

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LACTOCOCCUS LACTIS' TEN İZOLE EDİLEN NİSİNİN  
FARKLI LİPOMOZAL FORMÜLASYONLARININ  
ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Selda ÖZGEN ÖZGACAR**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Seyyal ROTA

ANKARA  
Mayıs 2013

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 29/05/2013

İmza  
Ünvanı Adı ve Soyadı  
GAZİ Üniversitesi  
Jüri Başkanı  
Prof. Dr. Meltem YALINAY GİRİZ

İmza  
Ünvanı Adı ve Soyadı  
GAZİ Üniversitesi  
Prof. Dr. Seyyal ROTA

İmza  
Ünvanı Adı ve Soyadı  
ANKARA Üniversitesi  
Prof. Dr. Mustafa AKKELİK

İmza  
Ünvanı Adı ve Soyadı  
GAZİ Üniversitesi  
Prof. Dr. Nedim SULTAN

İmza  
Ünvanı Adı ve Soyadı  
GAZİ Üniversitesi  
Doç. Dr. Betül ÖZKELİK

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay .....	i
İçindekiler .....	ii
Resimler .....	v
Şekiller.....	vii
Grafikler .....	viii
Tablolar.....	ix
Semboller, Kısaltmalar.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1.Lactococcus Cinsinin Genel Özellikleri .....	3
2.2. Bakteriyosinler .....	5
2.2.1. Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinler.....	6
2.2.1.1. Nisinin Genel Özellikleri .....	10
2.2.1.1.1. Nisinin Antimikrobiyal Etki Mekanizması.....	15
2.2.1.1.2 Nisin Biyosentezi ve Nisin Genleri .....	16
2.2.1.1.3. Nisin Üretimini Etkileyen Faktörler .....	22
2.2.1.1.3.1.Karbon Kaynağının Etkisi:.....	22
2.2.1.1.3.2. Azot Kaynağının Etkisi: .....	23
2.2.1.1.3.3.İnorganik Bileşiklerin Etkisi: .....	24
2.2.1.1.3.4. pH' nın Etkisi: .....	24
2.2.1.1.3.5. Nisin Miktarının Etkisi:.....	24
2.2.1.1.4. Nisinin Kullanım Alanları .....	25

2.3. Saflaştırma Yöntemleri .....	27
2.3.1. Kromatografi Yöntemleri .....	28
2.3.2.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	30
2.3.2.1.1. İyon Değiştirme Kromatografisi (IC).....	33
2.4. Lipozomlar .....	33
2.4.1. Lipozomların Avantajları .....	36
2.4.2. Lipozom – Hücre Etkileşimleri.....	37
2.4.3. Lipozomların Sınıflandırılması .....	37
2.4.4. Lipozom Hazırlama Yöntemleri.....	40
2.4.5. Lipozomların Teşhis ve Tedavide Kullanılışı.....	41
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>44</b>
3.1. Mikroorganizmalar .....	44
3.2. Mikroorganizmaların Üretiminde Kullanılan Besiyerleri.....	44
3.3. Çalışma Kullanılan Araç, Gereç ve Malzemeler.....	46
3.4. Yöntem .....	48
3.4.1. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 16 S rDNA Yöntemi ile Tanısı .....	48
3.4.2. Plazmid İçeriklerinin Tanımlanması .....	51
3.4.3. Protein İçeriklerinin Tanısı .....	57
3.4.4. Nisin Üretimi ve Saflaştırılması .....	61
3.4.4.1. Nisinin Üretimi.....	61
3.4.4.2. Nisinin Saflaştırılması .....	62
3.4.4.3. Nisinin Trisin SDS-PAGE ile Tanısı .....	65
3.4.5. Nisinin Lipozomal Formülasyonları.....	69
3.4.5.1. Nisinin Lipozomal Formülasyonlarının Hazırlanması .....	69

3.4.5.2. Lipozomal Nisin Formülasyonlarının Karakterizasyonu .....	70
3.4.5.2.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı.....	70
3.4.5.2.2. Lipozomların Zeta Potansiyelleri.....	71
3.4.5.2.3. Lipozomların Şekli .....	72
3.4.6. Lipozomal Nisinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması .....	72
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>79</b>
4.1. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 16 S rDNA Yöntemi ile Tanısı .....	79
4.2. Plazmid İçeriklerinin Tanımlanması .....	81
4.3. Protein İçeriklerinin Tanısı .....	82
4.4. Nisin Üretimi ve Saflaştırılması .....	84
4.5. Nisinin Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması.....	88
4.5.1. Lipozomların Karakterizasyonu.....	88
4.5.2. Lipozomların Şekli .....	99
4.6. Lipozomal Nisinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması .....	100
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>123</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>131</b>
<b>7. ÖZET .....</b>	<b>132</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>133</b>
<b>9. KAYNAKLAR .....</b>	<b>134</b>
<b>10. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>153</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>154</b>

## Resimler Dizini

Resim 1:	Laktokok cinsinin mikroskop görüntüsü.....	4
Resim 2a:	LL27 Suşunun İnkübasyonun Yapıldığı Fermentör.....	61
Resim 2b:	Üst Fazın Sterilizasyonu.....	61
Resim 3:	Capto S Kolonunda Uygulanan Kromatografi Protokolü..	63
Resim 4:	Fraksiyon Toplama İşlemi.....	64
Resim 5:	C18 Kolonunda Uygulanan Kromatografi Protokolü.....	65
Resim 6:	Çeşitli süre sonlarında gözlenen voltaj değerleri.....	66
Resim 7:	Fenol Kırmızılı Sıvı Besiyeri.....	74
Resim 8:	Fenol kırmızılı sıvı besiyerinin 24 kuyucuklu mikroplakadaki renk değişimi.....	76
Resim 9:	Resazurin içeren sıvı besiyerinin 24 kuyucuklu mikroplakadaki renk değişimi.....	77
Resim 10:	16S rDNA bölgesinin agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi.....	79
Resim 11:	<i>Lactococcus lactis</i> türüne ait suşların plazmid profilleri..	82
Resim 12:	<i>Lactococcus lactis</i> suşlarının hücre duvarı protein profilleri.....	83
Resim 13:	cLEX Kromatografide Oluşan Pik Değerleri.....	84
Resim 14:	Antimikrobiyal aktivite gösteren fraksiyonlar.....	85
Resim 15:	C18 Kolondan Elde Edilen Pik Değerleri.....	86
Resim 16:	C18 fraksiyonlarının oluşturduğu inhibisyon zon çapları	87
Resim 17:	Saflaştırılan nisinin Trisin SDS-PAGE ile gösterilmesi...	88
Resim 18:	Formülasyon 1' in partikül büyüklüğü.....	89
Resim 19:	Formülasyon 2' nin partikül büyüklüğü.....	90
Resim 20:	Formülasyon 3' ün partikül büyüklüğü.....	90
Resim 21:	Formülasyon 4' ün partikül büyüklüğü.....	91
Resim 22:	Formülasyon 5' in partikül büyüklüğü.....	91

Resim 23:	Formülasyon 6' nın partikül büyüklüğü.....	92
Resim 24:	Formülasyon 7' nin partikül büyüklüğü.....	92
Resim 25:	Formülasyon 8' in partikül büyüklüğü.....	93
Resim 26:	Boş lipozom formülasyonunun partikül büyüklüğü.....	93
Resim 27:	Formülasyon 1' in zeta potansiyeli.....	94
Resim 28:	Formülasyon 2' nin zeta potansiyeli.....	95
Resim 29:	Formülasyon 3' ün zeta potansiyeli.....	95
Resim 30:	Formülasyon 4' ün zeta potansiyeli.....	96
Resim 31:	Formülasyon 5' in zeta potansiyeli.....	96
Resim 32:	Formülasyon 6' nın zeta potansiyeli.....	97
Resim 33:	Formülasyon 7' nin zeta potansiyeli.....	97
Resim 34:	Formülasyon 8' in zeta potansiyeli.....	98
Resim 35:	Boş lipozom formülasyonunun zeta potansiyeli.....	98
Resim 36:	Boş lipozomun elektron mikroskobu görüntüsü.....	99
Resim 37:	Nisin içeren lipozomun elektron mikroskobu görüntüsü.	99

## Şekiller Dizini

Şekil 1:	Lantibiyotiklere özgü amino asit yapıları.....	7
Şekil 2:	Nisin molekül yapısı.....	12
Şekil 3:	Nisin A, Z, Q ve U'nun yapısı.....	13
Şekil 4:	Nisinin por oluşumu için önerilen lipit II modeli.....	15
Şekil 5:	Öncü peptit olgunlaşması.....	17
Şekil 6:	Nisin genlerinin organizasyonu.....	18
Şekil 7:	Translasyon Sonrası Modifikasyon.....	19
Şekil 8:	Nisin Biyosentezi.....	21
Şekil 9:	Kolon kromatografi ile bileşenlerin ayrılma prensibi.....	29
Şekil 10:	Kromatografide sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin gözenekleri ve büyüklükleri.....	30
Şekil 11:	Bazı fosfolipitlerin kimyasal yapılarının şematik gösterimi....	35
Şekil 12:	Konvansiyonel çok tabakalı lipozomun şematik görüntüsü...	36
Şekil 13:	MLV'nin şematik görünüşü.....	40
Şekil 14:	Moleküler büyüklükleri bilinen ccc DNA marker' larının elektroforetik hareketlilikleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişki.....	57
Şekil 15:	16S rDNA primerleri ile <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 'in çoğaltılan gen bölgesi.....	80



## Grafikler Dizini

Grafik 1:	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213' ün korelasyon grafiği.....	102
Grafik 2:	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212' in korelasyon grafiği.....	104
Grafik 3:	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922' nin korelasyon grafiği.....	106
Grafik 4:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853' ün korelasyon grafiği.....	108
Grafik 5:	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231' in korelasyon grafiği.....	110
Grafik 6:	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 için rengin değiğtiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.....	114
Grafik 7:	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 için rengin değiğtiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.....	116
Grafik 8:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 için rengin değiğtiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.....	118
Grafik 9:	<i>E.coli</i> ATCC 25922 için rengin değiğtiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.....	120
Grafik10:	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 için rengin değiğtiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.....	122

## Tablolar Dizini

Tablo 1 :	<i>L.lactis</i> suşlarının ürettiği bakteriyosinler.....	6
Tablo 2 :	Bakteriyosinlerin sınıflandırılması.....	9
Tablo 3:	Kolon kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.....	32
Tablo 4:	Lipozom hazırlanmasında kullanılan fosfolipitler.....	34
Tablo 5:	Lipozomların yapısal özelliklerine göre sınıflandırılması...	38
Tablo 6:	Lipozomların büyüklük ve tabaka içeriğine göre sınıflandırılması.....	39
Tablo 7:	Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı..	50
Tablo 8:	PZR Koşulları.....	51
Tablo 9:	Lipozom formülasyonları.....	70
Tablo 10:	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşlarının plazmid içerikleri.....	81
Tablo 11:	<i>L. lactis</i> suşlarının hücre duvarı protein içerikleri.....	83
Tablo 12:	cIEX Fraksiyonlarının İnhibisyon Zon Çapları.....	85
Tablo 13:	C18 Fraksiyonlarının İnhibisyon Zon Çapları.....	87
Tablo 14:	Lipozom formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları.....	89
Tablo 15:	Lipozom formülasyonlarının zeta potansiyelleri.....	94
Tablo 16:	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 için zaman-koloni tablosu.....	101
Tablo 17:	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 için zaman-koloni tablosu.....	103
Tablo 18:	<i>E.coli</i> ATCC 25922 için zaman-koloni tablosu.....	105
Tablo 19:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> için zaman-koloni tablosu.....	107
Tablo 20:	<i>Candida albicans</i> için zaman-koloni tablosu.....	109
Tablo 21:	Lipozomal nisinin in-vitro aktivite değerleri.....	111

Tablo 22: Tüm mikroorganizmalar için saptanan denklemler ve doğrusal katsayılar.....	112
Tablo 23: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri.....	113
Tablo 24: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri.....	115
Tablo 25: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri.....	117
Tablo 26: <i>E.coli</i> ATCC 25922 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri.....	119
Tablo 27: <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri.....	121

## SEMBOLLER, KISALTMALAR

cfu/mL	Mililitredeki Koloni Olusturma Birimi
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
g	gram
kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
<i>L</i>	<i>Lactococcus</i>
log	Logaritma
M	Molar
Mb	Megabaz
mg	Miligram
mL	Mililitre
N	Normal
nm	Nanometre
OD	Optik Density:Optik Yogunluk
rDNA	Ribozomal DNA
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikada Devir Sayısı

sn	Saniye
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/Hacim
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe

## 1. GİRİŞ

Enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların kontrolü ve tedavisi insan sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır. Mikroorganizmalara karşı yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere ise hızla direnç mekanizmaları gelişmekte, dolayısıyla uygulanan tedavinin etkinliği düşmektedir. Bunun sonucunda antimikrobiyal özellikteki yeni maddeler ile yapılan çalışmalar artmıştır. Antimikrobiyal peptitler de bu konuda dikkat çeken bir gruptur ve hızla önem kazanmışlardır. Bakteriyosinler; doğal, antimikrobiyal etkiye sahip ve insan sağlığı için zararsız biyomoleküllerdir. Taşıdıkları önemden dolayı her geçen gün yeni bakteriyosinler izole edilerek moleküler olarak tanımlanmaktadır.

*Lactococcus* cinsi üyelerinden *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* laktik asit bakterilerinden olup fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu bakteriler; fermentasyon süreçlerinde ürünün yapısal ve aromatik gelişiminin sağlanmasının yanında, kontamine mikroorganizmaların inhibisyonunda da etkin rol almaktadır.

Bakteriyosinler içerisinde, *L. lactis* subsp. *lactis* suşları tarafından üretilen nisin oldukça geniş bir etki spektrumuna sahiptir ve ticari olarak da kullanım olanağı bulmuştur. FDA (Food and Drug Administration) tarafından GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir ajan) metabolitler kapsamına alınmış olan nisin preparatları (E234), dünya genelinde gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, "klasik" antibiyotiklere karşı yaygın bakteri direnç gelişiminden dolayı,

nisinin klinik uygulamalardaki potansiyeli üzerine çalışmalar başlatılmış ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılabilirliği tanımlanmıştır.

Lipozomlar ise, hücre membranı ile uyumlu, çift tabaka veya çok sayıda tabakadan oluşabilen lipid taşıyıcılardır. Koloidal taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar, yaklaşık 0,02- 3,5 m çapında küresel veziküllerdir. Nisinin lipozomal formülasyonları ile stabilitesinin, ve antimikrobiyal aktivitesinin artması beklenmektedir.

*L. lactis* subsp. *lactis* LL 27 suşu, Türkiye kökenli ve nisin üretim yeteneği tanımlanmış olan önemli bir izolattır. Bu tez çalışması kapsamında *L. lactis* subsp. *lactis* LL 27 suşunun genetik doğası, nisin üretimi ve elde edilen nisinin lipozomal formülasyonlarının çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite potansiyelinin tanımlanması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Lactococcus* Cinsinin Genel Özellikleri

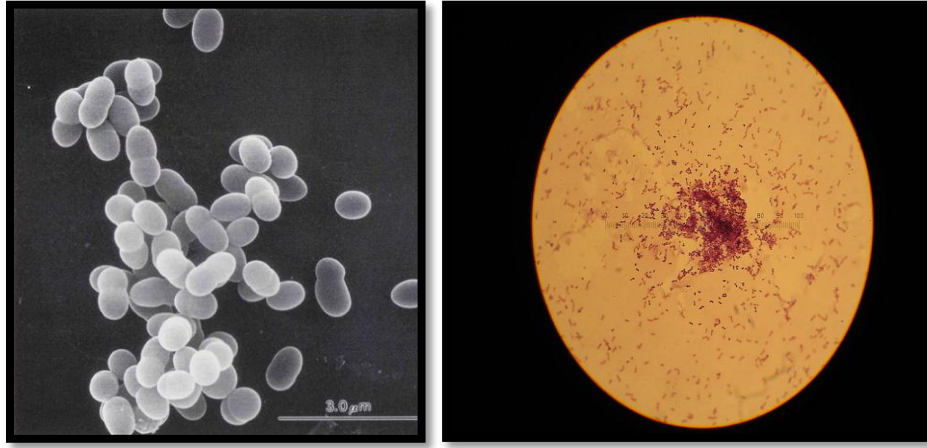
Laktokoklar (*Lactococcus* sp.); Laktik asit bakterileri grubunda yer alan, Gram-pozitif, spor oluşturmayan, katalaz negatif, fakültatif anaerob, kok şeklinde 0.5-1.2 x 0.5-1.5 µm boyutlarında oval şekilli bakteriler olarak tanımlanmışlardır (Resim 1) <sup>1,2</sup>.

*Lactococcus* cinsi, nükleik asit hibridizasyonu, immunolojik analiz, fizyolojik testler, lipoteikoik asit yapısı ve yağ asidi profilleri göz önünde bulundurularak tanımlanmıştır. *Streptococcus* cinsinden ayrılan *Streptococcus garviae*, *S. plantarum* ve *S. raffinolactis* ve *Lactobacillus* cinslerinden ayrılan *L. xylosus*, *L. hordinae*, *Lactococcus* cinsine geçiş yapmıştır. Lancelfield serolojik grup N üyesi olan laktokok cinsi içerisinde *L. lactis*, *L. piscium*, *L. gavriae*, *L. raffinolactis* ve *L. plantarum* olmak üzere beş farklı tür bulunmuş ancak Cho ve arkadaşları, çamur örneklerinden elde ettikleri *Lactococcus chungangensis* isimli yeni bir tür bildirmişlerdir. Bunun sonrasında ise lahanadan izole edilen *L. fujiensis* ile laktokok cinsi tür sayısı 7' ye ulaşmıştır. *L. lactis* türü ise *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae* ve son yıllarda bulunan *L. lactis* subsp. *tructae* türleri olmak üzere toplam 4 alt tür barındırmaktadır. <sup>3, 4, 5, 6, 7</sup>.

Laktokokların sıvı besiyerinde tek, çift ve kısa zincirler halinde üremeleri streptokok ve enterokoklarla benzerlik göstermektedir. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C' dir. 10 °C' nin altında ve 45 °C' nin üzerinde, % 6.5 NaCl varlığında ve ortam pH' sının 4.4 ve 9.6 olması durumunda gelişme göstermemektedirler. Zayıf α-



hemoliz yapan laktokok türlerinin birbirinden ayırımında ise 40 °C üzerinde ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (>% 4 sodyum klorür) gelişebilme ve farklı şekerlerden (laktoz, mannitol ve rafinoz) asit oluşturma özelliklerinden faydalanılmaktadır <sup>2, 4, 8</sup>.



Resim 1: Laktokok cinsinin mikroskop görüntüleri <sup>9</sup>.

*L. lactis* türü üyeleri; FDA (Food and Drug Administration) tarafından insan ve hayvan sağlığı açısından tüketilmeleri güvenilir mikroorganizmalar olarak (GRAS- Generally recognized as safe) kabul edilmektedir <sup>4</sup>.

Laktokokların ürettiği bakteriyosinler içerisinde yalnız nisinin gen kodu kromozomal DNA üzerinde tespit edilmiştir. Moleküler genetik analizi yapılan diğer *L. lactis* bakteriyosinlerinin tümü (Tablo 1), suşlara ve spesifiye ettikleri bakteriyosinlere göre farklılık gösteren değişik plazmidler tarafından kodlanmaktadır <sup>10</sup>.

## 2.2. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler, çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, protein yapısında, diğer bakteri türleri üzerinde bakteriyosidal ya da bakteriyostatik etkiye sahip bileşiklerdir. Bu bileşikler, gıda bozulması ve gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimini engelleme özelliklerinden dolayı, gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Diğer yandan, bakteriyosinler, insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde gösterdikleri potansiyel ile antibiyotiklerin alternatifi olarak öne çıkmaktadır <sup>11, 12, 13, 14, 15</sup>.

Antibiyotik olarak da adlandırılabilen bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenmeleri, birincil metabolit olmaları, etki mekanizmalarının antibiyotiklerden farklı olması ve dar etki spektrumuna sahip olmaları gibi farklılıklarından dolayı antibiyotiklerden ayrılmaktadırlar <sup>13</sup>.

Gram negatif bakterilerin ürettiği bakteriyosinler genellikle 20 kDa' dan büyük ve çok yakın akraba türlerin üremesini engelleyen bakteriyosinlerdir. Ancak *Enterobacteriaceae* türleri tarafından üretilen kolisin V ve mikrosinler 10 kDa' dan küçük heterojen peptidler olmaları bakımından diğer bakteriyosinlerden farklılık göstermektedirler <sup>14, 16</sup>.

Gram negatif bakterilerin aksine Gram pozitif bakteriler 6 kDa' dan daha küçük bakteriyosin üretmektedirler. Bu bakteriyosinlere karşı duyarlı suşlar üzerinde daha özgül etkinlik göstermektedirler <sup>16</sup>.

### 2.2.1. Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinler

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, antimikrobiyal peptitler ve proteinlerin geniş ve heterojen bir grubunu oluşturur.

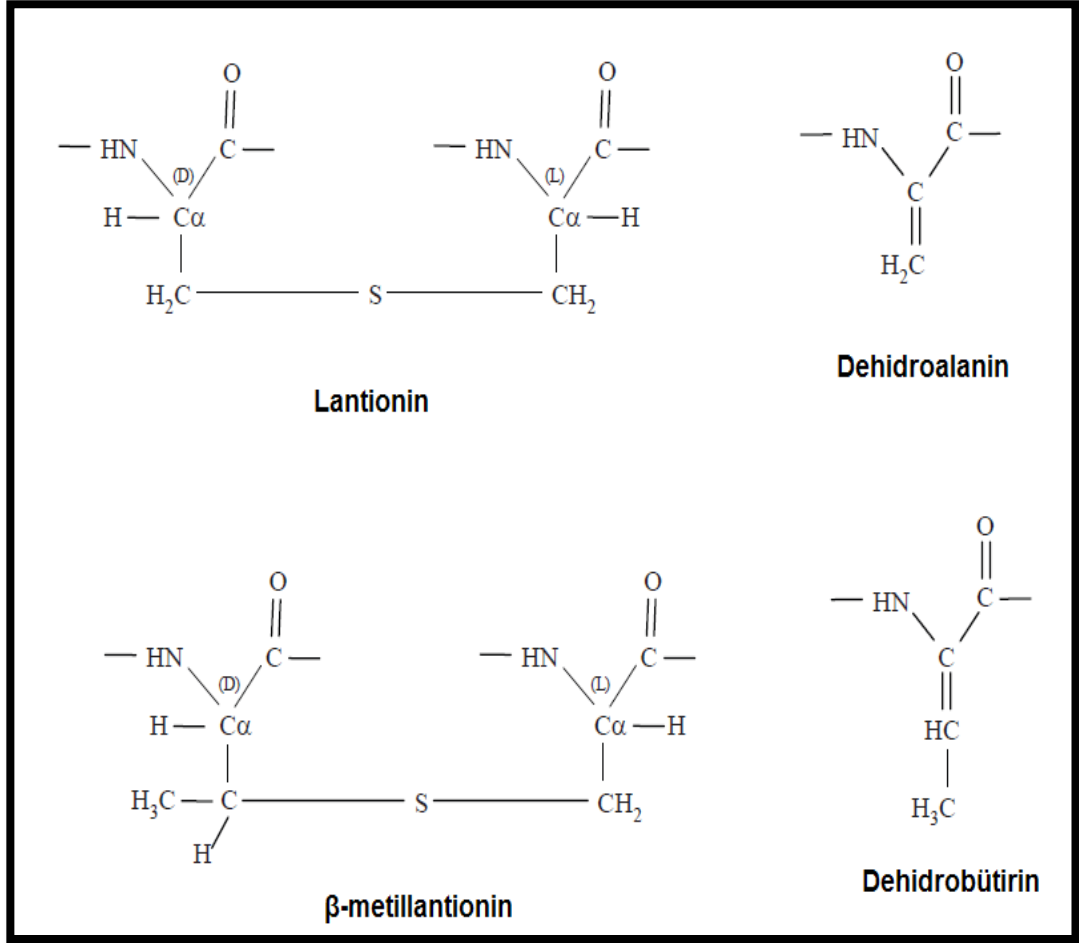
Tablo 1: *Lactococcus lactis* Suşlarının Ürettiği Bakteriyosinler

Bakteriyosinler	
Diplokoksin	
Laktoztrepsinler	las 1, las 2, las 3, las 4 ve las 5
Lantibiyotikler	nisin, laktisin 481 ve laktisin 3147
Laktokoksinler	laktokoksin a, b, mn, g, 972 ve mmfıı

LAB bakteriyosinlerinin sınıflandırılması çeşitli kaynaklara göre farklılık göstermekle birlikte, amino asit sekansına, etki mekanizmasına, ısı toleransına ve biyolojik aktivitesine göre 4 sınıfa ayırmak mümkündür (Tablo 2) <sup>17</sup>.

Lantibiyotikler olarak adlandırılan I. grup bakteriyosinler; lantionin,  $\beta$ -metillantionin, dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi translasyon sonrası modifikasyonlar ile oluşturulan amino asitleri içermektedir (Şekil 1). Lantibiyotikler yapısal özellikleri ve antimikrobiyal aktiviteleri göz önüne alındığında A ve B olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Tip A lantibiyotikler hedef hücrenin sitoplazmik zarını depolarize ederek etkilerini gösterirler. Ortalama büyüklükleri 21-38 amino asittir. Bu grubun en bilinen üyesi nisindir. Tip B lantibiyotikler, Tip A lantibiyotiklere göre oldukça küçüktür. Büyüklükleri 19 amino asiti

aşmamaktadır. Tip B lantibiyotikler konakçı hücre enzimlerini inhibe ederler<sup>11,15,18</sup>.



Şekil 1: Lantibiyotiklere özgü amino asit yapıları.

II. grup bakteriyosinler, 5–30 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip, modifiye olmamış ısı-stabil peptitlerdir. Lantiyonin içermemektedirler. Sitoplazmik membranda por oluşturarak etki göstermektedirler. IIa, IIb ve IIc olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. IIa YGNGV-C korunmuş N-terminal sekansına sahip olması, diğer gruplardan farklılık göstermektedir. Bu grupta pediosin PA-1(AcH), lökosin A, sakasin A, sakasin P ve enterosin A yer almaktadır. Grup IIb bakteriyosinler ise iki farklı protein ile birlikte hedef hücre zarında por oluşturarak etkisini göstermektedirler. Laktisin F ve laktokoksin G bu grupta yer alan bakteriyosinlerdendir. IIc bakteriyosinleri II. grup bakteriyosinler ve üretici organizmalar yüksek anti-listeriyal aktivite göstermelerinden dolayı oldukça önemli bir gruptur <sup>11, 19, 20</sup>.

III. grup bakteriyosinler ise, moleküler ağırlığı 30 kDa yukarısında ve ısı duyarlılık özelliğine sahip helvetisin J ve enterolizin A gibi peptitler olarak karakterize edilmektedir <sup>16, 21, 22</sup>.

IV. grup bakteriyosinler içerisinde yer alan glikoprotein veya lipoproteinler aktivite göstermeleri için protein yapısında olmayan yapılara ihtiyaç duyan biyomoleküllerdir. Laktosin 27, lakstrepsin, lökosin, mesenterosin bu grupta yer almaktadır <sup>14, 23</sup>.

Tablo 2: Bakteriyosinlerin sınıflandırılması <sup>23</sup>

I.	Grup Bakteriyosinler	Lantibiyotikler <b>Ia:</b> Nisin benzeri lantibiyotikler. Katyonik özellik içerirler. <b>Ib:</b> Globüler proteinler olup düşük negatif yük içerirler. Duramisin, Marsasidin, Alametisin
II.	Grup Bakteriyosinler	Lantibiyotik olmayan küçük ısı dirençli peptitler <b>Ila:</b> Antilisteriyal etkili pediosin benzeri peptitler <b>Ilb:</b> İki peptit içeren bakteriyosinler. Lactasin. <b>Ilc:</b> Salgılanan bakteriyosinler. Carnobakteriyosin
III.	Grup Bakteriyosinler	Büyük, ısıya hassas proteinler Helvetisin J ve enterolizin A
IV.	Grup Bakteriyosinler	Glikoprotein veya lipoproteinler aktivite gösterir  Laktosin 27, lakstrepsinler, Lökosin, Mesenterosin

Bakteriyosinler, genellikle sitoplazma membranında por oluşumuna yol açarak ya da hücre duvarı biyosentezini bozarak hedef hücre ölümüne neden olmaktadır. Üretici organizmalar, dirençlilik proteinleri aracılığı ile kendi bakteriyosinlerinin etkisinden korunmaktadır. Bakteriyosinler; gıdaların korunmasının yanında, gıda kalitesinin ve tüketici kabulünün artırılmasına yönelik endüstriyel uygulamalarda da kullanılmaktadır. Endüstriyel kullanım açısından bugüne kadar en geniş uygulama alanı bulan bakteriyosin, lantibiyotik grubu üyesi olan nisindir <sup>16, 24</sup>.

#### **2.2.1.1. Nisinin Genel Özellikleri**

Nisin laktik asit bakterilerinden *L. lactis* tarafından üretilen ve lantibiyotik olarak adlandırılan I. sınıf bakteriyosinler grubunda yer alan bir bileşiktir. Nisin, ilk olarak Rogers tarafından 1928 yılında çiğ süttten elde edilmiş ve 1944 yılında ise nisin ismi kullanılmaya başlanmıştır. 1950'li yıllarda ticari olarak üretimine başlanan nisin, ilk kez İngiltere' de gıda katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmış ve 1983 yılında E234 kod numarasıyla gıda katkı maddeleri listesine alınmıştır. İnsanlar da dahil olmak üzere hiçbir memeli için toksik etkisi bulunmamakla birlikte 1988 yılında FDA tarafından 'genel olarak güvenli kabul edilebilir ürün- GRAS' statüsüne girmiştir. Aynı zamanda Dünya Sağlık Örgütünün de gıda katkı maddesi olarak onay verdiği tek bakteriyosindir <sup>18, 25, 26, 27</sup>.

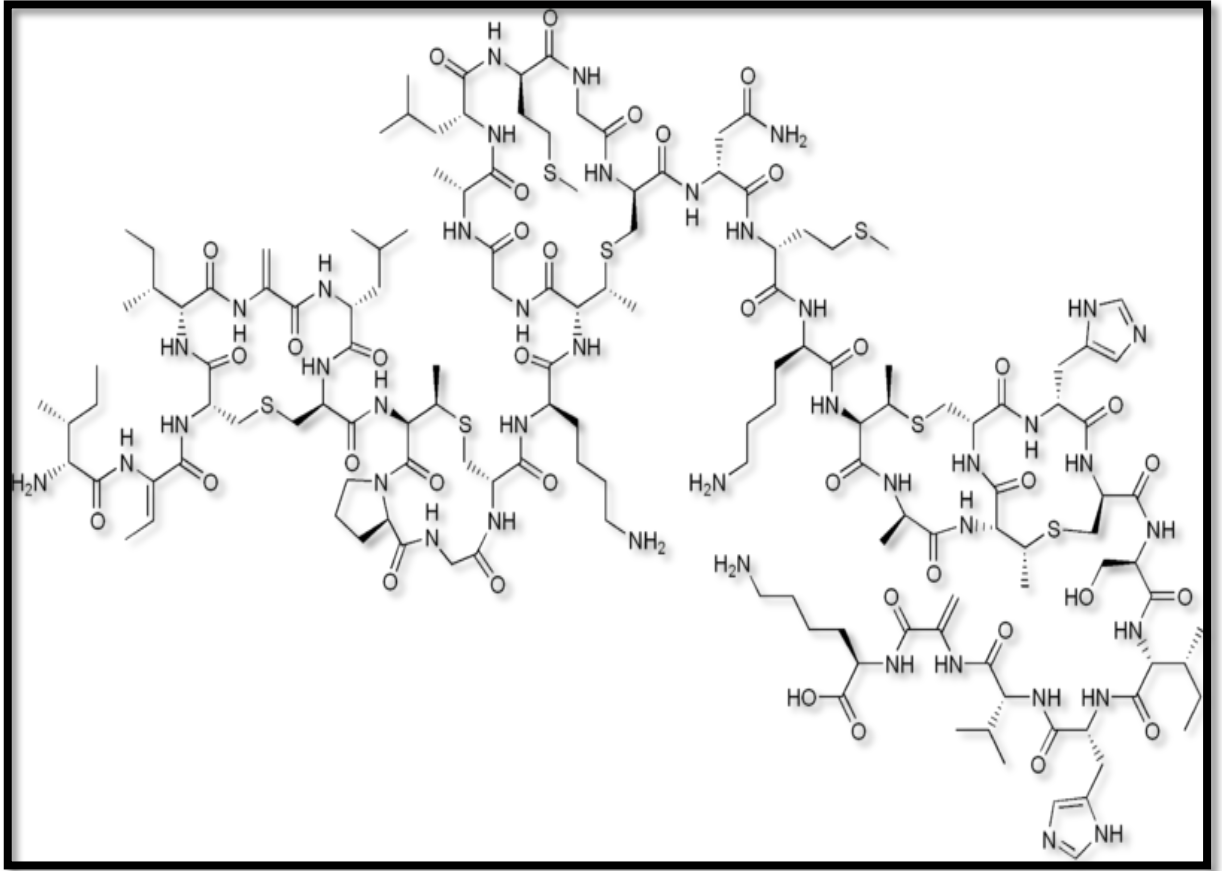
Nisin ismi, streptokoklar için düzenlenmiş olan "*Lancefield*" serotipleme şemasına dayanılarak saptanmıştır. Nisin bir çeşit Grup N inhibitör maddesi olarak tanımlanabilir (Grup N Inhibitory Substance).

Aldığı son ek “-in” ise antibiyotikler için kullanılan genel bir ektir ve nisin adı bu şekilde türetilmiştir<sup>28, 29</sup>.

Yapılan toksisite çalışmaları sonucunda nisinin güvenilirliğini kanıtlanmış ve günlük alınabilecek doz miktarı FDA tarafından 2.9 mg olarak belirtilmiştir. Antimikrobiyal etkiye sahip olması, insan sağlığına toksik etki göstermemesi, kuru formda yıllarca özelliğini kaybetmeden stabil olarak kalması nisinin endüstriyel potansiyelinin yüksek düzeyde kalmasını sağlamaktadır<sup>30</sup>.

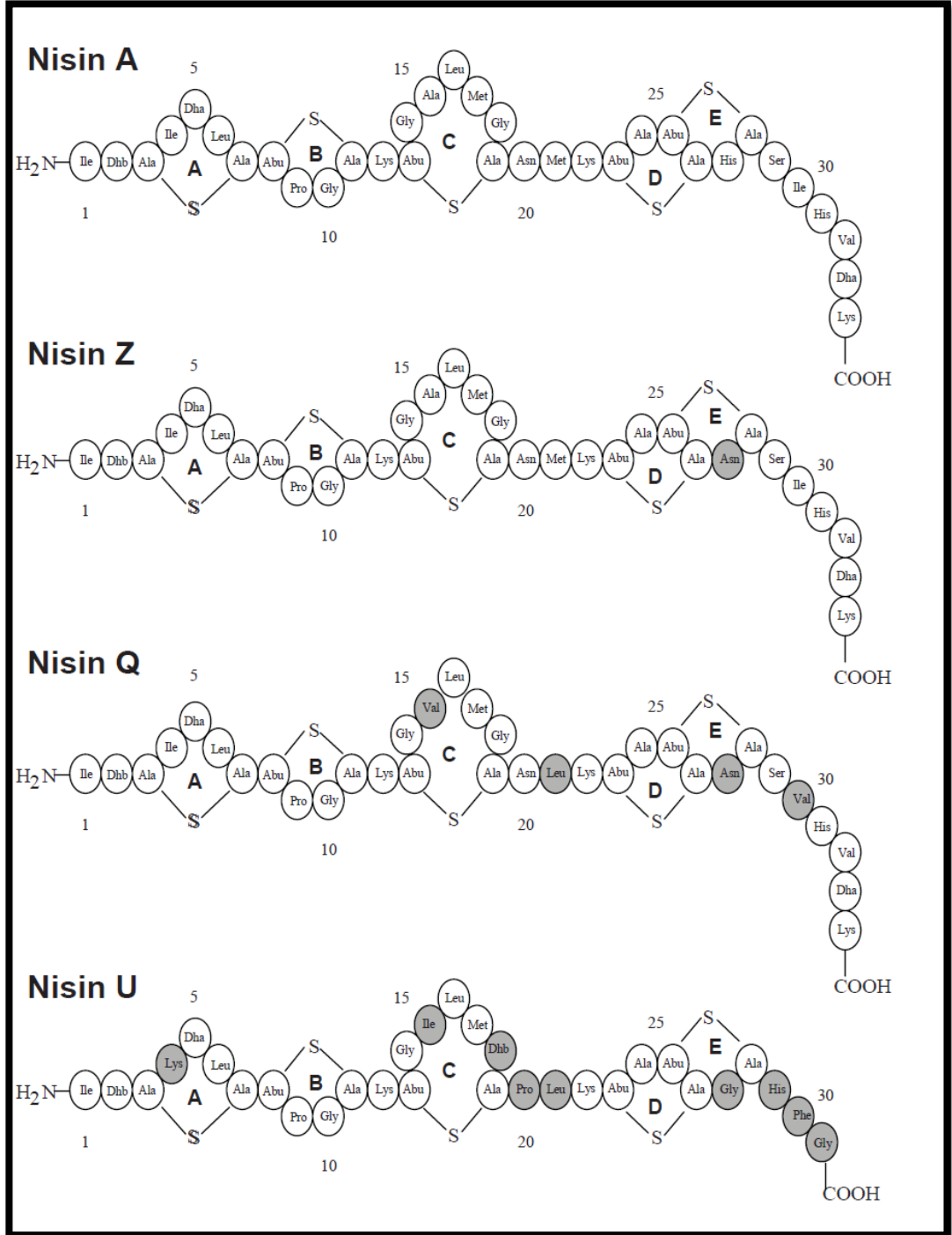
Nisinin molekül formülü  $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$  ve molekül ağırlığı 3354.25 Da’ dır (Şekil 2). Yapısında 34 adet amino asit bulunmaktadır. Bu amino asitlerden 8 tanesi kükürt içerir ve en önemlisi lantionin ve 3-metil lantionin’ dir. Zira, lantibiyotik terimi içerdiği bu amino asitten türetilmiştir. Bunlara ek olarak dehidroalanin ve dehidrobutirin gibi diğer amino asit kalıntılarını içermektedir. Asidik pH’ lı çözeltilerde kolay çözülür ve stabildir. Alkali pH’ larda kimyasal modifikasyonlara bağlı olarak stabilitesi ve biyolojik aktivitesi azalır. Pankreatin, tripsin, tükürük enzimlerine ve rennet hariç sindirim enzimlerine karşı duyarlıdır<sup>26, 31</sup>.





