye yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle başlatıcı kültür olarak kullanılabilme özelliğine sahip LAB'nin NO oluşturma yeteneklerinin bu açıdan araştırılması önem taşımaktadır.

NO oluşturan LAB'nin fermente et ürünlerinin üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılmaları hedeflendiği için özellikle bu ürünlerde sorun oluşturan biyojen aminler üzerinde durulmuştur. Sucuk gibi et ürünlerinde daha çok histamin, putresin, kadaverin ve tiramin gibi biyojen aminlerin bulunduğu ifade edilmektedir (Suzzi and Gardini, 2003). Bunun yanı sıra A-09 tarafından düşük düzeylerde üretilen feniletilamin ve triptamin de değerlendirilmiştir.

LAB'nin biyojen amin oluşturma özelliklerinin sıvı veya agarlı besiyerlerinde nitel olarak belirlenmesini takiben, biyojen aminlerin miktar tayini kromatografik yöntemlerle ya da kapiler elektroforezle gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler arasında özellikle HPLC'ye dayalı yöntemlerin uygulanması yaygındır. Biyojen aminlerin doğru şekilde tayin edilebilmesi açısından özütünün alınması ve saflaştırılması basamakları önem taşımaktadır. Bu işlemlerle analiz sırasında biyojen aminlerle karıştırılarak yanlış sonuçlara neden olacak bileşikler ortamdaki uzaklaştırılmaktadır. Biyojen aminlerin özütünün alınması işlemleri sırasında

istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması amacıyla hidroklorik asit, perklorik asit ya da triklorasetik asit kullanılmaktadır (Özdekan ve Üren, 2009). Bu çalışmada, özüt alınması işlemleri için hidroklorik asitten yararlanılmıştır.

Saflaştırma ise sıvı-sıvı ya da C<sub>18</sub> kartuşları kullanılarak katı faz özüt alma işlemleri şeklinde gerçekleştirilmektedir. Ancak biyojen aminlerin saptanmasına yönelik işlemlerin çoğunda özüt alınması basamağı doğru bulgulara ulaşmak açısından yeterli olmaktadır. Elde edilen özütün filtreden geçirilmesi ve santrifüj edilmesini takiben türevlendirme yapılmaktadır. Biyojen aminler kolon öncesi ya da kolon sonrası türevlendirme işlemleri ile HPLC’de tespit edilebilir hale gelmektedir. Bu amaçla benzol klorür, orto-fitaldehit ya da dansil klorür kullanılmaktadır. Araştırmaların çoğunda türevlendirici olarak dansil klorür seçildiğinden (Özdekan ve Üren, 2009), bu çalışmada da türevlendirme işlemleri dansil klorür ile gerçekleştirilmiştir. Dekarboksilaz Agar besiyerinde mor renk oluşturan A-09’un oluşturduğu biyojen aminler özüt alma ve türevlendirme işlemlerinden sonra 3.2.6.2’de belirtilen yöntemle HPLC kullanılarak doğrulanmıştır. A-09, incelenen tüm biyojen aminleri oluşturma özelliğine sahip bulunmuştur. Daha sonra NO üretimi yüksek olan 2 adet LAB’nin (S2, T119), A-09 suşunun biyojen amin üretimi üzerindeki engelleyici etkisinin saptanması için gerekli işlemler gerçekleştirilmiştir. HPLC ile biyojen aminlerin belirlenmesi sonucunda elde edilen standart ve örneklere ait kromatogramlar Şekil 4.11–4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.11. Biyojen amin standartlarına ait HPLC kromatogramı (1-triptamin, 2-feniletilamin, 3-putresin, 4-kadaverin, 5-histamin, 6-tiramin)

Standartlara ait kurvelerin oluşturulmasında 0,007-3,51 ppm arasında seçilen 5 noktada 1'er enjeksiyonla ölçümler yapılmıştır. İncelenen tüm aminler belirtilen çalışma aralığında doğrusal kurveler vermiştir. Örneklerdeki biyojen amin miktarları hazırlanan kalibrasyon kurvelerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Aminlere ait korelasyon katsayıları ( $R^2$ ), kalibrasyon aralığı ve tespit sınırları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Biyojen amin kalibrasyon kurvelerine ait özellikler

Aminler	R <sup>2</sup>	Kalibrasyon sınırları (ppm)	Tespit sınırı (ppm)
Feniletilamin	0,99846	0,017-2,731	0,01
Histamin	0,99625	0,014-2,210	0,01
Kadaverin	0,99974	0,007-2,269	0,01
Putresin	0,99953	0,012-1,855	0,02
Tiramin	0,99755	0,008-2,52	0,01
Triptamin	0,99370	0,02-3,51	0,001

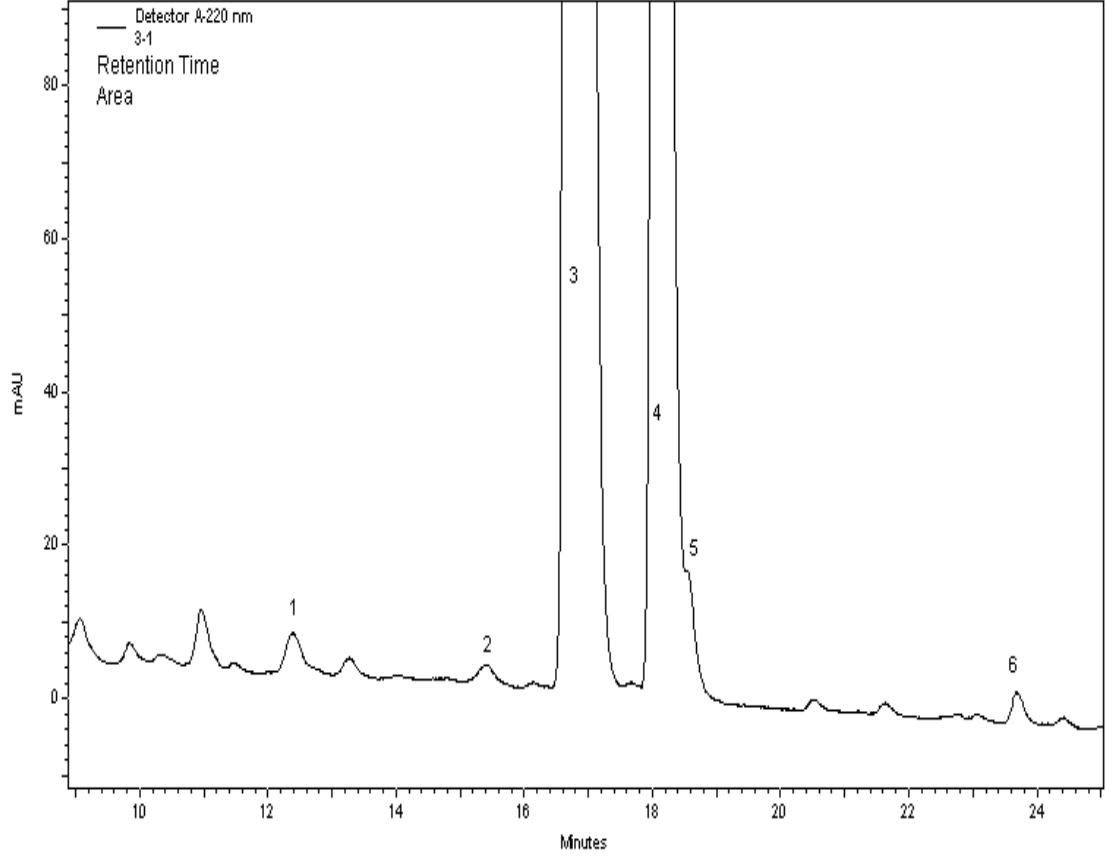
Çizelge 4.11’de görüleceği gibi tüm aminlerin (n=6) korelasyon katsayıları >0,99’dir ve 0,99370–0,99974 arasında değişmektedir. Kullanılan yöntemin tespit sınırı (detection limit) 0,001-0,02 ppm’dir. Tüm bu bulgular, kullanılan yöntemle biyojen amin tayinlerinin uygun şekilde yapıldığını göstermektedir.

Biyojen amin standartları ve örneklere ait geri kazanım zamanları (retention time) ise Çizelge 4.12’de verilmiştir.

