

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Lactococcus lactis* subsp. *lactis* EYL 38 SUŞUNDA NİSİN ÜRETİMİNİN
GENETİK ANALİZİ VE KONJUGAL AKTARIMI**

Emine ANAYOL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2006**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Lactococcus lactis subsp. *lactis* EYL 38 SUŞUNDA NİSİN ÜRETİMİNİN GENETİK ANALİZİ VE KONJUGAL AKTARIMI

Emine ANAYOL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada; konakçı spektrumu, fiziksel ve kimyasal muamelelere verdiği yanıtlar esas alınarak *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun ürettiği bakteriyosinin nisin olduğu tanımlandı. *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda, nisin üretiminin genetik doğası ve konjugal aktarım özellikleri incelenerek, söz konusu suşun starter kültür geliştirme programlarına uygunluğu araştırıldı. *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda; mutasyonel analiz, konjugal aktarım ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmaları ile, nisin üretiminin gen kodunun kromozomal DNA üzerinde bulunduğu ve konjugatif transpozonlarla ilişkili olduğu belirlendi. Bu suşta nisin üretim özelliğinin gen kodunun konjugal aktarım sıklığı, verici hücre başına $\sim 10^{-3}$ olarak tespit edildi. Nisin üretim özelliğinin stabilitesi, EYL 38 doğal suşunda % 90, konjugantlarında ise % 45 - % 55 arasında saptandı. Diğer yandan, ~ 70 generasyon sonunda doğal suş ve konjugantların nisin üretim yeteneğini sürdüren kolonilerinin başlangıçta tespit edilen oran ile aynı düzeyde nisin ürettiği tespit edildi.

2006, 72 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, nisin, konjugasyon

ABSTRACT

Master Thesis

GENETIC ANALYSIS AND CONJUGAL TRANSFER OF NISIN PRODUCTION IN
Lactococcus lactis subsp. *lactis* EYL 38

Emine ANAYOL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* EYL 38 was characterized as nisin according to the responses to physical, chemical treatments and host spectrum. The availability of this strain for developing starter culture programs was studied by determining the genetic nature and conjugal transfer ability of its nisin producing property. With the studies of mutational analyses, conjugal transfer and polymerase chain reaction (PCR); it was concluded that genes for nisin production at *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* EYL 38 were carried on chromosomal DNA and related with conjugal transposons. At this strain, the conjugal transfer frequencies of nisin production property was measured about $\sim 10^{-3}$ per donor cell. The stability of this property was 90 % at EYL 38 natural strain and between 45-55 % at conjugants. On the other hand, at the end of ~ 70 generation nisin production level was detected as well as in the beginning at both colonies of natural strain and conjugants having nisin production ability.

2006, 72 pages

Key Words: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, nisin, conjugation

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda alıŐma imkânı sunan ve alıŐmamın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e;

Tüm yardımları için laboratuvar arkadaşlarım AraŐ. Gör. Ömer ŐİMŐEK, AraŐ. Gör. Yasin TUNCER, AraŐ. Gör. Dilek AVŐAROĐLU, Banu ÖZDEN ve Burcu ÖZKALP'e;

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen çok değerli anneme, babama ve ablalarım;

ÇalıŐmalarım süresince birçok fedakârlık gösteren sevgili eŐim Dr. M. Alpaslan ANAYOL'a

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Emine ANAYOL

Ankara, Aralık 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	3
2.1.1 Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler.....	5
2.1.1.1 I. Grup bakteriyosinler.....	5
2.1.1.2 II. Grup bakteriyosinler.....	5
2.1.1.3 III. Grup bakteriyosinler.....	6
2.1.1.4 IV. Grup bakteriyosinler.....	6
2.1.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler.....	7
2.1.2.1 Laktokok lantibiyotikleri.....	8
2.1.2.2 Nisin.....	9
2.1.2.2.1 Nisinin yapısal özellikleri.....	9
2.1.2.2.2 Nisinin etki mekanizması.....	11
2.1.2.2.3 Nisin biyosentezi	13
2.1.2.2.4 Nisinin dirençlilik sistemi.....	15
2.1.2.2.5 Nisinin ticari önemi ve uygulamaları.....	16
2.1.2.2.6 Nisinin stabilitesi.....	19
2.1.2.2.7 Nisin üretim özelliğinin genetik determinantları.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1 Materyal.....	23
3.1.1 Mikroorganizmalar.....	23
3.1.2 Mikroorganizmaların saklanma koşulları ve besiyerleri.....	23
3.2 Yöntem.....	26