Şekil 2: Nisinin molekül yapısı <sup>32, 33</sup>.

Bugüne kadar nisinin, yapısındaki aminoasit kompozisyonuna göre nisin A, nisin Z, nisin Q, nisin U ve nisin F olmak üzere 5 farklı nisin varyantı karakterize edilmiştir (Şekil 3). Bu varyantlardan nisin A, Z, U üreticileri süt ve süt ürünlerinden, nisin Q üreticisi nehir suyundan, nisin F üreticisi ise yayın balığından izole edilmiştir. Bu varyantlardan yalnız nisin U *Streptococcus uberis* tarafından üretilmektedir <sup>34, 35, 36, 37, 38, 39</sup>.



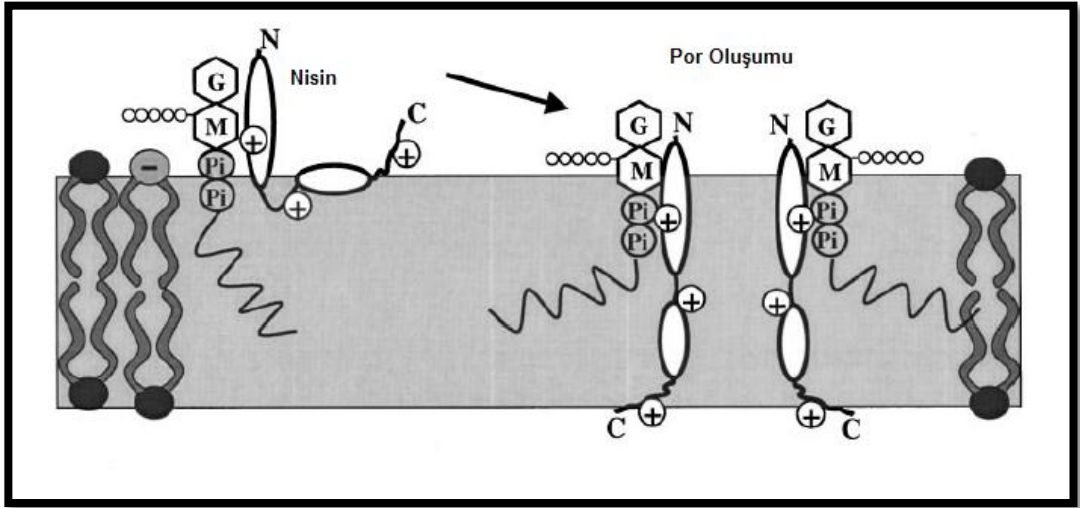
Şekil 3: Nisin A, Z, Q ve U'nun yapısı. A-E:Lantiyonin köprüleri. Dha: Dehidroalanin, Dhb: Dehidrobütrin; Ala-S-Ala, lantiyonin; Abu-S-Ala, β-metil lantiyonin. Varyantlarda Nisin A'dan farklı olan amino asitler gri tonla işaretlenmiştir<sup>38, 40</sup>.

Nisin varyantları arasındaki temel farklılık, primer yapıda bazı pozisyonlarında görülen amino asit değişimleridir. Nisin Z, nisin A'dan farklı olarak 27. pozisyonda histidin yerine asparajin aminoasitini içermektedir<sup>31</sup>. Nisin Q'da nisin Z'ye göre üç amino asit (Val 15, Leu 21, Val 30) bakımından farklı bulunmuştur. Bugüne kadar bu varyant üreticisi olan sadece bir suş tanımlanmıştır<sup>15</sup>. *S. uberis* tarafından üretilen nisin U; yaygın rastlanılan nisin A ve nisin Z'ye göre 9 amino asit (Lys 4, Ile 15, Dhb 18, Pro 20, Leu 21, Gly 27, His 29, Phe 30 ve Gly 31) bakımından farklılık göstermektedir. Ayrıca diğer varyantlardan farklı olarak 34 aminoasit yerine, 31 amino asit içermektedir. Aynı zamanda bu varyantta da modifiye amino asitlerin ve lantionin köprülerinin yerleşimi, diğer varyantlarla benzerdir. Yayın balığından izole edilen *L. lactis* tarafından üretilen nisin F, nisin A ve nisin Z'den sadece 30. pozisyondaki aminoasitin valin olmasıyla farklılaşmıştır. Ancak bu varyanta ait lantionin köprülerinin yerleşimi henüz belirlenememiştir<sup>15, 38, 39, 41</sup>.

Nisinin üç boyutlu yapısı çeşitli Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) çalışmalarıyla incelenmiş ve bunun sonucunda elastik bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Nisin molekülü, amino terminalindeki A, B ve C lantionin halkalarından ve karboksi terminalinde iç içe yer alan D ve E lantionin halkalarından oluşmuştur (Şekil 2). Nisinin B, D ve E halkalarında yer alan 1. ve 4. amino asitler tiyoeter bağlarıyla bağlanarak  $\beta$ -dönüşlerini oluşturmaktadır. A ve C halkaları ise kararlı bir yapıya sahip değillerdir<sup>42</sup>.

### 2.2.1.1.1. Nisinin Antimikrobiyal Etki Mekanizması

Nisin, antimikrobiyal aktivitesini hücre membranında porlar oluşturarak ve peptidoglikan biyosentezini engelleyerek göstermektedir. Nisinin por oluşturma mekanizması 'Nükleer Manyetik Rezonans-NMR' çalışmaları sonucunda, nisin ve lipit II etkileşiminin aydınlatılmasıyla netlik kazanmıştır (Şekil 4). Sitoplazmik membranda por oluşumu, nisinin N- ucundaki İle-1 aminoasidinin, lipit II' nin fosfat gruplarına bağlanması, ardından C- ucunun bu moleküle ilişkilmesi ve son aşamada membrana tutunmasıyla gerçekleşir. Oluşan por çapı yaklaşık olarak 2-2.5 nm olmakla birlikte; aminoasitler, ATP ve monovalent katyonlar gibi hücreler için önemli olan maddelerin hızlı bir şekilde kaybı sonucu membran potansiyelinin bozulmasına neden olmaktadır. Bu mekanizma 'fıçı-delme' modeli olarak adlandırılmıştır<sup>30,31,37</sup>.



Şekil 4: Nisinin por oluşumu için önerilen lipit II modeli. Nisin ilk aşamada lipit II'nin karbonhidrat parçasına dıştan yönelimli olarak bağlanır. N-terminal bölgesi bağlanma için gereklidir. C-terminal kısmı ise membranı geçerek por yapısını tamamlar<sup>43</sup>.

Nisinin bir diğerk etki mekanizması ise hücre duvarı sentezini durdurmaktır. Fosfolipid komponentlerinden, hücre duvarı sentezinde öncül bir molekül olan Lipid II aracılığıyla fosfatidilgliserol lipozomlarının anyonik yüzeyleriyle birleşir ve fosfolipit gruplarında bulunan lipitleri olumsuz yönde etkiyerek aktivitesini gösterir <sup>15</sup>.

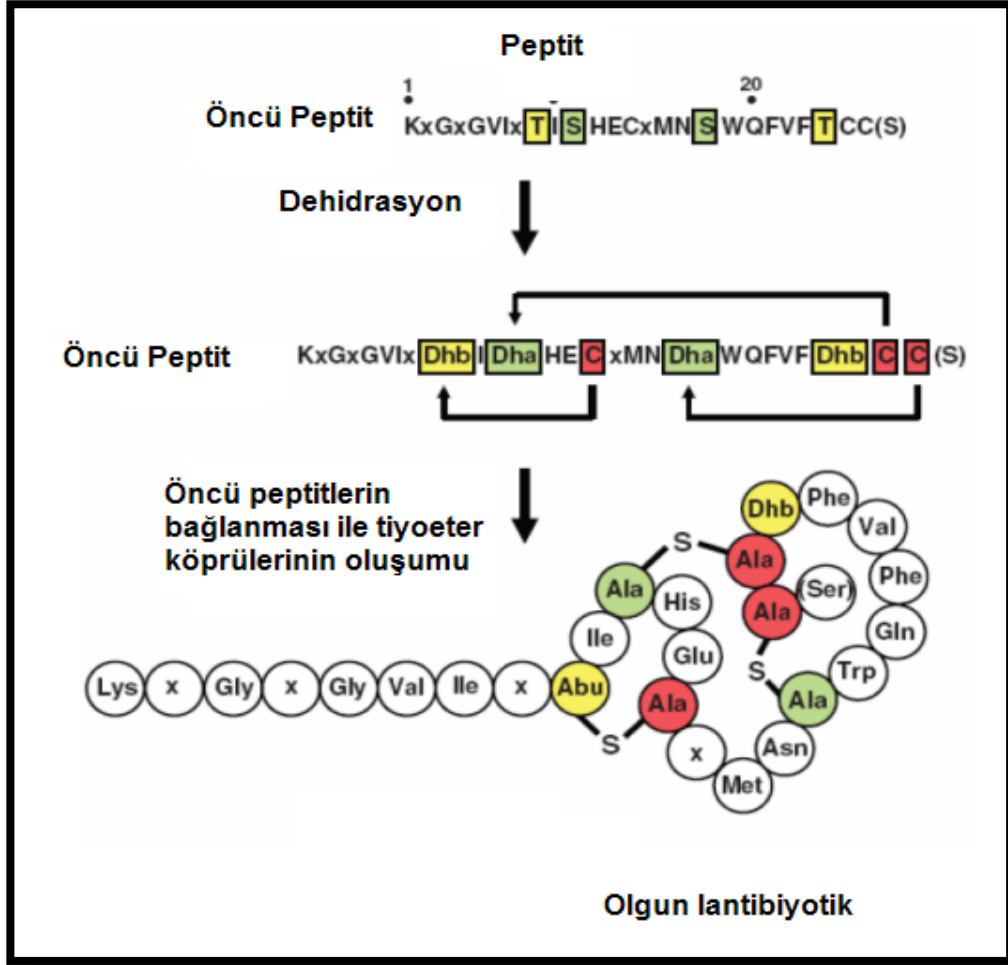
Hücre duvarı yapısal farklılığı nedeni ile nisin, Gram-negatif bakterilere karşı daha düşük etki göstermektedir. Ancak bu bakterilerin hücre duvar yapısını nisin için geçirgen hale getiren her türlü işlem, söz konusu bakterilerde nisin duyarlılığının artışına neden olmaktadır. Bu tip işlemler; şelat oluşturan ajanlara maruz bırakma, öldürücü doz altı sıcaklık ve ozmotik şok uygulamalarını kapsamaktadır <sup>44</sup>.

Nisin, vejetatif hücrelerin gelişiminin inhibisyonu yanında, bakteriyel sporların çimlenmesini de durdurmaktadır. Bu etkinin, çimlenmekte olan sporların membranlarında yer alan proteinlerin yapısında bulunan sülfidril gruplarına, nisinin bağlanması sonucu meydana geldiği saptanmıştır. Ayrıca sporosidal etkide, nisin molekülü içindeki bir veya daha fazla dehidro amino asit yapısının da rol aldığı belirlenmiştir <sup>45, 46, 47</sup>.

#### **2.2.1.1.2 Nisin Biyosentezi ve Nisin Genleri**

Nisin; ribozomal olarak sentezlenen öncü peptitlerin translasyon sonrası modifikasyonları ile oluşmaktadır. Ribozomlardan salınan nisin düzlemsel yapıdadır ve biyolojik aktiviteye sahip değildir. Salınma sonrasında öncü peptit, proteolitik kesime uğratılmakta ve

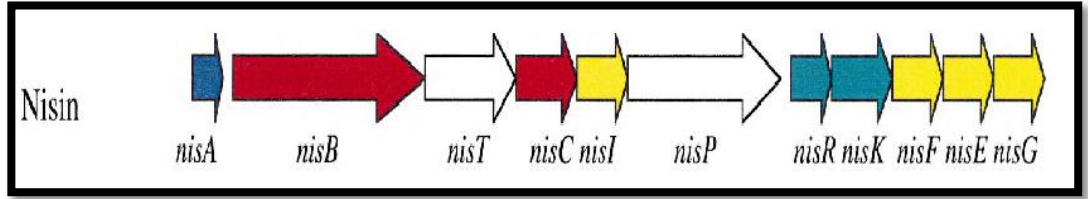
pentasiklik halkaların oluşumunda rol alan diğer modifikatör enzimlerin katalizörlüğünde, aktif nisin molekülü oluşturulmaktadır (Şekil 5) <sup>48, 49, 50</sup>.



Şekil 5: Öncü peptit olgunlaşması <sup>51</sup>.

Nisinin biyosentezi 11 tane genin kontrolünde gerçekleşmektedir (Şekil 6). *NisA/Z/Q/BTCIP*, *nisRK*, *nisFEG* gen kümesi; nisin öncü proteininin sentezini, proteinin translasyon sonrası modifikasyonunu, nisin dirençliliğini, transkripsiyonel regülasyonu, peptit transferini ve öncü proteinin işlenmesini gerçekleştiren proteinleri kodlamaktadır (Şekil 6). Biyosentez ve direnç genleri *nisA/Z/QBTCIPRK*

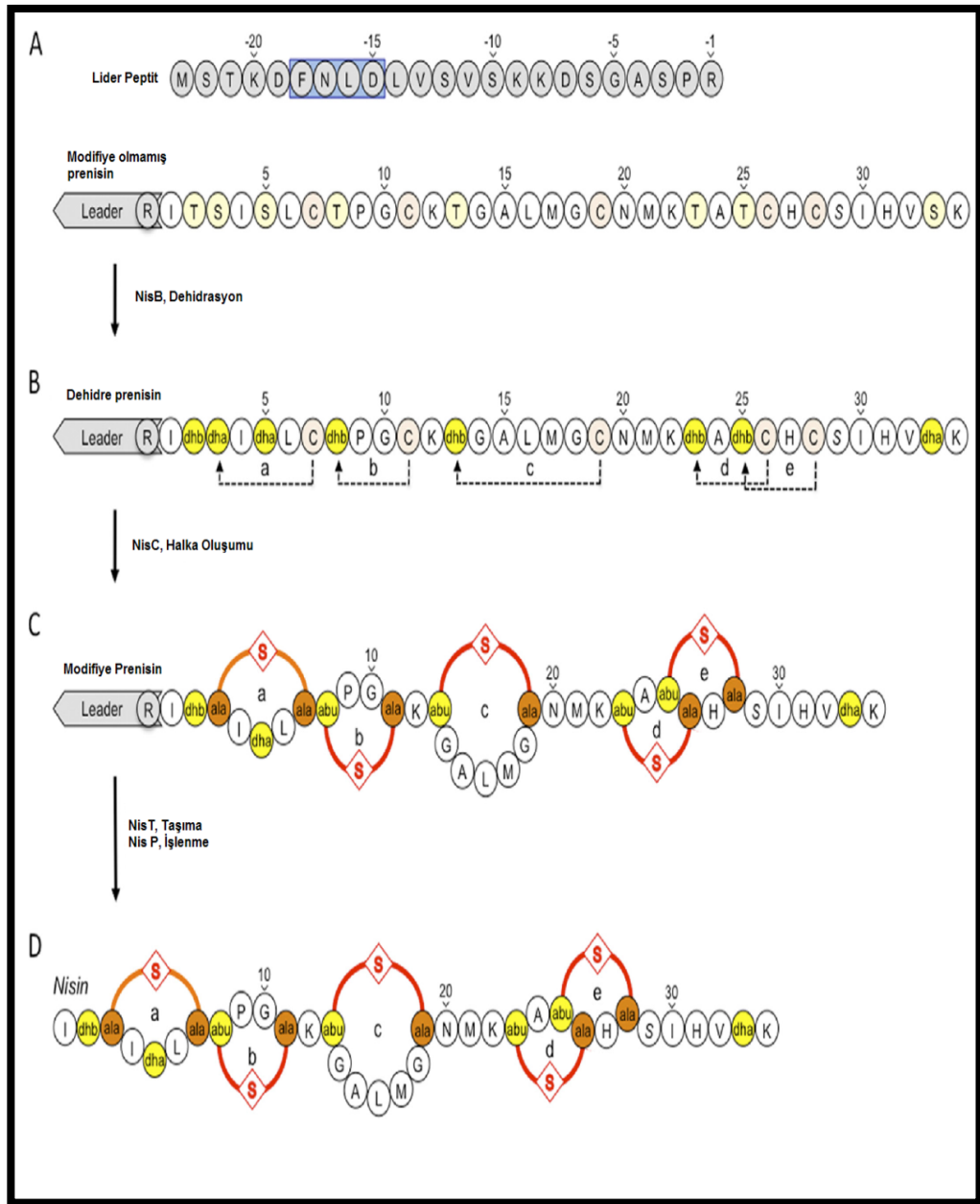
ve *nisFEG* olarak iki farklı operonda organize olmuşlardır. Bu genler yaklaşık olarak 70 kb büyüklüğünde, konjugatif bir nisin-sakkaroz transpozonunda yer almaktadır <sup>26, 49, 52</sup>.



Şekil 6: Nisin genlerinin organizasyonu <sup>53</sup>.

Temel nisin geni olan *nisA*, ribozomlarda sentezlenen inaktif öncü peptittir. Sentezlenen molekülü inaktif halde tutan lider peptit (23 amino asit) ve biyolojik aktif nisin öncüsü olan propeptitten (34 amino asit) oluşan iki ana yapıyı içermektedir. Translasyon sonrasında lider peptit, üretilen molekülün sitoplazmik membranda bulunan modifikasyon mekanizmasına yönlendirilmesini sağlamaktadır (Şekil 7). Bu öncü propeptitte yer alan serin ve treonin *nisB* dehidrataz enzimi ile sırasıyla 2,3-didehidroalanin (Dha) ve 2,3-didehidrobütirin (Dhb) formuna dehidre edilir. Sonrasında, *nisC* aracılığıyla sistein kalıntılarının tiyol grupları ve didehidro amino asitlerin çift bağlarını içeren molekül içi Michael ekleme reaksiyonu katalizlenir ve reaksiyonlar tiyoeter köprülerinin oluşmasıyla sonuçlanır. Bu tiyoeter köprüleri karakteristik ( $\beta$ -metil) lantionin halkalarını oluşturmaktadır <sup>26, 49, 54</sup>.

Modifiye nisin molekülü ABC taşıma proteini *nisT* vasıtasıyla hücre dışına taşınmaktadır. Nisin molekülünden lider peptidin proteolitik ayrılması serin proteaz *nisP* tarafından katalizlenmektedir <sup>48, 55</sup>.

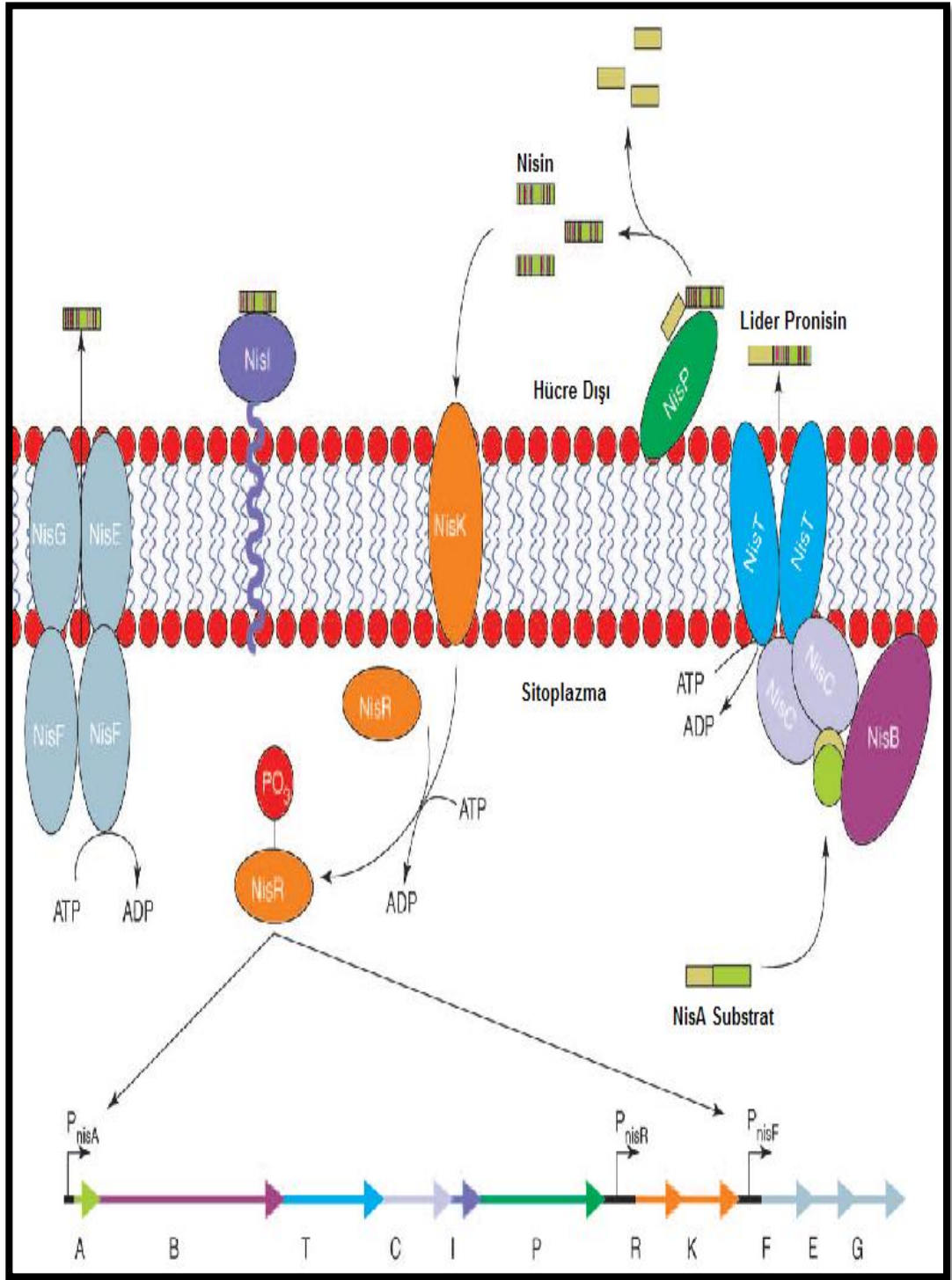


Şekil 7: Translasyon Sonrası Modifikasyon <sup>54</sup>.



Nisin dirençliliğinden *nisl*, *nisF*, *nisE* ve *nisG* genleri sorumludur. *nisl*, nisin gen kümesinin orta kısmında yerleşmiş olup, 245 amino asitlik NisI lipoproteinini kodlamaktadır. Nisin üreticisi olmayan *L.lactis* suşlarına *nisl* geninin klonlandığı çalışmalarda nisine karşı direnç geliştiği gösterilmiştir. *nisFEG* genleri ise ABC sınıfı transport proteinlerini kodlamaktadır. Kodlanan bu proteinlerden NisF sitoplazmik ATP-bağlama proteinini, NisE ve NisG ise hidrofobik integral membran proteinlerini oluşturmaktadır<sup>55, 56, 57</sup>.

Nisin biyosentezinin regülasyonu iki bileşenli bir sistem tarafından sağlanmaktadır (Şekil 8). Bu sistemde histidin kinazı kodlayan *nisR* geni ve hücre içi yanıtı düzenleyen *nisK* geni rol oynamaktadır. Ortamda bulunan olgun nisin miktarı yeter sayıya ulaştığında (Quorum sensing) *nisK* proteini nisin ile etkileşime girerek histidin kinazı fosforile etmektedir. Fosforil grubu NisR' ye aktarılarak hücre içi yanıtı düzenleyen *nisK* proteini, *nisABTCIP* ve *nisFEG* genlerinin transkripsiyonunu yönetmektedir<sup>19, 52, 55, 58</sup>.



Şekil 8: Nisin Biyosentezi <sup>59</sup>.

### 2.2.1.1.3. Nisin Üretimini Etkileyen Faktörler

Nisin biyosentezi, *L. lactis*' in aktif büyüme fazında başlayıp, durağan fazın başlamasıyla sona ermektedir. Nisin üretimi hücre biyokütlesiyle doğru orantılı olarak artış göstermektedir. Bakterisidal nisin aktivitesi ise gelişmenin başlamasından 4 saat sonra tespit edilebilmektedir. Biyokütle miktarı yaklaşık olarak % 60 oranına ulaştığı zaman nisin aktivitesinin oldukça güçlü bir artış gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek nisin titresine en fazla biyokütle miktarına karşılık gelen logaritmik büyüme fazının sonunda ulaşılmaktadır<sup>60, 61</sup>.

Nisin üretiminin *L. lactis* biyokütlesiyle paralellik göstermesi nedeniyle, çeşitli faktörler nisin üretiminde rol oynamaktadır. pH, sıcaklık, karbon ve azot kaynaklarının yanısıra inorganik bileşiklerle ortamda bulunan nisin miktarı da nisin üretimi üzerinde önemli etkiye sahiptirler.

#### 2.2.1.1.3.1. Karbon Kaynağının Etkisi:

Karbon kaynağı, hücre gelişimi ve dolayısıyla nisin üretimi açısından önemli bir yere sahiptir. Karbon kaynağı miktarının az oluşu üremeyi olumsuz etkilerken, fazla olması da üremeyi baskılayıcı etki göstermektedir. Karbon kaynaklarının nisin üretimine etkisinin incelendiği farklı çalışmalarda, çeşitli şekerlerin kullanılması sonucunda nisin üretim düzeylerinin farklılık gösterdiği belirtilmiştir<sup>62, 63</sup>.

Fruktoz, sakkaroz, glukoz, maltoz ve laktoz gibi şekerlerin kullanıldığı bir çalışmada, en fazla nisinin %1 oranında fruktoz kullanımı

sonucu elde edildiği bildirilmiştir <sup>64</sup>. Laktozun etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise en etkili aktiviteye 30g/L laktoz varlığında ulaşıldığı, 40g/L laktoz varlığında ise laktik asit oluşumu ve bazı proteolitik enzimlerin salınımı sonucunda 41.2 AU/mL aktivite kaybının olduğu belirlenmiştir <sup>61</sup>. Glukozun optimal karbon kaynağı olarak kullanılabileceğinin gösterildiği bir çalışmada, sakkaroz ve fruktoza kıyasla iki kat daha fazla nisin elde edilmiş; sakkaroz ve glukozun birlikte kullanılması sonucunda ise, sakkaroz metabolizması genlerinin nisin transpozonunun üzerinde yer alması nedeniyle, nisin üretimini baskıladığı belirlenmiştir <sup>65</sup>.

#### 2.2.1.1.3.2. Azot Kaynağının Etkisi:

Hücre biyokütlesinin artışı ile nisin üretimi arasındaki orantı sebebiyle, azot kaynaklarının besiyeri içerisinde bulunuşu nisin biyosentezinin regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Maya zt, et özütü, balık özütü gibi azot kaynaklarının kullanıldığı çalışmalar nisin üretimini teşvik etmektedir <sup>64, 66</sup>.

Nisin reticisi *L. lactis*'in gelişimi ve nisin biyosentezinin artırılması için besiyeri içerisine treonin, serin, sistein, lizin ve sistin gibi amino asitlerin eklenmesi söz konusu olabilmektedir. Bu amino asitler, nisin molekülünün bileşenleri olan lantiyonin ve  $\beta$ -metillantiyoninin öncül yapılarını oluşturmaları bakımından önem taşımaktadırlar <sup>66</sup>.

#### 2.2.1.1.3.3. İnorganik Bileşiklerin Etkisi:

Ortamda bulunan anyon ve katyonların bakteriyosin üretimine etkileri türe özgü olmakla birlikte, inorganik fosfat nisin üretiminin geliştirilmesi için kullanılabilir 67.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  gibi fosfat kaynaklarının besiyeri içerisine eklenmesi, fosforun ATP oluşumunu teşvik etmesi sebebiyle nisin üretimini artırıcı yönde etki yapmaktadır 68. Fosfatın yanısıra  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının da ortama eklenmesi nisin üretimini olumlu etkilemektedir. NisP peptidazların aktivasyonuna yol açarak öncü nisin molekülünün modifikasyonunu sağlamaktadır. Nisin üretiminin artırılması için kullanılacak bir diğer inorganik bileşik ise tween 80' dir. Tween 80 hücre çeperinden nisin ayrılmasını sağlayarak üretimin artmasına neden olmaktadır 69.

#### 2.2.1.1.3.4. pH' nın Etkisi:

Ortam pH' sı mikroorganizma gelişimini etkilediği gibi nisin üretimini ve aktivitesini de etkilemektedir. Yüksek asidik ve yüksek alkali pH değerlerinde aktivite kaybına uğramaktadır. Nisinin asidik pH' da çözünürlüğüne bağlı olarak aktivitesi asidik pH' da nötral pH' dan daha yüksektir. *Micrococcus luteus*' un kullanıldığı aktivite çalışmalarında nisin aktivitesinin besiyeri bileşimi göz önünde bulundurulduğunda, optimum pH değerlerinin 5.5 ve 7.5 arasında olduğu belirlenmiştir 27, 62, 70, 71, 72.

#### 2.2.1.1.3.5. Nisin Miktarının Etkisi:

Ortamda bulunan nisin miktarı da durağan fazda bulunan hücreler üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir. Optimum fermentasyon

koşullarının uygulandığı bir çalışmada, üretilen nisin miktarı yaklaşık olarak 2000-3000 IU olarak belirlenmiştir. Üretici suşun dirençlilik seviyesi, üretilebilecek azami nisin miktarını belirlediğinden, optimum değerlerin üzerinde nisin üretimi bildirilmemiştir<sup>60, 62, 73</sup>.

#### **2.2.1.1.4. Nisinin Kullanım Alanları**

Doğal koruyucu ajan olarak gıdalarda nisin kullanılmakla birlikte, yapılan araştırmalar, nisinin terapötik amaçlar için de kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Özellikle atopik dermatit tedavisinde, mide ülseri tedavisinde ve immün yetersizlikleri olan hastalarda kolon enfeksiyonlarının tedavisinde kullanım potansiyeli belirtilmiştir. 1990'ların başında, nisinin topikal formları Consept™ adıyla meme preparatı olarak ticari olarak piyasa sunulmuştur. Bu sıvı formülasyonun nisine duyarlı patojenlerin neden olduğu meme içi enfeksiyonların önlenmesi için etkili olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, sanitizer olarak Wipe Out® üretilen ve ana etken maddesi nisin olan farklı bir formda, gram negatif bakterileri de etki spektrumuna dahil etmek için şelatörler ve yüzey aktif maddeler eklenmiştir. Bu topikal ürünler bakteriyosinlerin kullanımıyla çapraz kontaminasyonu en aza indirmekte ve bu amaçla kullanılan bazı kimyasallarla karşılaştırıldığında cildi daha az tahriş ettiği bildirilmektedir. Veteriner hekimliğinde de nisinin sanitizer olarak kullanılması, mastite neden olan patojenlere karşı koruma sağlamaktadır<sup>49, 74</sup>.

Bunun yanısıra, *Staphylococcus aureus*' un neden olduğu solunum yolu enfeksiyonu olan hayvan modelinde, nisinin antimikrobiyal etkisi gösterilmiş, başka bir çalışmada ise nisinin, kadınlarda laktasyon

sırasında stafilokokal meme iltihabı tedavisi için antibiyotik etkili bir alternatif olarak uygulanabileceği vurgulanmıştır<sup>8, 75</sup>.

Nisinin antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *Streptococcus pneumoniae*'nin etken olduğu bir fare enfeksiyon modeli kullanılmış, iki doz 0.16 mg/kg nisinin intravenöz yoldan verildiğinde %100 etkili olduğunu, buna karşı, iki doz 1.25 mg/kg vankomisin intravenöz yoldan verildiğinde %80 oranında etkili olduğu bildirilmiştir. Nisinin kandaki yarılanma ömrü 0.9 saat gibi kısa bir süre olmasına rağmen vankomisinle karşılaştırıldığında daha hızlı bir bakterisidal etki gösterdiği ortaya konulmuştur<sup>76</sup>.

Nisinin ilginç bir diğer farmasötik uygulaması ise insanlar için güçlü bir vajinal kontraseptif olarak kullanılabilmesidir. Toksik etkisi bulunmayan nisinin, cinsel yolla bulaşabilecek hastalıklara karşı da profilaktik kontraseptif olarak benzersiz bir klinik potansiyel gösterdiği iddia edilmiştir. Ayrıca diş macunu ve cilt bakım ürünleri gibi sağlık bakım ürünlerinde kullanılabilir<sup>77</sup>.

Nisinin asidik koşullarda stabilitesini koruyabilmesi ve pepsine olan direnci, midede antimikrobiyal aktivitesini de korumasını sağlamaktadır. Bu sayede *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için uygun bir antimikrobiyal ajan olabileceği yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir<sup>44, 49, 74, 78</sup>.

Stabilitesi ve inhibitör etkisi artırılan lipozomal nisin, peynir yapımında ortama eklenmiş, üretim esnasında ve sonrasında

karşılaşılabilecek kontaminant mikroorganizmaların zararlı etkilerinden uzun süre korumak için güçlü bir araç olduğu belirtilmiştir. Ayrıca fermentasyon sürecine herhangi olumsuz bir etki oluşturmadığı da tespit edilen veriler arasında yer almaktadır<sup>79, 80, 81</sup>.

### **2.3. Saflaştırma Yöntemleri**

Protein saflaştırma, kompleks bir karışımdan tek bir protein türü izole etme amaçlı bir dizi süreçten oluşmaktadır. Protein saflaştırma işlevi, yapı karakterizasyonu ve ilgili protein etkileşimleri için hayati önem taşımaktadır. Başlangıç malzemesi genellikle bir doku veya biyolojik bir mikrobiyal kültür olmakla birlikte, saflaştırma işlemlerinin tamamlanması sonucunda istenen protein, diğer protein ve protein olmayan kalıntılardan ayrılabilir. Diğer tüm proteinlerin ayrılması genellikle protein saflaştırmanın en zahmetli yönüdür. Ayırma protokolünün basamakları; proteinlerin sahip olduğu büyüklük, fiziko-kimyasal özellikler, bağlanma afinitesi ve biyolojik aktivite gibi farklılıklar göz önünde bulundurularak belirlenmektedir. Protein saflaştırmada kullanılan yöntemler genel olarak analitik ve preparatif yöntemler olarak ayrılabilir. Preparatif saflaştırmada; enzimler (laktaz), besleyici proteinler (soya protein izolatu) ve bazı biyofarmasötik (insülin) ürünler görece olarak fazla miktarda elde edilebilir. Analitik saflaştırmada protein için çeşitli araştırma veya analitik amaçlar da dahil olmak üzere, tanımlama, ölçme, proteinin yapısı, post-translasyonel modifikasyonlar ve fonksiyonu belirlenebilmekte ve az miktarda da olsa saf protein elde edilmektedir. İlk kez kristalize formda pepsin ve üreaz proteinlerinin elde edilmesi 1946 yılında Northrop ve Sumner isimli araştırmacılara Nobel Ödülü kazandırmıştır. Proteinlerin saflaştırılmasında, tekrarlanan dondurma ve çözme, sonikasyon, yüksek basınç, filtrasyon, organik çözücülerin kullanıldığı ekstraksiyon

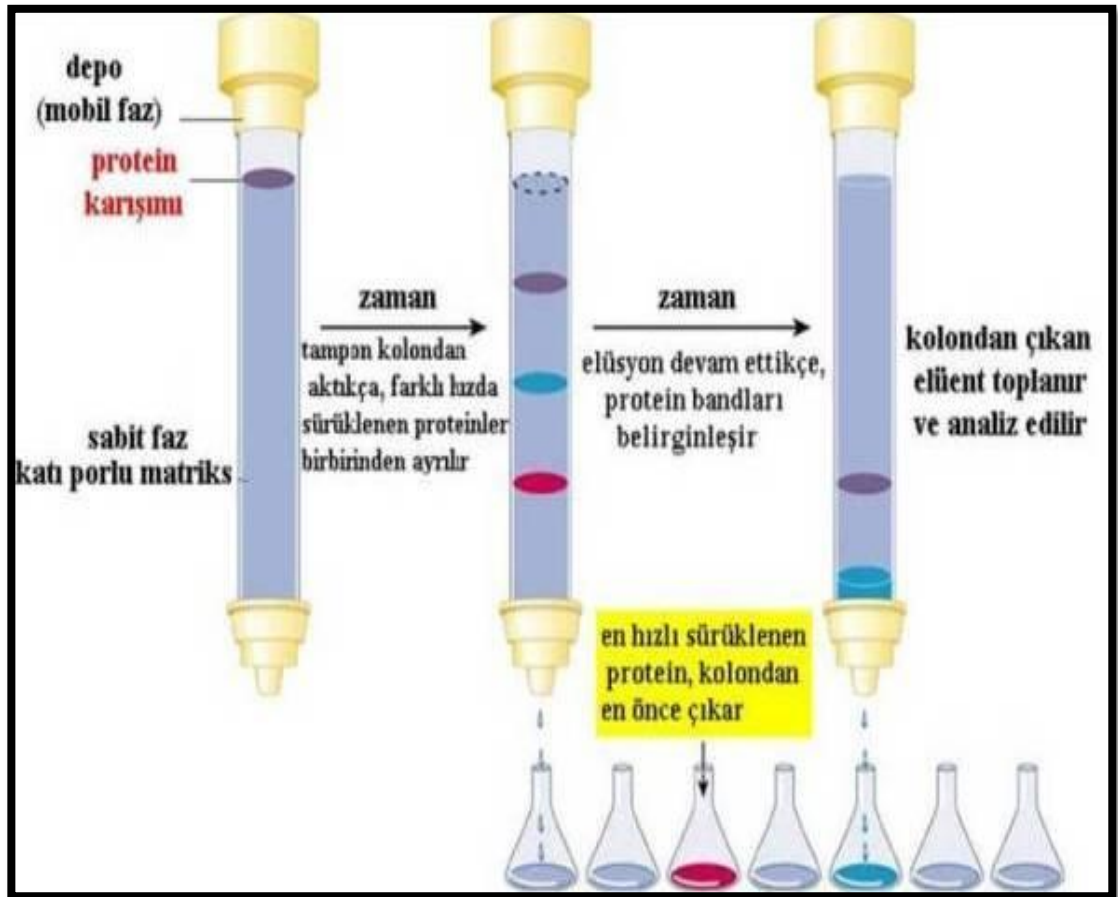


yöntemleri uygulanabilmektedir. Tercih edilen yöntem, proteinin yapısına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Ekstraksiyon işleminden sonra çözünür proteinler çözücü içinde bulunarak santrifüjleme ile DNA vb. hücre içeriklerinden ayrılabilir. Amonyum sülfat, Triton X-114, Chaps ve organik solventler, çöktürme protokollerinde kullanılabilen bileşiklerdir <sup>82, 83, 84, 85</sup>.