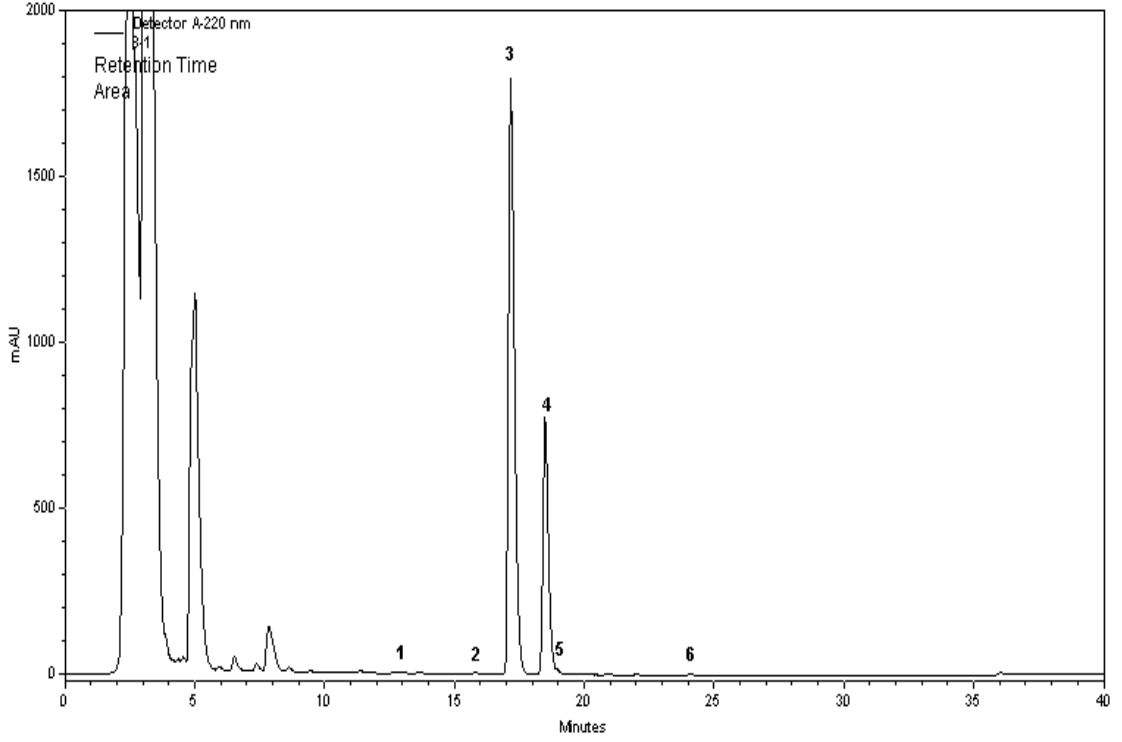
Çizelge 4.12. Biyojen amin örneklerine ait geri kazanım zamanları

Aminler	Örnek geri kazanım zamanı (dakika)
Triptamin	12,8
Feniletilamin	15,7
Putresin	17,1
Kadaverin	18,4
Histamin	18,9
Tiramin	24,0

Örnek ve standartlara ait geri kazanım zamanları arasındaki fark, örnek özütünde bulunan biyojen aminler dışındaki bileşiklerden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.12. Örnek kromatogramı (1-triptamin, 2-feniletilamin, 3-putresin, 4-kadaverin, 5-histamin, 6-tiramin)



Şekil 4.13. Örnek kromatogramı (1-triptamin, 2-feniletilamin, 3-putresin, 4-kadaverin, 5-histamin, 6-tiramin)

Nitrit miktarı, triptamin, feniletilamin, putresin, kadaverin, histamin, tiramin miktarları bakımından uygulamalar arası farklılığa ilişkin ortalama değerler ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.13’de ve bu değerler bakımından uygulamalar arası farklılığa ilişkin varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.14’de verilmiştir.

**Çizelge 4.13. Uygulamalara ait ortalama değerler ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları\* (n=3)**

Uygulama No	Uygulamalar	Nitrit (µM)	Triptamin (ppm)	Feniletilamin (ppm)	Putresin (ppm)	Kadaverin (ppm)	Histamin (ppm)	Tiramin (ppm)
1	A-09	0,28±0,03g*	0,72±0,10c	0,39±0,04b	297,90±2,78b	63,51±1,65b	1,74±0,27a	0,20±0,06a
2	A-09 + T119	18,47±0,18c	0,28±0,11d	0,29±0,04d	294,40±6,86b	1,23±0,12d	0,00±0,00c	0,09±0,00b
3	A-09 + S2	13,59±0,23e	0,24±0,03d	0,45±0,03a	393,35±4,61a	20,99±4,33c	0,38±0,04bc	0,09±0,01b
4	T119	18,38±0,20c	0,34±0,02d	0,09±0,04e	0,85±0,79c	0,05±0,06d	0,00±0,00c	0,09±0,01b
5	S2	15,38±0,36d	0,13±0,02d	0,00±0,00f	0,90±0,69c	0,08±0,03d	0,00±0,00c	0,09±0,01b
6	A-09+GSNO (100 µM)	131,66±0,13a	0,30±0,41d	0,35±0,07bc	350,76±8,23a	4,18±0,01d	0,58±0,78b	0,09±0,04b
7	A-09+GSNO (10 µM)	40,31±0,26b	0,96±0,05b	0,29±0,03d	468,00±6,17a	117,49±4,54a	1,82±0,06a	0,17±0,01a
8	A-09+GSNO (5 µM)	9,00±0,20f	1,00±0,02a	0,32±0,00cd	415,38±8,05a	112,27±5,80a	1,79±0,04a	0,17±0,00a

\*Aynı sütunda aynı harfle işaretlenen ortalama değerler, istatistik olarak birbirinden farklı değildir (p<0,01).

Çizelge 4.14. Uygulamalar arası farklılığa ilişkin varyans analiz sonuçları ( $R^2=0,998$ )

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-oranı
Nitrit	50037,904	7	7148,27	1,514E5**
Triptamin	3,318	7	0,474	19,299**
Feniletilamin	0,647	7	0,092	67,417**
Putresin	1020682,982	7	145811,855	31,113**
Kadaverin	66577,635	7	9511,091	25,214**
Histamin	20,150	7	2,879	33,251**
Tiramin	0,058	7	0,008	11,565**

\*\* p<0,01 seviyesinde önemli, \* p<0,05 seviyesinde önemli.

MRS sıvı besiyerinde oluşan nitrit miktarı bakımından uygulamalar arasındaki fark p<0,01 seviyesinde önemli bulunmuştur. Her uygulama farklı bir grup içerisinde yer almış, ancak ikinci ve dördüncü uygulama arasında nitrit değerleri bakımından istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (p<0,01). Yapılan çeşitli çalışmalarda 2-S-nitrososistein, S-nitrosoglutation, 1,1-dietil-2-hidroksi-2-nitroso-hidrazin vb. NO verici bileşikler kullanılarak, biyojen amin oluşumunda görev alan dekarboksilaz enzimleri üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır (Bauer et al., 1999). Bu çalışmada ise NO verici bileşik olarak GSNO kullanılmıştır. MRS sıvı besiyerinde oluşan nitrit miktarı bakımından en yüksek değer 131,66  $\mu\text{M}$  ile 100  $\mu\text{M}$ 'lık GSNO ilave edilmiş olan uygulamada meydana geldiği belirlenmiştir. GSNO miktarındaki azalışa bağlı olarak NO miktarları da azalmış, 10  $\mu\text{M}$ 'lık GSNO uygulamasında 40,31  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ 'lık GSNO uygulamasında ise 9,0  $\mu\text{M}$  düzeyinde nitrit oluşumu gözlenmiştir. GSNO bileşiği ilave edilmeyen uygulamalar içerisinde en yüksek nitrit oluşumu, sadece T119 suşunun inoküle edildiği besiyerinde belirlenmiştir. Buna karşın en düşük nitrit oluşumunun ise sadece A-09 suşunun inoküle edildiği besiyerinde 0,28  $\mu\text{M}$  düzeyinde olduğu gözlenmiştir.



MRS sıvı besiyerinde oluşan triptamin miktarlarının ise 0,13–1,00 ppm değerleri arasında değiştiği belirlenmiştir. Triptamin miktarları bakımından uygulamalar arasındaki fark  $p<0,01$  seviyesinde önemli bulunmuştur. En yüksek triptamin oluşumu 1,00 ppm’lik değerle sekizinci uygulamada gözlenmiş ve bu uygulama istatistiksel olarak birinci grupta yer almıştır. Triptamin oluşumu bakımından yedinci uygulama istatistiksel olarak ikinci grupta, birinci uygulama ise üçüncü grupta yer almıştır. Diğer uygulamalar arasında ise istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamaktadır ( $p<0,01$ ).