3.2.1 Nisin üretim özelliğinin belirlenmesi.....	26
3.2.2 pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının nisin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	26
3.2.2.1 Ortam pH'nın nisin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	26
3.2.2.2 Sıcaklık uygulamasının nisin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	27
3.2.2.3 Enzim uygulamalarının nisin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	27
3.2.3 Faj biyodenemeleri.....	27
3.2.4 Nisin dirençlilik düzeyinin belirlenmesi.....	28
3.2.5 Nisin üreten suştan plazmitlerin giderilmesi ve plazmitleri giderilmiş mutantların seçimi.....	29
3.2.6 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 suşu ve mutantlarının plazmit içeriklerinin tanımlanması.....	30
3.2.6.1 Plazmit izolasyonu.....	30
3.2.6.2 Elektroforez.....	32
3.2.6.3 Plazmit büyüklüklerinin saptanması.....	33
3.2.7 Kromozomal DNA izolasyonu.....	34
3.2.8 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) denemeleri.....	35
3.2.9 Konjugasyon.....	35
3.2.10 Nisin üretme yeteneğinin stabilite düzeyinin saptanması.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	37
4.1 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 Suşu Tarafından Üretilen Nisinin Etki Spektrumunun belirlenmesi.....	37
4.2 pH, Sıcaklık ve Enzim Uygulamalarının Nisin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	42
4.3 Nisin Üreticisi <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 Suşunun Faj Duyarlılık Düzeyinin Belirlenmesi.....	47
4.4 Nisin Üreticisi <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 suşunda Nisin Dirençlilik Düzeyinin Belirlenmesi.....	49

4.5 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 Suşunda Nisin Üretim Yeteneğinin Genetik Determinantının Saptanması.....	50
4.6 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 Suşunda ve Konjugantlarında Nisin Üretim Yeteneğinin Stabilitesi	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER DİZİNİ

AU	Arbitrary Unit
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Daimin Tetraasetik Asit
g	Gram
GRAS	İnsan ve Hayvan Tüketiminde güvenilir
IU	International Unit
kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
MDa	Mega Dalton
nm	Nanometre
pfu/mL	Mililitredeki Plak Oluşturma Birimi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
STE	Sodyum Tris EDTA
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Nisin A, Z, ve U' nun ve içerdiği modifiye amino asitlerin yapısı.....	11
Şekil 2.2 Nisinin por oluşumu için önerilen lipit II modeli.....	13
Şekil 2.3 Nisin biyosentezi aşamaları.....	14
Şekil 2.4 Nisin Z üretimine katılan genler.....	14
Şekil 4.1 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 suşu tarafından üretilen nisinin <i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003 suşuna karşı oluşturduğu inhibisyon zonu.....	39
Şekil 4.2 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 suşunun ürettiği nisin üzerine pH, sıcaklık ve enzimlerin etkisi.....	46
Şekil 4.3 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 doğal suşunun nisin üretimini sürdüren (Nis ⁺) nisin üretimini kaybeden (Nis ⁻) mutantların plazmit içerikleri.....	52
Şekil 4.4 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 doğal suşu ve nisin üretim yeteneği kazanmış konjugantın plazmit içerikleri.....	53
Şekil 4.5 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 suşunda nisin temel geninin kromozomal ve plazmid DNA kullanılarak PZR amplikasyonu.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Nisinin uygulama alanları.....	17
Çizelge 4.1 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 suşunun indikatör suşlara karşı gösterdiği inhibisyon etkinliği.....	38
Çizelge 4.2 Bakteriyosin üreticisi bazı laktokok suşlarının, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 suşu üzerine inhibisyon etkinlikleri.....	41
Çizelge 4.3 Nisin aktivitesi üzerine pH' nın etkisi.....	44
Çizelge 4.4 Nisin aktivitesi üzerine enzim ve sıcaklığın etkisi.....	45
Çizelge 4.5 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 suşunun faj direnç profili.....	48
Çizelge 4.6 Doğal <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> EYL 38 suşu ve konjugantlarının nisin üretim düzeyi ve stabilitesi	56