### **2.3.1. Kromatografi Yöntemleri**

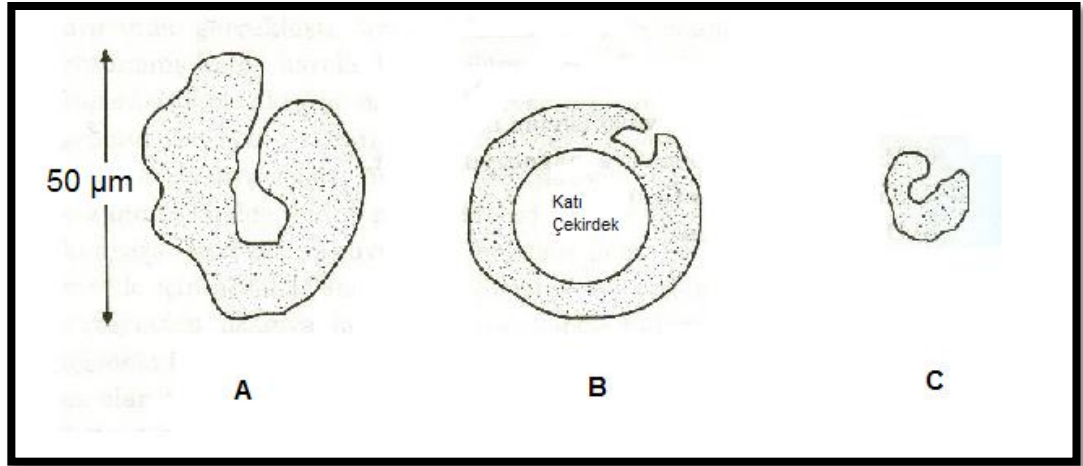
Ayrılmaları zor olan maddeleri ayırmak için kullanılır. Ayırma işlemiyle, genel olarak, bir madde, bulunduğu karışımdan kantitatif olarak başka bir ortama alınmaktadır. Buna ek olarak maddenin saf olarak başka bir ortama alınmasını da kapsamaktadır. Böyle bir ayırma sırasında ayrılması istenen madde, kantitatif olarak başka bir ortama alınırken; birlikte bulunduğu diğer maddelerin buldukları ortamda kalmaları istenmektedir. Bu şartların yerine getirildiği ayırma işlemine seçici veya spesifik ayırma denmektedir. Kromatografik ayırmalar, biri sabit diğeri hareketli olan iki faz (ortam) arasında gerçekleşmektedir. Ayrılması istenen madde veya maddeler çözülmüş halde hareketli faza ilave edilir. Hareketli faz; sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir. Hareketli faz; bir kolon içerisinde, ya normal yer çekimi kuvvetiyle veya basınçla kolondaki sabit faz içerisinde aşağı doğru indirilir. Bu indirme esnasında hareketli fazda çözülmüş halde bulunan maddelerle sabit faz arasında fiziksel ve kimyasal bazı çekim kuvvetleri meydana gelir. Bu çekim kuvvetleri her madde için farklıdır. Bu nedenle hareketli faz, sabit faz içinden veya yüzeyinden aşağı doğru inerken içinde bulunan maddelerin kolon içindeki hızları farklı olur. Sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en az olan madde, kolonda en az kalarak en hızlı yol alırken; sabit fazla

arasındaki çekim kuvveti en fazla olan en yavaş yol alır. Kolonun tepesinden aynı anda enjekte edilen maddeler kolonun altına farklı zamanlarda ulaşırlar. Bu esnada her maddenin tanecikleri kendi aralarında kümeler meydana getirerek kolondan aşağıya doğru bantlar halinde yol alır. Ayrılması istenen maddeler renkliyse, her madde kolonda ayrı ve renkli bir bant halinde görülür (Şekil 9). Bu renkli çözeltilerin kolonun alttaki ucundan çıkmaları gözle takip edilebilir ve bu bant şeklindeki çözeltiler farklı tüplere alınarak karışımdan ayrışmaları sağlanabilmektedir<sup>86, 87, 88</sup>.



Şekil 9: Kolon elüsyon kromatografi ile bileşenlerin ayrılma prensibi<sup>89</sup>.

Kromatografide hareketli sıvı faz olarak olarak, su dahil bütün organik çözücüler ve bu çözücülerin çeşitli oranlardaki karışımları kullanılabilir. Sabit faz olarak da silikajel, alümina, kömür, florisil, kalsiyum karbonat, diatom toprakları, poliamitler, nişasta ve toz şeker gibi birçok madde kullanılabilir. Bu maddelerin yüzeyi asidik (silika), bazik (alumina) veya nötral (kömür) olabilir. Sabit faz olarak kullanılan maddelerin yapısı gözeneklidir. Gözenekler farklı büyüklükte olabilirler. (Şekil 10)



Şekil 10: Kromatografide sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin gözenekleri ve büyüklükleri. (A: Büyük gözenek, B: Pelliküler gözenek, C: Mikro gözenek)

### 2.3.2.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografi yöntemleri fiziksel olarak, kolon ve düzlem olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kolon üzerine kurulan kromatografilerde hareketli faz, kolondaki sabit faz içinden geçerek

kolonun altına inmektedir. Düzlem kromatografisinde hareketli faz, ya kapiler olaylarla veya yer çekimi kuvvetiyle hareket etmektedir. Temel olarak kromatografi metotları; sıvı, gaz ve yüksek performans sıvı kromatografisi olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Tablo 3). Sıvı kromatografi de kendi içerisinde adsorbsiyon, dağılma, kağıt ve ince tabaka, iyon değiştirme kromatografileri olarak dörde ayrılmaktadır<sup>86, 87, 88</sup>.

Tablo 3: Kolon kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması <sup>86</sup>

Genel Sınıf	Özel Yöntem	Durgun Faz	Denge tipi
Sıvı Kromatografi (LC) (hareketli faz:sıvı)	Sıvı-sıvı veya dağılma	Katı üzerine adsorblanmış sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı-katı veya adsorbsiyon	Katı	Adsorbsiyon
	İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme	Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
Gaz kromatografisi (GC) (hareketli faz gaz)	Gaz-sıvı	Katı yüzeyine adsorblanmış sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
	Gaz- bağlı faz	Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı faz arasında dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorbsiyon
Süperkritik-akışkanlı kromatografi (SFC) (hareketli faz:süper kritik sıvı)		Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Süper kritik akışkan ve bağlı yüzey arasında dağılma

### 2.3.2.1.1. İyon Değiştirme Kromatografisi (IC)

İyon değiştirme kromatografisi, katı bir maddenin yapısında bulunan iyonların, temasta bulunduğu çözeltili içindeki aynı cinsten yüklü başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirilmesi özelliğine dayanmaktadır. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözeltili ortamında hiç çözünmeyen büyük moleküllü organik ve inorganik maddelerdir. Kromatografik proses iki basamakta oluşur. Adsorbsiyon basamağında ilgilenilen bileşikler, iyon değiştiriciden zıt şekilde yüklenerek elektriksel açıdan nötr hale gelirler. Desorbsiyon basamağında ilgilenilen bileşikler, zıt prosesle yani zıt iyonlarla yer değiştirme ile iyon değiştiriciden ayrılırlar. Bu yüzden kromatografik ayırma, örnek iyon değiştirici kolondan geğerken meydana gelen sayısız adsorbsiyon/ desorbsiyon işlemlerindeki seçiciliğin bir sonucu olarak geręekleşir <sup>86</sup>.

#### Kromatogramlar

Çözünen maddenin derişimlerine cevap veren bir dedektör, kolon çıkışına yerleştirilirse ve dedektör sinyali zamanın (veya kullanılan hareketli fazın hacminin) bir fonksiyonu olarak kaydedilirse bir seri pik elde edilir. Kromatogram olarak adlandırılan bu grafikler, hem kalitatif hemde kantitatif analiz için kullanılır. Zaman eksenindeki piklerin yerleri, numune bileşenlerini tanımda kullanılabilir. Pik alanları herbir bileşenin miktarının kantitatif bir ölçüsüdür <sup>86</sup>.

## 2.4. Lipozomlar

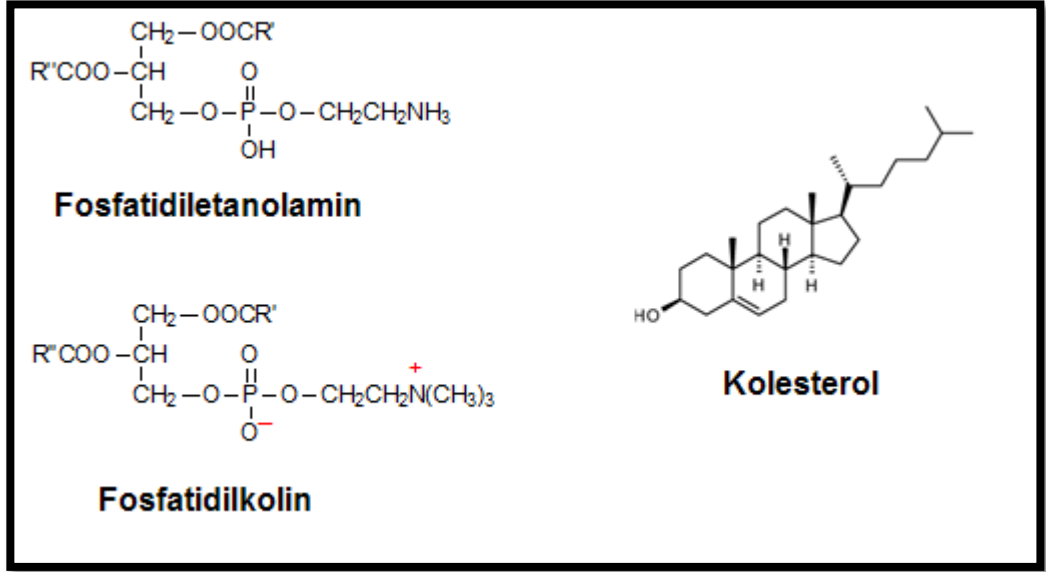
Lipozomlar, yaklaşık 50 yıl önce Bangham ve arkadaşları tarafından 1960' lı yıllarda keşfedilmiş ve 'fosfolipitlerin hidrate olmasıyla

veya sulu ortamda dağılımlarıyla oluşan mikroskobik, küresel kesecikler olarak tanımlanmıştır' <sup>90</sup>. İlk keşfedildiği yıllarda biyolojik membran özellikleri ile ilgili çalışmalarda kullanılmış olan lipozomlar, günümüzde öncelikle ilaç taşıyıcı sistem olmak üzere farklı birçok kullanım alanına sahiptir <sup>91, 92</sup>.

Lipozomlar sulu kısmını lipit moleküllerinin oluşturduğu membranla çevrilmiş mikropartiküler veya koloidal lipit keseciklerdir. Lipozom genellikle fosfolipitler kullanılarak oluşturulmaktadır (Tablo 4-Şekil 11). Oluşan lipozom veziküllerinin çapları ise nanometre ile mikrometre boyutları arasında değişiklik göstermektedir. Lipozomlar, biyogeçimli ve biyoparçalanan özellikteki lipit içerikleriyle hücre membran yapısına benzerlik göstermekle birlikte, benzerlik derecesi çeşitli kimyasal modifikasyonlarla artırılabilir. Bu özellikler, ilaç hedeflendirme çalışmalarında ve immün modülasyonunda yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır <sup>93, 94</sup>.

Tablo 4: Lipozom Hazırlanmasında Kullanılan Fosfolipitler <sup>92, 93</sup>

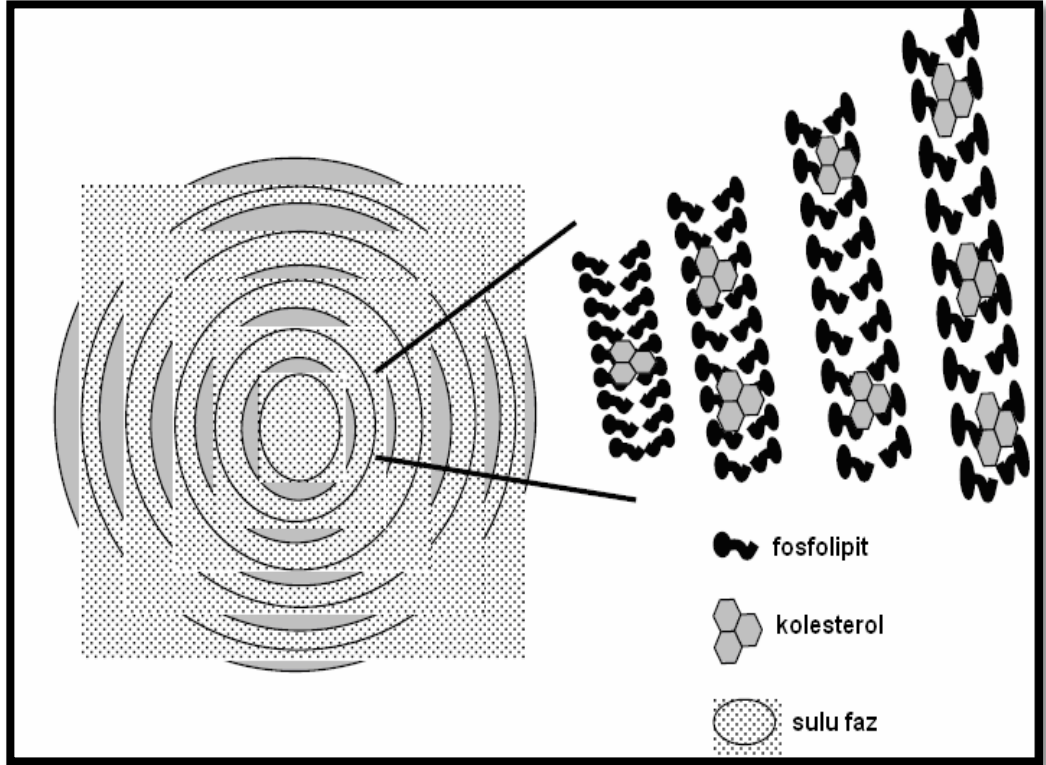
1. Kolin içeren fosfolipitler	Lesitin
	Sfingomiyelin
	Eter bağlanmış fosfatidilkolin
2. Yapısında doğal olarak fosfatidil bulunan fosfolipitler	Fosfatidilkolin(PC)
	Fosfatidiletanolamin(PE)
	Fosfatidilserin(PS)
	Fosfatidilgliserol(PG)
	Fosfatidilasit(PA)
3. Değişik yağ asitleri içeren fosfolipitler	Fosfatidilinozitol(PI)
	Lizolesitin
	Kardiyolipin



Şekil 11: Bazı fosfolipitlerin kimyasal yapılarının şematik gösterimi.

Lipozomlar, hapsedilen ilacı taşıyabilecek üç farklı bölgeye sahiptir. İlaç molekülü; lipofilik etkin maddeler fosfolipit tabakaya, hidrofilik etkin maddeler sulu kısma, peptid ve küçük proteinler ise su-lipit ara yüzeyine hapsedilmek suretiyle taşınabilmektedirler (Şekil 12). Bu sayede hem lipofilik hem dehidrofilik etkin maddeler hatta orta derecede lipofiliteye sahip etkin maddeler lipozom şeklinde formüle edilebilmektedir. <sup>90, 95, 96</sup>.





Şekil 12: Konvansiyonel çok tabakalı lipozomun şematik görüntüsü<sup>90</sup>.

#### 2.4.1. Lipozomların Avantajları

- Lipozomlar fosfolipit yapısında olduklarından, biyomembranlara benzerlik göstermektedirler. Bu sayede biyogeçimli ve biyoparçalanabilir özelliktedirler, immunojenite ve toksisite söz konusu değildir.
- Terapötik etkisini düşük dozlarla elde edilmesine olanak sağlamaktadırlar.
- Plazma etkin madde seviyesini istenen süre boyunca terapötik düzeyde tutabilmekte ve bu sayede dozlama aralığı uzatılmış olmaktadır.
- Yan ve toksik etkileri azaltabilirler veya tamamiyle ortadan kaldırabilmektedirler.

- Etkin maddenin enzimatik etkilerden korunmasını sağlamaktadırlar.
- Kısa yarı ömre sahip maddelerin yarılanma ömrünü uzatabilmektedirler.
- Hem lipofilik hem de hidrofilik özellikteki maddeleri taşıma özelliğine sahiptirler.
- İlacı hedeflendirmek için kullanılabilirler<sup>97</sup>.

#### **2.4.2. Lipozom – Hücre Etkileşimleri**

- Füzzyon; lipozomun en dış tabakasının hücre membranıyla birleşmesidir.
- Adsorbsiyon; lipozomun hücre yüzeyine sıkıca tutunmasıdır.
- Lipit değişimi; hücre membran yapısındaki lipitlerin, lipozom yapısında bulunan lipitlerle karşılıklı değişimidir.
- Endositoz; hücre yüzeyine temasta bulunan lipozomların fagositoz yoluyla hücre içine alınmasıdır.
- Hücre içine lipozom sızıntısı; hücre ve lipozomun birebir temasının sonucu olarak lipozomların hücre içine girişi söz konusu olur. Bu giriş lipozomların serum albumini ve lipoproteinler ile etkileşimi sonucunda meydana gelir<sup>98</sup>.

#### **2.4.3. Lipozomların Sınıflandırılması**

Lipozomlar bileşimlerine göre beş farklı sınıfa (Tablo 5), büyüklük ve tabaka içeriğine göre ise üç farklı sınıfa (Tablo 6) ayrılmaktadır.

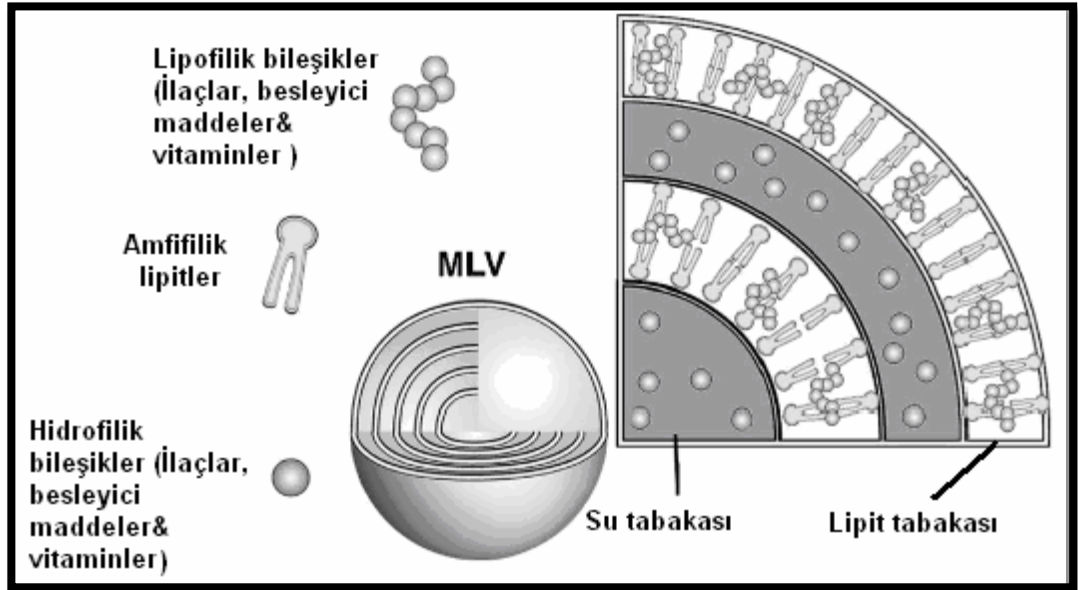
Tablo 5: Lipozomların yapısal özelliklerine göre sınıflandırılması <sup>99,100</sup>

Tip	Bileşim	Özellikler
1.Konvansiyonel Lipozomlar (CL)	Nötral veya negatif yüklü fosfolipitler ve kolesterol	Kısa yarı ömür Retikuloendotelyalsistem- RES tarafından hızla alınır) RES'e hedeflendirme için uygun doza bağlı farmakokinetik
2. pH-duyarlı Lipozomlar	Fosfatidil etanolamin (PE) veya dioleoil fosfatil etanol amin (DOPE) gibi fosfolipitler ayrıca kolesterol hemisüksinat (CHEMS) veya oleik asit (OA)	Zayıf bazların ve makromoleküllerin hücre içine taşınması için uygun dağılımı ve farmakokinetiği CL'ye benzer
3.Katyonik Lipozomlar	Katyonik lipitler DDAB (dioktodesil dimetilamonyumbromid), DOGS (dioktodesil amigdolislin spermin), DOSPA (2,3-dioleiloksi- N-[2(sperminkarboksiamido)etil]N,Ndimetil-1-propan aminyumtrifloroasetat)-,vb)	Negatif yüklü makromoleküllerin taşınması için uygun (DNA, RNA,vb) Yapısal olarak stabil değil Yüksek dozlardatoksik Lokal kullanımı sınırlı
4. Dolaşımda uzun süre kalan lipozomlar (LCL)	Nötral yüksek camsı geçiş sıcaklığına sahiplipitler Kolesterol+%5-10 PEG (poli etilen glikol)-DSPE (kuru katı polimer elektroliti), GM1 (galaktozil-Nasetilgalaktozaminil-(Nasetilnöroaminil)- galaktozilglikozil seramid) veya HPI (hidrojene fosfatidil inozitol)	Hidrofilik yüzey kaplama RES tarafından alımı zor Dolaşımda kalış süresi uzun Doza bağlı farmakokinetik
5. İmmunolipozomlar	Antikora bağlı CL veya LCL	Hücreye spesifik bağlanma Hedef doku çevresinde salım

Tablo 6: Lipozomların büyüklük ve tabaka içeriğine göre sınıflandırılması

99

Lipozom Çeşitleri	Büyüklük	Özellik
MLV Multilameler büyük kesecikler	> 0.1 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Çok tabakalıdır.</li> <li>• Uzun süre stabil kalır</li> <li>• RES tarafından hızla alınır</li> <li>• Hazırlanışı kolay</li> </ul>
LUV Büyük tek tabakalı kesecikler	> 0.1 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geniş tek tabakalıdır.</li> <li>• Su hacmi fazladır.</li> <li>• Hidrofilik ilaçlar için uygundur.</li> <li>• RES tarafından hızla alınır</li> </ul>
SUV Küçük tek tabakalı kesecikler	$\leq$ 0.1 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tek tabakalıdır.</li> <li>• Homojen dağılım gösterir</li> <li>• Termodinamik olarak stabil değildir.</li> <li>• Su hacmi düşüktür.</li> <li>• Yarılanma ömrü uzundur.</li> </ul>



Şekil 13: MLV'nin şematik görünüşü <sup>101</sup>.

#### 2.4.4. Lipozom Hazırlama Yöntemleri

##### 1. Mekanik dispersiyon:

- Elle çalkalama yöntemi: Cam balonun çeperlerinde oluşan lipit film, sulu faz eklendikten sonra elle çalkalanarak süspende edilir. Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.
- Çalkalamadan hazırlama: Lipit film kurduktan sonra, 15 dakika boyunca suyla doymuş azot püskürtülür, böylece çalkalamadan sulu ortamda şişmesi sağlanır. Bu yöntemle LUV'ler hazırlanır.
- Pro-lipozom hazırlama yöntemi: Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.
- Dondurup-kurutma yöntemi: Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.
- Lipit hidrasyon yöntemi
- Mikro-fluidizer yöntemi: Bu yöntemle mikroemülsifiye lipozomlar (MEL) hazırlanır.
- Sonikasyon yöntemi: Bu yöntemle SUV'ler hazırlanır. Probe sonikasyon, Sonikasyon banyosu
- Membran ekstrüzyon yöntemi

- Kurutulmuş-rekonstitüe lipozom hazırlama yöntemi (DRV)
- Dondurma-çözme sonikasyon yöntemi (FTS)
- pH ile indüklenen vezikül oluşumu
- Kalsiyum ile indüklenen füzyon: Bu yöntemle LUV'ler hazırlanır.

## 2. Solvan dispersiyon yöntemi

- Etanol enjeksiyon yöntemi: Bu yöntemle SUV'ler hazırlanır.
- Eter enjeksiyon yöntemi
- s/y emülsiyonu oluşturma yöntemi: Bu yöntemle hücre büyüklüğünde veziküller ve MVL'ler hazırlanabilir.
- Ters faz buharlaştırma yöntemi: Bu yöntemle REV'ler hazırlanabilir.

## 3. Deterjanda çözme yöntemi <sup>93, 100</sup>

### 2.4.5 Lipozomların Teşhis ve Tedavide Kullanılışı

Lipozomlar günümüzde teşhis ve tedavide geniş klinik kullanım alanlarına sahiptir <sup>93, 97, 100</sup>.

- Diagnostik Görüntüleme
- ❖ Bilgisayarlı tomografi: Suda ve yağda çözünen iyot bileşikleri kontrast bileşik olarak kullanılarak MLV, LUV ve MEL tipte lipozomlar hazırlanır.
- ❖ Manyetik Rezonans Görüntüleme: Paramanyetik elementler ya da lipozomal lipitler kontrast bileşik olarak kullanılarak MLV tipte lipozomlar hazırlanır.
- ❖ Radyonüklid Görüntüleme: Gama( $\gamma$ ) ışını ya da pozitron yayan maddeler kontrast madde olarak kullanılarak MLV tipte lipozomlar hazırlanır <sup>102</sup>.

- Göz Hastalıkları: Etkin maddelerin, lipozomdan salımı, gözyaşı gibi biyolojik sıvılardaki stabilitesi, lipozomla birleşim şekli, elektrostatik özellikleri, partikül büyüklüğü dağılımı ile lipozomların yüzey özellikleri gibi değişkenler optimize edilerek oftalmik hastalıkların tedavisinde gayet olumlu sonuçlar alınabilmektedir <sup>103</sup>.
- Kanser Tedavisi: Kanser tedavisinde kullanılan farklı etkin maddelerin lipozom formülasyonları hazırlanmakta ve bu sayede etkin maddenin tümör bölgesinde yoğunlaşması amaçlanmaktadır <sup>104, 105</sup>. Örneğin, beyin tümörlerinin tedavisinde ilaçları lipozom içine hapsedmek ve böylelikle kan-beyin engelini geçmelerini sağlamak üzere çalışmalar yapılmıştır <sup>106</sup>.
- Enzim Çalışmaları: Lipozom membranların hücre membranına olan benzerliği sayesinde enzimlerin hücre içine girişi sağlanabilmektedir <sup>107</sup>.
- Paraziter Hastalıklar: Lipozomlar özellikle mononükleer fagosit sisteminde lokalize enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır <sup>108</sup>.
- Aşılar: Katyonik lipozomlar DNA'nın ve protein yapısındaki aşılardan vücuda verilmesinde kullanılmaktadır. Bağışık yanıtın artırılması için de lipozom formülasyonları kullanılabilir <sup>109, 110, 111</sup>.
- Kozmetik Preparatlar: Lipozomların tabakalı yapısının vücuttaki doğal membranlara gösterdiği benzerlik sayesinde, hücre membranlarının akıcılık özellikleri değişerek, hücrelerle etkileşebilmektedirler. MLV tipi lipozomlar taşıdıkları etkin maddeleri 30 dakika içinde derinin stratum korneum, epidermis ve dermis tabakalarına hızlı bir şekilde geçirerek konvansiyonel preparatlara üstünlük sağlanmaktadır <sup>112</sup>.

- Gen Tedavileri: Lipozomlar gen tedavisinde terapötik aktiviteyi oldukça artırmaktadırlar <sup>113, 114</sup>. Lipozomların vücuda parenteral yol (intravenöz, intraperitoneal, intramusküler, subkütan), oküler yol, nazal yol, pulmoner yol, oral yol, transdermal yol, rektal ve vajinal yol gibi birçok şekilde verilebilmektedir <sup>97, 100</sup>.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Mikroorganizmalar

Bu tez çalışması kapsamında, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan inek sütlerinden izole edilmiş olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 suşu ve Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilen *Lactococcus lactis* ATCC 11454, *Lactococcus lactis* SIK83, *Micrococcus luteus* NCIMB8166 ve Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilen *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 suşları kullanılmıştır.

#### 3.2. Mikroorganizmaların Üretiminde Kullanılan Besiyerleri

Bakteriler M17, LB, MRS ve GM17 dik agar ortamlarında +4 °C'de ve M17, LB, MRS ve GM17 ortamlarına % 20 oranında steril gliserol ilave edilerek, -80 °C'de saklanmıştır <sup>115</sup>.

Çalışma materyalleri, gliserol ilave edilmemiş M17, LB, MRS ve GM17 broth ortamlarında ve haftalık transferler yapılarak korunmuştur.

**M17 Broth**

Polipepton	5	g
Fitopepton	5	g
Maya ekstraktı	2.5	g
Et ekstraktı	5	g
Laktoz monohidrat	5	g
Askorbik asit	0.5	g
B-gliserofosfat	19	g
Magnezyum sülfat	0.25	g
Distile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH  $7.2 \pm 0.2$ ' ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

**MRS Broth**

Kazein peptonu	10	g
Et ekstraktı	8	g
Maya ekstraktı	4	g
D-glukoz	20	g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2	g
Tween 80	1	g
Diamonyum hidrojen sitrat	2	g
Sodyum asetat	5	g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2	g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.04	g
Distile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH  $5.7 \pm 0.2$ ' ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

### **Lauria Bertani Broth**

Tripton	10	g
Maya ekstraktı	5	g
NaCl	10	g
Distile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH  $7.0\pm 0.2$ ' ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

### **Mueller Hinton Broth**

Et infüzyonu	2	g
Kazein hidrolizat	17.5	g
Nişasta	1.5	g
Destile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH  $7.4\pm 0.2$ ' ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

### **3.3. Çalışma Kullanılan Araç, Gereç ve Malzemeler**

Agaroz Jel Elektforezi Sistemi (Thermo Midicell Primo Electrophoretic Gel System)

Buz Makinası (Stratek)

Buzdolabı (Derin dondurucu Siemens)

Çalkalayıcı (Heidolph Unimax 1010)

Çeker ocak (Metisafe Fume Hold)

Distile Su Cihazı (Millipore Milli-Q Gard1)

Elektforez Güç Kaynağı (BioRad PowerPac HC)

Elektron mikroskobu (Carl Zeis EM 900)  
Etüv (Memmert)  
Jel Görüntüleme Sistemi (Bio Rad Versa Doc )  
Jel Görüntüleme Sistemi (EI Logic 200 Imaging System )  
Kuru Sıcaklık Bloğu (MS Major Science)  
Laminar Flow (Chemocell LRCX-UV)  
Laminar Flow (Clean Air Techniek B.V.)  
Liyofilizatör (Millrock)  
Manyetik Karıştırıcı (Thermolyne Cimarec)  
Orbital Karıştırıcı (Fine PCR SH30)  
Otoklav (Alp-Nüve)  
Partikül büyüklüğü ölçüm aleti (Smpatec GmbH-Partikel Technick)  
Pasteur Fırını  
pH Metre (Hanna H1221)  
Rotavapor (Buchi-Heidolph)  
Santifüj ( Beckman Coulter Allegra X-15R)  
Santrifüj (Mikro 22R Hettich Zentrifugen )  
Santrifüj (Ultra, Sigma 3K30)  
SDS-PAGE Sistemi (BioRad)  
Su banyosu (Buchi- Lab-line- Medingen)  
Terazi (Shimadzu BX3204)  
Termal Cycller (Techne- TC-512, England)  
Ultrasonik banyo (Brainsonic 221)  
Vakum Pompası (Laborbedorf Erich Wiegard)  
Vorteks (Labnet VX100)  
Zeta potansiyeli ölçüm aleti (Zetasizer-Nano ZS-Malvern)

### 3.4. Yöntem

#### 3.4.1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27' nin 16 S rDNA Yöntemi ile Tanısı

LL27 suşunun 16S rDNA dizi analizine göre tanımlanması için genomik DNA izolasyonu yapılmış, 16S ileri (5'-3') ve 16S geri (3'-5') primerleri kullanılarak 16S rDNA bölgeleri çoğaltılmıştır.

Genomik DNA izolasyonu için, 37 °C'de 18 saat süre ile geliştirilen aktif kültürden, MRS broth ortamında % 10 oranında inokülasyon yapılarak 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda bakteri kültürleri 10000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek üst sıvı ortamdaki uzaklaştırılmış ve 10-20 mg civarında hücre çökeltisi steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. 200 µL TE tamponunda çözülen örneklerin üzerine 400 µL liziz çözeltisi ilave edilerek 65 °C'de 10 dakika inkübe edilmişlerdir. Bu sürenin sonunda, 600 µL kloroform eklenen mikrosantrifüj tüplerine 10000 devirde 2 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüplerde oluşan üst faz, mikropipet yardımıyla yeni tüplere alınıp, 800 µL 10x çöktürme çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler düz bir zemin üzerinde 1-2 dakika süre ile yavaşça çevrildikten sonra 10000 devirde 2 dakika santrifüj edilip sıvı faz dökülmüştür. Örneklerin üzerine 200 µL 1.2 M NaCl çözeltisi aktararak, çökelti tamamen çözülene kadar karıştırılmıştır. Son aşamada ise mikrosantrifüj tüplerine 300 µL etil alkol ilave edilmiştir. Bu ortam -20 °C' de bir gece bekletildikten sonra, 15000 devirde 15 dakika santrifüj edilmek suretiyle genomik DNA çöktürülerek sıvı faz dökülmüş ve çökelti steril kabinde, oda sıcaklığında kurutulmuştur. 20 µL distile suda çözülen örnekler polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

### Liziz Çözeltisi

NaCl	250 mM
EDTA	10 mM
Tris HCl	10 mM
Lizozim	100 mg
Destile su	50 mL
pH 8.0 ± 0.02	

### TE Çözeltisi

Tris	0.121 g
EDTA	0.037 g
Destile su	100 mL
pH 8.0 ± 0.02	

Nisin üreticisi suştan izole edilen genomik DNA üzerindeki 16S rDNA bölgeleri 16S ileri ve 16S geri primerler kullanılarak 'thermal cycler' da çoğaltılmıştır <sup>10</sup>.

---

16S ileri primer dizisi 5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3'

16S geri primer dizisi 3' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 5'

---

Bu amaçla, 500 µL'lik PZR tüplerine toplam hacim 50 µL olacak şekilde, sırasıyla; 29.5 µL moleküler steril su, 10 µL 10xPZR tamponu, 1 µL deoksinükleotidtrifosfat (dNTP) karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP'lerden her birinin konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde hazırlanan karışım), 1 µL 16S ileri ve 1 µL 16S geri primer, 0.25 µL Taq

DNA polimeraz enzimi (Fermentas, Finland), 4 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub> ve 3 µL kalıp DNA ilave edilip, tüm bileşenler pipetle iyice karıştırılmıştır (Tablo 7).

PZR tüpleri, cihaza yerleştirilerek bir çevrimi 94 °C'de 90 saniye (çift zincirin açılması), 58 °C'de 1 dakika (primerlerin bağlanması), 72 °C'de 1 dakika (zincir uzaması) ile tanımlanan, toplam 30 çevrimlik PZR protokolü uygulanmıştır. Reaksiyonun başlangıcına çift zincirin açılması için 94 °C' de 5 dk, reaksiyonun sonuna ise zincir uzaması için 72 °C' de 10 dk ek süre eklenmiştir (Tablo 8) <sup>116</sup>.