MRS sıvı besiyerinde oluşan feniletılamin miktarları ise 0,00–0,45 ppm değerleri arasında değişmektedir. En yüksek feniletılamin üretimi A–09 ve S2 suşlarının inoküle edildiği üçüncü uygulamada belirlenmiştir. Triptamine benzer şekilde feniletılamin miktarları bakımından uygulamalar arasında istatistiksel olarak  $p<0,01$  seviyesinde önemli farklılıklar olduğu ve farklı gruplar içerisinde yer aldıkları görülmüştür. Ancak 2., 7. ve 8. uygulamalar arasında önemli bir farklılık bulunmazken, S2’nin tespit edilebilir düzeyde feniletılamin oluşturmadığı belirlenmiştir. GSNO bileşiğinin 100  $\mu\text{M}$  ilave edildiği uygulamada önemli düzeyde bir azalma meydana gelmezken, daha düşük miktarlardaki uygulamalarda farklılıklar önemli ( $p<0,01$ ) bulunmuştur. Bu durum GSNO’nun feniletılamin üzerinde tartışılabilir bir etkisinin olmadığını düşündürmüştür. T119 suşunun inoküle edildiği 2. uygulamada feniletılamin miktarının önemli düzeyde düşüş meydana gelmiştir. Tüm uygulamalar bir arada değerlendirildiğinde, feniletılamin düzeylerinin son derece düşük olmasının da anlamlı sonuçlar alınmasını engellediği düşünülmüştür.

*L. plantarum* T119 ve S2’nin putresin üretimleri son derece düşük bulunmuştur. Buna karşılık A–09 ile T119 ve S2’nin bir arada geliştirildiği 2 ve 3. gruplarda ise putresin miktarında beklenen azalma gerçekleşmemiştir. Bunun aksine özellikle 3. grupta putresin miktarı A–09’a kıyasla önemli düzeyde ( $p<0,01$ ) yüksektir. Benzer eğilim GSNO’nun 3 farklı miktarı kullanılarak oluşturulan deneme gruplarında da belirlenmiştir.

A-09'un fazla miktarda ürettiği diğer biyojen amin ise kadaverindir. Kimyasal olarak putresine benzerlik gösteren bir diamin olan kadaverin, A-09 tarafından 63,51 ppm düzeyinde oluşturulmuştur. Putresinden farklı olarak, NO üreten suşlar özellikle de T119 kadaverin üretimini önemli ölçüde azaltarak, 1,23 ppm düzeyine geriletmiştir. Benzer etki 100 µM'lık GSNO uygulaması ile de elde edilmiş ve putresin miktarı 4,18 ppm olarak saptanmıştır. Ancak GSNO'nun azalan miktarları putresin düzeylerinin 100 ppm'in üzerine çıkmasına neden olmuştur.

Histamin ve tiramin düzeyleri üzerinde ise T119, S2 ve GSNO'nun benzer etkileri söz konusudur. A-09'un yüksek olmayan üretim miktarları T119 ve S2 tarafından önemli düzeyde azaltılmış ( $p < 0,01$ ), aynı etki GSNO'nun 100 µM'lık miktarı tarafından da yaratılmıştır. Ancak düşük GSNO miktarlarının histamin ve tiramin miktarları üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır ( $p > 0,01$ ).

A-09 tarafından oluşturulan histamin, tiramin ve feniletilamin miktarları tehlikeli sınırların oldukça altındadır. Biyojen aminlerin zehir etkisi yapan miktarları farklılık göstermektedir. Histaminin 8-40 mg, 40-100 mg ve 100 mg'ın üzerindeki miktarları hafiften ağıra doğru seyreden zehirlenmelere neden olmaktadır. Tiraminin 100 mg'ın üstüne çıkması ise migrene yol açmaktadır. Feniletilaminin gıdalardaki zehirli miktarı 30 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Putresin ve kadaverin ise histamin/tiraminin etkilerini güçlendiren biyojen aminlerdir ve etkili miktarları bildirilmemiştir. Biyojen aminlerin gıdalarda bulunması ile ilgili yasal sınırlamalar bulunmamakla birlikte, gıdaların kg'ında 100-800 mg tiramin, 396 mg putresin düzeylerinin üzerine çıkılmaması da tavsiye edilmektedir (Ayhan vd., 1999). Fermente gıdalarda biyojen amin oluşumuna neden olan laktobasillerin varlığı çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir. Özellikle fermente süt ürünlerinden izole edilmiş laktobasillerle ilgili bulgular dikkat çekicidir. İsviçre tipi sert peynirlerden izole edilen 2 *Lactobacillus buchneri* suşunun yüksek düzeyde (4,070 ve 3,730 nmol/ml) histamin oluşturduğu belirlenmiştir. Özellikle başlatıcı kültür olmayan ve peynirlerin florasında bulunan laktobasillerin histamin oluşumundan sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Histamin zehirlenmesi vakalarından sorumlu tutulan *Lactobacillus buchneri* en fazla çalışılan bakteri niteliğini kazanmıştır. Yine yapılan çeşitli

çalışmalarda tiramin ve histamin oluşumunu gerçekleştiren laktobasillerin varlığı bildirilmektedir (Durlu-Özkaya, 2001). Farklı gıdalardan ve başlatıcı kùltürlerden alınan 11 adet laktobasilin histamin ve tiramin oluşturma düzeylerinin incelendiği çalışmada bakterilerden sadece birinin (*Lactobacillus brevis*) 700 ppm tiramin oluşturduğu, diğer suşların ise histamin üretiminin <1 ppm ve tiramin üretimlerinin <20 ppm olduğu saptanmıştır (Maijala, 1993). Çiğ et, fermente sosis ve peynirlerden izole edilen Enterobacteriaceae ve LAB'nin biyojen amin oluşturma özelliklerinin incelendiği çalışmada ise et ve peynirlerden izole edilen enterokokların yanı sıra, fermente sosis ve peynirlerden izole edilen *Lactobacillus/Leuconostoc* suşlarının büyük çoğunluğunun da >100 mg/l tiramin oluşturduğu belirlenmiştir (Pircher et al., 2007).

Ruiz-Moyano vd., (2009) tarafından yapılan çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilmiş laktobasillerin kurutulmuş fermente sosis üretiminde kullanılabilmesi açısından güvenilirlikleri ve fonksiyonel özellikleri incelenmiştir. Laktobasil suşlarının (18 adet) biyojen aminleri <100 mg/l düzeyinde oluşturmaları nedeniyle güvenilir oldukları bildirilmiştir. Suşlardan 4'ü 5,9–10,8 mg/l triptamin meydana getirmiş, 15 suş ise 7,5–29,7 mg/l tiramin üretmiştir.

Tüm bu bulgulara rağmen, başlatıcı kùltürlerin bileşiminde yer alan laktobasillerin, bulaşmalarla fermente et ürünlerinde bulunan mikroorganizmaların biyojen amin oluşturmasını engellediği de bilinmektedir. Ayhan vd., (1999) *Lactobacillus sake*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*+*Staphylococcus xylosus* kullanılarak üretilen sucuklarda biyojen amin varlığını incelemiştir. Başlatıcı kùltür kullanılması aerobik toplam bakteri sayısını azaltmıştır. LAB'nin sayısı kontrol grubunda ve başlatıcı kùltürle üretilen sucuklarda olgunlaşma sırasında artmıştır. Toplam Enterobacteriaceae sayısı olgunlaşmanın 30. gününde vakum paketlenmiş ve başlatıcı kùltürle üretilmiş örneklerde azalmıştır. Kontrol örneklerinin tümünde putresin ve tiramin belirlenirken, başlatıcı kùltür içeren sucuklarda sadece tiramin varlığı saptanmıştır. Benzer şekilde Lu vd., (2010) tarafından yapılan çalışmada da 2 farklı başlatıcı kùltürle (*Pediococcus pentosaceus* + *Staphylococcus xylosus*, deneme A; *Lactobacillus farciminis* + *Staphylococcus saprophyticus*, deneme B) üretilen

fermente sosislerin biyojen amin içeriği, pH ve  $a_s$  değerleri incelenmiştir. Başlatıcı kültür B'nin doğal florayı etkili bir şekilde engellediği, buna bağlı olarak da histamin, putresin, kadaverin ve tiramin miktarlarının deneme A'ya kıyasla önemli lde ( $p < 0,001$ ) azaldığı belirlenmiştir.