1. GİRİŞ

Hastalık ya da zehirlenme etmeni mikroorganizmaların gıda sistemlerinde kontrolü; gerek üretim ekonomisi ve gerekse insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Söz konusu mikroorganizmalara karşı mücadele amacı ile, antibiyotikler ve bazı kimyasal koruyucu ajanlar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak özellikle bakterilerin bu koruyuculara karşı hızlı bir şekilde dirençlilik özelliği kazanması, yürütülen mücadelenin etkinliğini önemli ölçüde düşürmektedir. Ayrıca tüm dünyada tüketici tercihleri, daha az kimyasal bileşen içeren doğal ve güvenli gıdalara yönelmektedir. Bakteriyosinler; doğal, çevreci ve etkin gıda koruma özellikleri ile, son yıllarda öne çıkan biyomoleküllerdir. Endüstriyel açıdan taşıdıkları bu kritik önemden dolayı yeni bakteriyosinlerin izolasyonu, moleküler tanısı ve üretim süreçlerine uygunluğu, yoğun araştırmaların odağı haline gelmiştir.

Laktik asit bakterileri grubunda yer alan *Lactococcus* cinsi üyeleri (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*), başta fermente süt ürünleri olmak üzere, değişik tip fermente gıdaların üretiminde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadır. Bu bakteriler; fermentasyon süreçlerinde ürünün yapısal ve aromatik gelişiminin sağlanmasının yanında, kontamine floranın inhibisyonunda da etkin rol almaktadır. Gıda fermentasyon süreçlerinde starter kültür suşu olarak kullanılan *L. lactis* üyelerinin ürettiği bakteriyosinler içerisinde, yalnız atipik *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının sentezlediği nisin ticari kullanım olanağı bulmuştur. Oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olan nisin, FDA (Food and Drug Administration) tarafından GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir ajan) metabolitler kapsamına alınmış ve gıda koruma ajanı olarak belgelendirilmiştir. Nisin 50'den fazla ülkede gıdaların korunması amacı doğrultusunda kullanılsa da, üretim maliyetinin yüksek olması nedeniyle, gıda üreticileri tarafından sınırlı düzeyde tercih edilmektedir. Diğer yandan; nisinin üretici suşlar tarafından düşük verimde üretiliyor olması, fermente gıdalarda koruyucu rolünü sınırlandırmaktadır. Bu nedenlerle, yüksek oranda nisin üretme yeteneğine sahip suşların izolasyonu ve karakterizasyonu yolu ile, hem endüstriyel nisin üretiminde ve hem de starter kültür programlarında kullanılabilecek yeni suşlar kazanılmaya çalışılmaktadır. Diğer yandan, *L. lactis*

suşlarında nisin üretimini kontrol eden gen kümesinin konjugatif transpozonlarla ilgili olması, tür içi aktarımını ve dolayısı ile bakteriyosin üretme özelliğindeki starter kültür suşlarının geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Zira endüstriyel starter kültür suşu geliştirme programlarında yalnız bu doğal gen aktarım yönteminin kullanımına izin verilmektedir. Laktokoklarda en etkin doğal gen aktarım sisteminin konjugasyon oluşu da, ayrıca bu sistemi pratikte çok etkin hale getirmektedir.

Geleneksel fermente ürünler açısından zengin bir kültüre sahip olan ülkemizde, endüstriyel starter kullanımı kısa bir geçmişe sahiptir. Bu nedenle ülkemiz, teknolojik açıdan önem taşıyan özelliklere sahip doğal suşlar bakımından ciddi bir kaynak teşkil etmektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu, Türkiye kökenli ve nisin üretim yeteneği tanımlanmış değerli bir izolattır. Bu tez kapsamında söz konusu suşun nisin üretiminin genetik doğası ve konjugal aktarım özellikleri incelenerek, endüstriyel nisin üretimi ve starter kültür geliştirme programları açısından potansiyelinin tanımlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Bakteriyosinler, bazı bakteriler tarafından sentezlenen ve genellikle yakın akraba türler üzerinde bakteriyosidal ya da bakteriyostatik etkiye sahip olan protein yapıdaki bileşiklerdir (Tagg *et al.* 1976, Klaenhammer 1993). İlk tanımlanan bakteriyosinler, *Escherichia coli* suşlarından izole edilen kolisin'lerdir. Bu öncü çalışmaları izleyen araştırmalarda, başta *Lactobacillus* ve *Lactococcus* olmak üzere; *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsi bakterilerin sentezlediği çok sayıda farklı bakteriyosin tanımlanmıştır (Gorris 1994). Bakteriyosinlerin etki spektrumları, gıda kökenli patojen ya da bozulma etmeni olan *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* gibi bakterileri kapsayabilmektedir (Riley 1998, De Martinis 2002). Genel olarak bakteriyosinlerin inhibisyon etkinliği, hücre duvarı biyosentezinin engellenmesi ve por oluşumu mekanizmaları tarafından teşvik edilen, proton motivasyon gücünün bozulması ile gerçekleşmektedir (Twomey *et al.* 2002). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda; laktik asit bakterilerine ait bazı bakteriyosinlerin, hücre bölünmesinin engellenmesi yolu ile de bakteriyel inhibisyona neden olduğu anlaşılmıştır (Mills *et al.* 2005). Bugüne kadar çok sayıda bakteriyosin moleküler düzeyde incelenmiş ve büyük bir kısmının genetik kodunun plazmitler üzerinde bulunduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda kromozomal DNA tarafından kodlanan nadir bakteriyosinler de tanımlanmıştır (Klaenhammer 1993, Nes and Tagg 1996, Papaigianni 2003, Mills *et al.* 2006).