Tablo 7 : Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı

<b>Madde adı</b>	<b>Hacim (µL)</b>
5X PZR Tamponu (Promega Green Go Taq Flexi Buffer)	10.0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM- Promega)	4.0 µL
10 mM dNTP karışımı	1.0 µL
Primer (ileri)	1.0 µL
Primer (geri)	1.0 µL
Taq DNA polimeraz (Promega Go Taq Polimeraz)	0.25 µL
Kalıp DNA	3.0 µL
dH <sub>2</sub> O	29.75 µL
Toplam hacim	50.0 µL

Tablo 8: PZR Koşulları

PZR Koşulları	
94 °C.....5 dk	
94°C.....90 sn (çift zincirin açılması)	} 30 Döngü
58 °C.....1 dk (primerlerin bağlanması)	
72 °C.....1 dk (zincir uzaması)	
72 °C.....10 dk	

Elde edilen PZR ürünleri % 1 agaroz içeren jelde yürütülmüş ve 16S rDNA gen bölgesini içeren 900 bazlık DNA fragmentlerinin büyüklükleri O'rangeruler 250 bç marker kullanılarak tanımlanmıştır.

PZR ürünlerinin dizi analizleri Refgen Biyoteknoloji (ODTÜ Teknokent/Ankara) tarafından yapılmıştır. Dizi analiz sonuçları, BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmış, tarama sonucu aranan dizi sırasının benzerlik yüzdesiyle belirlenmiştir.

### 3.4.2. Plazmid İçeriklerinin Tanımlanması

MRS broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat geliştirilen kültürlerden, 10 mL'lık MRS broth ortamlarına % 2.5 ve % 10 oranında inokülasyonlar yapılarak 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ikinci saatinden itibaren kültürlerin 650 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek, OD<sub>650</sub>= 0.6–0.8 arasında olan örneklerden plazmid izolasyonu yapılmıştır.



Santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri, 6000 devirde 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Hücre çökeltisi kurutulduktan sonra, 379 µL sakkaroz tamponunda çözülerek steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. 37 °C'ye ısıtılan bu ortama, 96.5 µL lizozim çözeltisi ilave edilerek 37 °C su banyosunda 7 dakika inkübe edilmiştir. 48.2 µL Tris-EDTA-1 uygulamasından sonra, mikrosantrifüj tüplerine % 20 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 27.6 µL aktararak karıştırılmıştır. Bu aşamada ortamda viskozitenin artışı lizozin başladığını göstermektedir. Lizozin tamamlanması için tüpler 37 °C su banyosunda 10 dakika süre ile tutulmuştur. Bu süre sonunda tüp içerikleri yüksek devirde 45 saniye karıştırılarak kromozomal DNA'nın kırılması sağlanmıştır. Ortama taze olarak hazırlanmış 3 N NaOH çözeltisinden 27.6 µL ilave edilmiş ve tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dakika süreyle yavaş bir şekilde çevrilerek, kromozomal DNA'nın alkali denatürasyonu gerçekleştirilmiştir. Denatürasyon aşamasının sonunda bu tüplere 49.6 µL Tris-HCL çözeltisi aktararak, 3 dakika süreyle yine düz bir zeminde karıştırılmıştır. Ortam pH'sının 8.5-9.0 arasına düşüşü ile nötralizasyonun sağlandığı belirlenmiştir. Bu ortamlara +4 °C'de tutulan 5 M NaCl çözeltisinden 71.7 µL ve % 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 µL ilave edilerek, +4 °C'de 15000 devirde 15 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüplerde oluşan üst faz, mikropipet yardımıyla yeni tüplere aktarılmış ve deproteinasyonun sağlanması için 700 µL kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi ilave edilmiştir. Bu ortamlar +4 °C'de 15000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek üst faz yeni tüplere alınmış ve eşdeğer hacimde etil alkol aktarılmıştır. Ekstraktlar -20 °C'de bir gece bekletildikten sonra, 15000 devirde 20 dakika santrifüj edilmek suretiyle plazmid DNA çöktürülmüş ve sıvı faz dökülerek çökeltiler şeffaflaşınca kadar kurutulmuştur. Kurutulan örnekler 20 µL Tris-EDTA-2 içerisinde çözülmüş ve son aşamada ortama RNaz A stok çözeltisinden 2 µL ilave edilerek 37 °C'de 45 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur <sup>117</sup>.

Plazmid DNA örneklerinin elektroforezi % 0.7 agaroz içeren jellerde yapılmıştır <sup>118</sup>. Yatay jel sistemleri için agaroz, kullanılan jel plaka sisteminin hacmine göre 30-35 mL ya da 150-200 mL tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde kaynar su banyosunda çözülmüştür. 45 °C'ye kadar soğuması beklenen ortam, elektroforez plakalarına dökülmüş ve jel tarakları yerleştirilerek 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin üzerini kapatacak hacimde tampon çözelti ilave edilmiş ve jelin zedelenmemesine dikkat edilerek, taraklar ortamdaki alınmıştır. 37 °C'de 45 dakika inkübe edilen DNA örnekleri su banyosundan alınarak 2 µL marker boya çözeltisi ile karıştırılmış ve mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına 20 µL aktarılmıştır. Elektroforez, 100 voltta 3 – 3.5 saat süreyle yapılmıştır. Marker boyanın jel sistemini terk etmesinden sonra elektrik akımı kesilmiş ve ortamdaki alınan jeller, 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren elektroforez tampon çözeltisinde 1 saat boyanmıştır. Bu süre sonunda jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışık altında incelenmiş <sup>119</sup> ve Kodak Gel Logic 200 jel dökümantasyon sisteminde (Eastman Kodak Co., USA) fotoğrafları alınmıştır.

### **Plazmid İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar**

#### Sakkaroz Çözeltisi

Tris	0.655 g
EDTA	0.0372 g
Sakkaroz	6.7 g
Distile su	100 mL
pH 8.0 ± 0.02	

#### Lizozim Çözeltisi

Tris	0.3 g
Lizozim	0.1 g
Distile su	10 mL
pH 8.0 ± 0.02	

#### Tris-EDTA-1

Tris	0.6 g
EDTA	9.31 g
Distile su	100 mL
pH 8.0 $\pm$ 0.02	

#### Tris-HCl

Tris-HCl	31.52 g
Distile su	100 mL
pH 7.0 $\pm$ 0.02	

#### SDS Çözeltisi

Tris	0.6 g
EDTA	0.74 g
SDS	20 g
Distile su	100 mL
pH 8.0 $\pm$ 0.02	

#### Tris-EDTA-2

Tris	0.121 g
EDTA	0.037 g
Distile su	100 mL
pH 7.5 $\pm$ 0.02	

#### % 3 NaCl ile Doyurulmuş Fenol Çözeltisinin Hazırlanışı

100 g fenol üzerine 20 mL distile su ve 3 g NaCl aktararak, 45 °C su banyosunda çözülmüştür. Ortama 0.1 g hidroksiguinolin ilave edilip, karıştırılarak oda sıcaklığında tutulmuştur.

### RNaz A Çözeltisi

5 mL steril distile su içerisinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat çözeltisinin pH'sı, asetik asit ile 5.0'a ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A (Sigma, Chem. Co., USA) ilave edilmiştir. Kaynar su içerisinde ortalama 5 dakika tutulduktan sonra, -20 °C'de saklanmıştır.

### **Elektroforezde Kullanılan Tamponlar**

#### Tris-Asetat Tamponu

Tris	4.84 g
Sodyum asetat	4.08 g
EDTA	0.37 mL
Distile su	1000 mL
pH 8.0 ± 0.02	

#### Marker Boya

Bromfenol mavisi	0.25 g
Sakkaroz	40 g
Distile su	100 mL

Plazmid büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler büyüklükleri bilinen ccc DNA marker' larının elektroforetik hareketlilikleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkidir (Şekil 14) yararlanılmıştır<sup>120, 121, 122</sup>. Marker ccc DNA moleküllerinin agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğrileri çıkarılmıştır. İstatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek, bakterilerden izole edilen plazmidlerin büyüklükleri saptanmıştır<sup>123, 124, 125</sup>.

$$\text{Eğrinin Eğimi (I)} = \frac{E - (G \cdot C)}{B - (G \cdot A)}$$

$$\text{Korelasyon Katsayısı (J)} = \frac{E - (G \cdot C)}{\sqrt{[D - (H \cdot C)] \cdot [B - (G \cdot A)]}}$$

Moleküler Büyüklük (W) = Antilog<sub>10</sub> [ I . ( α - G ) + H ]

X = Marker DNA moleküllerinin agaroz jel üzerindeki göç aralığı (mm)

Y = Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

$$A = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n$$

$$B = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + \dots + X_n^2$$

$$C = \log_{10}Y_1 + \log_{10}Y_2 + \log_{10}Y_3 + \dots + \log_{10}Y_n$$

$$D = (\log_{10}Y_1)^2 + (\log_{10}Y_2)^2 + (\log_{10}Y_3)^2 + \dots + (\log_{10}Y_n)^2$$

$$E = X_1 (\log_{10}Y_1) + X_2 (\log_{10}Y_2) + X_3 (\log_{10}Y_3) + \dots + X_n (\log_{10}Y_n)$$

$$G = \text{Ortalama X} = \frac{A}{N} \quad H = \text{Ortalama Y} = \frac{C}{N}$$

α = Moleküler büyüklüğü bilinmeyen plazmidlerin jel üzerinde göçü (mm)

Şekil 14: Moleküler büyüklükleri bilinen ccc DNA marker' larının elektroforetik hareketlilikleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişki.

### 3.4.3. Protein İçeriklerinin Tanısı

Mikroorganizmanın hücre duvarı protein içerikleri Gatti ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek tanımlanmıştır<sup>126</sup>. Suş kültürlerinden 10 mL MRS broth besiyerine % 1 oranında inokülasyon yapıp, 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri, 6000 devir/dk hızda 10 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj uygulaması ile tüplerde oluşan üst faz dökülüp, kalan hücre çökeltisi steril distile su ile 2 kez yıkanmıştır. Hücre çökeltisi kurutulduktan sonra üzerine 10X SDS yükleme çözeltisi aktarılmış ve 5 dakika kaynar su banyosunda tutulmuştur. Oda sıcaklığına kadar soğutulan örnekler 12000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj işlemi uygulandıktan sonra, üst sıvı steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Örneklerdeki protein varlığı spot test ile belirlendikten sonra, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sistemlerinde analizi yapılmıştır.

SDS-PAGE denemelerinde, Laemmli tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır<sup>127</sup>. Dikey jel sisteminde, 10 x 8 cm ve 10 x 7,5 cm ebatlarında iki adet cam plaka kullanılmıştır. Elektroforez plakaları % 70'lik etanol çözeltisi ile yıkanıp kurutulduktan sonra, Bio-Rad jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra jel tarağının 1 cm altına kadar gelecek şekilde % 12'lik ayırıcı jel dökülmüştür. Üzerine yaklaşık 1 mL distile su ilave edilen ayırıcı jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklendikten sonra ortamdaki su filtre kağıdı ile alınmıştır. Plakanın kalan kısmına, yağma jel dökülerek tamamlanıp tarak yerleştirilmiştir. Yağma jelin polimerizasyonu için 20 dakika kadar beklendikten sonra plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiş, elektrot tamponu ilave edilip tarak çıkarılmıştır. Hazırlanan örnekler jel kuyucuklarına mikropipet aracılığıyla 15 µL olacak şekilde aktarılmıştır. Jel sistemine; yağma jeldeki göç için 75

V, ayırıcı jelde göç için ise 100 V akım uygulanmıştır. Yaklaşık 2 saat ayırıcı jelde yürütülen örnekler jelin son kısmına ulaştığında, akım durdurulup sistemden çıkarılan jel, Commasie Brilliant Blue Çözeltisinde 45 dakika ve boya giderme çözeltisinde 45 dakika tutulmuştur. Beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek alınan jel fotoğraflarında proteinlerin moleküler büyüklükleri belirlenmiştir.

#### 10X SDS Yükleme Çözeltisi

Tris-HCL pH 6.8	0.5 M
SDS	2 g
Gliserol	10 mL
2-merkaptoetanol	2.5 mL
Bromfenol mavisi	50 mg

#### Ayırıcı Jel

Akrilamit (% 30) / bisakrilamit (% 8) (Sigma)	6 mL
4xTris-Cl / SDS (pH 8.8)	3.75 mL
Steril distile su	5.25 mL
% 10 Amonyum persülfat	50 µL
TEMED (N'N'N'N'-Tetra-Metilendiamin)	10 µL

Dökmeden hemen önce, % 10 amonyum persülfat ve TEMED ilave edilmiştir.



### Yığıma Jel

Akrilamit (% 30) / bisakrilamit (% 8) (Sigma)	0.65 mL
4xTris-Cl / SDS (pH 6.8)	1.25 mL
Steril distile su	3.05 mL
% 10 Amonyum persülfat	25 µL
TEMED	5 µL

Dökmeden hemen önce, % 10 amonyum persülfat ve TEMED ilave edilmiştir.

### 4xTris-Cl / SDS (pH 8.8)

Tris	91 g
Distile su	300 mL
pH 8.8 (1N HCl ile)	

Distile su ile toplam hacim 500 mL'ye tamamlanmış ve 2 g SDS ilave edilip çözülmüştür.

### 4xTris-Cl / SDS (pH 6.8)

Tris	6.05 g
Distile su	40 mL
pH 8.8 (1N HCl ile)	

Distile su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmış ve 0.4 g SDS ilave edilip çözülmüştür.

### Amonyum Persülfat (% 10)

Amonyum Persülfat	0.1 g
Distile su	1 mL

#### Tris-Glisin Tamponu (5x)

Tris	15.0 g
Glisin	94 g
SDS (% 10)	50 mL

Bu karışım 700 mL distile su içerisinde çözülmüş ve toplam hacim distile su ile 1000 mL' ye tamamlanmıştır.

#### Commasie Brilliant Blue Boya Çözeltisi

Commasie Brilliant Blue	1 g
Metanol	400 mL
Glasiyel Asetik Asit	100 mL
Distile su	500 mL

#### Boya Giderme Çözeltisi

Metanol	400 mL
Glasiyel asetik asit	100 mL
Distile su	500 mL

### **3.4.4. Nisin Üretimi ve Saflaştırılması**

#### **3.4.4.1. Nisin Üretimi**

Nisin üretimi için Abts ve arkadaşlarının kullandığı yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır<sup>128</sup>. *L. lactis* LL27 suşunun bir gecelik taze kültüründen %1 oranında, 1L MRS sıvı besiyeri içeren fermentöre inokülasyonu yapılarak 30 °C' de çalkalamalı olarak inkübasyona bırakılmıştır (Resim 2a ). Inkübasyon sonrasında MRS sıvı besiyerinde

üreyen kültür 5000×g' de 30 dk 4 °C' de santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Hücre içermeyen ve pH sı 5 olarak ölçülen üst faz milipor filtre ile vakum altında süzülerek steril edilmiştir (Resim 2b).



a



b

Resim 2: a) LL27 Suşunun İnkübasyonunun Yapıldığı Fermentör. b) Üst Fazın Sterilizasyonu

#### 3.4.4.2. Nisinin Saflaştırılması

Nisinin saflaştırılma işlemi iyon değişimi prensibine dayanan kromatografi yöntemi ile yapılmıştır. Kromatografi işlemi öncesinde, elde edilen üst faz steril distile su ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. Bu solüsyondaki peptitlerin ayrımı için Capto S kolon dolgu materyali kullanılmıştır. 1 g Capto S tartılarak üzerine 10 mL distile su eklenmiş, iyice karışması sağlanarak oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Bu şekilde dolgu materyalinin dengelenmesi sağlanmış ve kolon kapatılmıştır. 2.5 mL/dk akış hızı ile iyon değişimi kromatografisi için kullanılan Capto S kolonuna yüklenmiştir. Kullanılan büyük hacime bağlı olarak bu işlem 1 gece boyunca uygulanmıştır. Kolon, özgül olmayan bağlanmaların ortadan

kaldırılması için durağan faza gelinceye kadar 50 mM laktik asitle (pH 3) yıkanmıştır. Peptitler, NaCl konsantrasyonun kademeli olarak artırıldığı, 200 mM (Aşama I), 400 mM (Aşama II), 600 mM (Aşama III), 800 mM (Aşama IV) ve 1 M (Aşama V) NaCl, 1 mL/dk'lık bir akış hızı kullanılarak toplanmıştır (Resim 3).

Volume	Description	Parameters			
1	0.00	Collection Fractions within 1 time window(s) ending at 285.00 ml			
2	0.00	Lamp [UV Detector]	Turn ON		
3	0.00	Zero Baseline	UV Detector		
4	0.00	Isocratic Flow	A: 50mM LacticAcid	100%	Volume: 5.00 ml
			B: 50mM LacticAcid + 1M NaCl	0%	Flow: 1.00 ml/min
5	5.00	Load/Inject Sample	Sample		Volume: 100.00 ml
			Dynamic Loop	Auto Inject Valve	Flow: 1.00 ml/min
6	105.00	Isocratic Flow	A: 50mM LacticAcid	100%	Volume: 80.00 ml
			B: 50mM LacticAcid + 1M NaCl	0%	Flow: 1.00 ml/min
7	185.00	Isocratic Flow	A: 50mM LacticAcid	80%	Volume: 20.00 ml
			B: 50mM LacticAcid + 1M NaCl	20%	Flow: 1.00 ml/min
8	205.00	Isocratic Flow	A: 50mM LacticAcid	60%	Volume: 20.00 ml
			B: 50mM LacticAcid + 1M NaCl	40%	Flow: 1.00 ml/min
9	225.00	Isocratic Flow	A: 50mM LacticAcid	40%	Volume: 20.00 ml
			B: 50mM LacticAcid + 1M NaCl	60%	Flow: 1.00 ml/min
10	245.00	Isocratic Flow	A: 50mM LacticAcid	20%	Volume: 20.00 ml
			B: 50mM LacticAcid + 1M NaCl	80%	Flow: 1.00 ml/min
11	265.00	Isocratic Flow	A: 50mM LacticAcid	0%	Volume: 20.00 ml
			B: 50mM LacticAcid + 1M NaCl	100%	Flow: 1.00 ml/min
	285.00	End of Protocol			

Resim 3: Capto S kolonunda uygulanan kromatografi protokolü.

Aromatik amino asit içermemesi sebebiyle 280 nm' de nisini tespit etmek mümkün olmadığından protein elüsyonu için 215 nm' de absorban ölçülerek kontrol edilmiştir. Toplanan fraksiyonlardan (Resim 4) pik veren örneklerin antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Nisine duyarlı aktif *Micrococcus luteus* kültürü, Mac Farland 0.5 yoğunluğuna göre MHB sıvı besiyerinde hazırlanarak MHA katı besiyeri üzerine steril eküvyon yardımıyla yayılmıştır. Whatman kağıdından hazırlanan steril disk üzerine elde edilen fraksiyonlardan 60 µL emdirilerek MHA katı besiyeri üzerine koyulmuş ve 30 °C' de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün incelenen plaklarda inhibisyon zonu oluşturan fraksiyon ve/veya fraksiyonlar belirlenmiştir.

İnhibisyon zonu oluşturan fraksiyonların saflaştırılması için, C18 dolgu materyalinin kullanıldığı kolon hazırlanmıştır. 1 g C18 dolgu materyali tartılmış ve üzerine 10 mL etanol eklenmiştir. İyice karışması sağlandıktan sonra kolon içine konularak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve dengeye ulaşması sağlanmıştır. Hazırlanan kolona daha önce toplanan örnekler yüklenmiştir. Peptitler, %100 asetonitril ile 1 mL/dk akış hızıyla toplanmıştır (Resim 5). Elde edilen fraksiyonların antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemiyle araştırılmış ve inhibisyon zonu oluşan fraksiyon Trisin SDS-PAGE' te yrtlmek zere -20°C' de saklanmıştır.



Resim 4: Fraksiyon Toplama İşlemi.

1	0.00	Collection Fractions within 1 time window(s) ending at 93.00 ml			
2	0.00	Lamp (UV Detector)	Turn ON		
3	0.00	Zero Baseline	UV Detector		
4	0.00	Isocratic Flow	A: 50 mM lactic acid	100%	Volume: 5.00 ml
			B: Acetonitril	0%	Flow: 1.00 ml/min
5	5.00	Load/Inject Sample	Sample		Volume: 28.00 ml
			Dynamic Loop	Auto Inject Valve	Flow: 1.00 ml/min
6	33.00	Isocratic Flow	A: 50 mM lactic acid	100%	Volume: 25.00 ml
			B: Acetonitril	0%	Flow: 1.00 ml/min
7	58.00	Isocratic Flow	A: 50 mM lactic acid	0%	Volume: 40.00 ml
			B: Acetonitril	100%	Flow: 1.00 ml/min
	98.00	End of Protocol			

Resim 5: C18 Kolonunda Uygulanan Kromatografi Protokolü.

#### 3.4.4.3. Nisinin Trisin SDS-PAGE ile Tanısı

Elde edilen nisinin Trisin SDS-PAGE ile tanısı, Schägger tarafından önerilen, kütle aralığı 1-100 kDa olan proteinlerin ayrımını sağlayan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır <sup>129</sup>.

Elektroforez plakaları % 70'lik etanol çözeltisi ile yıkanıp kurutulduktan sonra, Bio-Rad jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra jel tarağının 1 cm altına kadar gelecek şekilde ayırıcı jel dökülmüştür. Üzerine yaklaşık 1 mL butanol ilave edilen ayırıcı jelin polimerizasyonu için yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra ortamdaki su filtre kağıdı ile alınmıştır. Plakanın kalan kısmına, yığma jel dökülerek tamamlanmış ve tarak yerleştirilmiştir. Yığma jelin polimerizasyonu için 30 dakika kadar beklendikten sonra plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Plakalar arasına katot tamponu ilave edilerek tarak çıkarılmıştır. Hazırlanan örnekler jel kuyucuklarına mikropipet aracılığıyla 30 µL olacak şekilde aktarıldıktan sonra tankın dış kısmına anot tamponu ilave edilmiştir. Jel sistemine; 20 mA akım

uygulanmıştır. Başlangıçta 45 V olan akım, 1 saat sonra 80 V, süre sonunda ise 135 V' a ulaşmıştır (Resim 6). Yaklaşık 2 saat yürütülen örnekler jelin son kısmına ulaştığında, akım durdurulup sistemden çıkarılan jel, fiksasyon çözeltisine alınarak 45 dakika orbital karıştırıcıda bekletilmiştir. Sürenin sonunda SYPRO® Ruby boyasına alınmış ve bir gece boyunca orbital karıştırıcıda bekletilmiştir. Ertesi gün boya giderme çözeltisinde 45 dakika tutulmuştur. Beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek alınan jel fotoğraflarında proteinlerin moleküler büyüklükleri belirlenmiştir.



Resim 6: Çeşitli süre sonlarında gözlenen voltaj değerleri.

#### 10X SDS Yükleme Çözeltisi

Tris-HCl pH 6.8	0.5 M
SDS	2 g
Gliserol	10 mL
2-merkaptoetanol	2.5 mL
Bromfenol mavisi	50 mg

### Ayırıcı Jel

Akrilamit (% 48) / bisakrilamit (% 3)	1.16 mL
3XTris-HCl (pH 8.9)	1.16 mL
Gliserol	0.5 mL
%20 SDS	0.025 mL
% 10 Amonyum persülfat	0.025 mL
TEMED (N'N'N'N'-Tetra-Metilendiamin)	0.003 mL
Steril distile su	1.114 mL

Dökmeden hemen önce, % 10 amonyum persülfat ve TEMED ilave edilmiştir.

### Yığma Jel

Akrilamit (% 30) / bisakrilamit (% 1)	0.167 mL
3XTris-HCl (pH 6.8)	0.3 mL
%20 SDS	0.005 mL
% 10 Amonyum persülfat	0.005 mL
TEMED	0.001 mL
Steril distile su	0.523 mL

Dökmeden hemen önce, % 10 amonyum persülfat ve TEMED ilave edilmiştir.

### Amonyum Persülfat (% 10)

Amonyum Persülfat	0.1 g
Steril Distile su	1 mL



### Katot Tamponu

Tris baz (0.1 M)	25 mL
Trisin (0.1 M)	4.479 g
SDS (% 20)	1.250 mL
Steril Distile Su	220.5 mL

Bu karışım 200 mL distile su içerisinde çözülmüş ve toplam hacim distile su ile 250 mL' ye tamamlanmıştır.

### Anot Tamponu

Tris-Cl (pH 8.9)	16.6mL
Distile Su	233.4 mL

### Fiksasyon Çözeltisi

Metanol	400 mL
Glasiyel asetik asit	100 mL
Distile su	500 mL

### Sypro Ruby Boya Çözeltisi

Sypro Ruby Boyası	1 mg
Metanol	400 mL
Glasiyel Asetik Asit	100 mL
Distile su	500 mL

### Boya Giderme Çözeltisi

Metanol	400 mL
Glasiyel asetik asit	100 mL
Distile su	500 mL

### **3.4.5. Nisinin Lipozomal Formülasyonları**

#### **3.4.5.1. Nisinin Lipozomal Formülasyonlarının Hazırlanması**

Antimikrobiyal etkisi araştırılacak olan lipozomlar aseptik şartlar altında, steril olarak hazırlanmıştır. Bunun için, formülasyonlarda steril serum fizyolojik çözeltisi kullanılmış ve hazırlanan lipozomlar 0.22 µm' lik membran filtreden süzölmüştür. Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan cam malzemeler iyice yıkandıktan sonra etanolden geçirilmiş ve bidistile su ile muamele edildikten sonra 180°C'de bir saat kuru ısı sterilizasyonu yapılmıştır.

Nisinin lipozomal formülasyonlarının hazırlanmasında kolesterol (CH), dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), dipalmitoilfosfatidil etanolamin (DPPE) kullanılmıştır. Yönteme göre; CH, DPPC ve DPPE armut tipli cam balona konulup üzerine nisin ilave edilmiştir. CH, DPPC, DPPE' nin çözünmesi için kloroform-metanol eklenmiştir. 44 °C de rotavaporda kloroform uçurularak kuru lipit film elde edilmiştir. Elde edilen kuru lipit filme serum fizyolojik ilave edilerek 5 dakika vortekslendikten sonra 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Böylece lipozom süspansiyonu elde edilmiştir. Bu işlem üç farklı içeriğe sahip 8 formülasyon için tekrarlanmıştır<sup>130</sup>.

Tablo 9: Lipozom Formülasyonları

Formülasyon	DPPC*	DPPC-E**	CH***	Nisin	İzotonik Solüsyon
Kontrol	15 mg	15 mg	15 mg	-	10 mL
1	15 mg	15 mg	15 mg	100 mg	10 mL
2	30 mg	15 mg	15 mg	100 mg	10 mL
3	15 mg	30 mg	15 mg	100 mg	10 mL
4	30 mg	30 mg	15 mg	100 mg	10 mL
5	15 mg	15 mg	30 mg	100 mg	10 mL
6	30 mg	15 mg	30 mg	100 mg	10 mL
7	15 mg	30 mg	30 mg	100 mg	10 mL
8	30 mg	30 mg	30 mg	100 mg	10 mL

\* Dipalmitoilfosfatidilkolin

\*\* Dipalmitoilfosfatidil etanolamin

\*\*\* Kolesterol

### 3.4.5.2. Lipozomal Nisin Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Hazırlanan lipozomların karakterize edilmesi amacıyla, partikül büyüklüğü ve dağılımı, partikül şekli, zeta potansiyeli incelenmiştir.

#### 3.4.5.2.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımı Laser-X Diffraction Particle Sizer aleti ile ölçülmüştür. Ölçümler, aletin kuvvet sisteminde az miktarda lipozomun bidistile su içinde dağıtılmasıyla elde edilen dispersiyon kullanılarak yapılmıştır.

Laser-X Diffraction Particle Sizer aletinin çalışma prensibi, partikül yüzeyine çarpan lazer ışığının optik özelliklerine (saçılma, absorpsiyon gibi) dayanmaktadır. Kırılma (difraksiyon), gelen lazer ışınının saçılma ve absorpsiyonundan sonra kalan kısmında gerçekleşmektedir. Sistemi oluşturan kısımlar optik eksen üzerinde; lazer kaynağı, ışın artırıcı, ölçüm noktası, lens odaklayıcılar ve çok noktalı fotodedektörler şeklinde sıralanmaktadır. Fotodedektördeki spektrum, ölçüm noktası ve lens odaklanma aralığı ile belirlenir. Fotodedektör, lensin odak uzaklığına göre ayarlanmıştır. Partikül büyüklüğü ve dağılımı incelenen numunenin, partikül özelliklerine bağlı olarak dairesel ve simetrik bir görüntü oluşmakta ve merkezden uzaklaştıkça enerji yoğunluğu azalmaktadır. Çok noktalı fotodedektör, 31 tane yarım çember şeklindeki bölgeyi ölçebilme özelliği taşımaktadır. Işık, yoğunluğu ile orantılı bir şekilde elektrik akımına dönüştürülüp, bu değer aletin bilgisayar programı ile sayısal hale getirilir, kaydedilir ve program tarafından değerlendirilir.

#### **3.4.5.2.2. Lipozomların Zeta Potansiyelleri**

Hazırlanan lipozomların Zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zeta Sizer aleti kullanılarak yapılmıştır. Bu aletin çalışma prensibi elektroforezdir. Elektroforez ortamda bulunan partiküllerin elektriksel alandaki hareketini ifade etmektedir. Elektroforetik hız, elektroforetik mobilite ile orantılı olup elektroforetik mobilite, ölçülebilir bir parametre özelliğini taşımaktadır. Elektroforetik mobilite de zeta potansiyeli ile ilişkilidir.

### 3.4.5.2.3. Lipozomların Şekli

Hazırlanan lipozomların şekli ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda bulunan elektromn mikroskopi laboratuvarında, taramalı elektron mikroskobu ile gözlenmiştir.

### 3.4.6. Lipozomal Nisinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması

Mikrodilüsyon yöntemi, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory Standards Institute) (CLSI) M100-S18 ve M27-A3 önerileri doğrultusunda yapılmıştır <sup>131,132</sup>.

Doksanaltı kuyucuklu steril mikrolakaların her kuyucuğuna, çok kanallı otomatik pipetle, bakteriler için 100 µL Mueller Hinton Broth (MHB), *C. albicans* için L-glutamin ile tamponlanmış pH:7 MOPS içeren RPMI–1640 besiyeri eklenmiştir.

Lipozomal nisinin stok solüsyonları Gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) için 78 µg/mL, Gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) ve *C.albicans* için 5000 µg/mL olarak hazırlanmıştır. Her bir formülasyon, mikrolakanın ilk kuyucuğuna 100 µL eklenmiştir. Çok kanallı otomatik pipet ile Gram pozitif bakteriler için en düşük konsantrasyon 1.2 µg/mL, Gram negatif bakteriler ve *C.albicans* için en düşük konsantrasyon 78 µg/mL olacak şekilde besiyeri ile dilüe edilmiştir.

Kalite kontrol amacıyla standart olarak ampisilin, gentamisin, flukonazol kullanılmış ve antibiyotiklerin stok solüsyonları sırasıyla 8 µg/ml, 8 µg/ml ve 64 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. İlk kuyucuklara 100 µL eklenmiş ve çift katlı dilüsyonları yapılmıştır.

Besiyeri kontrolü için nisin, antibiyotik ve mikroorganizma içermeyen kontrol kuyucukları; mikroorganizma kontrolü için ise nisin ve antibiyotik içermeyen kontrol kuyucukları kullanılmıştır.

Bakteriler için MHA, *C.albicans* için SDA kültür plaklarında üremiş olan kolonilerden 3-5 tanesi seçilip öze ile alınarak sırasıyla MHB ve SLM besiyerlerine aktarılmıştır. Sıvı besiyerlerindeki kültürler 37 °C' de 0.5 McFarland standardına ulaşıncaya kadar inkübe edilmiş, kültürün bulanıklığı, üzerine sıvı besiyeri eklenerek ayarlanmıştır. Ayarlanmış inokulum süspansiyonu hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde, inokülasyon sonunda her kuyucukta bakteriler için 10<sup>6</sup> CFU/mL, *C.albicans* için 2.5 x 10<sup>3</sup> CFU/mL olacak şekilde sıvı besiyerinde sulandırılmıştır. Mikroplakalardaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum süspansiyonlarından 10 µL inokülasyon yapılmıştır. Bakteri ve *C.albicans* inoküle edilmiş mikroplakalar, sırasıyla 37 °C' de 16–20 saat ve 35 °C' de 24–48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. MİK değeri, mikroorganizmaların mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu olarak saptanmıştır.

Standart mikrodilüsyon yönteminin yanısıra, lipozomal nisinin antimikrobiyal etkisinin araştırılması BioTimer (BT) Yöntemi ile de yapılmıştır<sup>133, 134</sup>. BT yönteminde de, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve

*Candida albicans* kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalardan *S. aureus*, *E. faecalis*, *E.coli* için fenol kırmızışı içeren glukozlu MHB, *C. albicans* için fenol kırmızışı içeren glukozlu SLM ve *P. aeruginosa* için resazurin içeren MHB besiyerleri kullanılmıştır. Kullanılan besiyerlerinin pH değerleri, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra, seyreltik NaOH ve HCl kullanılarak ayarlanmıştır.

### Fenol Kırmızılı MHB

Et zütü	2,0 g/L
Kazein Hidrolizatı	17,5 g/L
Nişasta	1.5 g/L
Fenol Kırmızışı	25 mg/L
Glikoz	10 g/L
Distile Su	1 L



Resim 7: Fenol Kırmızılı Sıvı Besiyeri

### **Fenol Kırmızılı SLM Besiyerinin İçeriği**

Et zütü	10 g/L
Glikoz	20 g/L
Fenol Kırmızısı	25 mg/L
Distile Su	1 L

### **Rezasurinli MHB Besiyerinin İçeriği**

Et zütü	2,0 g/L
Kazein Hidrolizatı	17,5 g/L
Nişasta	1.5 g/L
Resazurin	10 mg/L
Distile Su	1 L

Resazurin, besiyeri içerisine, otoklavdan çıkarıldıktan sonra 55 °C' ye kadar soğutulularak steril koşullarda eklenmiştir.

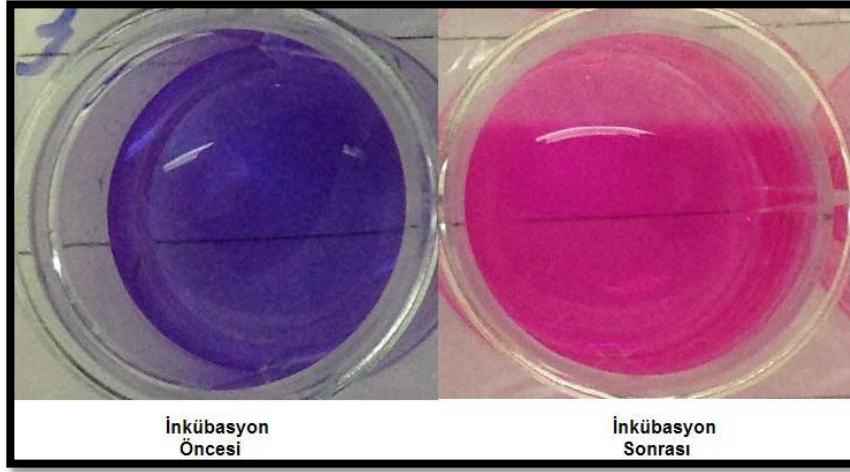
Yirmi dört kuyucuk içeren mikroplakaların ilk kuyucuklarına 1,8 mL diğer kuyucuklarına ise 1 mL renkli indikatör içeren besiyeri eklenmiştir. İlk kuyucuğa 0,2 mL mikroorganizma süspansiyonu eklenerek 2 mL' ye tamamlanmiştir. İlk kuyucuktan 1 mL alınarak 2. kuyucuğa, 2. kuyucuktan 1 mL alınarak 3. kuyucuğa eklenecek şekilde, mikroorganizma süspansiyonu çift katlı olarak dile edilmiş ve son kuyucuktan 1 mL dışarıya atılmıştır. Bu işlem tüm mikroorganizmalar için tekrarlanmiştir. Dilüsyon işleminden sonra her kuyucuktan 10 µL alınarak bakteriler için MHA, *C. albicans* için SDA besiyerlerine aktarılarak steril eküvyon ile petri yüzeyine yayılmıştır. Yirmidört kuyucuklu mikroplakalar ve katı besiyerleri inkübasyona bırakılmıştır.



İnkübatörün içerisine kurulan bir düzenek yardımıyla mikroplakaların dakikada bir fotoğrafı çekilmiş ve her bir kuyucuğun renginin, fenol kırmızılı besiyeri için kırmızıdan sarıya, resazurinli besiyeri için maviden pembeye döndüğü süre tespit edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda petrideki katı besiyerlerinde oluşan koloniler sayılarak besiyerinin renk değiştirdiği süreye karşı  $\log_{10}$ CFU grafiği çizilmiştir.



Resim 8: Fenol kırmızılı sıvı besiyerinin 24 kuyucuklu mikroplakadaki renk değişimi.



Resim 9: Resazurin içeren sıvı besiyerinin 24 kuyucuklu mikropalakadaki renk değişimi.

Lipozom formülasyonları hazırlanmış olan nisinin antimikrobiyal etkisinin araştırılması için de fenol kırmızısı içeren glukozlu MHB, fenol kırmızısı içeren glukozlu SLM ve resazurin içeren MHB besiyerleri kullanılmıştır. Bakteri inokülasyonu yapılacak olan mikrodilüsyon plakalarının her bir kuyucuğuna besiyerleri koyulduktan sonra stok solüsyonları hazırlanan nisinin farklı lipozom formülasyonları ilk kuyulara besiyeri ile eşit hacimde olacak şekilde eklenmiştir. Çift katlı dilüsyonu yapılan nisinin konsantrasyonu her defasında yarı yarıya azaltılmıştır.