Biyojen aminlerin  $R-CH_2-NH-R' + O_2 + H_2O \rightarrow R-CHO + H_2N-R' + H_2O_2$  denkliğine göre amin oksidazlarla parçalanarak, etkisiz hale getirildiği ileri sürülmektedir. Yüksek canlıların yanı sıra bakteriler de mono ve diamin oksidaz aktivitesine sahiptir. Fermente gıdaların üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılan mikroorganizmalar, histamin ve tiramin parçalama özelliklerinin belirlenmesi açısından incelenmiştir. Çalışmada incelenen 64 LAB'den 27'sinin histamini ve 1'nin tiramini parçaladığı belirlenmiştir. *Brevibacterium linens* ve korineform bakterilerin 32 suşundan 21'i histamin ve tiramin oksidaz aktivitesi göstermiştir. İncelenen 20 *Staphylococcus carnosus* suşunun hiçbiri histamin ya da tiramine etkili olmamıştır. *Geotrichum candidum*'un 9 suşundan sadece 1'i tiramini yavaşça paralayabilmiştir. *Micrococcus* sp.'nin 44 suşundan 17'si ise histamin ve/veya tiramine etkili bulunmuştur. Enzim sitoplazmada yer alan ve membrana bağlı olmayan yapıdadır. Parçalanma tepkimelerinin son ürünü olan *p*-hidroksifenil asetik asit HPLC ile tespit edilmiştir. Amin oksidazların aktivitesiyle meydana gelen  $H_2O_2$ 'in varlığı, doğal (native) poliakrilamid jelde gerçekleştirilen boyama işlemi ile saptanmıştır. Amin oksidazlar en yüksek aktiviteyi pH 7'de 37–40°C'de göstermiştir. NaCl, glikoz ve hidralazin enzim aktivitesinin düşmesine neden olmuştur (Leuschner et al., 1998).

Başlatıcı kültürlere ilaveten sosis bileşiminin değiştirilmesi (şeker çeşidi ve/veya miktarı) yoluyla da biyojen amin düzeylerinin kontrol altında tutulmasına çalışılmaktadır. Glikoz (1,9 g/kg) + sakkaroz (1,9 g/kg) ve glikoz (3 g/kg) + sakkaroz (2 g/kg) uygulamaları kadaverin miktarının kontrol gruplarına göre %43 ve %21 azalmasını sağlamıştır. şeker miktarının daha fazla arttırılması ise kadaverin üzerinde etkili olmamıştır. Yüksek şeker miktarları dekarboksilaz aktivitesine sahip bakterilerin gelişimini teşvik ederek, incelenen aminlerin artışına yol açmıştır. Tiramin oluşumu bu uygulamalardan etkilenmemiştir. Belirli miktarlarda şeker kullanılması LAB'nin gelişimini teşvik ederek, asitliğin hızla ve yüksek düzeyde

artmasına neden olmakta ve sosiste bulaşmalar yoluyla bulunan dekarboksilaz aktivitesine sahip bakterilerin gelişimini sınırlandırmaktadır. Başlatıcı kültür olarak *Lactobacillus sakei*'nin kullanılması tüm biyojen aminlerde %17'den %100'e değişen oranlarda azalmaya yol açmıştır (Latorre-Moratalla et al., 2010).

Fermente gıdaların üretiminde kullanılan başlatıcı kültürlerde bulunan LAB'nin biyojen aminler üzerine asitliği geliştirerek dolaylı ve amin oksidaz aktivitesi ile doğrudan etkili olduğu bildirilmektedir. Memelilerde ise biyojen aminlerin olumsuz etkilerini gidermeye yönelik farklı yöntemlerden yararlanılmaktadır. Çiftlik hayvanlarında ağırlık kaybına yol açan biyojen amin oluşumunun, düşük miktarda antibiyotik uygulamaları ile azaltılabileceği bilinmektedir. Genç domuzların yemine klortetrasiklin (40 ppm) katılarak, besleme yapılmış ve ileum içeriğinde bulunan biyojen aminler kağıt kromatografi ve kağıt elektroforez yöntemleriyle incelenmiştir. Aminlerin her 2 grupta da dekarboksilaz aktivitesine sahip *E. coli* tarafından üretildiği belirlenmiştir. Kontrol grubunda yüksek miktarda ve çeşitli biyojen aminlerin varlığı belirlenirken, klortetrasiklin içeren yemle beslenenlerde biyojen amin miktarlarının yanı sıra *E. coli* sayıları da daha düşük bulunmuştur. Az miktarda klortetrasiklin kullanılması mikrofloranın metabolik aktivitesini azaltmıştır (Larson and Hill, 1960). Tedavi edici dozun altındaki miktarlarda antibiyotik kullanımı tüketici tepkisine yol açtığından son yıllarda yem katkısı olarak probiyotiklerden yararlanılması da yaygın bir eğilim olarak kabul görmektedir (Karahana ve Çakmakçı, 1996).

Vücutta üretilen biyojen amin miktarlarının düzenlenmesi için ise farklı mekanizmalardan yararlanılmaktadır. Substratı L-arjinin olan NOS enzimi, NO oluşumunu sağlamak ve ODC aktivitesi engellenmektedir. Bu hipotezi ispatlamak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. S-nitrosistein (CysNO), S-nitrosoglutation (GSNO) ya da 1,1 dietil-2-hidroksi-2-nitrozo-hidrazin (DEA/NO) şeklindeki NO'in kullanım miktarına bağlı olarak, ODC aktivitesine etkili olduğu belirlenmiştir. CysNO (1 mM) ODC aktivitesini yaklaşık olarak %90, 3 mM GSNO ise %70'den fazla düzeyde engellemektedir. Çok daha az etkili olan DEA/NO ise 30 mM'lık miktarlarda %70 engelleyici olabilmektedir. Her 3 bileşiğin ODC üzerindeki engelleyici etkisi ortama ditiotreitol ya da glutation eklenmesiyle giderilebilmektedir.

Elde edilen bulgular, NO'in ODC üzerindeki sistein kalıntılarının S-nitrozilasyonu ile ODC aktivitesini engellediğini göstermiştir (Bauer et al., 1999). NO ve S-nitrosotioller sistein kalıntıları ile tepkimeye girerek, proteinin üzerinde S-nitrozotiollerini oluşturmaktadır. Her ODC monomeri üzerinde Cys360'ı da içeren 4 sistein kalıntısı enzim aktivitesi açısından büyük önem taşımaktadır (Bauer et al., 2001).

Bauer vd., (1999; 2001) tarafından elde edilen bu bulgular rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak doğrulanmıştır. Memeli hücrelerinde poliamin sentezi anahtar nitelikli 2 dekarboksilaz tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler ornitin ve S-adenozilmetionini substrat olarak kullanmaktadır. Rekombinant insan proteinlerinin kristalografik analizleri, yapılarının ve işlevlerinin aydınlatılmasına büyük katkı sağlamıştır. Her 2 enzim de ürün oluşumu üzerinde önemli etkileri olan sistein kalıntıları içermektedir. ODC'deki Cys360 ve S-adenozilmetionin dekarboksilazdaki Cys82 NO ile tepkimeye girerek, poliamin sentezinin durması sağlanmaktadır (Hillary and Pegg, 2003). Ancak bu çalışmada, ODC tarafından oluşturulan putresinin ne GSNO ne de NO üreticisi LAB ile azaltılması mümkün olmamıştır. Memeli ODC'ye yönelik çalışmalarda NO'in etkisinin son derece özgül şekilde Cys360 üzerine olduğu bildirilmektedir. Memeli ve mikroorganizma ODC'leri arasındaki yapısal farklılıkların bu sonuca yol açmış olabileceği düşünülmüştür. Ancak konunun aydınlatılması bundan sonra gerçekleştirilecek projelerle mümkün olabilecektir.

Putresin miktarlarında beklenen düşüşün elde edilememesine rağmen, özellikle kadaverin miktarları önemli düzeyde azaltılmıştır. GSNO'nun 100 µM'lık miktarları T119 ve S2'ye benzer etki yaparak, triptamin, kadaverin, histamin ve tiramin miktarlarının azaltılmasını sağlamıştır. Ancak GSNO miktarının azalması söz konusu biyojen amin miktarlarında artışlara neden olmuştur. GSNO (100 µM), T119 ve S2 tarafından oluşturulan NO miktarları da dikkate alındığında, biyojen aminlerdeki azalmaya NO'in yanı sıra, T119 ve S2'nin A-09 üzerinde yarattığı besin maddeleri için rekabet, mono ve diamin oksidazlar vb. diğer etkilerin de yol açmış olabileceği

düşünülmüştür. Tez kapsamı dışında kalan bu konuların da araştırılması bilime önemli katkılar sağlayabilecek potansiyele sahiptir.