Bakteriyosinlerin sentezlenebilmesi için, en az 4 farklı fonksiyona sahip gen ya da genlere gereksinim vardır. Bu genler fonksiyonları esas alınarak aşağıdaki gruplara ayrılmaktadır;

1. Öncü bakteriyosinin sentezlenmesinde görev alan yapısal genler
2. Öncü peptidin olgunlaştırılmasında ve hücre dışına salgılanmasında görev alan genler

3. Hücreyi kendi bakteriyosinine karşı koruyan proteinleri sentezleyen dirençlilik genleri
4. Bakteriyosin sentezinin regülasyonundan sorumlu genler (Klaenhammer 1993, Nes and Tagg 1996).

Bakteriyosinler, benzer aktivite özelliklerinden dolayı, birçok kaynakta antibiyotiklerle karıştırılmaktadır. Ancak bu antimikrobiyel bileşik grupları arasında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Söz konusu farklılıkları dört başlık altında toplamak olasıdır;

1. Bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenen ürünlerdir. Antibiyotikler ise enzimatik işleme sonucu aktif formlarını kazanırlar (bu süreçlerde kotranslasyonel ve post-translasyonel modifikasyonlar etkilidir).
2. Bakteriyosinler, antibiyotiklere göre çok daha dar etki spektrumuna sahiptir.
3. Her bakteriyosinin kendi dirençlilik proteini vardır. Bu dirençlilik proteinlerini kodlayan genler, bakteriyosinlerin yapısal genleri ile bağlantılıdır. Antibiyotik dirençliliğini yöneten genetik determinantlar ise, yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir.
4. Bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilir (birincil metabolitler) ve iki bileşenli bir sistem tarafından regüle edilir. Antibiyotikler ise, gelişimin durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Nes *et al.* 2001).

Endüstriyel önemleri nedeniyle, tüm dünyada yürütülen yoğun çalışmalar sonucu bakteriyosinlerin sayısı ve türünün hızla artması, bu bileşiklerin genel geçer bir sınıflandırma şemasının yapılması gereksinimini doğurmuştur. Klaenhammer (1993) tarafından, Gram-pozitif bakteriler esas alınarak yapılan sınıflandırmaya göre bakteriyosinler; molekül ağırlıkları, ısıl stabiliteleri, enzim hassasiyetleri, etki mekanizmaları ve modifiye amino asitleri gibi ortak özelliklerine göre 4 grup altında toplanmıştır. Bu sınıflandırmada Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler yer almamaktadır.

2.1.1 Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler

2.1.1.1 I. Grup bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler genellikle “lantionin” köprüleri içermeleri nedeniyle lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Lantibiyotiklerin yapılarında lantionin (Lan) ve metillantonin (MeLan) olarak adlandırılan türev amino asitlerin bulunuşu karakteristiktir. Ayrıca bu grup üyelerinde, biyokimyasal özelliklerini etkileyen dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi, dehidro amino asitler de bulunmaktadır (Twomey *et al.* 2002). Molekül ağırlıkları 5 kDa'dan daha düşüktür. Bu grupta yer alan nisın, laktisin 3147A ve 3147B ile plantarisin C, ısı stabil biyomoleküllerdir. Bu bakteriyosinler, asidik pH'da 100°C'ye kadar stabilitelelerini koruyabilmektedir (Chen and Hoover 2003). I. Grup bakteriyosinler, kimyasal yapılarına ve antimikrobiyel aktivitelelerine göre, IA ve IB olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