Bakteriler için MHA, Candida için SDA kültür plaklarında üretilmiş olan kolonilerden 3-5 tanesi seçilmiş ve öze ile alınarak sırasıyla MHB ve SLM besiyerlerine aktarılmıştır. Sıvı besiyerlerindeki kültürler 37 °C'de 0.5 McFarland standardına ulaşıncaya kadar inkübe edilip, kültürün bulanıklığı, üzerine sıvı besiyeri eklenerek ayarlanmıştır. Ayarlanmış

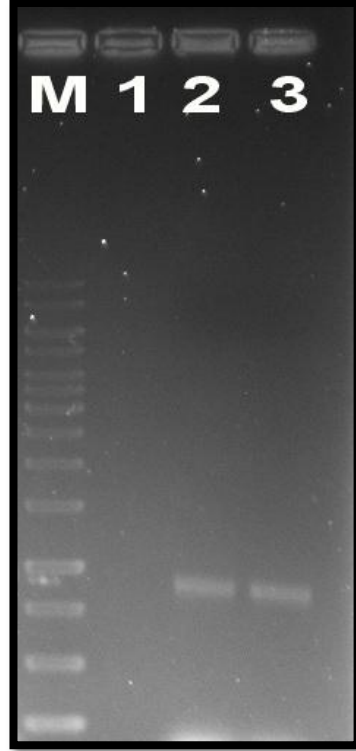
inokulum süspansiyonu hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde inokülasyon sonunda her kuyucukta bakteriler için  $10^6$  CFU/mL, Candida için  $2.5 \times 10^3$  CFU/mL olacak şekilde sıvı besiyerinde sulandırılmıştır.

Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra mikrolakalardaki her bir kuyucuğa 10 µL mikroorganizma süspansiyonundan inokule edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübatörün içerisinde bulunan aynı düzenek ile mikrolakaların dakikada bir fotoğrafı çekilmiş ve mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük nisin konsantrasyonu, renginin fenol kırmızılı besiyeri için kırmızıdan sarıya döndüğü, resazurinli besiyeri için maviden pembeye döndüğü süre belirlenerek not edilmiştir. Her bir mikroorganizmaya ait olan logCFU grafiği kullanılarak, mikroorganizma üremesini engelleyen en düşük nisin konsantrasyonuna sahip kuyucuktaki mikroorganizma sayısı tespit edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27' nin 16 S rDNA Yöntemi ile Tanısı

*L. lactis* subsp. *lactis* 16S rDNA primerleri ile yürütülen tanımlayıcı PZR ve DNA dizi analizleri sonucunda da (Şekil 1), çoğaltılan gen bölgesinin *L. lactis* subsp. *lactis* genomundaki bölge ile % 100 oranında homoloji verdiği BLAST analizleri ile saptanmıştır.



Resim 10: 16S rDNA bölgesinin agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi. (M: Marker-250 bç.,1:Negatif Kontrol, 2:LL27 (900 bç), 3: Pozitif kontrol- *L. lactis* ATCC 11454 (900 bç))

```
GTGCGGTCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTATTGCGTTAGCTGCGAT
ACAGAGAACTTATAGCTCCCTACATCTAGCACTCATCGTTTACGGCGT
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGAGCC
TCAGTGTCAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCTTTTCGCCACCGGTGTTCC
TCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTCTCCT
CTCCTGCACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGCATACAATGGTTGAGCC
ACTGCCTTTTACACCAGACTTAATAAACCACCTGCGCTCGCTTTACGC
CCAATAAATCCGGACAACGCTCGGGACCTACGTATTACCGCGGCTGC
TGGCACGTAGTTAGCCGTCCCTTTCTGGGTAGTTACCGTCACTTGAT
GAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACG
ATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGT CAGACTTTC
GTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTAT
GTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCTAATACAAC
GCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAA ACTTAAA ACT
TGTGTTTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTC
CCCCGCTCAAAGGCAGATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGC
TCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTTCAGCGCTCAACTTGCATGTA
TAGCACGCCGCACGTCTGCGCTCCGGGGCGAAAAATAATATATATAA
AAAACCACGCGGGGAAATGGGTGTGGGAGGGGCGAAGAAGAAGAG
GGGCACTACGGCATAAAGCAAATAGT
```

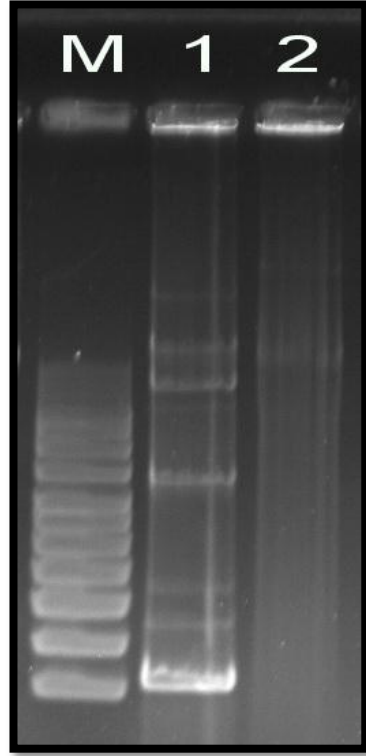
Şekil 15: 16S rDNA primerleri ile *L. lactis* subsp. *lactis*'in çoğaltılan gen bölgesi

#### 4.2. Plazmid İçeriklerinin Tanımlanması

*L. lactis* subsp. *lactis* LL 27 suşunda plazmid içerikleri Anderson ve McKay (1983) tarafından önerilen alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır<sup>117</sup>. Özellikle 30 kb' dan büyük plazmidlerde sıklıkla rastlanan stabilite sorunu göz önünde bulundurularak, plazmid izolasyonunda 5 mL ile 1 L arasında değişen başlangıç kültür hacimleri denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, *L. lactis* subsp. *lactis* LL 27 suşunda standart plazmid izolasyonunun yapılabildiği en düşük kültür miktarı 10 mL olarak tanımlanmış ve bu kültür hacmi analizlerde kullanılmıştır. Üç paralelli ve iki tekrarlı olarak yürütülen plazmid izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi çalışmaları sonucu, LL 27 suşunun 7 farklı plazmid içerdiği belirlenmiştir (Resim 11). Moleküler büyüklükleri bilinen ticari plazmid marker' larının jel göçü ölçülerek çıkarılan standart eğri esas alınarak, bu plazmidlerin büyüklükleri tablo 10' da belirtilmiştir.

Tablo 10: *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içerikleri

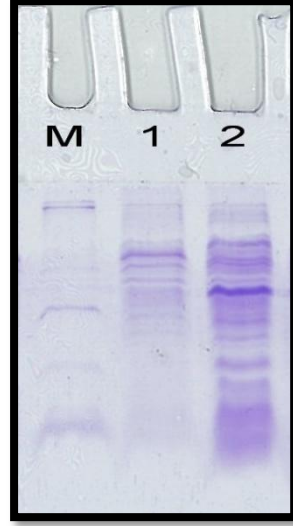
	Suş Numarası	
	LL 27	SIK 83
Plazmid Büyüklükleri	30.462 kb	-
	20.282 kb	-
	17.619 kb	-
	10.017 kb	-
	4.701 kb	-
	3.623 kb	-
	2.213 kb	-



Resim 11: *Lactococcus lactis* türüne ait suşların plazmid profilleri.  
(M: Marker-DNA Ladder Supercoiled Marker Sigma D5292, 1: *L. lactis* LL27 Suşu, 2: Negatif Kontrol *L. lactis* SIK83 Suşu)

#### 4.3. Protein İçeriklerinin Tanısı

SDS-PAGE denemelerinde, Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Yapılan elektroforez sonucunda *Lactococcus lactis* LL27 suşunun toplamda 12 adet protein bantı verdiği görülmüştür (Resim 12). Elde edilen protein bantlarının büyüklüğü marker proteinlerinin (Sigma USA; ürün kodu B2787) bağlı hareketlilik (Rf) değerleri ve moleküler büyüklüklerinin logaritmalarından yararlanılarak çizilen standart eğri kullanılmak suretiyle belirlenmiştir (Tablo 11).



Resim 12: *L. lactis* suşlarının hücre duvarı protein içerikleri. (M: Marker, 1: *L. lactis* SIK83 Kontrol Suş, 2: *L. lactis* LL 27)

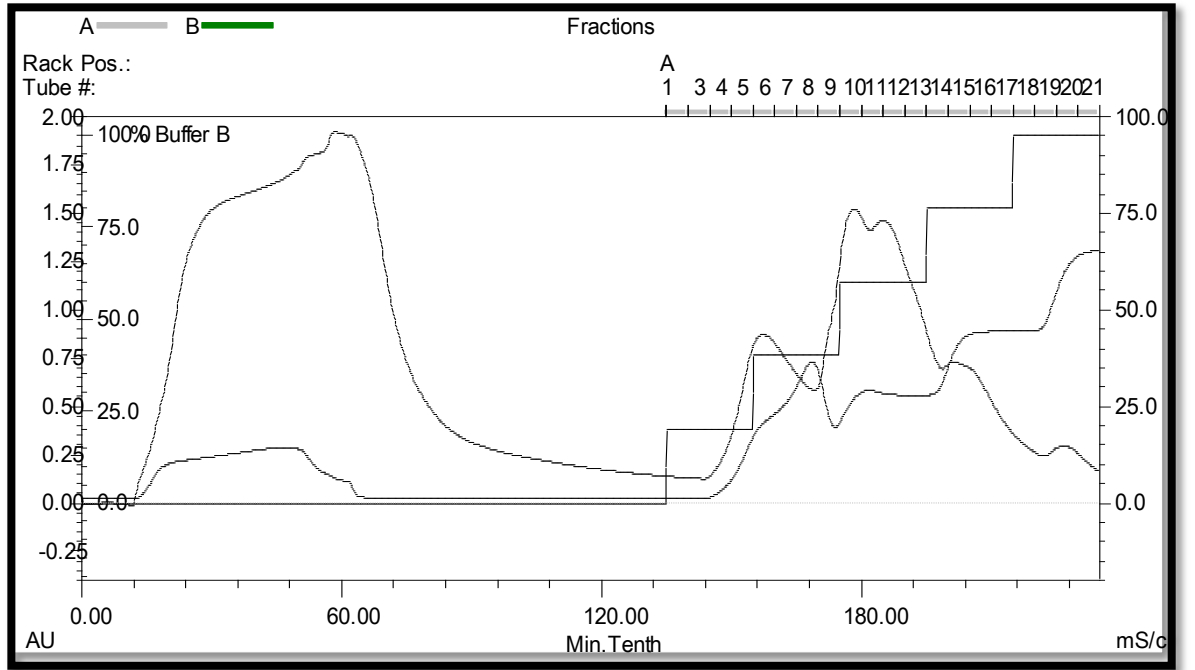
Tablo 11: *L. lactis* suşlarının hücre duvarı protein içerikleri

Marker (kD)	<i>L. lactis</i> SIK83 (kD)	<i>L. lactis</i> LL27 (kD)
180	101.75	104.12
116	73.76	91.59
97	66.20	71.60
58.1	58.64	63.50
39.8	49.73	59.72
29,	44.50	51.82
20.1	27.96	42.41
14.3	25.38	27.45
6.5		24.22
		20.48
		17.52
		14.40



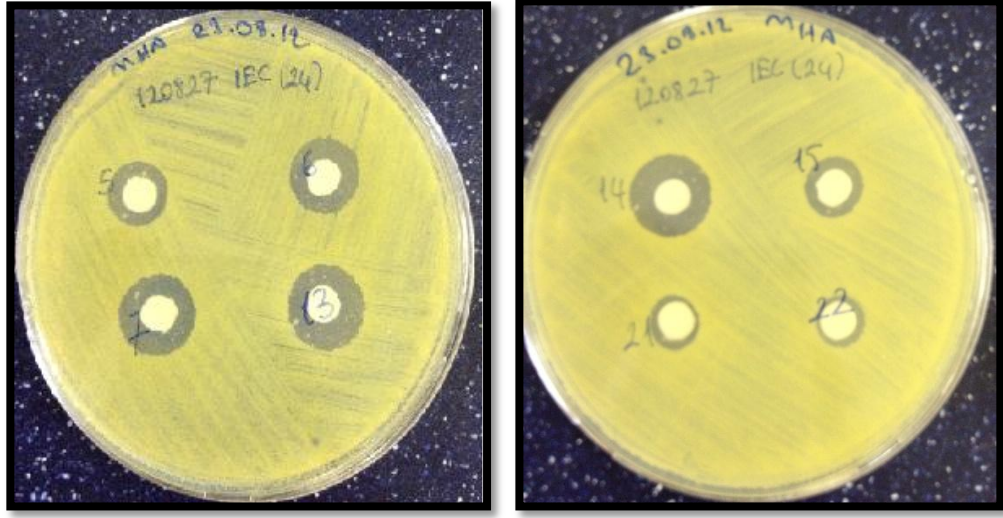
#### 4.4. Nisin Üretimi ve Saflaştırılması

Nisin üretimi için, *L. lactis* LL 27 suşunun MRS sıvı besiyerinde üretilmesi sonucunda elde edilen kültür üst fazı iyon değişimi (cIEX) kolonu kullanılarak, beş aşamalı NaCl elüsyonuna dayanan kromatografiye tabi tutulmuştur. Kromatografide elde edilen pik değerleri resim 13' de gösterilmiştir.



Resim 13: cIEX Kromatografide Oluşan Pik Değerleri.

Elde edilen piklerin toplandığı fraksiyonların, nisine duyarlı *Micrococcus luteus* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesine disk difüzyon yöntemiyle bakılmış (Resim 14) ve sonuçları tablo 12' de belirtilmiştir.

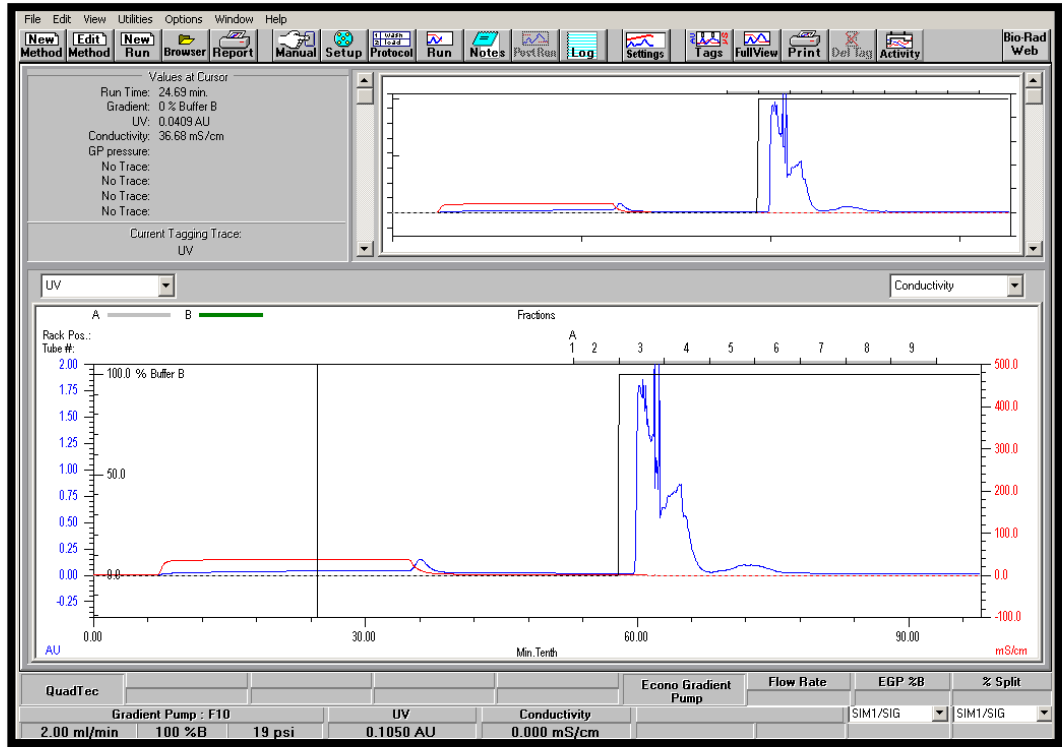


Resim 14: Antimikrobiyal aktivite gösteren fraksiyonlar.

Tablo 12: cLEX Fraksiyonlarının İnhibisyon Zon Çapları

Fraksiyon Numaraları*	Zon Çapı (mm)
5	11 mm
6	14 mm
7	12 mm
8	14 mm
9	11 mm
13	16 mm
14	16 mm
15	13 mm
16	10 mm
Pozitif Kontrol (Üst Faz)	11 mm
Negatif Kontrol (Kolona Tutunmayan Üst Faz)	Zon Oluşmadı

Gözlenen pik değerlerine göre antimikrobiyal aktivite gösteren fraksiyonlardan 5 ve 6 numaralı fraksiyonlar, 7,8 ve 9 numaralı fraksiyonlar ve 12, 13, 14, 15 ve 16 numaralı fraksiyonlar birleştirilerek C18 kolonuna yüklenmiştir. Kolonun asetonitril ile elüsyonu sonucu elde edilen pik değerleri resim 15' de gösterilen şekildedir.



Resim 15: C18 Kolondan Elde Edilen Pik Değerleri.

Resimde görülen pik değerlerinden elde edilen sekiz adet fraksiyonun nisine duyarlı *M. luteus* suşuna karşı disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve oluşan inhibisyon zon çapları tablo 13' de belirtilmiştir. (Resim 16)

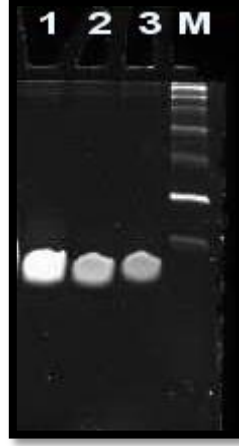
Tablo 13: C18 Fraksiyonlarının İnhibisyon Zon Çapları

<b>cIEX Kolon Fraksiyon Numaraları</b>	<b>C18 Kolon Fraksiyon Numaraları</b>	<b>İnhibisyon Zon Çapı (mm)</b>
5-6	2,3,4,5,6,7,8,9	Zon Yok
7,8,9	2,3,4,5,6,7,8,9	Zon Yok
12,13,14,15,16	2	3 mm
	3	19 mm
	4,5,6,7,8,9,	Zon yok



Resim 16: C18 fraksiyonlarının oluşturduğu inhibisyon zon çapları.

Saflaştırması yapılan nisinin moleküler büyüklükleri, trisin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforez (Trisin-SDS-PAGE) sistemi kullanılarak belirlenmiştir (Resim 17) <sup>129</sup>.



Resim 17: Nisinin Trisin SDS-PAGE ile gösterilmesi. 1: Ticari Nisin (Sigma), 2: 2 numaralı fraksiyon, 3: 3 numaralı fraksiyon. M: Marker (180,116,97,58.1,39.8, 29, 20.1, 14.3, 6.5-kD)

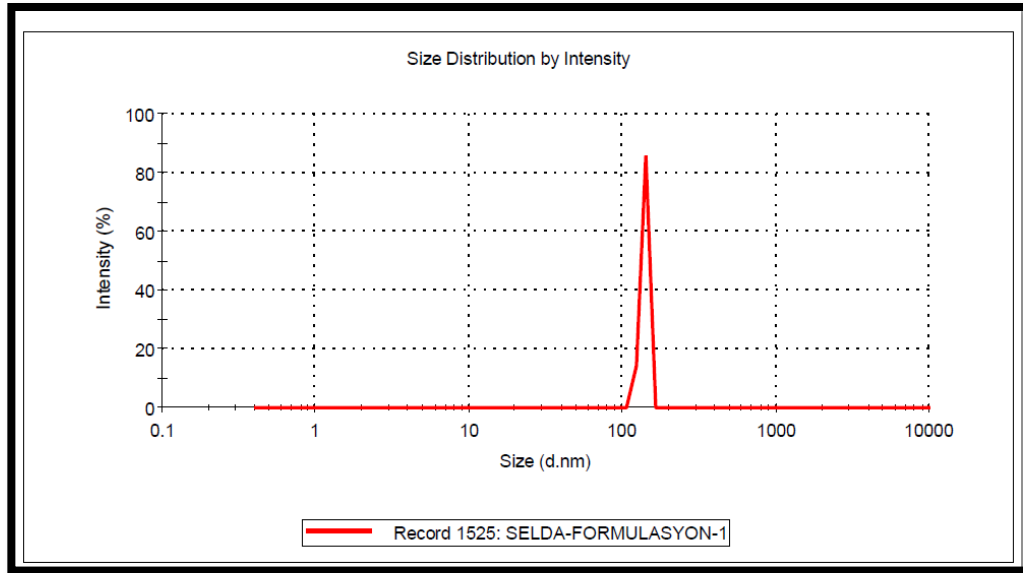
#### **4.5. Nisinin Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması**

##### **4.5.1. Lipozomların Karakterizasyonu**

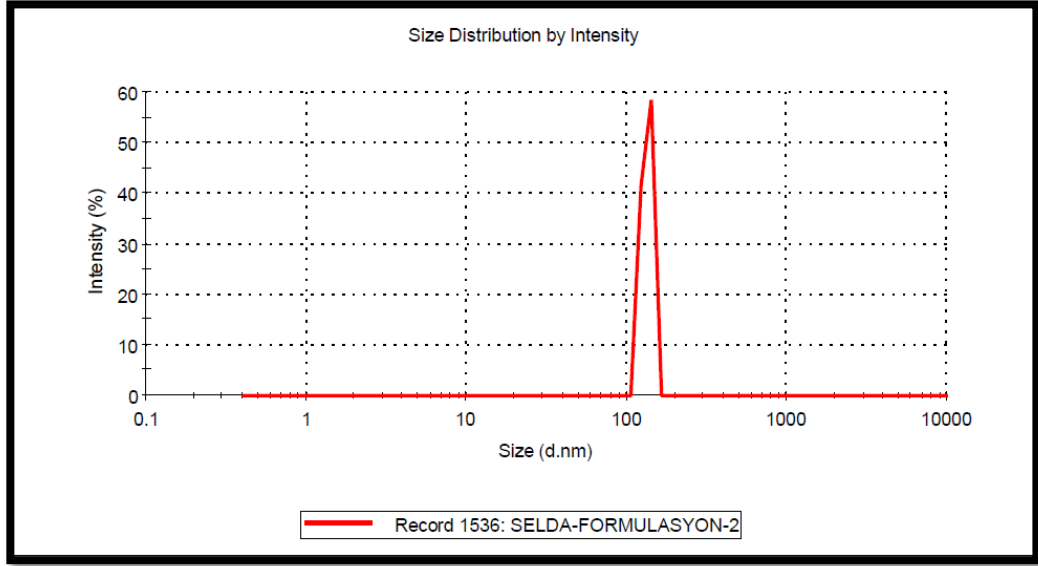
Lipozomların karakterizasyonuna ait bulgular tablo 14 ve tablo 15' te ve resim 18-35' te belirtilmiştir.

Tablo 14: Lipozom formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

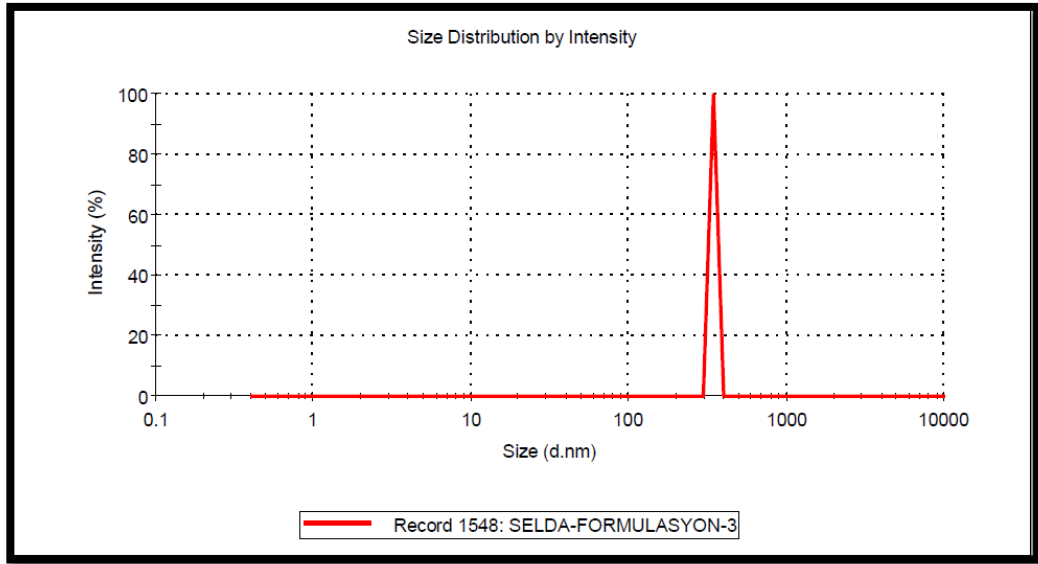
Formülasyon	Ortalama çap ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ S.S
1	139 $\pm$ 0.01
2	134 $\pm$ 0.63
3	342 $\pm$ 0.09
4	184 $\pm$ 0.05
5	709 $\pm$ 0.08
6	98 $\pm$ 0.05
7	106 $\pm$ 0.01
8	307 $\pm$ 0.06
Boş lipozom	45,5 $\pm$ 0.02



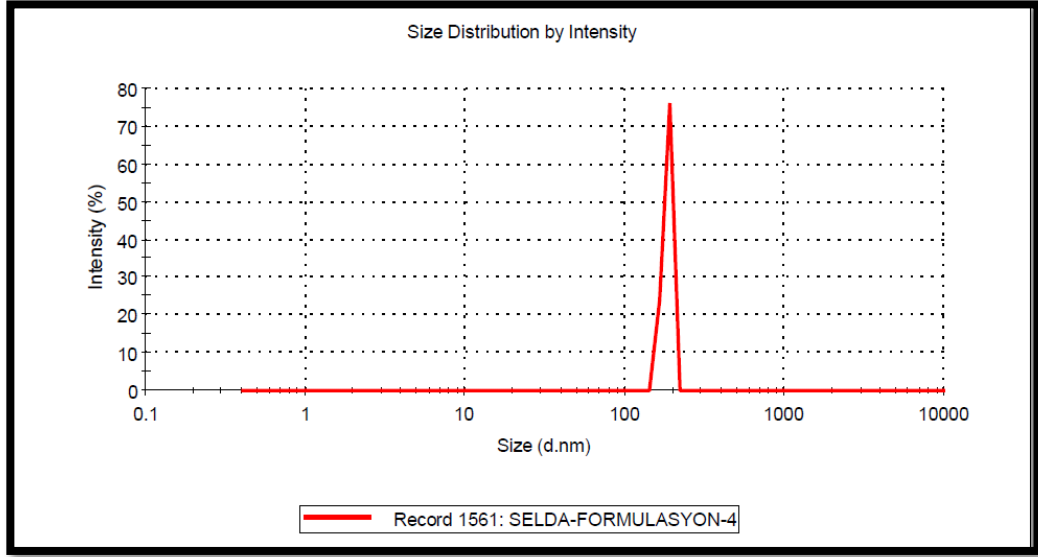
Resim 18: Formülasyon 1' in partikül büyüklüğü.



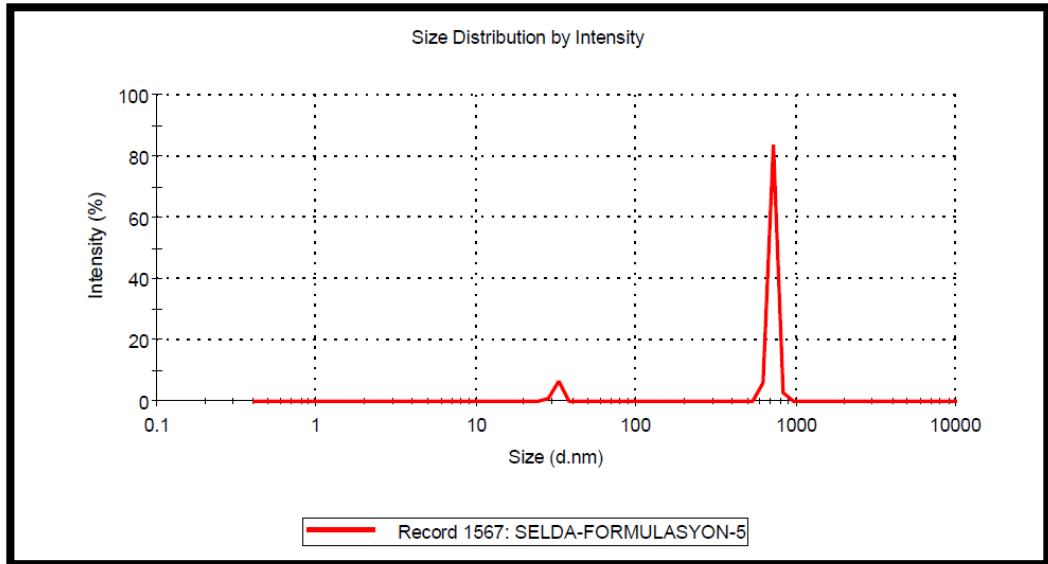
Resim 19: Formülasyon 2' nin partikül büyüklüğü.



Resim 20: Formülasyon 3' ün partikül büyüklüğü.

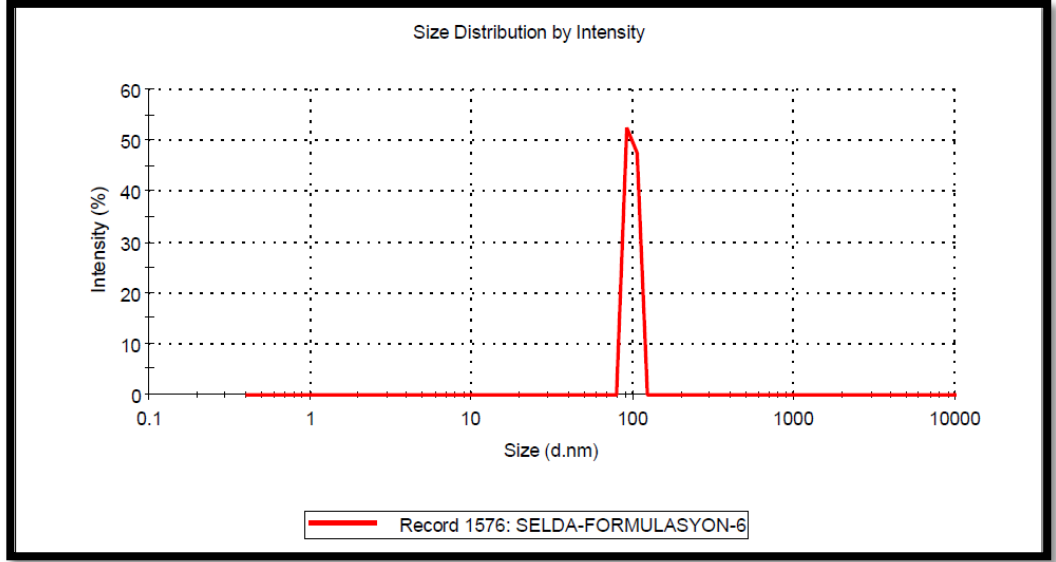


Resim 21: Formülasyon 4' ün partikül büyüklüğü.

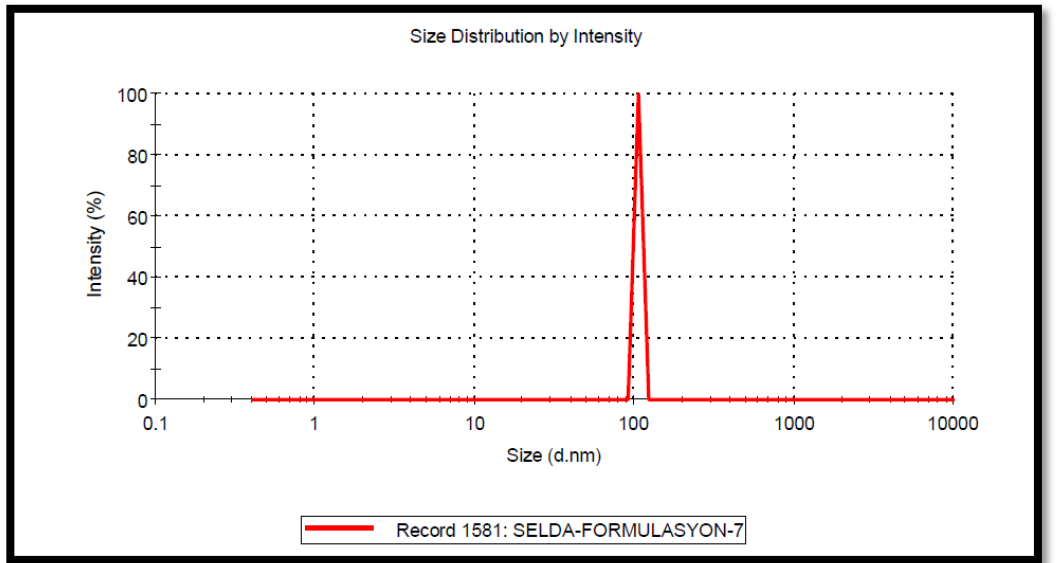


Resim 22: Formülasyon 5' in partikül büyüklüğü.

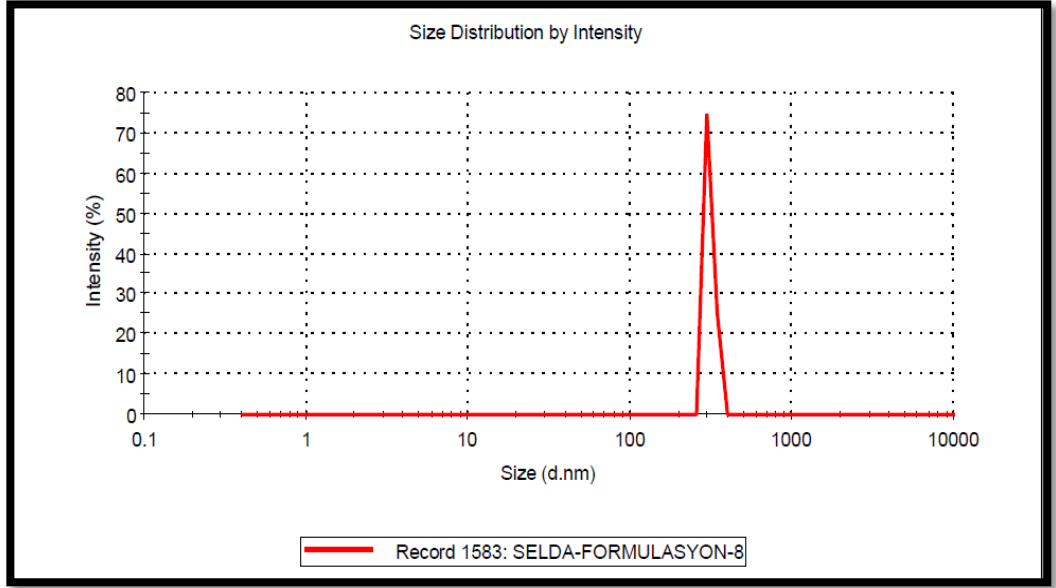




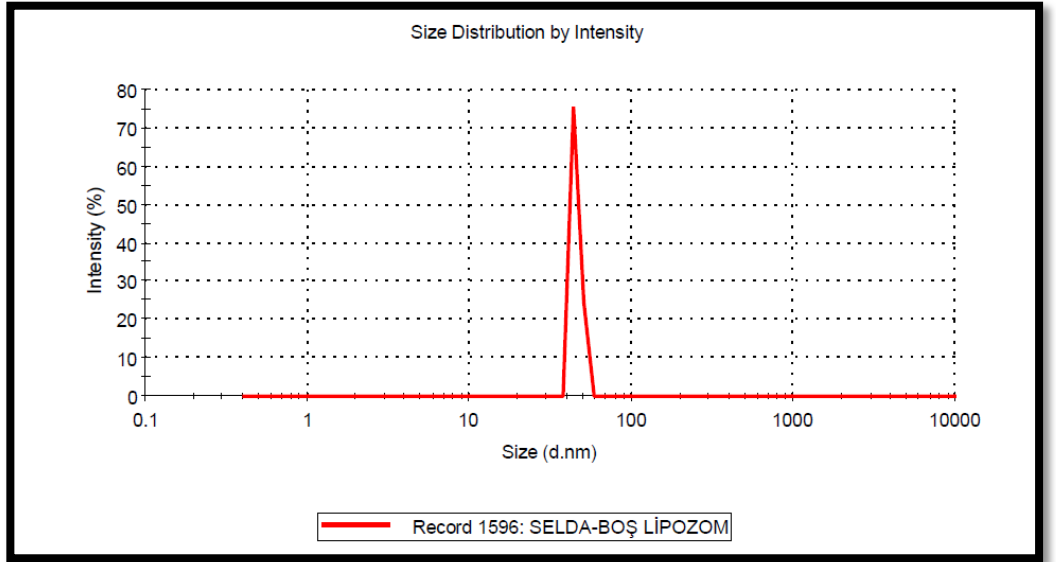
Resim 23: Formülasyon 6' nın partikül büyüklüğü.



Resim 24: Formülasyon 7' nin partikül büyüklüğü.