Üretimi azaltılan biyojen aminler içinde özellikle kadaverinle ilgili veriler dikkat çekicidir. Kadaverin, lizinin dekarboksilasyonu ile üretilmektedir. Lizin dekarboksilazın kodlandığı gen bölgesi *cad* olarak adlandırılmakta ve bu bölgenin ürünü olan proteinler, bakterilerde koloni oluşumundan sorumlu genlerin düzenlenmesini sağlamaktadır. Kadaverinin canlılık üzerindeki en önemli etkisi ise bazı patojenik *E. coli* suşlarının stres koşullarından etkilenmesini önlemektir (Torres, 2009). Mikroorganizmaların ürettiği kadaverin miktarının NO aracılığıyla azaltılması pH, kimyasallar vb. stres etkenlerine dayanımı azaltacağından, canlılık üzerine de olumsuz etki yapacaktır. Bu nedenle NO'in kadaverin üretimi üzerinde varsayılan etkisi de yeni araştırmalara kaynak oluşturabilecek önemli bir bilgidir.

## 5. SONUÇ

NO, insan vücudunda biyolojik aktivitesi ve potansiyel klinik uygulamaları ile sonsuz sayıda işlevi kontrol eden bunun yanı sıra hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar açısından da pek çok önemli işlevleri bulunan bir bileşiktir. Bu nedenle farklı organizmalar tarafından üretilen NO'nun biyoteknolojik ve tıbbi uygulama alanlarının aydınlatılması ve geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra sağlıklı gıdalara olan talebin artması gıda sanayinde yeni keşifleri ve yeni ürün geliştirilmesini teşvik etmekte ve gıda teknolojisinde NO'dan yararlanabilme olanaklarının da bu yönde araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla;

- 1) NO oluşturma yeteneğine sahip *Lactobacillus plantarum* (S1b, T119, Z1, Z2, Z3), *Pediococcus acidilactici* (S2, S3, S1a) ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (P2, P10) türlerine ait 10 adet laktik asit bakterisi kullanılarak, NOS enzimiyle NO üretimini sağlayan genlerin belirlenmesi üzerinde durulmuştur.
- 2) Bu hedefe yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmaların ilk aşamasında LAB'nin NO üretim miktarlarına depolamanın etkisi belirlenmiştir. Uzun süre depolamanın etkisiyle tüm suşların NO üretimlerinde azalma meydana gelmiş, NO en yüksek miktarda *Pediococcus acidilactici* S2 (15,058 µM), en düşük miktarda *L. plantarum* Z3 (2,877 µM) tarafından üretilmiştir.
- 3) NO üretiminde etkili olan mekanizmanın belirlenmesi amacıyla NOS engelleme denemeleri gerçekleştirilmiştir. NOS enziminin engellenmesinde N<sup>G</sup>-methyl-L- arginine (L-NMA) kullanılmıştır. Deneme sonucunda, 500 µM'lık L-NMA bileşiğinin 5 suşun (S1b, T119, Z1, Z2, Z3) NO üretimlerini %40'ın üzerinde azalttığı belirlenmiştir. Buna ilaveten suşların NOS enzim aktiviteleri de incelenmiştir.
- 4) NOS gen bölgesinin saptanması amacıyla uygun primer çiftleri (6 adet) kullanılarak, suşlara ait genomik DNA'da PZR gerçekleştirilmiştir. PZR işlemi sonucu elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir. Ancak yapılan denemeler sonucunda genomik DNA'da NOS geni belirlenememiştir. NOS genine ait bilginin plazmit DNA'da



bulunabileceği düşüncesi ile çalışmalar, bu konu üzerinde yoğunlaştırılmıştır. NO üreticisi LAB'nin plazmit profilleri incelenmiş ve plazmit DNA'da NOS gen bölgesi aranmıştır. Ancak kullanılan primerlerle plazmit DNA'da da gen bölgesi belirlenememiştir.

- 5) NO üretiminde etkili olan mekanizma ve gen bölgesinin araştırılmasının yanı sıra NO'in biyojen amin oluşumu üzerine etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla, öncelikle çeşitli ürünlerden izole edilen LAB'nin biyojen amin oluşturma özellikleri nitel ve nicel olarak belirlenmiştir. Biyojen amin üreten LAB ile NO oluşturma yeteneğine sahip LAB, biyojen aminlerin öncülü olan amino asitleri içeren MRS sıvı besiyerinde bir arada üretilmiştir. İnkübasyondan sonra suşların biyojen amin üretimlerinde meydana gelen değişimler HPLC ile saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda NO üreticisi *Lactobacillus plantarum* T119 suşunun, A-09 suşunun oluşturduğu triptamin,  $\beta$ -fenil etilamin, kadaverin, histamin ve tiramin miktarlarında önemli düzeyde azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Ancak NO, putresin üretimi üzerinde etkili olmamıştır. NO üreticisi *Pediococcus acidilactici* S2 ise A-09'un triptamin, kadaverin, histamin ve tiramin üretimlerini azaltmıştır. Bu yönü ile tez son derece yeni bulguları taşımaktadır. Yapılan çalışmanın bir başka önemli yönü de NO üreticisi LAB'nin başlatıcı kültür olarak kullanılmasına yönelik yeni ölçütlerin belirlenmeye çalışılmasıdır. Ancak bu konudaki çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.
- 6) Başlatıcı kültür olarak kullanılabilen laktik asit bakterilerinin ürettikleri NO aracılığıyla daha kaliteli gıda üretilebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle NO üretiminde etkili olan genetik özelliklerin belirlenmesi ayrıca bakteriyel NO-gıda ve gıda-sağlık etkileşiminin farklı boyutlarının incelenmesi de önemli bir gereksinimdir. Dolayısıyla bu konuda daha çok araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Adak, S., Bilwes, A.M., Panda, K., Hosfield, D., Aulak, K.S., McDonald, J.F., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Crane B.R., Stuehr, D.J., 2002a. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(1), 107-112.
- Adak, S., Aulak, K.S., Stuehr, D.J., 2002b. Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. The Journal of Biological Chemistry, 277(18), 16167-16171.
- Adawi, D., Kasravı, F.B., Molın, G.R., Jeppsson, B., 1997. Effect of *Lactobacillus* Supplementation with and without Arginine on Liver Damage and Bacterial Translocation in an Acute Liver Injury Model in the Rat. Hepatology, 25, 642-647.
- Aktan, N., Yücel, U., Kalkan, H., 1998. Turşu Teknolojisi. Ege Üniversitesi, Ege Meslek Yüksek Okulu yayınları, 23, 138s. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir.
- Aladağ, M.A., Türköz, Y., Özerol, İ.H., 2000. Nitric oxide and its Neurophysiopathological Effects. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 20, 107-111.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric Oxide Synthases : Structure, Function and Inhibition. Biochemical Journal, 357, 593-615.
- Altuğ, T., Ova, G., Demirağ, K., Kurtcan, Ü., 2000. Gıda Kalite Kontrolü. Ege Üniversitesi, Müh. Fak. Yayınları, 29, Bornova- İzmir.
- Anlı, E.R., Vural, N., Yılmaz, S., Vural, Y.H., 2004. The determination of biogenicamines in Turkish red wines. Journal of Food Composition and Analysis. 17, 53–62.
- Anonymous, 1993. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway, New England Journal of Medicine, December 30.
- Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analyses of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature, 408, 796–815.
- Arihara, K., Kusida, H., Konda, Y., Itoh, M., Luchansky, J.B., Cassens, R.G., 1993. Conversion of metmyoglobin to bright red myoglobin derivatives by *Chromobacterium violaceum*, *Kurthia* sp., and *Lactobacillus fermentum* JCM1173. Journal of Food Sciences, 58, 38–42.