IA: IA grubuna dahil olan bakteriyosinler, net pozitif yüke sahip hidrofobik polipeptitlerden meydana gelmiştir. Bu grup üyeleri membran aktif özellik gösterir. Antimikrobiyel aktivitelelerini, bakteriyel membranlarda oluşturdukları porlar aracılığı ile gerçekleştirmektedirler (Twomey *et al.* 2002, Chen and Hoover 2003).

IB: Bu grup bakteriyosinler genellikle yüksüzdür ya da negatif yüke sahiptir. Globüler peptit yapısı içerirler. Belirli bakteriyel enzimleleri ya da enzim sistemlelerini inhibe ederek antimikrobiyel aktivite göstermektedirler (Twomey *et al.* 2002).

2.1.1.2 II. Grup bakteriyosinler

II. Grup bakteriyosinler, I. gruptan farklı olarak, lantionin köprüleleri içermezler. Molekül ağırlıkları 10 kDa'dan daha düşüktür ve ısı stabil moleküllelerdir. Antimikrobiyel aktiviteleleri, membran aktif molekül yapısından kaynaklanmaktadır. Çok sayıda bakteriyosin içeren bu grup, 3 alt gruba ayrılmaktadır (De Martinis *et al.* 2002).

IIA: IIA Grubu, pediosin benzeri bakteriyosinleleri kapsar (Stoddard *et al.* 1992, Cintas *et*

al. 1997). Bu grup bakteriyosinler, özellikle *Listeria*' ya karşı aktif olup, yapısal peptidin N-terminal bölgesinde Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizisi içerirler (Chen and Hoover 2003).

IIb: Bu grup üyeleri, tam bir antimikrobiyel aktivite için, interaksiyonları zorunlu olan iki peptid molekülü içermektedir (van Belkum *et al.* 1991, Diep *et al.* 1996). Söz konusu polipeptit zincirleri yapısal olarak birbirinden farklıdır. Antibakteriyel aktiviteleri membran üzerinde oluşturdukları porlardan ileri gelmektedir (Hécharad and Sahl 2002).

IIc: Bu grup üyelerinin çoğu sistein amino asit kalıntısı içermekte ve bu nedenle söz konusu bakteriyosinlere, tiolbiyotikler veya sistobiyotikler adı verilmektedir. Tiyol-aktif bakteriyosinler olup, aktiviteleri için indirgenmiş sistein amino asidine gereksinim duyarlar (De Martinis *et al.* 2002).

2.1.1.3 III. Grup bakteriyosinler

III. Grup üyeleri; helveticin J (Joerger and Klaenhammer, 1986), metalloendopeptidaz ve enterolislin gibi büyük moleküler ağırlığa (>30 kDa) sahip bakteriyosinlerdir. Bu grup üyelerinin tümü dirençli proteinlerden oluşmaktadır (De Martinis *et al.* 2002, Hickey *et al.* 2003, Nilsen *et al.* 2003).

2.1.1.4 IV. Grup bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler “ karmaşık bakteriyosinler” olarak adlandırılan, büyük ve heterojen moleküller olup, aktiviteleri için karbonhidrat veya lipit bileşenlerine gereksinim duymaktadırlar. Bu bakteriyosinlerin biyokimyasal karakterizasyonu henüz tamamlanamamıştır. Karbonhidrat ve lipit yan gruplarının antibakteriyel aktivitede oynadığı rolün belirlenmesi üzerine yoğun araştırmalar sürdürülmektedir (Jimenez-Diaz *et al.* 1995, Chen and Hoover 2003, Kurt ve Zorba 2005).