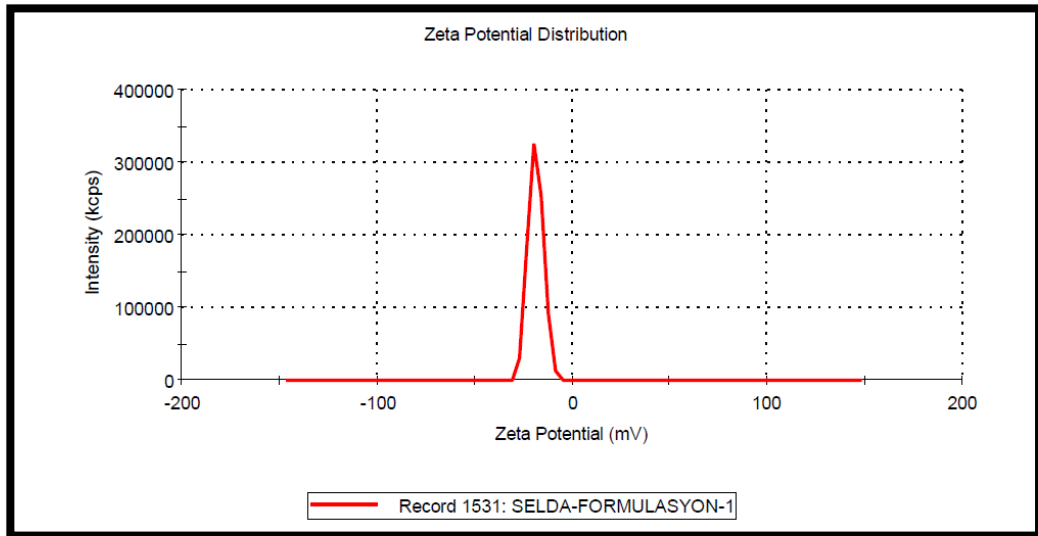
Resim 25: Formülasyon 8' in partikül büyüklüğü.



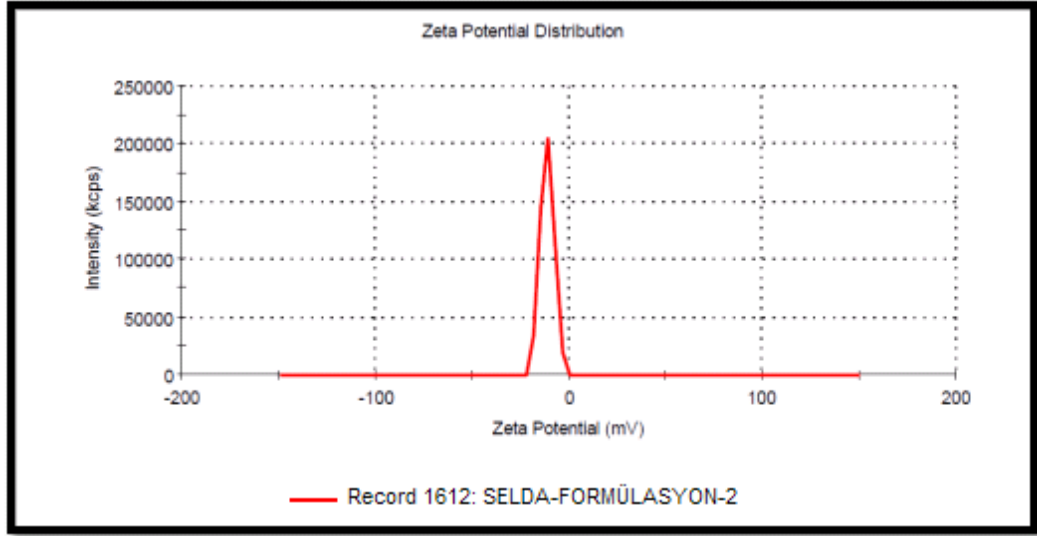
Resim 26: Boş lipozom formülasyonunun partikül büyüklüğü.

Tablo 15: Lipozom formülasyonlarının zeta potansiyelleri

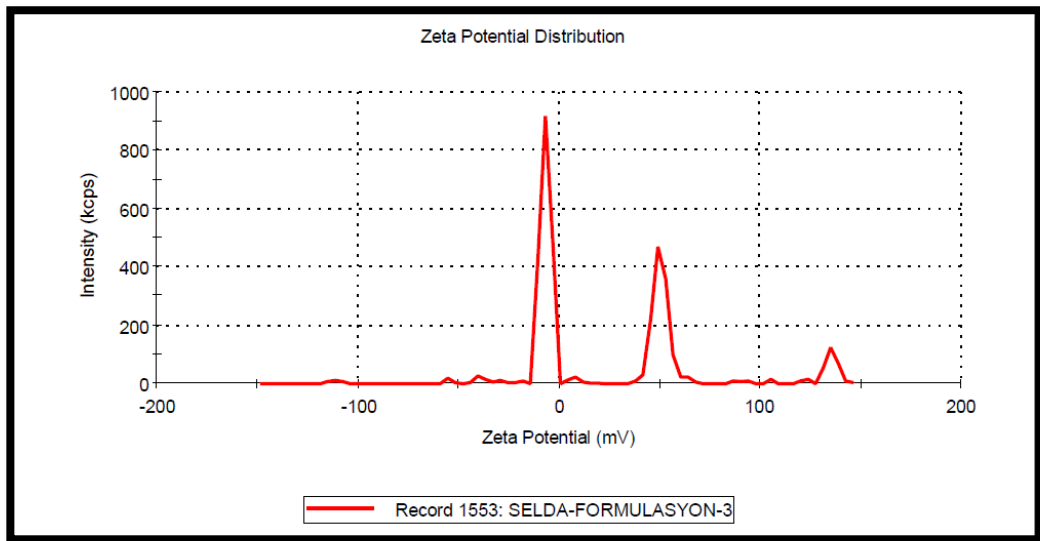
Formülasyon	Zeta Potansiyeli (mV) $\pm$ S.S
1	-18.6 $\pm$ 0.20
2	-12.2 $\pm$ 0.41
3	-6.82 $\pm$ 0.60
4	-10.7 $\pm$ 0.20
5	-11.1 $\pm$ 0.00
6	-13.0 $\pm$ 1.01
7	-18.0 $\pm$ 0.10
8	-9.52 $\pm$ 0.49
Boş Lipozom	-23.7 $\pm$ 0.30



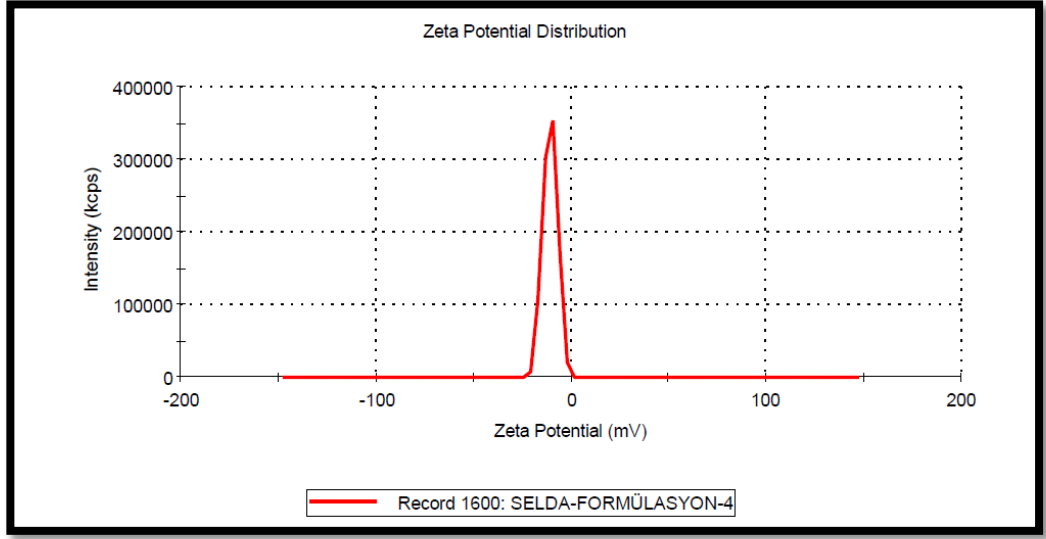
Resim 27: Formülasyon 1' in zeta potansiyeli.



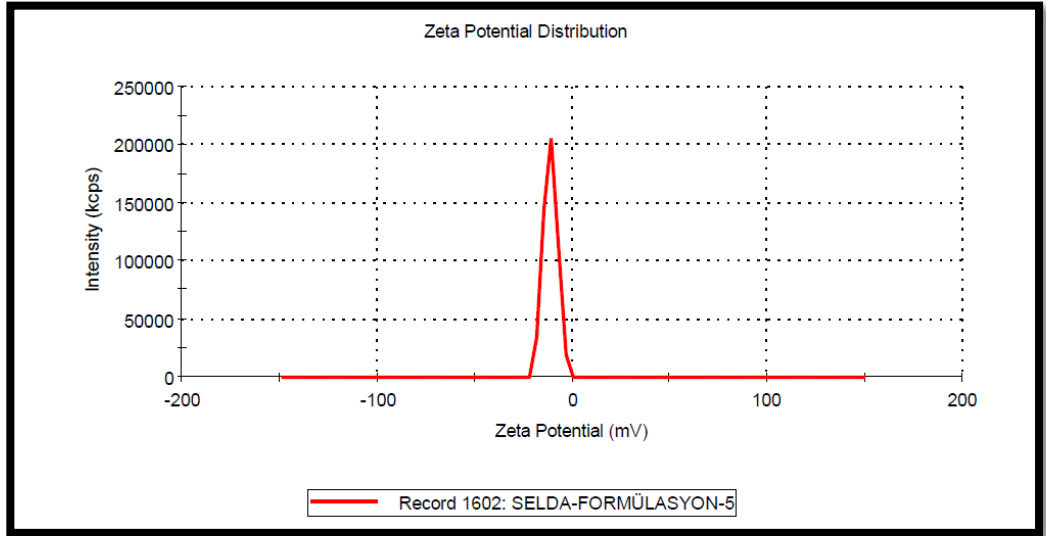
Resim 28: Formülasyon 2' nin zeta potansiyeli.



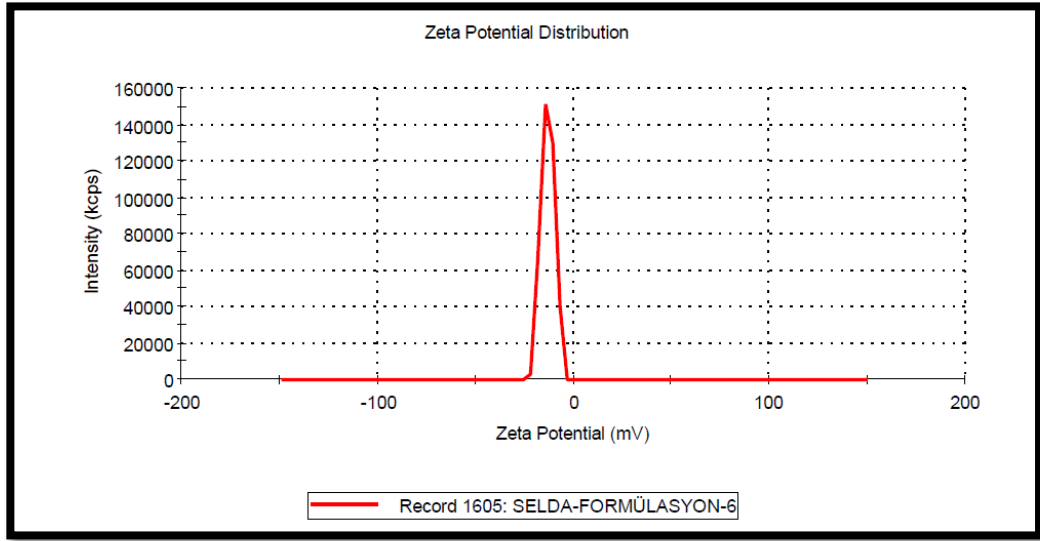
Resim 29: Formülasyon 3' ün zeta potansiyeli.



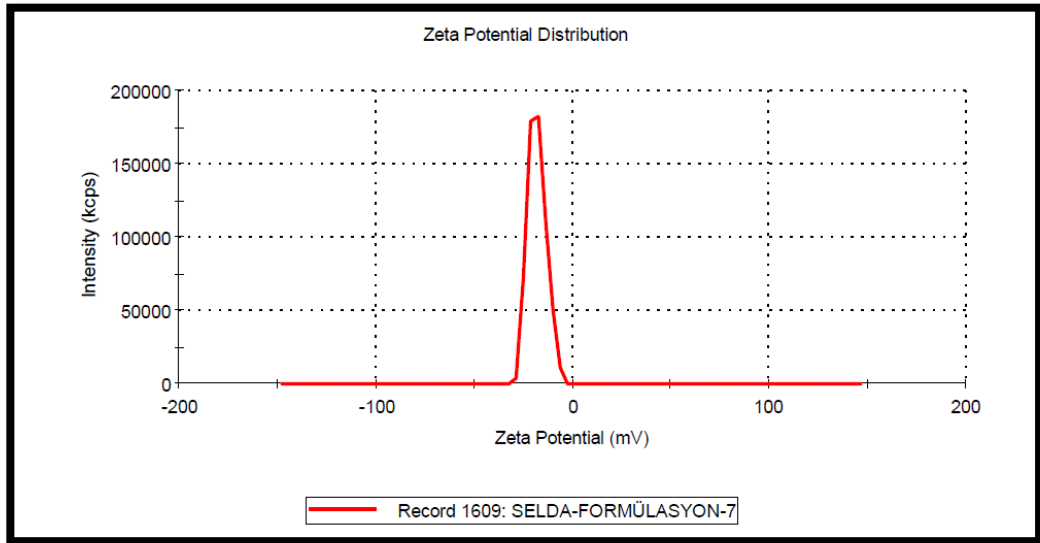
Resim 30: Formülasyon 4' ün zeta potansiyeli.



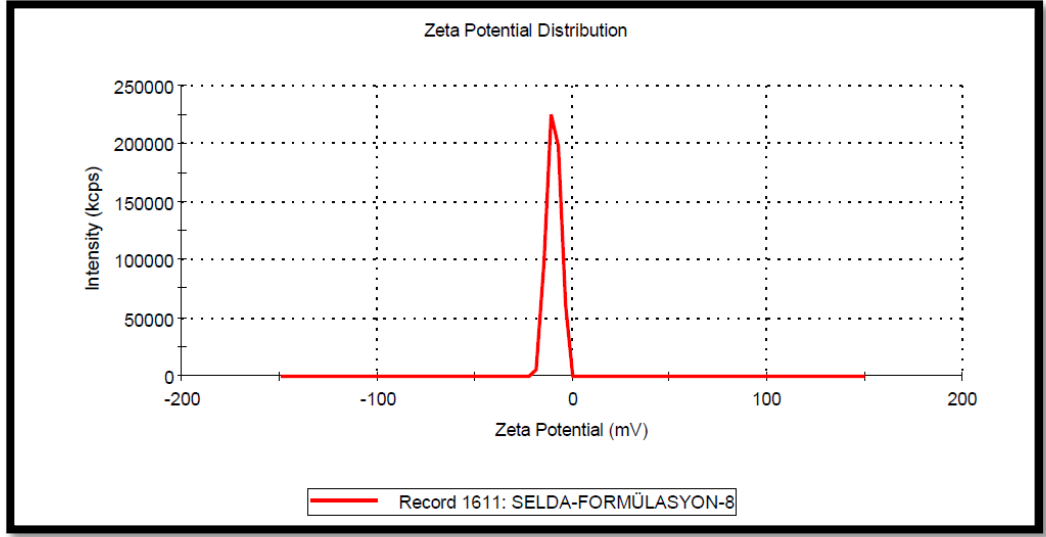
Resim 31: Formülasyon 5' in zeta potansiyeli.



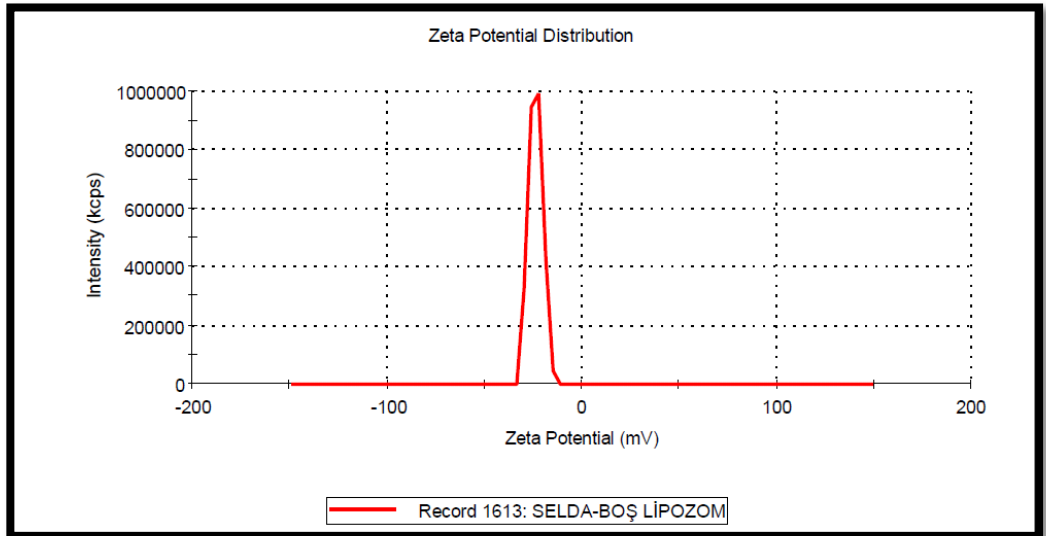
Resim 32: Formülasyon 6' nın zeta potansiyeli.



Resim 33: Formülasyon 7' nin zeta potansiyeli.



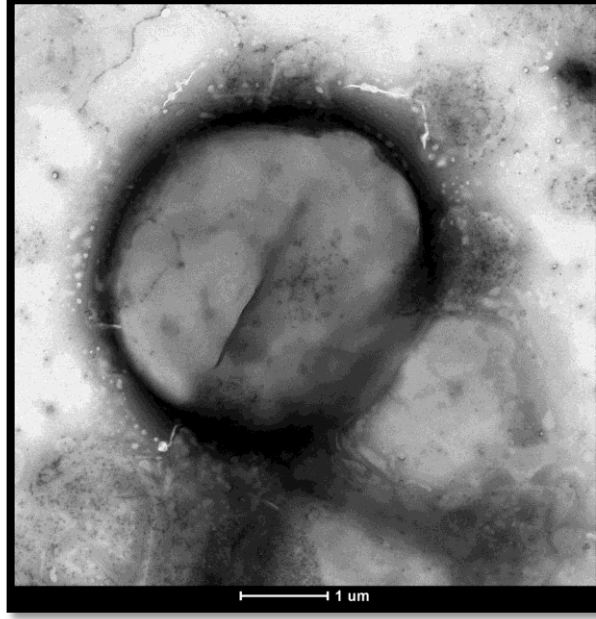
Resim 34: Formülasyon 8' in zeta potansiyeli.



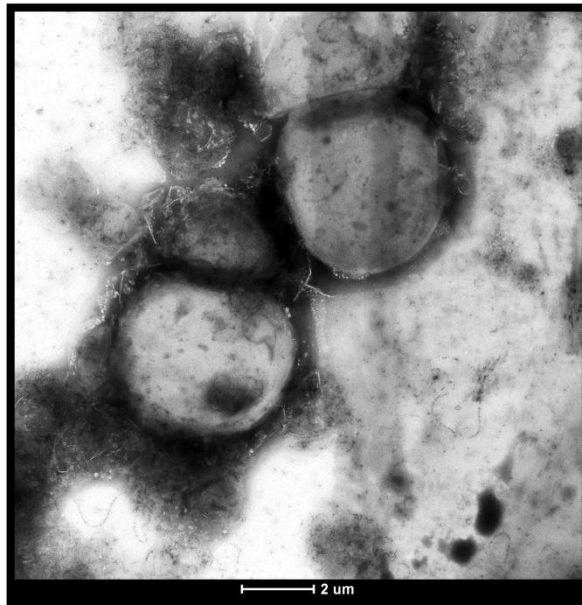
Resim 35: Boş lipozom formülasyonunun zeta potansiyeli.

#### 4.5.2. Lipozomların Şekli

Lipozomların elektron mikroskobu görüntüleri resim 36 ve 37’ de görülmektedir.



Resim 36: Boş lipozomun elektron mikroskobu görüntüsü.



Resim 37: Nisin içeren lipozomun elektron mikroskobu görüntüsü.



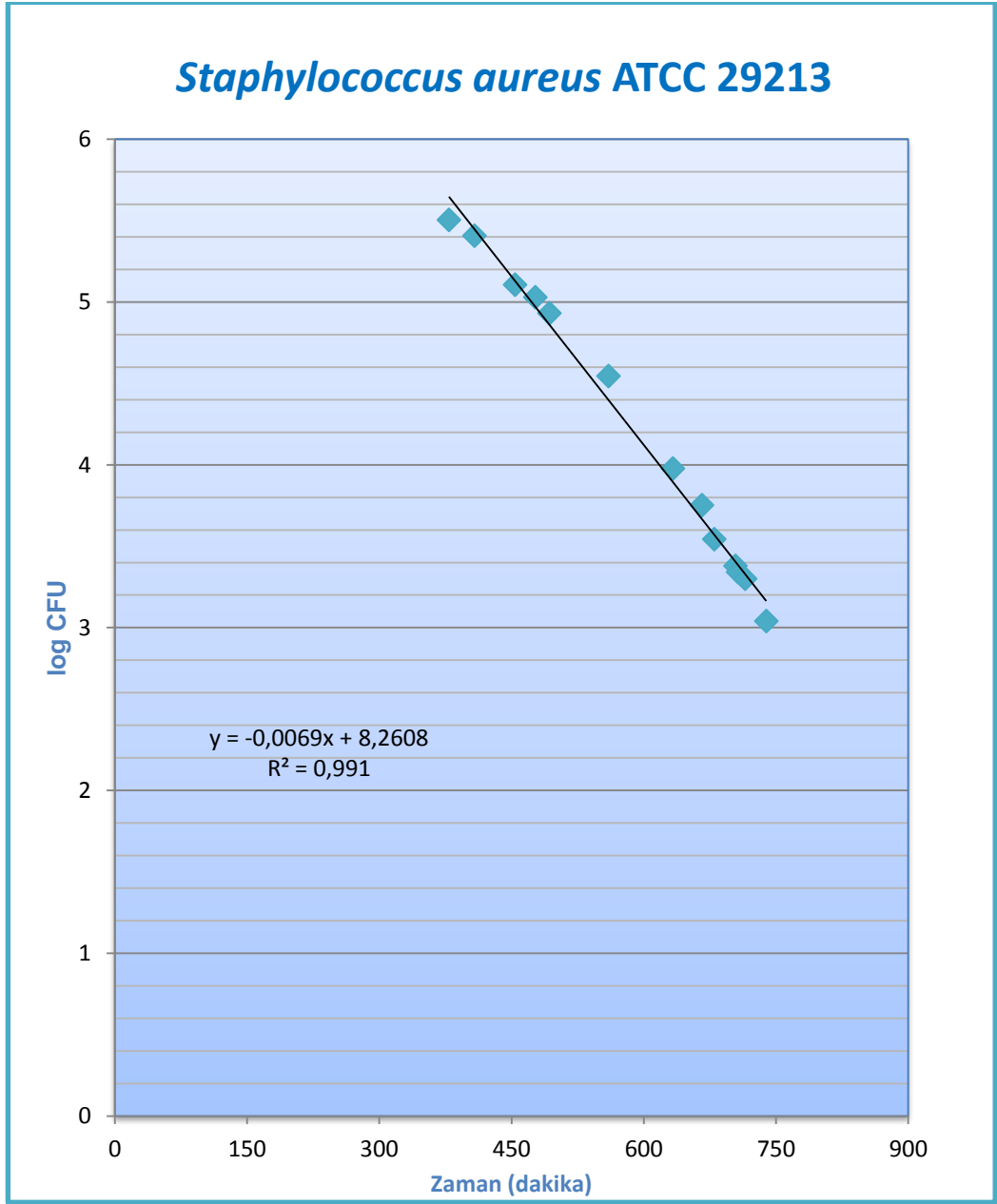
#### **4.6. Lipozomal Nisinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması**

Antimikrobiyal aktivitenin araştırılmasında kullanılan mikroorganizmaların, inkübasyon süresi sonunda oluşturdukları koloni sayıları ve buna bağlı olarak renk değiştirdiği zamana karşı  $\log_{10}$ CFU grafiği aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 16: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 için zaman-koloni tablosu

Zaman (dk)*	Koloni Sayısı	logCFU
379 ±8,19	320000	5,505
408 ±12,12	256000	5,408
454 ±3,60	128000	5,107
477 ±2,64	107200	5,03
493 ±6,24	85600	4,932
560 ±14,11	35200	4,546
633 ±15	9500	3,978
666 ±5,29	5800	3,753
680 ±2,64	3500	3,544
704 ±4,58	2400	3,38
707 ±5	2200	3,342
715 ±4,35	20	3,301
739 ±3,60	11	3,041

\*Ortalama Değer

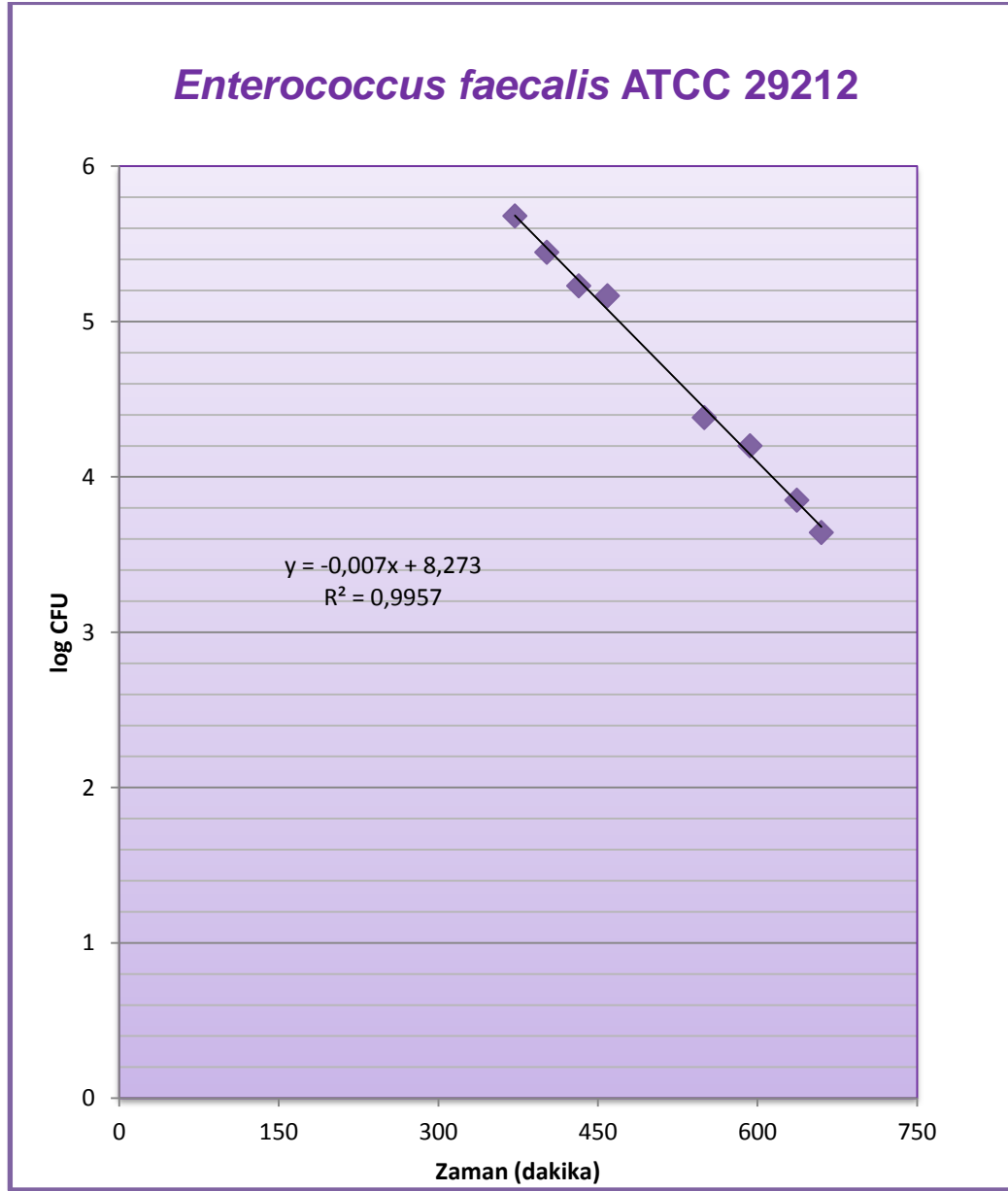


Grafik 1: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213' ün korelasyon grafiği.

Tablo 17: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 için zaman-koloni tablosu

Zaman (dk)*	Koloni Sayısı	logCFU
372 ±6,08	480000	5,681
402 ±3,46	280000	5,447
432 ±7,93	170400	5,231
459 ±7,93	147200	5,167
550 ±7,54	24200	4,383
593 ±3,60	15900	4,201
637 ±5,56	7100	3,851
660 ±1,73	4400	3,643

\*Ortalama Değer

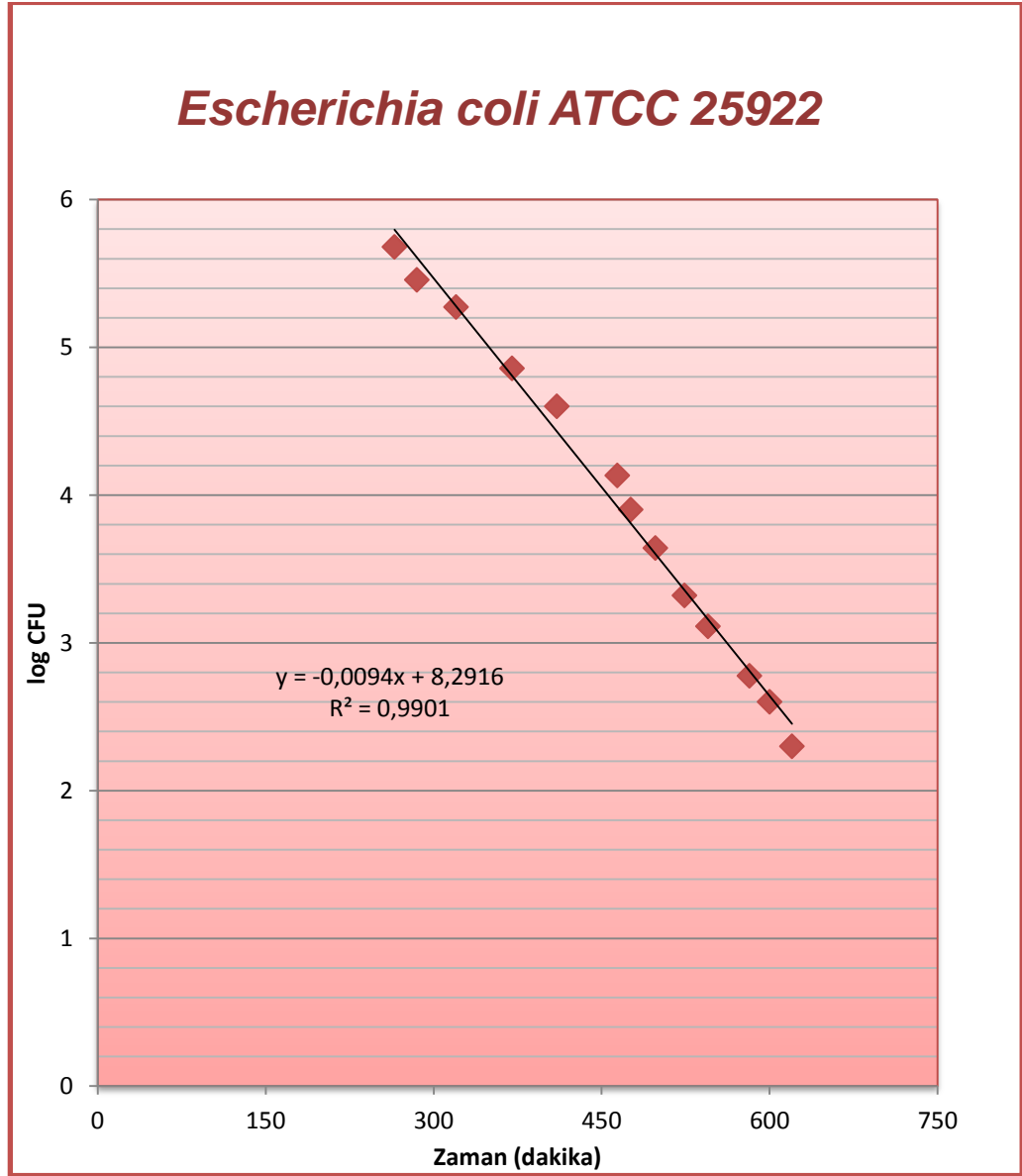


Grafik 2: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212' in korelasyon grafiği.

Tablo 18: *E.coli* ATCC 25922 için zaman-koloni tablosu

Zaman (dk)*	Koloni Sayısı	logCFU
265±5	480000	5,681
285 ±1,73	287200	5,458
320 ±2,64	188000	5,274
370 ±4,35	72400	4,859
410 ±5,56	40000	4,602
464 ±1,73	13600	4,134
476 ±1,73	8000	3,903
498 ±4,35	4400	3,643
524 ±1,73	2100	3,322
545 ±4,35	1300	3,113
582 ±2,64	600	2,778
600 ±4,58	400	2,602
620 ±2,64	200	2,301

\*Ortalama Değer



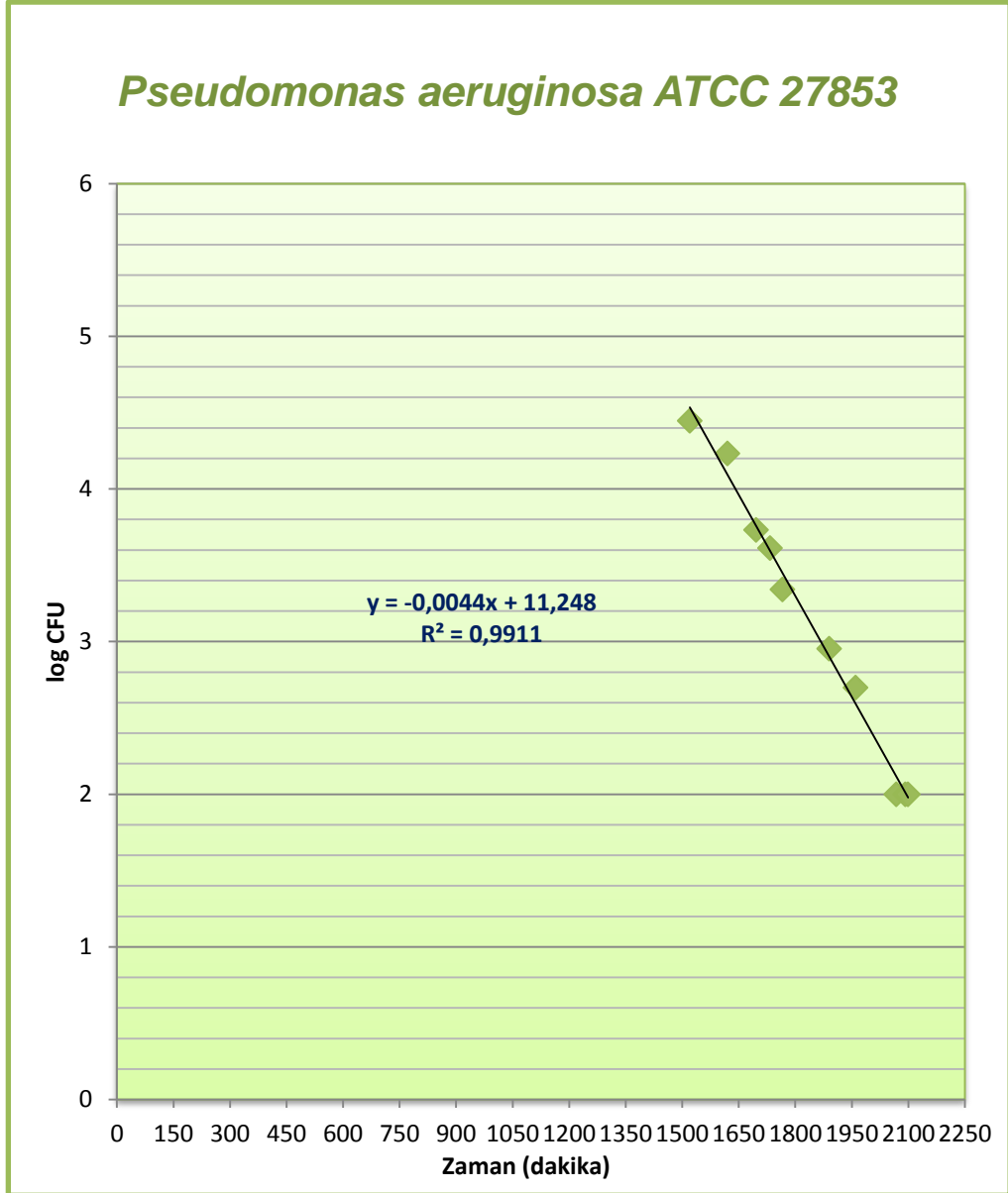
Grafik 3: *E.coli* ATCC 25922' nin korelasyon grafiği.

Tablo 19: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için zaman-koloni tablosu.