- Ayhan, K., Kolsarıcı, N., Alsancak Özkan, G. 1999. The effects of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. *Meat Science*, 53: 183–188.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R., 1983. Detection and Activity of Lactacin B, A Bacteriocin Produced by *L. acidophilus*. *Applied of Environmental Microbiology*, 45 (6), 1808-1815.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma, J.M., Lupiañez, J.A., del Rio, L.A., 1999. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 36729–36733.
- Bauer, P. M., Buga, G. M., Fukuto, J. M., Pegg, A. E., Ignarro, L. J. 2001. Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(37): 34458–34464.
- Bauer, P.M., Fukuto, J.M., Buga, G.M., Pegg, A.E., Ignarro, L.J., 1999. Nitric Oxide Inhibits Ornithine Decarboxylase by S-Nitrosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262, 355–358.
- Baydoun, A.R., Morgan, D.M.L., 1998. Inhibition of ornithine decarboxylase potentiates nitric oxide production in LPS-activated J774 cells. *British Journal of Pharmacology*, 125, 1511-1516.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 1620–1624.
- Bengmark, S., 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora. *Gut*, 42, 2-7.
- Bird, L.E., Ren, J., Zhang, J., Foxwell, N., Hawkins, A.R., Charles, I.G., Stammers, D.K., 2002. "Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*". *Structure*, 10(12), 1687-1696.
- Boşgelmez-Tınaz, G., Ulusoy, S., 2008. Characterization of N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL) deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 44, 13–19.
- Boucher, J.L., Moalia, C., Tenu, J.P., 1999. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 1015–1028.

- Bover-Cid., S., Holzapfel, W.H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 33-41.
- Bringel, F., Frrey, L., Boivin, S., Hubert, J.C., 1997. Arginine biosynthesis and regulation in *Lactobacillus plantarum*: the *carA* gene and the *argCJBDF* cluster are divergently transcribed. *The Journal of Bacteriology*, 179(8), 2697-2706.
- Buddha, M.R., Crane, B.R., 2005a. Structures of Tryptophanyl-tRNA Synthetase II from *Deinococcus radiodurans* Bound to ATP and Tryptophan. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31965–31973.
- Buddha, M.R., Keery, K.M., Crane, B.R., 2004b. "An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), 15881-15886.
- Buddha, M.R., Tao T., Parry, R.J., Crane, B.R., 2004a. Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase and tryptophanyl-tRNA synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 49567-49570.
- Buga, G. M., Wei, L. H., Bauer, P. M., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J. 1998.  $N^G$ -hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *American Journal of Physiology Regulatory and Integrative Comparative Physiology*, 275: 1256-1264.
- Buga, G.M., Wei, L.H., Bauer, P.M., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., 1999.  $N^G$ -hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms, *American Journal of Physiology*, 275, 1256- 1264.
- Burgner, D., Rockett, K., Kwiatkowski, D., 1999. Nitric Oxide and Infectious Diseases. *Archives of Disease in Childhood*, 81(2), 185.
- Casey, M.G, Jimeno, J., 1989. *Lactobacillus delbruckii* subsp lactis plasmids. *Netherland Milk and Dairy Journal*, 43, 279–286.
- Chartier, F.J.M., Couture, M., 2004. Stability of Heme Environment of the Nitric Oxide Synthase from *Staphylococcus aureus* in the absence of Pterin Cofactor. *Biophysical Journal*, 87, 1939-1950.
- Chateau, N., Castellanos, I., Deschamps, A.M., 1993. Distribution of Pathogen Inhibition in the *Lactobacillus* Isolates of A Commercial Probiotic Consortium. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 36-40.
- Chen, Y., Rosazza, J.P.N., 1994. A bacterial nitric oxide synthase from *Nocardia* species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203, 1251-1258.

- Chen, Y., Rosazza, J.P., 1995. "Purification and characterization of nitric oxide synthase (NOS<sub>Noc</sub>) from a *Nocardia* species". *Journal of Bacteriology*, 177(17), 5122-5128.
- Choi, W.S., Chang, M.S., Han, J.W., Hong, S.Y., Lee, H.W., 1997. "Identification of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus*". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3), 554-558.
- Cornforth, D., 1996. Role of Nitric Oxide in Treatment of Foods. *Nitric Oxide: Principles and Actions*. Academic Press Inc, 259-283.
- Culotta, E., Koshland, Jr. D.E., 1992. NO news is good news. *Science*, 258, 1862-1865.
- Çakmakçı, S., Çelik, İ., 1995. Gıda Katkı Maddeleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notu No: 164., Erzurum.
- Çekmen, M.B., Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, A.D., Gözükar, E.M., 2001. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *Türkiye Klinik Pediatri Dergisi*, 10, 226- 236.
- Çolak, H., Aksu, H., 2002. Gıdalarda Biyojen Aminlerin Varlığı ve Amin Oluşumunu Etkileyen Faktörler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 13, 35-40.
- Çön, A.H., Gökalp, H.Y., 1998. Türkiye Pazarlarındaki Sucukların Bazı Kimyasal ve Mikrobiyolojik Nitelikleri. *Gıda*, 23(5), 347-355.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L.M., Park, H.J., Noritake, T., Yoshioka, H., Kawakita, K., 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence. *Gene*, 179(1), 45-51.
- Dupont, A.B.L., 2006. Role of NOS-like proteins found in Bacteria. A thesis presented to the University of Waterloo, Master of Science in Chemistry, 1-111, Canada.
- Durlu Özkaya, F. 2001. Salamura Beyaz peynirlerden izole edilen bazı laktokok, enterokok ve laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkinliği ve biyogen amin oluşumu açısından karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara.
- Durner, J., Gow, A.J., Stamler, J.S., Glazebrook, J., 1999. Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), 14206-14207.

- Eıssa, N.T., Wuan, J.W., Haggerty, C.M., Choo, E.K., Palmer, C.D., Moss, J., 1998. Cloning and characterization of human inducible nitric oxide synthase splice variants: A domain, encoded by exons 8 and 9, is critical for dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 7625-7630.
- Ertugay, Z., Elgün, A., Kurt, A., Gökalp, H.Y., 1994. *Gıda Bilimi ve Teknolojisi*, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Erzurum, 189s.
- Fennema, O.R., 1985. *Food Chemistry*. 2<sup>nd</sup> edn, Marcel Dekker INC, 991s.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- Garthwaite, J., 1991. Glutamic, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends in Neurosciences*, 14, 1460–1467.
- Gökalp, H.Y., 1983. Et Ürünlerinde Nitrat, Nitrit Kullanımı ve Nitrit Zehirlenmesi. *Gıda*, 8(5), 239-243.
- Gökalp, H.Y., 1984. N- Nitroso Bileşikleri, Kanserojenik Etkileri, Çeşitli Gıdaların N- Nitrosamin İçerikleri ve Çeşitli Kaynaklardan Bünyeye Alınan N- Nitrosamin Miktarları. *Gıda*, 9(6), 317-324.
- Gökalp, H.Y., Kaya, M., Zorba, Ö., 1997. Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fak. Yayınları: 320, Ders Kitapları Serisi, 561s. Erzurum.
- Göktan, D., 1990. Gıdaların Mikrobiyal Etkisi. Et Mikrobiyolojisi, Cilt I. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fak. Yayınları No: 21, İzmir.
- Gümüşel, B., Orhan, D., Tolunay, O., Uma, S., 2001. The role of Nitric Oxide in Mediating Nonadrenergic, Noncholinergic Relaxation in Rat Pulmonary Artery. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, 5(4), 296-301.
- Hausladen, A., Stamler, J.S., 1998. Nitric oxide in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 10345–10347.
- Havenaar, R., Huis In't Veld, J.H.J., 1995. Probiotics: A General View. *The Lactic Acid Bacteria*, 1, 151- 165.
- Hillary, R.A., Pegg, A.E., 2003. Decarboxylases involved in polyamine biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1647, 161–166.
- Hochstein, L.I., Tomlinson, G.A., 1988. The enzymes associated with denitrification. *Annual Review of Microbiology*, 42, 231-261.

- Holzapfel, W. H. 2002. Appropriate starter cultures technologies for small scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 197–212.
- Hong, I.S., Kim, Y.K., Choi, W.S., Seo, D.W., Yoon, J.W., Han, J.W., Lee, H.Y., Lee, H.W., 2003. "Purification and characterization of nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus*". *FEMS Microbiology Letters*, 222, 177-182.
- Hunt, M.C., Sorheim, O., Slinde, E., 1999. Color and Heat Denaturation of Myoglobin Forms in Ground Beef. *Food Chemistry and Toxicology*. 64(5), 847-851.
- Ignarro, L.J., Bugo, G.M, Wood, K.S, Byrns, R.E, Chaudhuri, G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 9265-9269.
- James, S.L., 1995. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Reviews*, 59(4), 533–547.
- Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C., 1993. Plantaricins S and T, Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, Isolated from a Green Olive Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5), 1416-1424.
- Joshi, M., 1997. The importance of L-arginine metabolism in melanoma: an hypothesis for the role of nitric oxide and polyamines in tumor angiogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(3): 573-578.
- Kanatani, K., Oshimura, M., 1994 Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus plantarum* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 2084–2089.
- Karahan, A. G., Çakmakçı, M. L. 1996. Probiyotikler. *Gıda*, 21(4): 297-302.
- Karahan, A.G., 1986. D-Laktat dehidrogenaz enziminin *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20193'den elde edilmesi ve starter bakterilerin identifikasyonunda kullanılması. AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarım Ürünleri Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Alınmıştır. Beisenhertz, G., Boltze, H. J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G. 1953. Diphosphofruktose-aldolase, phosphoglycerinaldehiddehydrogenase, milchsäuredehydrogenase, glycerophosphat dehydrogenase und pyruvat kinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* 8b, 555–577.
- Karahan, A.G., 1992. *Streptococcus diacetylactis*'den yüksek düzeyde diasetil oluşturan mutantların eldesi ve bunların doğal suşa oranla faj duyarlılıklarının belirlenmesi. A. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Bilimi ve Teknolojisi AD. Doktora Tezi (yayınlanmamıştır), 118s.