2.1.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler

Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinler, endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır. Zira laktik asit bakterileri, fermente gıdaların büyük bir bölümünün doğal mikroflorasını oluşturmaktadır. Bakteriyosin üretici starter kültür suşları, fermente gıdaların patojen ve bozulma etmeni bakterilerden korunmasında, gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından en etkin çözümü sunmaktadır. Diğer yandan bu bakteriyosinler, endüstriyel süreçlerde saflaştırıldıktan sonra gıdalarda koruma ajanı olarak kullanılma potansiyeline de sahiptir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, yakın akraba türler yanında, diğer bazı Gram-pozitif bakterileri de inhibe etme özelliğindedir. Gram-negatif türlere karşı inhibisyon etkisi içeren herhangi bir üyesi tespit edilememiştir. LAB bakteriyosinleri; amino asit dizileri, sıcaklık stabiliteyi, moleküler büyüklükleri, biyolojik aktiviteleri ve yapılarındaki farklı amino asitler esas alınarak, 3 farklı grup altında sınıflandırılmaktadır (Klaenhammer 1993, de Vuyst and Vandamme 1994).

I. Sınıf: lantibiyotikler

Ia: nisin benzeri lantibiyotikler. Katyonik özellik içerirler.

Iib: duramisin benzeri lantibiyotikler. Globüler proteinler olup düşük negatif yük içerirler.

II. Sınıf: lantibiyotik olmayan küçük ısı dirençli peptitler

Iia: antilisteriyel etkili pediosin benzeri peptitler

Iib: iki peptit içeren bakteriyosinler

Iic: salgılanan bakteriyosinler

III. Sınıf: büyük ısıya hassas proteinler (Nes *et al.* 1996).

Bu sınıflandırma içerisinde, gıda koruma esasına göre ön plana çıkan bakteriyosinler I. ve II. Sınıf üyeleridir. Zira bu sınıflara ait bakteriyosinler, endüstriyel uygulamalar açısından güçlü bir potansiyel taşımaktadır. Bu durumun en tipik örneği, bazı *L. lactis* üyeleri tarafından sentezlenen nisindir. Nisin, günümüzde birçok gıdanın korunmasında antimikrobiyel ajan olarak kullanılmaktadır. Nisinin de dahil olduğu I. Sınıf lantibiyotiklerin ayırıcı özellikleri; bu bakteriyosinlerin 5 kDa'dan küçük olmaları ve

yapılarında doğada yaygın olmayan lantiyonin ve β -metillantiyonin gibi amino asitleri bulundurmalarıdır. II. Sınıf bakteriyosinler ise, 10 kDa'dan küçük yapılar olup, ısıya karşı oldukça dayanıklıdır. Grup üyeleri; *L. lactis* subsp. *lactis* 9B4 tarafından üretilen laktokoksin A, B ve M (van Belkum *et al.* 1991, Venema *et al.* 1993), *Lactobacillus sake* LB706 tarafından üretilen sakasin A (Schillinger and Lücke 1989), *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 tarafından üretilen pediosin PA-1 olarak tanımlanmıştır. III. Sınıf bakteriyosinler ise; 30 kDa üzerinde moleküler büyüklüğe sahip olup, yapılarında karbonhidrat ve lipit yan grupları da bulunmaktadır (Chen and Hoover 2003).

Laktik asit bakterileri içerisinde özel bir yeri olan laktokok bakteriyosinleri ise; farklı enzimlere (tripsin, pepsin, lipaz gibi) karşı duyarlılıkları, ısı dirençleri ve diğer bakteriyosin-konakçı interaksyonları göz önünde bulundurularak kendi aralarında; laktokoksinler, lantibiyotikler, diplokoksinler ve laktoztrepsinler olmak üzere 4 grup altında toplamıştır. Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerden en bilinenleri; nisin başta olmak üzere, laktokoksin A, laktokoksin B, laktokoksin MN, laktokoksin G, laktokoksin 972, laktisin 481, laktisin 3147 ve son yıllarda tanımlanan laktisin FS92, laktisin RM, laktisin NK24, laktokoksin R, laktokoksin MMT24 ve laktokoksin MMFII' dir (Venema *et al.* 1995, Martinez *et al.* 1996, Ross *et al.* 1999, Yarmus *et al.* 2000, Ferchichi *et al.* 2001, Lee and Paik 2001, O' Sullivan *et al.* 2003, Badis *et al.* 2004).