Zaman (dk)	Koloni Sayısı	logCFU
1520 ±4,35	28000	4,447
1620 ±4,35	17100	4,233
1696 ±5,29	5400	3,732
1733 ±1,73	4100	3,613
1766 ±2,64	2200	3,342
1890 ±3,60	900	2,954
1960 ±1,73	500	2,699
2068 ±1	100	2
2092 ±3	100	2
2099 ±4,35	100	2

\*Ortalama Değer



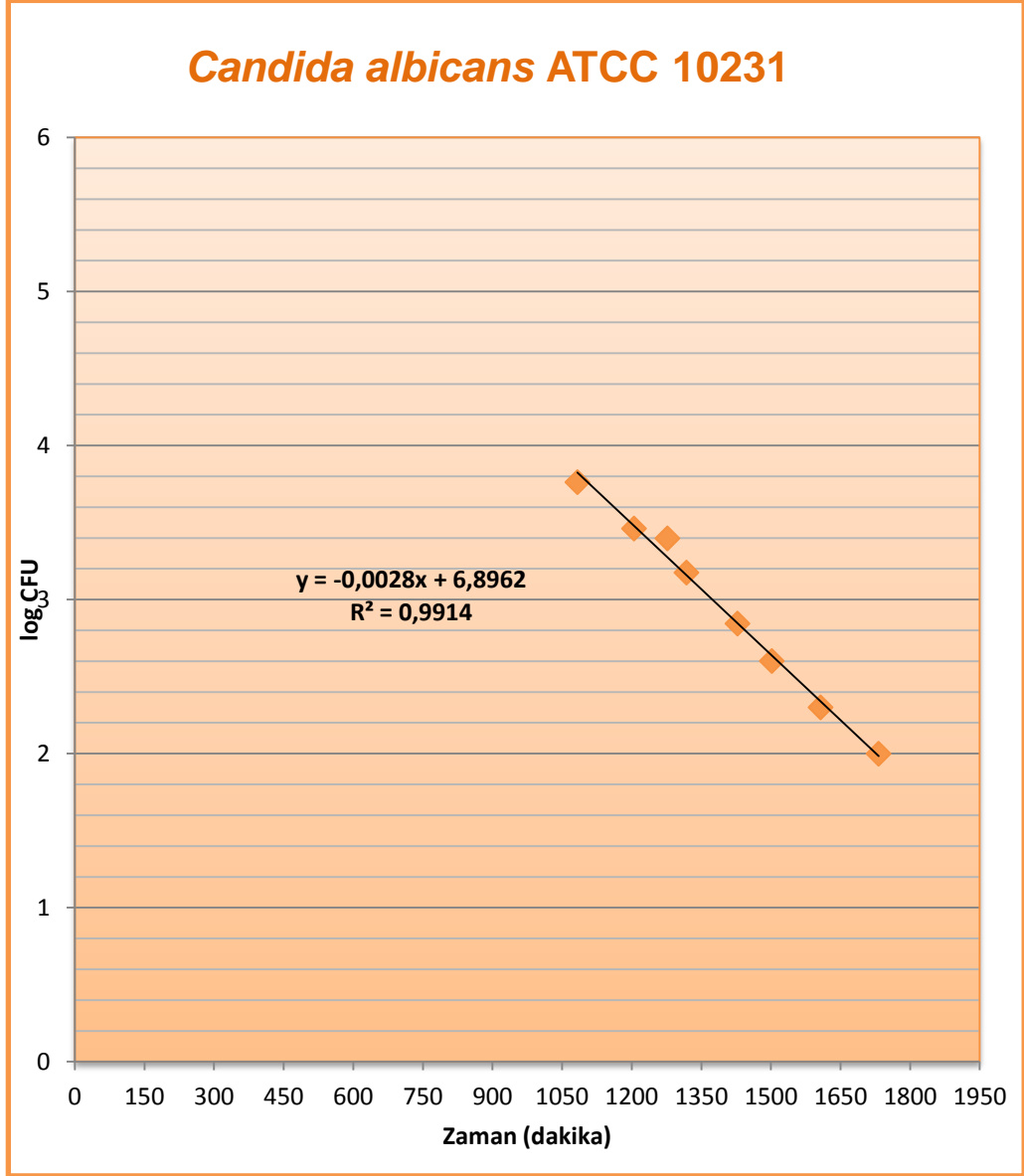


Grafik 4: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853' ün korelasyon grafiği.

Tablo 20: *Candida albicans* ATCC 10231 için zaman-koloni tablosu

Zaman (dk)*	Koloni Sayısı	logCFU
1083 ±4,58	5800	3,763
1205 ±2,64	2900	3,462
1277 ±6,08	2500	3,398
1318 ±2,64	1500	3,176
1428 ±1,52	700	2,845
1502 ±2,64	400	2,602
1607 ±2	200	2,301
1732 ±1,73	100	2

\*Ortalama Değer



Grafik 5: *Candida albicans* ATCC 10231' in korelasyon grafiği.

Lipozomal nisinin antimikrobiyal aktivite sonuçları incelenmiş ve tablo 21' de gösterilmiştir.

Tablo 21: Lipozomal nisinin in-vitro aktivite değerleri

Formülasyon	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
1	19,5 µg/mL	9,75 µg/mL	312 µg/mL	312 µg/mL	>5000 µg/mL
2	9,75 µg/mL	9,75 µg/mL	312 µg/mL	312 µg/mL	>5000 µg/mL
3	9,75 µg/mL	4,8 µg/mL	312 µg/mL	312 µg/mL	>5000 µg/mL
4	19,5 µg/mL	9,75 µg/mL	312 µg/mL	312 µg/mL	>5000 µg/mL
5	19,5 µg/mL	9,75 µg/mL	312 µg/mL	312 µg/mL	>5000 µg/mL
6	19,5 µg/mL	9,75 µg/mL	312 µg/mL	312 µg/mL	>5000 µg/mL
7	4,8 µg/mL	9,75 µg/mL	312 µg/mL	312 µg/mL	>5000 µg/mL
8	2,4 µg/mL	2,4 µg/mL	156 µg/mL	156 µg/mL	>5000 µg/mL
<b>Lipozom*</b>	>5000 µg/mL	>5000 µg/mL	>5000 µg/mL	>5000 µg/mL	>5000 µg/mL
<b>Nisin</b>	19,5 µg/mL	19,5 µg/mL	312 µg/mL	312 µg/mL	>5000 µg/mL
<b>Ampisilin</b>	0,5 µg/mL	1 µg/mL	-	2 µg/mL	-
<b>Gentamisin</b>	-	-	0,5 µg/mL	-	-
<b>Flukonazol</b>	-	-	-	-	4 µg/mL

\*Nisin içermeyen lipozom

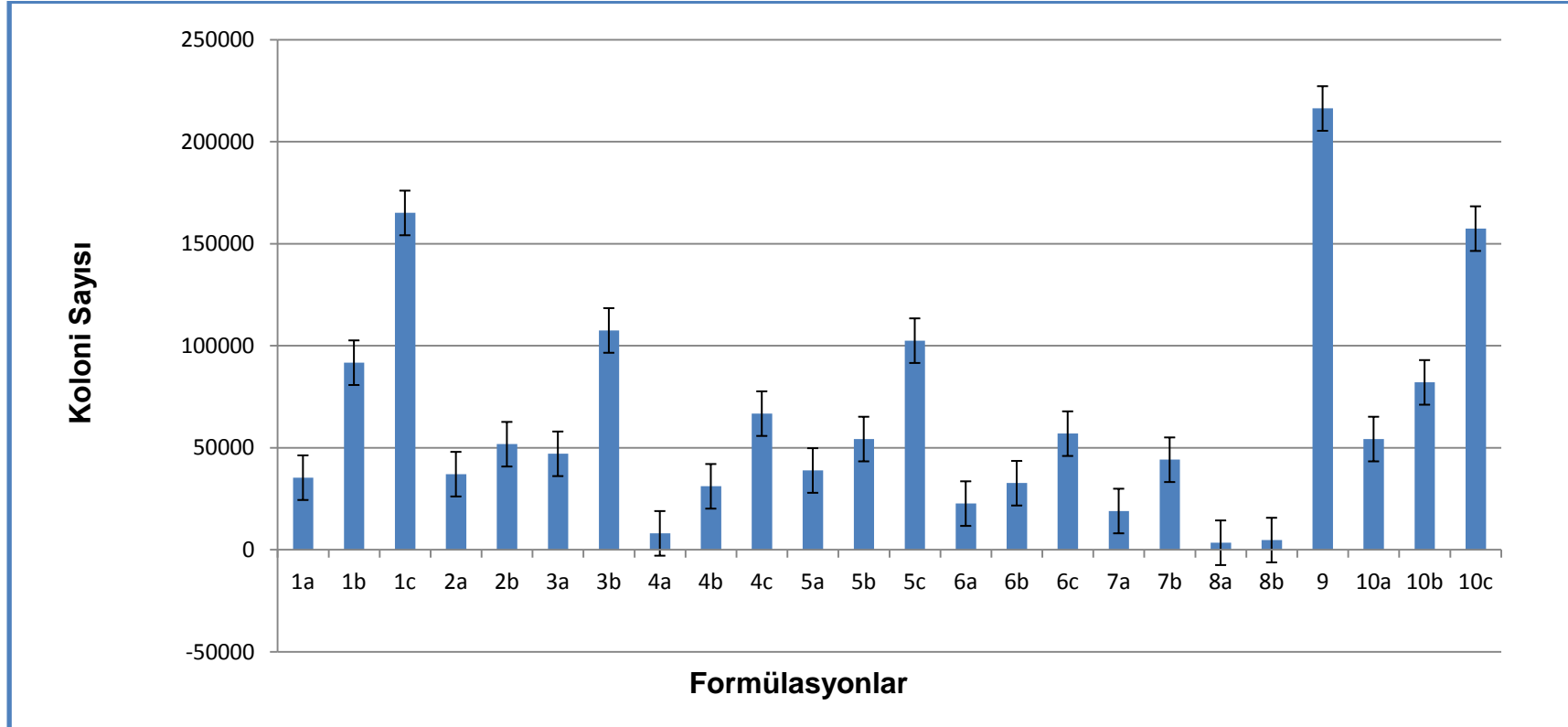
Tablo 22: Tüm mikroorganizmalar için saptanan denklemler ve doğrusal katsayılar

<b>Mikroorganizmalar</b>	<b>y Değeri</b>	<b>R<sup>2</sup> Değeri</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	-0,0069x + 8,2608	0,9910
<i>Enterococcus faecalis</i>	-0,007x + 8,273	0,9957
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-0,0044x + 11,248	0,9911
<i>Escherichia coli</i>	-0,0094x + 8,2916	0,9901
<i>Candida albicans</i>	-0,0028x + 6,8962	0,9914

Tablo 23: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri

Formülasyon	Zaman*	logCFU	Koloni Sayısı
1	538 ± 2,64	4,5486	35367
	478 ± 2	4,9626	91748
	441 ± 1,73	5,2179	165158
2	535 ± 2,64	4,5693	37093
	514 ± 1,73	4,7142	51784
3	520 ± 1,73	4,6728	47076
	468 ± 1	5,0316	107547
4	631 ± 1,73	3,9069	8070
	546 ± 1,73	4,4934	31145
	498 ± 1,73	4,8246	66772
5	532 ± 2,64	4,59	38904
	511 ± 1,73	4,7349	54312
	471 ± 2,64	5,0109	102541
6	566 ± 1	4,3554	22667
	543 ± 2	4,5141	32666
	508 ± 2,64	4,7556	56963
7	577 ± 1,73	4,2795	19032
	524 ± 2,64	4,6452	44177
8	684 ± 1,73	3,5415	3480
	664 ± 2,64	3,6796	4782
9	424 ± 1,73	5,3352	216371
10	511 ± 2,64	4,7349	54312
	485 ± 1	4,9143	82091
	444 ± 1,73	5,1972	157470

\* Ortalama Değer



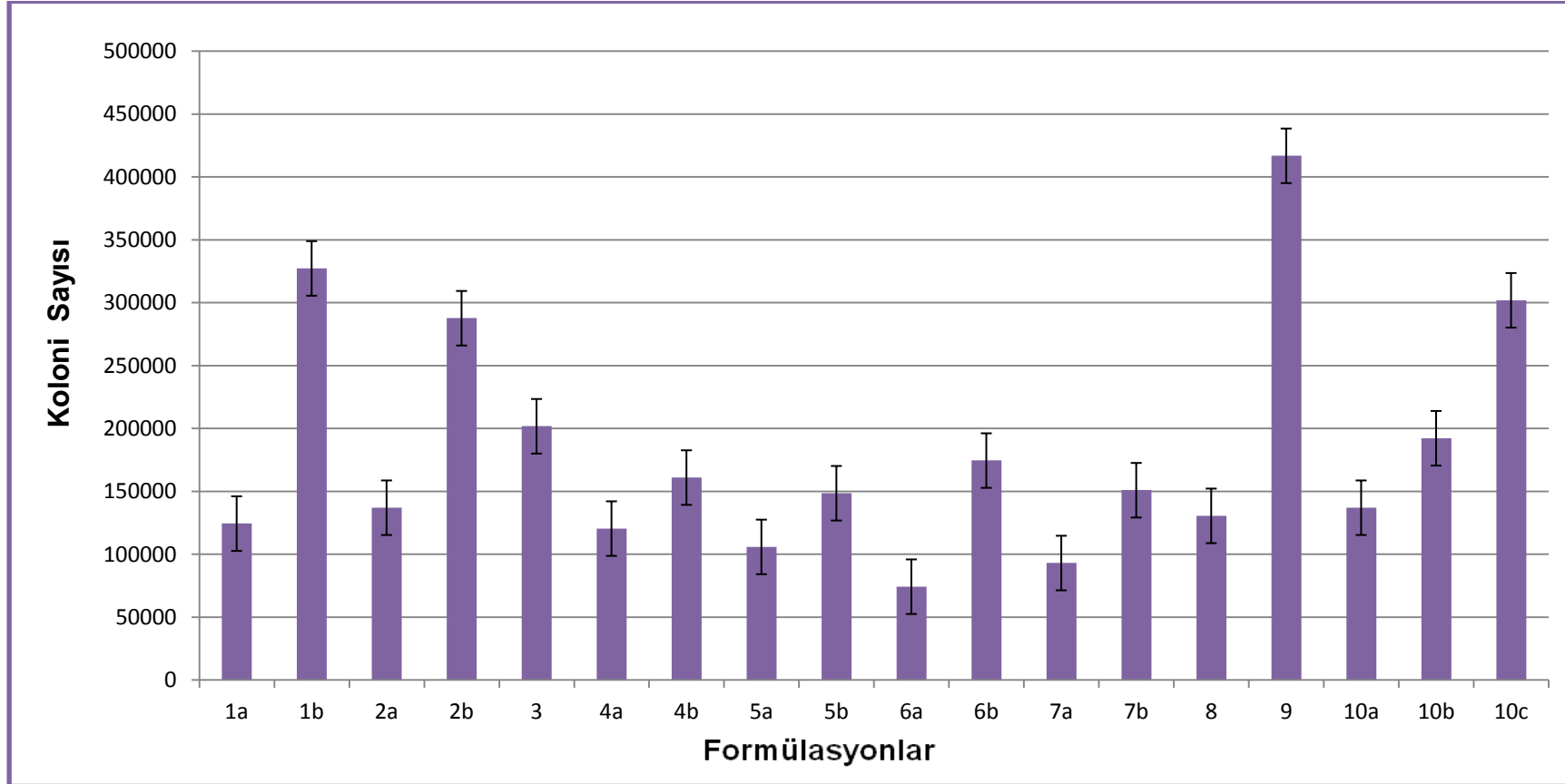
Grafik 6: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 için rengin değiştiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.

Tablo 24: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri

Formülasyon	Zaman*	logCFU	Koloni Sayısı
	454 ± 2,64	5,095	124451
1	394 ± 3	5,515	327341
	448 ± 1,73	5,137	137088
2	402 ± 1,73	5,459	287740
3	424 ± 1,73	5,305	201837
	456 ± 2,64	5,081	120504
4	438 ± 1,73	5,207	161065
	464 ± 3	5,025	105925
5	443 ± 3,60	5,172	148594
	486 ± 3	4,871	74302
6	433 ± 1,73	5,242	174582
	472 ± 1	4,969	93111
7	442 ± 3,60	5,179	151008
8	594 ± 2,64	4,115	13061
9	379 ± 2	5,62	416869
	448 ± 3	5,137	137088
10	427 ± 1,73	5,284	192309
	399 ± 1,73	5,48	301995

\*Ortalama Değer

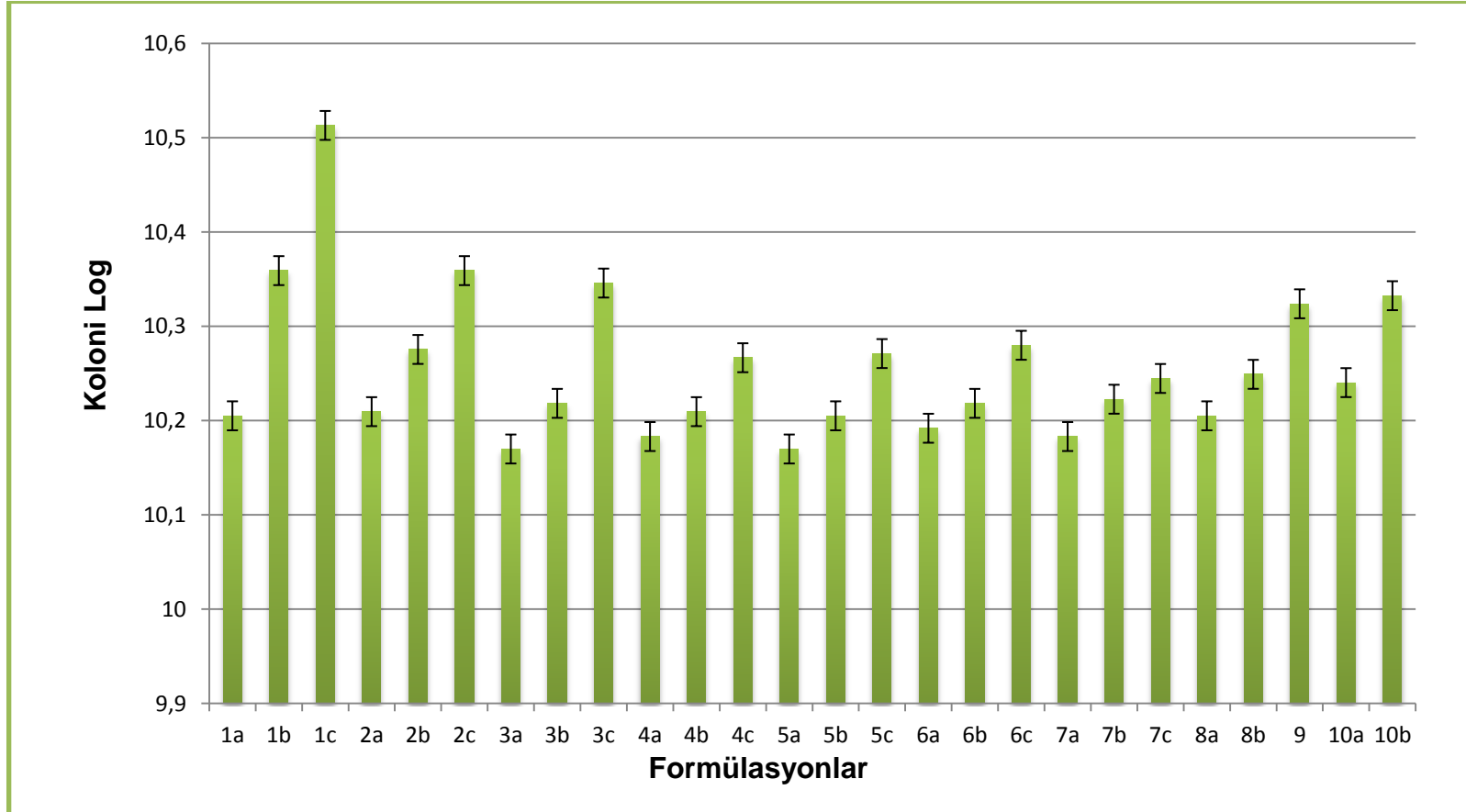




Grafik 7: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 için rengin değiştiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.

Tablo 25 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri

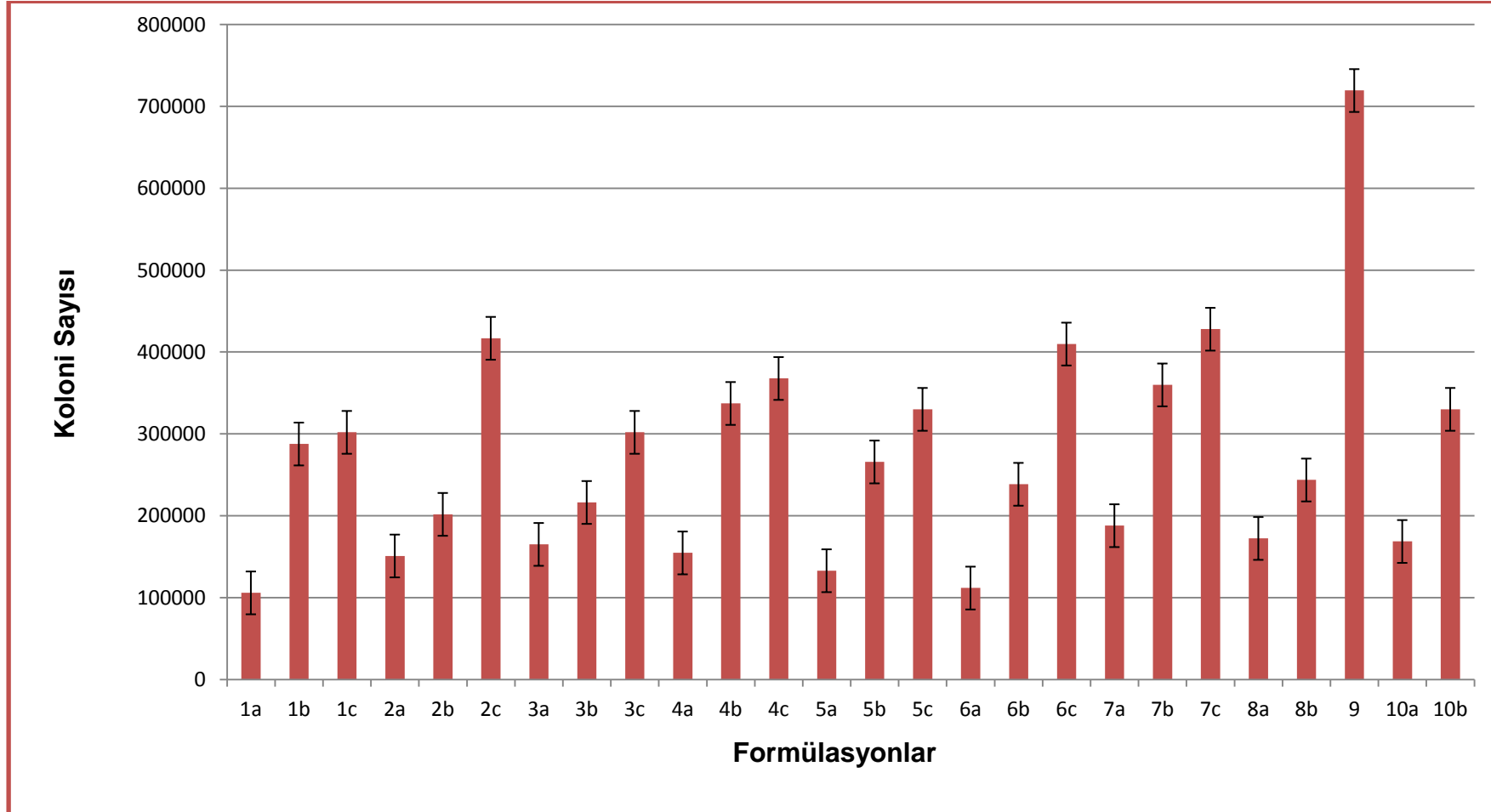
Formülasyon	Zaman*	logCFU	Koloni Sayısı
1	167 ± 1,73	10,5132	32598678890
	202 ± 2,64	10,3592	22866516029
	237 ± 1	10,2052	16039838825
2	202 ± 2,64	10,3592	16039838825
	221 ± 1,73	10,2756	18862532453
	236 ± 1	10,2096	16203170427
3	205 ± 1,73	10,346	22181964198
	234 ± 1	10,2184	16534840121
	245 ± 2	10,17	14791083881
4	223 ± 1	10,2668	18484171953
	236 ± 1,73	10,2096	16203170427
	242 ± 1,73	10,1832	15247547676
5	222 ± 1,73	10,2712	18672393883
	237 ± 2,64	10,2052	16039838825
	245 ± 1,73	10,17	14791083881
6	220 ± 1,73	10,28	19054607179
	234 ± 1	10,2184	16534840121
	240 ± 1,73	10,192	15559656316
7	228 ± 1	10,2448	17571142465
	233 ± 0	10,2228	16703212258
	242 ± 1,73	10,1832	15247547676
8	227 ± 1,73	10,2492	17750067135
	237 ± 1	10,2052	16039838825
9	210 ± 2,64	10,324	21086281499
10	208 ± 1	10,3326	21507998622
	229 ± 2	10,2404	17394021397



Grafik 8: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için rengin değiştiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.

Tablo 26: *E.coli* ATCC 25922 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri

Formülasyon	Zaman*	logCFU	Koloni Sayısı
1	347 ± 1,73	5,025	105925
	301 ± 2,64	5,459	287740
	299± 1,73	5,48	301995
2	331± 1,73	5,179	151008
	317± 2,64	5,305	201837
	284± 1,73	5,62	416869
3	326± 2,64	5,2179	165158
	314± 1,73	5,3352	216371
	299± 2,64	5,48	301995
4	330 ± 2,64	5,1896	154739
	294 ± 2	5,528	337287
	290 ± 1,73	5,5656	367790
5	337 ± 1	5,1238	132984
	305 ± 1,73	5,4246	265827
	295 ± 1,73	5,5186	330065
6	345 ± 1,73	5,0486	111840
	310 ± 1,73	5,3776	238561
	285± 1,73	5,6126	409826
7	321 ± 1,73	5,2742	188018
	291 ± 2,64	5,5562	359915
	283 ± 1,73	5,6314	427956
8	325 ± 1,73	5,2366	172424
	309 ± 1	5,387	243781
9	259 ± 1,73	5,857	719448
10	326 ± 1	5,2272	168732
	295 ± 1,73	5,5186	330065

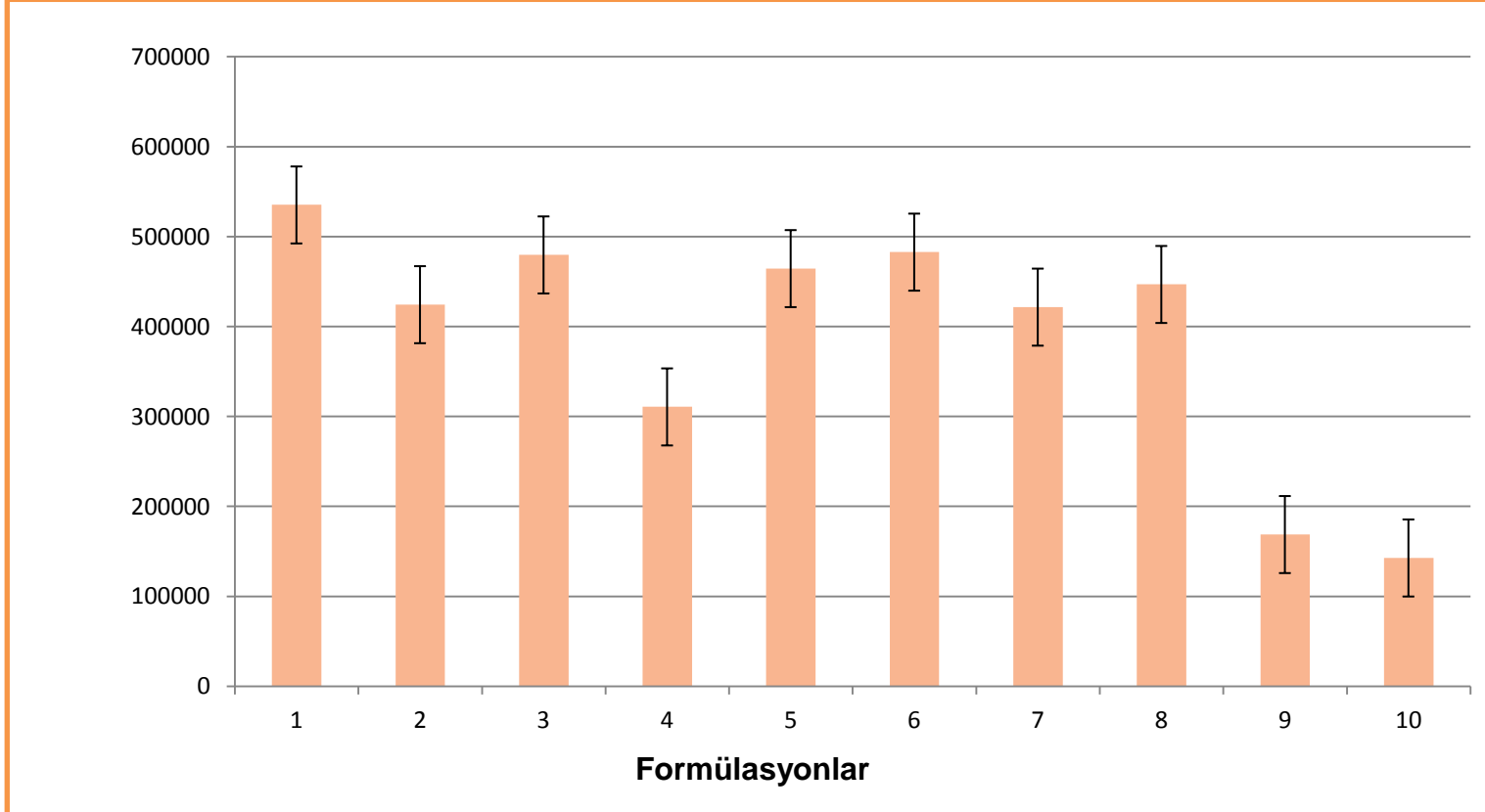


Grafik 9: *E.coli* ATCC 25922 için rengin değiştiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.

Tablo 27: *Candida albicans* ATCC 10231 için zaman, logCFU ve koloni sayısı değerleri

Formülasyon	Zaman*	logCFU	Koloni Sayısı
1	417 ± 1	5,7286	535303
2	453 ± 3	5,6278	424424
3	434 ± 1,73	5,681	479733
4	501 ± 1,73	5,4924	310742
5	439 ± 1,73	5,667	464515
6	433 ± 1,73	5,6838	482836
7	454 ± 1	5,625	421696
8	445 ± 3	5,6502	446889
9	596 ± 3,60	5,2274	168810
10	622 ± 2,64	5,1546	142757

\* Ortalama Değer



Grafik 10: *Candida albicans* ATCC 10231 için rengin değiştiği anda kuyucuklardaki koloni sayısı grafiği.

## 5. TARTIŞMA

*Lactococcus* cinsine ait türler, süt ve süt ürünleri gibi gıda maddelerinin yanısıra, doğada bitkiler ve hayvanlar gibi farklı birçok ortamda bulunabilen mikroorganizmalardır. Özellikle *Lactococcus lactis* türü starter kültür olarak kullanılabilmesi nedeniyle endüstriyel alanda oldukça yaygın kullanım alanı bulmuş ve bu sayede ekonomik açıdan önem kazanmıştır. Fermente gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan *L. lactis* türleri, insanlar tarafından günlük tüketimi dikkate alındığında genellikle güvenli (GRAS) olarak tanımlanmış olup, görülen enfeksiyon sıklığının oldukça düşük olduğu görülmüştür<sup>4, 135</sup>.

Bakterilerin identifikasyonunda genellikle suşların biyokimyasal ve genetik özelliklerine dayanan yöntemler kullanılmakta ve böylelikle türlerin ayrımı kesin olarak yapılabilmektedir. Bu tez çalışmasında *Lactococcus lactis* LL27 suşunun identifikasyonu, 16S rDNA genlerinin tanımlayıcı PZR uygulaması ve DNA dizi analizi ile yapılmış ve kullanılan bakterinin *L. lactis* subsp. *lactis* olduğu kesinlik kazanmıştır. Benzer bir çalışmada da süttten *L. lactis* izole edilmiş ve tanımlanması için çalışmamızda uyguladığımız 16 S rDNA genlerinin tanımlanmasına yönelik yöntemler kullanılmıştır<sup>10</sup>.

*L. lactis* LL27 suşunun tanımlanma aşamalarından biri plazmid içeriğinin belirlenmesi olup, bakteriyosin üretimi, laktoz fermentasyonu, faj dirençliliği gibi bazı genetik özelliklerin plazmid üzerinde yer alması bakımından, suşun karakterizasyonunun belirlenmesinde oldukça büyük önem taşımaktadır. Anderson ve arkadaşlarının<sup>117</sup> önerdiği plazmid izolasyonu protokolünün uygulandığı çalışmamızda yaklaşık olarak 2 ila 30 kb büyüklüğünde 7 farklı plazmid içerdiği saptanmıştır. Plazmid izolasyonu araştırmamızda elde ettiğimiz



bulgularımız, Mills ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada belirtilen *Lactococcus lactis* plazmidlerinin büyüklük sınırları ile paralellik göstermektedir<sup>21</sup>.

Laktokokların identifikasyonlarında konvansiyonel metotlar yetersiz kalmakta, tür seviyesinde identifikasyon yapabilmek için daha spesifik yöntemler gerekmektedir. Total hücre protein profillerinin analizi de, mikroorganizmaların taksonomik temelde araştırılması için kullanılan önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Bu tez kapsamında Gatti' nin önerdiği yöntemi<sup>126</sup> kullanarak *Lactococcus lactis* LL27 suşuna ait, büyüklükleri 104.12 ila 14.40 kD arasında değişiklik gösteren 12 farklı hücre duvarına ait protein tespit edilmiştir. *Lactococcus lactis* suşlarının tür seviyesinde ayrımının yapıldığı çeşitli çalışmalarda, *L. lactis* türünü diğer türlerden ayıran en önemli protein bantının moleküler büyüklüğünün yaklaşık olarak 40.20 kD olduğunu belirtilmiş ve bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz ve molekül büyüklüklerini hesapladığımız protein bantlarıyla uyumludur<sup>126, 136</sup>.

Bakteriyel protein üretiminin çok yönlülüğü ilaç firmaları için de yeni ticari fırsatların doğmasına olanak sağlamıştır. Rekombinant insülinin onaylanmasından sonra, diğer rekombinant DNA ilaçları, bazı heterolog protein üretim sistemlerinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi ile paralel olarak pazarlanmaya başlamıştır. Bu proteinlerin üretimi için çok sayıda mikroorganizma türünün spesifik suşları da oluşturulmuştur. Farmasötik sanayinin artan taleplerini yerine getirmekte olan, hücre fabrikası olarak tanımlanabilen, Rekombinant DNA Teknolojisi artık klasik olarak kabul edilmekle birlikte yeni farmasötik ürünlerin ve buna bağlı olarak da üretim sistemlerinin derinlemesine araştırılmasını zorunlu kılmıştır<sup>137</sup>. Farmasötik sanayinin

ihtiyaç duyduğu yeni farmasötik ürünlere paralel olarak, çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakta olan antibiyotiklere karşı direnç gelişimi ve özellikle çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması da bu sürecin öneminin artmasına neden olmuştur. Buna bağlı olarak antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinen ajanların klinik olarak anlamlı olup olmadığının belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmış ve nisin gibi, mikroorganizmalar üzerine seçici hedefleme yapmakta olan antibakteriyel proteinler önem kazanmaktadır. İnsanlar için bilinen hiçbir toksisiteye sahip olmayan nisin, dünya çapında eşsiz bir konuma yerleşmiş, yaklaşık 40 yıldır 50' den fazla ülkede güvenli bir gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır <sup>138</sup>.

Nisinin endüstriyel alanda kullanılması yüksek üretim kapasitesine bağlı olup, yüksek biyokütleyi de gerekli kılmaktadır. Bu hedef doğrultusunda yapılan çalışmalar sonucunda; yüksek nisin üretimi için çeşitli karbon, azot ve fosfor kaynaklarını içeren kompleks besiyeri içeriğinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu doğrultuda çalışmamız kapsamında yüksek nisin üretiminin sağlanması için, çeşitli organik ve inorganik besin maddelerini içeren ve çeşitli çalışmalar sonucunda da nisin üretimi için önerilen Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) sıvı besiyeri kullanılmıştır <sup>24, 60, 64, 68, 139</sup>.