- Karahan, A.G., 2003. Gıdalarda Biyojen Aminler. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 01(05), 21-32.
- Karahan, A.G., Çakmakçı, M.L., 1996. Probiyotikler. Gıda, 21 (4), 297-382.
- Karahan, A.G., Çakmakçı, M.L., Cicioğlu-Ardoğan, B. and Kart-Gündoğdu, A., 2005. Nitric Oxide (NO) and Lactic Acid Bacteria-Contributions to Health, Food Quality, and Safety. Food Reviews International, 21, 313–329.
- Karow, D.S., Pan, D., Tran, R., Pellicena, P., Presley, A., Mathies, R.A., Marletta, M.A., 2004. Spectroscopic characterization of the soluble guanylate cyclase-like heme domains from *Vibrio cholerae* and *Thermoanaerobacter tengcongensis*. Biochemistry, 43(31), 10203-10211.
- Kart, A., 2002. The isolation of *Lactobacillus* from milk and milk products, silage and pickle and determination of their capability of nitric oxide formation. Master Thesis, SDÜ Graduate School of Natural and Applied Sciences, Isparta.
- Kart-Gündoğdu, A., Karahan, A.G., Çakmakçı, M.L., 2005. Production of nitric oxide (NO) by lactic acid bacteria isolated from fermented products. European Food Research and Technology, 00, 1–4.
- Kempler, G.M., McKay, L.L., 1981. Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. Journal of Dairy Science, 64, 1527–1539.
- Kers, J.A., Wach, M.J., Krasnoff, S.B., Widom, J., Cameron, K.D., Bukhalid, R.A., Gibson, D.M., Crane, B.R., Loria, R., 2004. "Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase". Nature, 429(6987), 79-82.
- Klatt, P., Schmidt, K., Brunner, F., Mayers, B., 1994. Inhibitors of Brain Nitric Oxide Synthase. The Journal of Biological Chemistry, 269(3), 1674- 1680.
- Kondo, J.K., 1989. Gene Cloning and transfer in Dairy Lactococci. Journal of Dairy Science, 72, 3381-3387.
- Larson, N. L., Hill, E. G. 1960. Amine formation and metabolic activity of microorganisms in the ileum of young swine fed chlortetracycline. Journal of Bacteriology, 80(2): 188–192.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid S., Talon, R., Garriga, M., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Elias, M., Drosinos, E.H., Vidal-Carou, M.C. 2010. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. LWT - Food Science and Technology, 43: 20–25.



- Lee, J-H., O'Sullivan, D.J., 2006. Sequence Analysis of Two Cryptic Plasmids from *Bifidobacterium longum* DJO10A and Construction of a Shuttle Cloning Vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1), 527-535.
- Leitão, M. C., Teixeira, H. C., Crespo, M. T. B., San Romão, M. V. 2000. Biogenic amines occurrence in wine: amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (7): 2780–2784.
- Leshem, Y.Y., Harmaty, E.Y., 1996. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radicals in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum*. L. foliage. *Journal of Plant Physiology*, 148,258–263.
- Leuschner, R. G., Heidel, M., Hammes, W. P. 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 1–10.
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic Activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 7(1-2), 149-163.
- Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J., Piloni, G.J., 1995. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 310-316.
- Lu, S., Xu, X., Zhou, G., Zhu, Z., Meng, Y., Sun, Y. 2010. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control*, 21: 444–449.
- Magalhaes, J.R., Monte, D.C., Durzan, D., 2000. Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 6, 117–127.
- Majjala, R. L., 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 40-43.
- Mancinelli, R.L., McKay, C.P., 1983. Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 198–202.
- Marletta, M.A., 1993. Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12231-12234.
- Mayer, B., Schmid, M., Klatt, P., Schmidt, K., 1993. Reversible inactivation of endothelial nitric oxide synthase by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine. *Federation of European Biochemical Societies*, 333(1), 203-206.

- McCormick, E.L., Savage, D.C., 1983. Characterization of *Lactobacillus* sp. Strain 100-37 From The Murine Gastrointestinal Tract: Ecology, Plasmid Content and Antagonistic Activity Toward *Clostridium ramosum* H1. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(5), 1103-1112.
- McKay, L.L., 1983. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 259-274.
- McKay, L.L., Baldwin, K.A., Efstathiou, J.D., 1976. Transductional Evidence for Plasmid Linkage of Lactose Metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(1), 45- 52.
- Midha, S., Mishra, R., Aziz, M.A., Sharma, M., Mishra, A., Khandelwal, P., Bhatnagar, R., 2005. "Cloning, expression, and characterization of recombinant nitric oxide synthase-like protein from *Bacillus anthracis*". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(1), 346-356.
- Mitchell, D.A., Erwin, P.A., Michel, T., Marletta, M.A., 2005. "S-Nitrosation and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase". *Biochemistry*, 44(12), 4636-4647.
- Møller, J.K.S., Jensen, J.S., Skibsted, L.H., 2003. Microbial formation of nitrite-cured pigment, nitrosylmyoglobin, from metmyoglobin in model systems and smoked fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* strains and a commercial starter culture. *European Food Research and Technology*, 216, 463-469.
- Moncada, S., Higgs, A., Furchgott, R., 1997. XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacological Reviews*, 49(2), 137-142.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Jorganes, F., Muñoz, R. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 117– 123.
- Morita, H., Sakata, R., Nagata, Y., 1998. Nitric Oxide Complex of Iron (II) Myoglobin Converted from Metmyoglobin by *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Food Science*, 63(2), 352-355.
- Morita, H., Yoshikawa, H., Sakata, R., Nagata, Y., Tanaka, H., 1997. Synthesis of Nitric Oxide from the Two Equivalent Guanidino Nitrogens of L- Arginine by *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Bacteriology*, 179(24), 7812-7815.
- Mourad, K., 2007. Plasmid DNA studies in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations: production of and immunity to plantaricin OL15 is associated to a 9.6 Kb plasmid (pOL15). *Grasas y Aceites*, 58 (2), 136-141.

- Mungrue, I.N., Bredt, D.S., Stewart, D.J., Husain, M., 2003. REVIEW From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiologica Scandinavica*, 179, 123–135.
- Nakamura, M., Nakamura, S., 1996. Conversion of Metmyoglobin to NO myoglobin in The Presence of Nitrite and Reductans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1289, 329-335.
- Nathan, C., 1995. Natural-resistance and nitric-oxide. *Cell*, 82, 873–876.
- Nathan, C., Xie, Q.W., 1994. Nitric-oxide synthases—Roles, tolls, and controls. *Cell*, 78, 915–918.
- Ninnemann, H., Maier, J., 1996. Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry and Photobiology*, 64, 393–398.
- Noritake, T., Kawakita, K., Doke, N., 1996. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology*, 37(1), 113–116.
- Oguntoyinbo, F. A. 2007. Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of solid state fermentation of cassava during traditional gari production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 1425–1432.
- Özdestan, Ö., Üren, A. 2009. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta*, 78: 1321–1326.
- Öztan, A., Vural, H., 1991. Sosis Üretiminde Nitrosomyoglobin ve Kalıntı Nitrit Miktarını Etkileyen Faktörler. *Gıda*, 16 (2), 117-121.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived-relaxing factor. *Nature*, 327, 524–526.
- Pant, K., Bilwes, A.M., Adak, S., Stuehr, D.J., Crane, B.R., 2002. "Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*". *Biochemistry*, 41(37), 11071-11079.
- Park, S.Y., Ji, G.E., Ko, Y.T., Jung, H.K., Ustunol, Z., Pestka, J.J., 1999. Potentiation of Hydrogen Peroxide, Nitric oxide, and Cytokine Production in RAW 264.7 Macrophage Cells Exposed to Human and Commercial Isolates of *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 231-241.

- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R., Durzan, D., 2000a. A nitric oxide burst processed apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *The Journal of Experimental Botany*, 51, 1027–1036.
- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R., Durzan, D.A., 2000b. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Science*, 157, 173–180.
- Pircher, A., Bauer, F., Paulsen, P. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*, 226: 225–231.
- Roig-Sagués, A.X., Hernández-Herrero, M.M., López-Sabater E.I., Rodríguez-Jerez, J.J., Mora-Ventura, M.T., 1997. Evaluation of three decarboxylating agar media to detect histamine and tyramine-producing bacteria in ripened sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 25: 309–312.
- Ruiz-Barba, J.L, Piard, J.C, Jimenez-Diaz, R., 1991. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 417–421.
- Ruiz-Moyano, S., Martin, A., Benito, M. J., Casquete, R., Serradilla, M. J., Córdoba, M. G. 2009. Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, 83: 460–467.
- Sakihama, Y., Nakamura, S., Yamasaki, H., 2002. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant and Cell Physiology*, 43(3), 290–297.
- Sanders, M.E., 2000. Considerations for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health. *Journal of Nutrition*, 130, 384-390.
- Santolini, J., Roman, M., Stuehr, D.S., Mattioli, T.A., 2006. Resonance Raman Study of *Bacillus subtilis* NO Synthase-like Protein: Similarities and Differences with Mammalian NO Synthases. *Biochemistry*, 45, 1480-1489.
- Santos, M. H. S. 1998. Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 227–230.
- Satriano, J., Ishizuka, S., Archer, D.C., Blantz, R.C., Kelly, C.J., 1999. Regulation of intracellular polyamine biosynthesis and transport by NO and cytokines TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . *American Journal of Physiology*, 276, 892– 899.
- Schillinger, U., Lücke, F.,K., 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, 4, 199, 208.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 1901-1906.

- Schmidt, H.H., Walter, U., 1994. NO at work. *Cell*, 78(6), 919–925.
- Schmidt, K., Klatt, P., Mayer, B., 1994. Uptake of nitric oxide synthase inhibitors by macrophage RAW 264.7 cells. *Biochemical Journal*, 301, 313-316.
- Stamler, J.S., 1994. Redox signaling—Nitrosylation and related target interactions of nitric-oxide. *Cell*, 78, 931–936.
- Stamler, J.S., Toone, E.J., Lipton, S.A., Sucher, N.J., 1997. NO signals: Translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*, 18, 691–696.
- Stuehr, D., Pou, S., Rosen, G.M., 2001. Oxygen Reduction by Nitric-oxide Synthases. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14533–14536.
- Stuehr, D.J., 2004. Enzymes of the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway. *The Journal of Nutrition*, 134, 2748–2751.
- Stuehr, D.J., Santolini, J., Wang, Z.Q., Wei, C.C., Adak, S., 2004. "Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases". *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36167-70.
- Stuehr, D.J., Wei, C.C., Wang, Z., Hille, R., 2005. "Exploring the redox reactions between heme and tetrahydrobiopterin in the nitric oxide synthases". *Dalton Transactions*, 21, 3427-3435.
- Sudhamsu, J., Crane, B.R., 2006. "Structure and Reactivity of a Thermostable Prokaryotic Nitric-oxide Synthase That Forms a Long-lived Oxy-Heme Complex". *The Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9623-9632.
- Suzzi, G., Gadrini, F. 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 41–54.
- Toksoy, A., Beyatlı, Y., 1999. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Antagonistik İlişkileri Üzerine Bir Araştırma. *Gıda*, 24(4), 269-275.
- Torres, A. G. 2009. The cad locus of Enterobacteriaceae: More than just lysine decarboxylation. *Anaerobe*, 15: 1–6.
- Tulic, M.K., Wale, J.L., Holt, Sly, P.D., 2000. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors in an in vivo allergic rat model. *European Respiratory Journal*, 15, 870-877.
- van Kranenburg, R., Golic, N., Bongers, R., Leer, R.J., deVos, W.M., Siezen, R.J., Kleerebezem, M., 2005. Functional analysis of three plasmids from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1223–1230.

- Vatansever, L., 2004. Et ve et ürünlerinde Biyojenik amin ürünler. Kafkas Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 10(2), 203-208.
- Vignolo, G.M., Suriani, F., deRuiz-Holgado, A.P., Oliver, G., 1993. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. Journal of Applied Bacteriology, 75, 344-349.
- Wach, M.J., Kers, J.A., Krasnoff, S.B., Loria, R., Gibson, D.M., 2005. Nitric oxide synthase inhibitors and nitric oxide donors modulate the biosynthesis of thaxtomin A, a nitrated phytotoxin produced by *Streptomyces* spp. Nitric Oxide, 12, 46-53.
- Walkowiak-Tomczak, D., 2002. Microbiological denitrification of red beet juice. European Food Research and Technology, 215, 401-406.
- Wang, T.T., Lee, B.H., 1997. Plasmids in *Lactobacillus*. Critical Reviews in Biotechnology, 17(3), 227-272.
- Wang, Z-Q., Lawson, R.J., Buddha, M.R., Wei, C.C., Crane, B.R., Munro, A.W., Stuehr, D.J., 2007. Bacterial Flavodoxins Support Nitric Oxide Production by *Bacillus subtilis* Nitric-oxide Synthase. The Journal of Biological Chemistry, 282(4), 2196-2202.
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. "Quorum Sensing: Cell-To-Cell Communication in Bacteria". Annual Review of Cell and Developmental Biology, 21, 319-346.
- Wrage, N., Velthof, G.L., van Beusichem, M.L., Oenema, O., 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. Soil Biology and Biochemistry, 33, 1723-1732.
- Wright, A.V., Suomine, M., Sivela, N.S., 1986. Identification of lactose fermentation plasmids of streptococcal dairy starter strains by Southern hybridization. Letters in Applied Microbiology, 2, 73-76.
- Xanthopoulos, V., Hatzikamari, M., Adamidis, T., Tsakalidou, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 2000. Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* isolates from Feta cheese throughout ripening. Journal of Applied Microbiology, 88, 1056-1064.
- Xu, J., Verstraete, W., 2001. Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli. Applied Microbiology and Biotechnology, 56, 504-507.
- Ye, R.W., Thomas, S.M., 2001. Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. Current Opinion in Microbiology, 4, 307-312.
- Yeğin, S., Üren, A., 2008. Gıdalarda Biyojen Amin Olusumunu Etkileyen Faktörler. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 977-980.

- Yetişmeyen, A., imer, A., 1996. Peynir Teknolojisinde Nitrat, Nitrit ve Nitrozaminler. Süt Teknolojisi, 1(2), 58-63.
- Zemojtel, T., Wade, R.C., Dandekar, T., 2003. In search of the prototype of nitric oxide synthase. FEBS Letters, 554(1-2), 1-5.
- Zotta, T., Ricciardi, A., Parente, E., 2007. Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs. International Journal of Food Microbiology, 115, 165–172.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Arzu KART

Doğum Yeri ve Yılı: Konya/ 1976

Bedeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Konya Atatürk Kız Lisesi/ 1990-1993

Lisans: Selçuk Üniversitesi/ 1994-1998

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi/ 1999-2002

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl:

Özakupınar Süt Fabrikası/ 1998-1999

Süleyman Demirel Üniversitesi/ 1999

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)

- 1- Karahan, A. G., Çakmakçı, M. L., Cicioğlu-Arıdoğan, B., Kart-Gündoğdu, A. 2005. Nitric oxide (NO) and lactic acid bacteria-contributions to health, food quality and safety. Food Reviews International, 21 (3): 313-329.
- 2- Kart-Gündoğdu, A., Karahan, A. G., Çakmakçı, M. L., 2006. Production of nitric oxide (NO) by lactic acid bacteria isolated from fermented products. European Food Research and Technology, 223: 35-38.
- 3- Kart Gündoğdu, A., Karahan, A. G. 2008. Nutrigenomik teknolojileri. Gıda, 33(4): 183-191.
- 4- Karahan, A. G., Başyigit Kılıç, G., Kart, A., Sanlıdere Aloğlu, H., Öner, Z., Aydemir, S., Erkus, O., Harsa, Ş. 2010 Genotypic Identification of Some Lactic Acid Bacteria by AFLP and Investigation of Their Usage Possibility as Starter Culture Combinations on Beyaz Cheese Manufacture. Journal of Dairy Science, 93: 1-11.