2.1.2.1 Laktokok lantibiyotikleri

Laktokokkal lantibiyotikler, bu cins üyesi bakterilerin ürettiği diğer bakteriyosinlerden daha geniş bir aktivite spektrumu içermektedir. Bu moleküllerin sentezlenebilmesi için gerekli gen kümeleri; bakteriyel kromozomlar, plazmit DNA ya da transpozonlar gibi hareketli elementlerin üzerlerinde bulunabilmektedir. Tüm lantibiyotikler, N-terminal öncü peptit halinde sentezlenmektedir. Daha sonra bu öncü peptit post-translasyonel düzenlenmelere tabi tutulmakta ve aktif lantibiyotik oluşturulmaktadır. *L. lactis* suşları tarafından üretilen başlıca lantibiyotikler; laktisin 3147, laktisin 481 ve nisin' dir (Klaenhammer 1993, Kuipers *et al.* 1993, Sahl *et al.* 1995, Sahl and Bierbaum 1998, Pag and Sahl 2002, Gillor *et al.* 2005).

2.1.2.2 Nisin

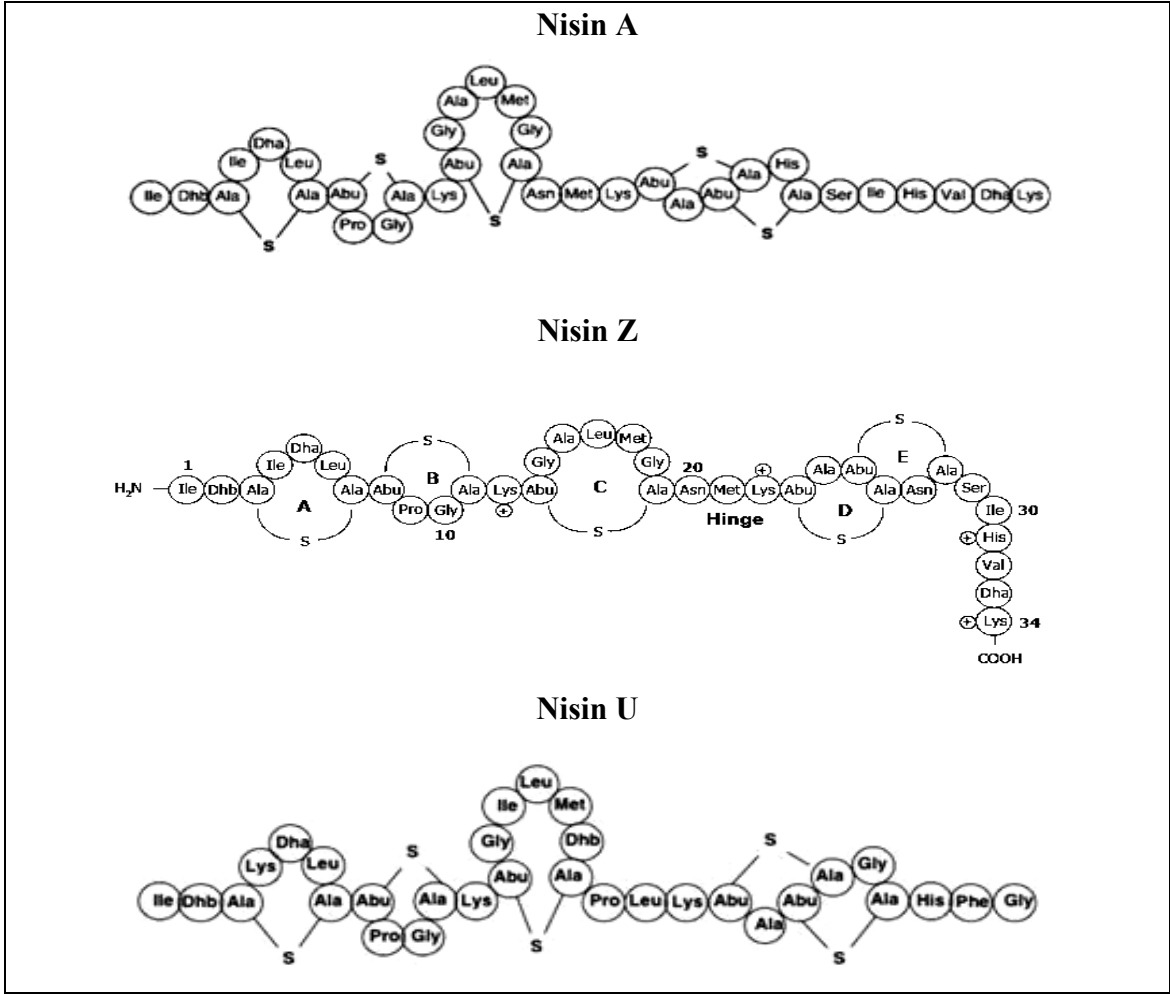
2.1.2.2.1 Nisinin yapısal özellikleri

Nisin *L. lactis* ve *S. uberis*' in bazı suşları tarafından üretilen ve post-translasyonel modifikasyonlarla aktif formu oluşturulan polipeptit yapısında bir bakteriyosindir (Klaenhammer 1988, Hansen 1994). 1928 yılında Rogers tarafından belirlenen bu inhibitör madde, daha sonra Mattich ve Hirsch tarafından çalışılmış ve "Nisin" olarak adlandırılmıştır (Delves-Broughton 1990). İnhibisyon etkinliği ve memeli sindirim sistemi tarafından inaktive edilme özellikleri esas alınarak, 1969 yılında Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gıda koruyucusu olarak kabul edilmiştir (WHO 1969). Böylece nisin, Avrupa Birliği ve ABD' yi de kapsayan 50'den fazla ülkede süt ve süt ürünleri, konserveler ve hazır çorbalar gibi değişik gıdaların korunması amacı ile kullanılmaya başlanmıştır (Delves-Broughton 1990).

Nisinin moleküler ağırlığı 3353 Dalton'dur. Yapısında doğada ender rastlanan bazı modifiye amino asitler (lantiyonin, 3-metillantiyonin, dehidroalanin ve dehidrobütirin) bulunmaktadır. Bu bakteriyosin, 57 amino asit içeren bir polipeptit olarak ribozomlarda sentezlenmekte ve post-translasyonel düzenlemelerle 34 amino asit uzunlukta aktif nisin molekülü oluşturulmaktadır. Nisin molekülü, bazı amino asitlerin dehidrasyonu ile meydana gelmiş 5 adet