Uygun besiyerinde geliştirilen mikroorganizmadan elde edilen nisinin saflaştırılması gerekmektedir. Saflaştırma için kullanılan yöntemler bakteriyosinlerin sahip oldukları karakteristik özelliklere bağlıdır. Aynı zamanda bakteriyosin üretimi için gerekli olan kompleks besiyeri içeriği de saflaştırma yönteminin seçiminde göz önünde bulundurulması gereken önemli bir özelliktir. Bu kompleks besiyeri içeriği üretim maliyetini artırmanın yanısıra saflaştırma yöntemini de

zorlaştırmaktadır. Bu nedenle bakteriyosinlerin ve özellikle nisinin saflaştırılmasına yönelik bugüne kadar birçok yöntem kullanılmış ve amaca yönelik olarak farklı birçok sonuç elde edilmiştir. Bu yöntemler arasında amonyum sülfat, organik solvent ve asidik çözeltiler kullanılarak yapılan kısmi saflaştırma yöntemleri yer almakta, bunların yanısıra sıvı-sıvı ekstraksiyon, iyon değişimi kromatografisi, immünoaffinite kromatografisi ve ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin tek başlarına ya da birlikte kullanılması da söz konusu olabilmektedir.<sup>81, 140, 141, 142, 143</sup>

Çalışmamızda nisinin saflaştırılma işleminde, nisinin katyonik bir bileşik olması, düşük molekül ağırlığına sahip olması, halkasal amino asit içermemesi, aktivite kaybının önlenmesi gibi nedenlerden dolayı iyon değişimi kromatografisi kullanılmıştır. 5 aşamalı NaCl elüsyonunun uygulandığı iyon değişimi kromatografisinde artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak nisin içeren fraksiyonlar elde edilmiş ve bu nisinin çöktürülmesi için ise ayrıca C18 kolonunun kullanıldığı ikinci bir fraksiyon ile elde edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, yalnızca tek aşamalı 1 M NaCl elüsyonu uygulanmasının nisinin saflaştırılması için yeterli olabileceği ancak, besiyeri içeriğinde yer alan proteinöz özellikte birçok kontaminantın varlığının saf nisinin elde edilememesine neden olduğu belirtilmiş ve uygulanan bu yöntemle ek olarak farklı metotların da kullanılmasının gerekliliği vurgulanmıştır<sup>128,141</sup>.

Saflaştırma işlemi için belirlenen yöntemlerin birlikte kullanılması spesifik aktivitenin artmasında ve yüksek verim alınmasında önem taşımaktadır. Asit uygulaması, amonyum sülfat ile çöktürme, katyon-değişim kromatografisi ve ters fazlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin birlikte kullanıldığı bir çalışmada elde edilen nisinin spesifik aktivitesinin başlangıç maddesine göre 122 kat daha fazla bulunduğu bildirilmiştir <sup>144</sup>.

Lipozom formülasyonları, çeşitli mikroorganizmalara karşı protein ya da polipeptidin bozunmaya bağlı olarak antimikrobiyal etkinlik kaybının önlenmesi, gıda ve ilaç sistemlerinde uzun dönem etki etmesi, nisin gibi antimikrobiyal proteinleri olumsuz koşullardan ve inhibitörlerden koruması, etki spektrumunda olmayan bileşiklere etkisinin ortadan kaldırılması veya azaltılması, dirençli suşların ortaya çıkışını engellenmesi gibi sebeplerle geliştirilmektedir. Günümüzde kozmetik alanda kullanılması da oldukça yaygın hale gelmiştir. Bu doğrultuda, lipozomların taşıyıcı olarak birçok avantaj sağladığı yapılan çeşitli çalışmalarla da desteklenmiştir <sup>91, 145, 146, 147</sup>.

Lipozom formülasyonlarının hazırlanması için gerekli olan maddeler, yüksek üretim maliyetine bağlı olarak kısıtlı kullanımı zorunlu kılmakta ve deneyin optimizasyonunun sağlanmasını gerektirmektedir. Faktöriyel tasarım, eczacılık teknolojisinde birçok çalışmada; tabletler, mikropartiküler sistemler gibi çeşitli formülasyonlarda ve önformülasyon çalışmalarında, yardımcı maddelerin ve eklenecek miktarlarının seçiminde ve stabilite çalışmalarında tercih edilmiştir <sup>148</sup>.

Formülasyon denemelerinin yapıldığı çeşitli çalışmalarda da faktöriyel denemeler kullanılmış ve pahalı araştırma giderlerini azaltmak, araştırmalarda zaman ve emek tasarrufu sağlamak amacıyla istenen sonuçlara ulaşmak için yeterli olan en az deney yapma olanağının bulunduğu bildirilmiştir<sup>148, 149</sup>.

Bu bilgilerin doğrultusunda, çalışmamızda nisin lipozomal formülasyonlarının içeriklerini belirlerken faktöriyel denemeler kullanılmıştır. 2<sup>3</sup> faktöriyel tasarımdan faydalanılmış olup, değişken olarak CH, DPPC, DPPE kullanılmıştır. Her faktör ikişer seviyede ele alınmış ve 8 farklı kombinasyon oluşturulmuştur. Bu şekilde formülasyonda yer alan faktörler değişik düzeylerde ele alınabilmektedir.

Bu tez kapsamında Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* suşları için nisin 8 farklı lipozom formülasyonu ve nisin içermeyen lipozomun antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Beklenildiği üzere nisin içermeyen boş lipozom formülasyonu denenen hiçbir mikroorganizma üzerinde antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Yapısında doğal olarak fosfatidil bulunan fosfolipitlerin kullanıldığı diğer lipozomal formülasyonların bu mikroorganizmalar üzerine yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Formülasyonlar içerisinde ortak olarak en düşük MİK değeri, *S. aureus* ve *E. faecalis* için 2.4 µg/mL, *P. aeruginosa* ve *E.coli* için 156 µg/mL olarak ve aynı zamanda mikroorganizma sayısının yüksek oranda azalma gösterdiği formülasyon, kullanılan tüm fosfolipitleri eşit miktarda içeren 8. formülasyon olarak belirlenmiştir. Diğer formülasyonlar da Gram pozitif bakteriler üzerine benzer düzeyde aktivite göstermiş ve mikroorganizma sayısını azaltmıştır. Gram negatif bakteriler için, beklenildiği üzere düşük konsantrasyonlarda etki

görülmemiş ancak yüksek konsantrasyonlarda etkili olduğu görülmüştür. Çalışmamızda yer alan bakterilere ek olarak *Candida albicans* suşu kullanılmış ve 5 mg/mL konsantrasyonda bile etki göstermediği belirlenmiştir.

Çalışmamıza paralel olarak; Severina ve arkadaşları da nisinin *S. aureus* ve *E. faecalis* üzerine antibakteriyel etkisini araştırdıkları çalışmalarında, nisinin güçlü bakterisidal aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir <sup>150</sup>.

Nisinin Gram pozitif bakteriler üzerine etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise nisinin *S.aureus* için MİK değeri 4,2 µg/mL ve *E.faecalis* için ise 1,5 µg/mL olarak belirlenmiş ve bu sonuçların çalışmamızla da uygunluk gösterdiği, *S.aureus* için nisinin lipozomal formülasyonun daha etkili olduğu bulgularımızda da görülmüştür <sup>151</sup>.

Çoklu ilaç direncine sahip olan metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli *E.faecalis* (VRE) suşlarıyla yapılan bazı çalışmalarda, nisinin bu mikroorganizmalar üzerinde sırasıyla 10.1 µg/mL ve 14.3 µg/mL konsantrasyonda etkili olduğu bildirilmiş ve uzun zamandır bir gıda katkı maddesi olarak bilinen nisinin olası terapötik kullanımı önerilmiştir <sup>70,151,152,153</sup>.

Çalışmada, kalite kontrol amaçlı olarak kullanılan antibiyotik maddeler, CLSI tarafından belirlenen limit değerler aralığında bulunmuştur <sup>131, 132</sup>. Nisin içeren lipozom formülasyonlarının aktivite gösterdiği konsantrasyonlar, Gram pozitif bakteriler için standart

antibiyotiklere göre 2 ila 20 kat fazladır. Ancak standart antibiyotiklerin, kimyasal bileşenlerine bağlı olarak göstermiş oldukları sitotoksik etki, yan etkiler ve antibiyotiklere karşı gelişen mikroorganizma direnci sorun teşkil etmekte ve insan sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Herhangi bir yan etkisinin veya toksik etkisinin bulunmaması nisini, antibiyotikler karşısında avantajlı konuma taşımaktadır. Nisinin günlük alınabilecek miktarı FDA tarafından 2.9 mg olarak belirtilmiştir. Bu miktarın, bulgularımızda da belirtilen aktivite değerlerinin üzerinde olması, nisinin farmasötik formülasyonlarının aktif olarak kullanılabileceğinin altını çizmektedir. Gıda katkı maddesi olarak kullanım alanı bulan nisinin, lipozomal formülasyonlarının gıda içeriğinde kullanılması ile bazı enfeksiyon hastalıklarının da önüne geçilebileceği öngörülmektedir.

Nisinin Gram negatif bakteriler üzerindeki yetersiz antimikrobiyal etkisi, Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarının nisinin hücre içine geçmesini engellemesinden kaynaklanmaktadır. Çünkü nisin hücre membranını etkileyerek onun yarı geçirgen özelliğinin bozulmasına neden olmaktadır. Ancak yapılan bazı çalışmalarda, Gram negatif bakteriler EDTA gibi kimyasal maddelere, sıcaklık uygulaması gibi fiziksel zorluklara ya da yüksek nisin konsantrasyonuna maruz bırakılmaları durumunda nisine karşı duyarlılığı artış göstermektedir <sup>154, 155, 156, 157</sup>.

## 6. SONUÇ

*L. lactis* subsp. *lactis* LL 27 suşunun kullanıldığı tez çalışması kapsamında, suşun genetik doğası incelenmiş, sahip olduğu plazmidlerin varlığı ve total protein içeriği de yapılan deneylerle tanımlanmıştır. Doğal bir bakteriyosin olan nisin üreten LL 27 suşunun, bu yeteneğinden faydalanılarak yüksek miktarda nisin elde edilmiştir. Elde edilen nisinin, çeşitli fosfolipitler kullanılarak lipozomal formülasyonları geliştirilmiş, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* gibi çeşitli mikroorganizmalar üzerine, klinik kullanımının değerlendirilebilmesi için antimikrobiyal değeri araştırılmıştır. Nisinin lipozomal formülasyonları Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler için bildirilen MİK değerleri aralığında aktivite göstermiş ancak bu formülasyonlar içerisinde 8 numaralı formülasyonun daha düşük dozda aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Candida albicans* üzerine hem nisinin hemde lipozomal formülasyonlarının çok yüksek dozlarda dahi aktivite göstermediği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, antimikrobiyal etki göstermekte olan nisinin lipozomal formülasyonlarının geliştirilmesinin, patojen mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların kontrolünde ve tedavisinde önemli bir araç olabileceği düşünülmektedir.



## 7. ÖZET

### **Lactococcus lactis' ten İzole Edilen Nisinin Farklı Lipozomal Formülasyonlarının Antimikrobiyal Etkisinin İncelenmesi**

Bu çalışmada, Türkiye kökenli çiğ süttten izole edilen, nisin üreticisi *Lactococcus lactis* LL 27 suşunun moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ayrıca suşun üretmiş olduğu nisinin lipozomlanarak antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

16 S rDNA yöntemi ile suşun genetik karakterizasyonu, plazmid ve protein profilleri tanımlanmıştır. Suşun sahip olduğu nisin üretim yeteneği kullanılarak iyon değişimi kromatografisi ile nisin elde edilmiştir. Elde edilen nisinin çeşitli lipozomal formülasyonları hazırlanarak bunların bazı gram pozitif, gram negatif ve *Candida* türlerine karşı antimikrobiyal etkisi BioTimer yöntemi ile araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, nisinin lipozomal formülasyonları, Gram pozitif bakterilere düşük konsantrasyonlarda, Gram negatif bakterilere yüksek konsantrasyonlarda etki göstermiştir. *Candida albicans'* a karşı ise herhangi bir konsantrasyonda etki göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler: Nisin, Kromatografi, Lipozom

## **8. SUMMARY**

### **Investigating the Antimicrobial Effect of Different Liposomal Formulations of Nisin Isolated from *Lactococcus lactis***

In this study, nisin producer *Lactococcus lactis* LL 27 strain, originating from raw milk isolated in Turkey, were characterized by molecular techniques and also aimed to evaluate the antimicrobial activity of liposome encapsulated nisin produced by the bacteria.

Genetic characterization of strain was defined by 16 S rDNA method, plasmids and protein profiles. Nisin was obtained by ion exchange chromatography. Different nisin loaded liposome formulations were prepared and its antimicrobial effect against some Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and some *Candida* species were investigated by BioTimer assay.

According to the results, liposomal formulations of nisin has antimicrobial activity against to the Gram positive bacteria at low concentrations. Besides this nisin formulations has antimicrobial activity against to Gram negative bacteria at high concentrations. Liposomal formulations of nisin has no activity against to *Candida albicans* at any concentration.

Key Words: Nisin, Chromatography, Liposome

## 9. KAYNAKLAR

1. Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir L. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 2009; 131: 30–39.
2. Axelsson L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S, Wright VA, Ouwehand A, editors. *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. Third Edition. New York: Marcel Dekker Inc; 2004. p.1-66.
3. Samaržija D, Antunac N, Luka\_ Havranek J. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo* 2001; 51(1):35-48.
4. Casalta E, Montel MC. Safety assesment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 126: 271-273.
5. Cho SI, Nam SW, Yoon JH, Lee JS, Sukhoom A, Kim W. *Lactococcus chungangensis* sp nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; 58 (8): 1844-1849.
6. Cai Y, Yang J, Pang H, Kitahara M. *Lactococcus fujiensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010; 61: 1590-1594.
7. Pérez T, Balcázar JL, Peix A, Valverde A, Velázquez E, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I. *Lactococcus lactis* subsp. *Tructae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011; 61(8):1894-8.

8. Fernandez E, Alegría A, Delgado S, Martín MC, Mayo B. Comparative Phenotypic and Molecular Genetic Profiling of Wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* Genotypes, Isolated from Starter-Free Cheeses Made of Raw Milk. *Applied And Environmental Microbiology* 2011; 77(15): 5324–5335.
9. *Lactococcus lactis* [online]. 2010 [cited 2012 June 20]. Available from: URL:  
<http://ipkc.njau.edu.cn/spwswx/imgbank/tuku/Lactococcus%20lactis%20subsp.%20lactis.jpg>
10. Beasley SS, Saris PEJ. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from human milk. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5051–5053.
11. O’Sullivan L, Ross RP, Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 2002; 84:593–604.
12. Savadogo A, Ouattara CAT, Bassole IHN, Traore SA. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *Afr J Biotechnol* 2006; 5 (9): 678-683.
13. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 1999; 9: 43-52.
14. Akkoç N, Şanlıbaba P, Akçelik M. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2009; 25 (1-2): 59 – 70.
15. Zendo T, Fukao M, Ueda K, Higuchi T, Nakayama J, Sonomoto K. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67:1616-1619.

16. Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances* 2003; 21: 465–499.
17. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12; 39-85.
18. Nagao J, Asaduzzaman SM, Aso Y, Okuda K, Nakayama J, Sonomoto K. Lantibiotics: Insight and Foresight for New Paradigm. *Journal Of Bioscience and Bioengineering* 2006; 102 (3): 139-149.
19. Eijsink VGH, Axelsson L, Diep DB, Håvarstein LS, Holo H, Nes IF. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002; 81: 639–654.
20. Drider D, Fimland G, Hé'chard Y, M. McMullen L, Pré'vost H. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70( 2): 564–582.
21. Mills S, McAuliffe OE, Coffey A, Fitzgerald GF, Ross RP. Plasmids of lactococci-genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30:243-273.
22. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriol Rev* 1976; 40(3):722-756.
23. Malgorzata BL, Brzychczy-Wloch M, Gosiewski T, Heczko PB. Antibacterial Activity of Selected Standard Strains of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins – Pilot Study. *Postepy Hig Med Dosw* (online), 2012; 66: 787-794.
24. El-Shafie HA, Ibrahim N, Abd El-Sabour H, Mostafa YA. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by Isolated Strain of *Lactococcus lactis*. *J Appl Sci Res* 2008; 4(11):1315-1321.

25. Twomey D, Ross RP, Ryan M, Meany B, Hill C. Lantibiotics produced by actic acid bacteria: structure, function and application. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002; 82: 165-185.
26. Cheigh CI, Pyun Y. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 1641-1648.
27. Badr S, Abdel Karem H, Hussein H, El-Hadedy D. Characterization of Nisin Produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Agri Biol* 2005; 7(3): 499–503.
28. Uğurlu T, Türkoğlu M, Soyoğul Gürer Ü, Gürbüz Akarsu B. Colonic delivery of compression coated nisin tablets using pectin/HPMC polymer mixture *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007;67: 202–210.
29. Crabb JH. Bacteriocins: Applications in Prevention and Treatment of Mastitis. ImmuCell Corporation Portland, Maine, USA. [online]. 2010 [cited 2012 June 20]. Available from: URL: <http://www.immucell.com/documents/NMCManuscript.pdf>
30. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 71: 1–20.
31. Hampikyan H, Çolak H. Nisin ve Gıdalardaki Antimikrobiyal Etkisi. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni* 2007; 6 (2): 142-147.
32. Nisin Product Description. [online]. 2010 [cited 2012 June 20]. Available from: URL: <http://www.cathayindustries.com.au/food/index.php?MID=11&DivID=4&GroupID=3&ProdItemID=43>

33. The Structure of Nisin. [online]. 2010 [cited 2012 June 20]. Available from: URL: <http://www.combichem.co.uk/research/antibacterials.htm>
34. Gross E, Morell JL. The structure of nisin. *J Am Chem Soc* 1971; 93: 4634-4635.
35. Koponen O, Takala TM, Saarela U, Qiao M, Saris PEJ. Distribution of the NisI immunity protein and enhancement of nisin activity by the lipid-free NisI. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 231:85-90.
36. Şanlıbaba P, Akkoç N, Akçelik M. Identification and Characterisation of Antimicrobial Activity of Nisin A Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27. *Czech J Food Sci* 2009; 27(1): 55–64.
37. Zendo T, Yoneyama F, Sonomoto K. Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 88:1–9.
38. Wirawan RE, Klesse NA, Jack RW, Tagg JR. Molecular and genetic characterisation of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 1148-1156.
39. Kwaadsteniet M, Doeschate K, Dicks LMT. Characterization of the Structural Gene Encoding Nisin F, a New Lantibiotic Produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolate from Freshwater Catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 547-549.
40. Chatterjee C, Paul M, Xie L, van der Donk WA. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev* 2005; 105: 633-683.
41. Mulders JWM, Boerrtgter IJ, Rollema HS, Siezen RJ, Vos WM. Identification and characterization of the lantibiotic nisin 2, a natural nisin variant. *Eur J Biochem* 1991; 201: 581 -584.

42. van de Ven FJM, van den Hooven H W, Konings RNH, Hilbers CW. NMR studies of lantibiotics. *Eur J Biochem* 1991; 202: 1181-1188.
43. Wiedemann I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaun G, de Kruijff B, Sahl HG. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* 2001; 276: 1722-1779.
44. Delves-Broughton J. Nisin as a food preservative. *Food Australia* 2005; 57(12): 525-527.
45. Udompijtkul P, Paredes-Sabja D, Sarker MR. Inhibitory Effects of Nisin Against *Clostridium perfringens* Food Poisoning and Nonfood-Borne Isolates. *Journal of Food Science* 2012; 71(1):51-56.
46. Buchman GW, Banerjee S, Hansen JN. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein peptide. *J Biol Chem* 1988; 263: 16260-16266.
47. Asaduzzaman SM, Al-Mahin A, Bashar T, Noor R. Lantibiotics: A Candidate for Future Generation of Antibiotics. *Stamford Journal of Microbiology* 2011; 1(1):2074-5346.
48. Cheng F, Takala TM, Saris PEJ. Nisin Biosynthesis in vitro. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007;13:248–254.
49. Guder A, Wiedemann I, Sahl HG. Posttranslationally Modified Bacteriocins-The Lantibiotics. *Biopolymers (Peptide Science)* 2000; 55:62–73.
50. Plat A, Kluskens LD, Kuipers A, Rink R, Moll GN. Requirements of the Engineered Leader Peptide of Nisin for Inducing Modification, Export and Cleavage. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(2):604-611.



51. Dufour A, Hindré T, Haras D, Le Pennec JP. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol* 2007; 31: 134-167.
52. Kuipers OP, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, de Vos W.M. Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the nisA and nisl genes for development of immunity. *Eur J Biochem* 1993; 216: 281-291.
53. McAuliffe O, Ross RP, Hill C. Lantibiotics: biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev* 2001; 25: 285-308.
54. Mavaro A, Abts A, Bakkes PJ, Moll GN, Driessen AJM, Smits SHJ, Schmitt L. Substrate Recognition and Specificity of the NisB Protein, the Lantibiotic Dehydratase Involved in Nisin Biosynthesis. *The Journal Of Biological Chemistry* 2011; 286(35):30552–30560.
55. Siegers K, Heinzmann S, Entian KD. Biosynthesis of Lantibiotic Nisin. *The Journal Of Biological Chemistry* 1996; 271(21): 12294–12301.
56. de Vos WM, Hugenholtz J. Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology* 2004; 22(2):72-79.
57. Engelke G, Gutowski-Eckel Z, Kiesau P, Siegers K, Hammelmann M, Entian KD. Regulation of Nisin Biosynthesis and Immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Applied And Environmental Microbiology* 1994; 60: 814-825.
58. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* 2004; 25: 1405-1414.

59. Patton GC, van der Donk WA. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current Opinion in Microbiology* 2005; 8:543–551.
60. De Vuyst L, Vandamm EJ. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology* 1992;138:571-578.
61. Cheigh C , Choi HJ, Park H, Kim S, Kook MC, Kim TS, Hwang JK, Pyun YR. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology* 2002; 95:225–235.
62. Şimşek Ö, Çon AH, Akçelik M. Endüstriyel Nisin Üretiminde Etkili Faktörler Ve Model Sistemler. *Journal Of Engineering Sciences* 2007; 13(1):57-67.
63. de Vuyst L, Vandamme E J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J General Microbiol* 1992; 138: 571-578.
64. Şimşek Ö, Akkoç N Çon AH, Özçelik F, Saris PEJ, Akçelik M. Continuous nisin production with bioengineered *Lactococcus lactis* Strains. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2009; 36:863–871.
65. Chandrapati S, O’Sullivan DJ. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Biotechnology* 1998; 63:229–233.
66. Stoyanova LG, Levina NA. Components of Fermentation Medium Regulate Bacteriocin Synthesis by the Recombinant Strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116. *Microbiology* 2006; 75(3): 286–291.

67. Parente E, Ricciardi A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 52: 628-638.
68. De Vuyst L, Vandamm EJ. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* batch fermentations using a complex. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993; 40:17-22.
69. Liu X, Chung Y, Yang S, Yousef AE. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry* 2005; 40:13–24.
70. Thomas LV, Wimpenny JVT. Investigation of the Effect of Combined Variations in Temperature, pH, and NaCl Concentration on Nisin Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ. Microbiol* 1996; 62(6): 2006-2012.
71. Tafreshi SH, Mirdamadi S, Norouzian D, Khatami S, Sardari S. Effect of non-nutritional factors on nisin production. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(9):1382-1391.
72. Guerra B, Malorny B, Schroeter A, Helmuth R, et al. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47: 2059-2060.
73. Qiao M , Omaetxebarria MJ, Ra R, Oruetxebarria I, Saris PE. Isolation of a *Lactococcus lactis* strain with high resistance to nisin and increased nisin production. *Biotechnology Letters* 1997; 19(2): 199–202.
74. Kim TS, Hur JW, Yu MA, Cheigh CI, Kim KN, Hwang JK, Pyun YR. Antagonism of *Helicobacter pylori* by Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* 2003; 66(1): 3-12.

75. De Kwaadsteniet M, Doeschate KT, Dicks LMT. Nisin F in the treatment of respiratory tract infections caused by *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology 2009; 48:65–70.
76. Goldstein B, Wei J, Greenberg K, Novick R. Activity of nisin against *S. pneumoniae*, in vitro, and in mouse infection model. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 277-278.
77. Reddy KVR, Aranha C, Gupta SM, Yedery RD. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: in vitro and in vivo studies. Reproduction 2004; 128: 117–126.
78. Gotteland M, Brunser O, Cruchet S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? Aliment Pharmacol Ther 2006; 23: 1077–1086.
79. Benech RO, Kheadr EE, Laridi R, Lacroix C, Fliss I, et al. Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar Cheese by addition of Nisin Z in Liposomes or by In situ Production in Mixed Culture. Appl Environ Microbiol 2002; 68(8): 3683-3690.
80. Benech RO, Kheadr EE, Lacroix C, Fliss I. Impact of Nisin Producing Culture and Liposome-encapsulated Nisin on Ripening of *Lactobacillus* added-Cheddar Cheese. J Dairy Sci 2003; 86:1895–1909.
81. Laridia R, Kheadra EE, Benecha RQ, Vuillemarda JC, Lacroixa, Fliss CL. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. International Dairy Journal 2003; 13: 325–336.
82. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2009; doi:10.1155/2009/574398.

83. Arnold T, Linke D. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. *BioTechniques* 2007; 43:427-440.

84. Cutler P. *Methods in Molecular Biology, Protein Purification Protocols*. 2nd Ed. Totowa (NJ): Humana Press; 2004.

85. Nobel Prizes List. [online]. 2010 [cited 2012 June 20]. Available from: URL:

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/nomination/nomination.php?action=advsearch&start=11&key1=candcity&log1==&string1=lthaca&key2=candcountry&log2==&string2=US&log10=AND&log11=&order1=year&order2=nomname&order3=cand1name](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/nomination/nomination.php?action=advsearch&start=11&key1=candcity&log1==&string1=lthaca&key2=candcountry&log2==&string2=US&log10=AND&log11=&order1=year&order2=nomname&order3=cand1name)

86. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Enstrümantal Analiz İlkeleri*. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H (Çev), 1. Basım, Ankara, Bilim Yayıncılık, 1998.

87. Hışıl Y. *Enstrümantal Gıda Analizleri*. Genişletilmiş 6. Baskı. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları; 2010.

88. Gündüz T. *İnstrumental Analiz*. 9. Baskı. Ankara: Gazi Kitabevi; 2005.

89. Kromatografi. [internette]. 2010 [okunduğu tarih: 2012 June 20]. Elektronik Adresi:

[http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders\\_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html](http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html)

90. Uhumwangho MU, Okor RS. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. *J Med Biomed Res* 2005; 4: 9-21.

91. Lasic DD. Applications of liposomes. In: Lipowsky R, Sackmann E, eds. Handbook of Biological Physics. Vol. Elsevier Science BV. 1995: 491-519.
92. Torchilin VP, Weissig V. Liposomes. 2. Boston: Oxford University Press; 2003.
93. New RRC. Liposomes: a practical approach. 1. New York: Oxford University Press; 1990.
94. Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain?. Int J Pharm 2005; 298: 274-292.
95. Allen TM. Liposomes : Opportunities in drug delivery. Drugs 1997; 4: 8-14.
96. Matteucci ML, Thrall DE. The role of liposomes in drug delivery and diagnostic imaging: a review. Vet Rad Ultrasound 2000; 41: 100-107.
97. Gürsoy AZ. Kontrollü salım sistemleri.1. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2002.
98. Ostro MJ. Liposomes. 1. New York: Marcel Dekker, inc; 1983.
99. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. Int J Pharm 1997; 154: 123-140.
100. Kreuter J. Colloidal drug delivery systems. 1. USA: Marcel Dekker; 1994.
101. Keller BC. Liposomes in nutrition. Trends F Sci & Tech 2001; 12:25-31.
102. Erdoğan S, Özer AY, Hıncal AA. Radyopak lipozomların nükleer tıpta kullanımları. FABAD J Pharm Sci 1995; 20: 105-116.

103. Özer AY. Oküler ilaç taşınmasında lipozomlar. *FABAD J Pharm Sci* 1995; 20: 173-180.
104. Cheema SK, Gobin AS, Rhea R, Lopez-Berestein G, Newman RA, Mathur AB, et al. Silk fibroin mediated delivery of liposomal emodin to breast cancer cells. *Int J Pharm* 2007; 341: 221-229.
105. Zavaleta CL, Phillips WT, Soundararajan A, Goins AB. Use of avidin/biotin-liposome system for enhanced peritoneal drug delivery in an ovarian cancer model. *Int J Pharm* 2007; 337: 316-328.
106. Bozdağ S, Vural İ, Çapan Y, Dalkara T. Beyin tümörlerinin tedavisinde ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulanması. *FABAD J Pharm Sci* 2002; 27: 89-104.
107. Li C, Yoshimoto M, Fukunaga K, Nakao K. Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. *Biosource Tech* 2007; 98: 1366-1372.
108. Hoiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrappe albendazole on larval mobility and number in *Toxocano canis* infected mice. *Vet Parasitol* 2005;129:83-87.
109. Yan W, Chen W, Huang L. Mechanism of adjuvant activity of cationic liposome: Phosphorylation of a mapkinase, ERK and induction of chemokins. *Mol Immun* 2007;44:3672-3681.
110. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamru N, Hoshimoto S, Nagasawa T, et al. Evaluation of a novel vaccine (HVJliposome/HSP65 DNA+IL-RNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine* 2007;25:2990-2993.

111. Feng-chun QI, Chun-i W, Ya-jun W, Xue-mei Z, Yan Z, Bo S, et al. Immunogenicity and efficacy of Liposome encapsulated influenza split vaccine in Balb/C Mice. *Chem Res Chinese U*;23(3):314-318.
112. Betz G, Aeppli A, Nenshutina N, Leuenberger H. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *Int J Pharm* 2005;296:255-260.
113. Serikawa T, Kikuchi A, Sugaya S, Suzuki N, Kikuchi H, Tanaka K. In vitro and in vivo evolution of novel cationic liposomes utilized for cancer gene therapy. *J Cont Rel* 2006;113:225-260.
114. Kajiwara E, Kawano K, Hattori J, Fukushima M, Hayashi K, Maitani Y. Long circulating liposome encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy. *J Cont Rel* 2007;120:104-110.
115. Todorov S, Onno B, Sorokine O, Chobert JM, Ivanova I, Dousset X. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *Inter J of Food Microbiol* 1999; 48: 167-177.
116. Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani, Andolfi R, Moschetti G, et al. 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garreriae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence. *Analysis System Appl Microbiol* 2002; 25: 520-527.
117. Anderson DG, McKay LL, et al. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46: 549–552.
118. Meyers JA, Sanches D, Elwell LP, Falkow S, et al. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 1976; 127: 1529-1537.



119. Macrina FL, Tobian JA, Jones KR, Evans RP, Clewell DB. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene* 1982.; 19:345-353.
120. Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DS, McCoven SM. A multiple plasmid containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* 1978; 1: 417-420.
121. Southern EM. Measurement of DNA lengths by gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1979.; 100:319-323.
122. Schaffer HE, Sederoff RR. Improvement estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Analytical Biochemistry* 1981; 115: 122-133.
123. Campbell RC. *Statistics for biologists*. Second Edition, Cambridge: Cambridge University Press, 1974.
124. Elder JK, Southern EM. Measurement of DNA length by gel electrophoresis (II). Comparison of methods for planting mobility of fragment length. *Analytical Biochemistry* 1983; 170; 38–44.
125. Elder JK, Amos A, Southern EM, Shippey GA. Measurement of DNA length by electrophoresis (I). *Analytical Biochemistry* 1983; 128: 223–226.
126. Gatti M, Fornasari E, Neviani E, et al. Cell-wall profiles of dairy thermophilic lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology* 1997; 25: 345-348.
127. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

128. Abts A, Mavaro A, Stindt J, Bakkes PJ, Metzger S, Driessen AJM, Smits SHJ, Schmitt L. Easy and Rapid Purification of Highly Active Nisin. *International Journal of Peptides* 2011, Article ID 175145, 9 pages. doi:10.1155/2011/175145
129. Schägger H. Tricine–SDS-PAGE. *Nat. Protocols* 2006; 1:16–22.
130. Hernandez J, Estelrich J, Pouplana R, et al. Determination of the encapsulation efficiency in liposomes obtained by the ‘extruder method’. *J Microencapsulation* 1987; 4(4):315-320.
131. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 6th Informational Supplement. CLSI M100-S18. Pennsylvania, USA:2008.
132. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast Approved Standard, M27-A3. Pennsylvania, USA:2008.
133. Pantanella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T. Biotimer assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods* 2008; 75: 478-84.
134. Pantanella F, Berlutti F, Passeri D, Sordi D, Frioni A, Natalizi T, Letizia Terranova M, Rossi M, Valenti P. Quantitative Evaluation of Bacteria Adherent and in Biofilm on Single-Wall Carbon Nanotube-Coated Surfaces. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2011; Article ID 291513, doi:10.1155/2011/291513.
135. Zhu Y, Zhang Y, Li Y. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 83:597–610.

136. Elliott JA, Collins MD, Pigott NE, Facklam RR. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from Humans by Comparison of Whole-Cell Protein Patterns. *J Clin Microbiol* 1991; 29(12): 2731-2734.
137. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero JL, Vázquez E, Villaverde A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 2009, 8:17.
138. Asaduzzaman SM, Sonomoto K. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2009; 107(5):475–487.
139. Yang R, Ray B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 1994; 11(4): 281–291.
140. Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG, Penna TCV. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology* 2009; 20:146-154.
141. Carolissen-Mackay V, Arendse G, Hastings JV. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *J. Food Microbiol* 1997; 34:1-16.
142. Suarez AM, Azcona JI, Rodríguez JM, Sanz B, Hernández PE. One-Step Purification of Nisin A by Immunoaffinity Chromatography. *Appl. Environ Microbiol* 1997; 63(12):4990–4992.
143. Jozala AF, Silva DP, Vicente AA, Teixeira JA, Pessoa AJ, Penna TCV. Processing of byproducts to improve nisin production by *Lactococcus lactis*. *Afr J Biotechnol* 2011; 10(66):14920-14925.
144. Matsusaki H, Endo N, Sonomoto K, Ishizaki A. Purification and Identification of a Peptide Antibiotic Produced by *Lactococcus lactis* IO-1. *J Fat Agr* 1995; 40(1-2): 73-85.

145. Stone WL, Smith M. Therapeutic uses of antioxidant liposomes. *Molec Biotech* 2004; 27: 217-230.
146. Paromov V, Suntres Z, Smith M, Stone WL. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure- role of oxidative stress and antioxidant therapy. *J Burns Wounds* 2007; 7: 60-85.
147. Colas JC, Shi W, Malleswara Rao VSN, Omri A, Mozafari MR, Singh H. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron* 2007; 38:841–847.
148. İskenderoğlu C. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Oral İlaç Şekli Üzerine Çalışmalar. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.
149. Sankalia MG, Mashru RC, Sankalia JM, Sutariya VB. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 65: 215–232.
150. Severina E, Severin A, Tomasz A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram positive Pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41: 341–347.
151. Mota-Meira M, Lapointe G, Lacroix C, Lavoie MC. MICs of Mutacin B-Ny266, Nisin A, Vancomycin, and Oxacillin against Bacterial Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(1):24–29.
152. Brumfitt W, Salton MRJ, Hamilton-Miller JMT. Nisin alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 50: 731–734.

153. Piper C, Draper LA, Cotter PD, Ross RP, Hill C. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and Enterococcus species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 64: 546–551.
154. Stevens K, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR. Nisin Treatment for Inactivation of Salmonella Species and Other Gram-Negative Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57(12):3613-3615.
155. Kalchayanand N, Hanlin MB, Ray B. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Letters in Applied Microbiology* 1992; 15(6): 239–243.
156. Cutter CN, Siragusa GR. Population Reductions of Gram-Negative Pathogens Following Treatments with Nisin and Chelators under Various Conditions. *Journal of Food Protection* 1995; 58(9) : 977-983.
157. Ivanova I, Kabadjova P, Pantev A, Danova S, Dousset X. Detection, Purification and Partial Characterization of a Novel Bacteriocin Substance Produced By *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 Isolated From Boza Bulgarian Traditional Cereal Beverage. *Biocatalysis: Fundamentals & Applications* 2000; 41(6):47-53.

## 10. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim için bana çalışma imkanı sunan; bilgi, yardım ve önerilerini esirgemeyen danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Seyyal ROTA' ya;

Bu çalışmayı mümkün kılarak, bana her zaman cesaret veren, her türlü laboratuvar imkanını kullanımıma sunan ve çalışmalarım sırasında karşılaştığım her türlü sorunun çözümü için değerli vaktini, sabrını ve desteğini esirgemeyen hocam, Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK' e;

Çalışmalarım boyunca bana olanaklar sunan ve desteğini esirgemeyen hocam, Sayın Prof. Dr. Ufuk ABBASOĞLU' na;

Bilgi birikimlerinden faydalandığım, fikirleri ve tecrübeleriyle bana karşı her zaman içten ve anlayışlı olan hocam, Sayın Prof. Dr. Nedim SULTAN' a;

Her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan, benden ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocam, Sayın Prof. Dr. Tuncer DEĞİM' e;

Akademik hayatımın ilk gününden itibaren yanımda olan, yardımseverliği, yakın ilgisi ve herşeyden önemlisi gerçek dostluğu ile her zaman bana destek olan sevgili arkadaşım, Doç. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ' a ve eşi Uzm. Dr. Fatih ONURDAĞ' a;

Protein kimyası dünyasında bana rehberlik ederek, çalışmalarına ışık tutan Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN' e;

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yakın arkadaşlıklarını ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Dr. Ecz. Başaran MUTLU AĞARDAN' a ve Uzm. Bio. Duygu ABBASOĞLU' na;

Beni her zaman gönülden destekleyen sevgili babam Mehmet ÖZGEN' e, canım ablam Özlem ÖZGEN' e ve biricik eşim Özkan ÖZGACAR' a fedakarlıklarından dolayı sonsuz teşekkürler ederim.

*Başarabileceğime her zaman inanan ve beni de inandıran ANNEM için...*

## **11. ÖZGEÇMİŞ**

**Adı:** Selda

**Soyadı:** Özgen Özgacar

**Doğum yeri ve tarihi:** Kozan- 02.03.1982

### **Eğitimi**

- Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2004-2007 (Yüksek lisans)
- Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 2000-2004 (Lisans)
- Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı Lise)

### **Yabancı Dili**

- İngilizce

### **Üye Olduğu Kuruluşlar**

- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti
- The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)