lantiyonin halkasına sahiptir. Bu halkalar; polipeptitte 3 ve 7, 8 ve 11, 13 ve 19, 23 ve 26, 25 ve 28 sırada yer alan amino asitler arasında meydana gelmektedir. Moleküler analiz çalışmaları, nisin molekülünün tanımlı bir katlanma yapısı içermediğine ve bu yapının çözelti içerisinde oldukça esnek olduğuna işaret etmiştir. Bu çalışmalar sonucunda; molekülde bulunan B, D ve E halkalarının β dönüş içerdiği ve halka içindeki 1. ve 4. amino asitlerin tioeter bağı ile sabitlendiği saptanmıştır. Ancak A ve C halkaları için detaylı veriler elde edilememiştir. Bu halkalardan N-terminal bölgeye yakın olanlar, C-terminal ucunda bulunan iki halkaya göre daha yüksek hidrofobik özellik göstermektedir (van de Ven *et al.* 1991, van den Hooven *et al.* 1993). Nisin molekülü sadece monomer (3350 Da) yapıda değildir. Yapısında bulunan dehidro amino asitlerin ve amino grupların interaksiyonuyla dimer

(6700 Da) veya tetramer (13400 Da) yapıda da bulunabilmektedir (Hurst 1983, Mulders *et al.* 1991).

Nisinin; nisin A, nisin Z nisin Q ve nisin U olarak adlandırılan dört doğal varyantı bulunmaktadır (Graeffe *et al.* 1991, Mulders *et al.* 1991, Zendo *et al.* 2003). Nisin U *Streptococcus uberis*' te tanımlanmıştır (Wirawan *et al.* 2006). İlk olarak *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO22186 suşu tarafından üretildiği belirlenen nisin Z, 27. pozisyonda histidin yerine asparajin amino asiti bulundurması ile nisin A' dan ayrılmaktadır. Bu durum nisin Z'nin nötral pH değerlerinde, nisin A' dan daha fazla çözünürlük göstermesine yol açmaktadır. Japonya' da nehir sularından izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* 61-14 suşu tarafından üretildiği belirlenen nisin Q ise, nisin Z' ye benzer şekilde 27. pozisyonda asparajin amino asidi içermektedir. Ancak, N-terminal ve C-terminal bölgelerin birbirine bağlandığı 21. pozisyonda; nisin A ve nisin Z' de esnek bir dönme noktası olarak hareket eden metiyonin bulunurken, nisin Q' da lösin yer almaktadır (Şekil 2.1) (de Vuyst and Vandamme 1994, Twomey *et al.* 2002, Papagianni 2003, Wirawan *et al.* 2006).



Şekil 2.1 Nisin A, Z, ve U' nun ve içerdiği modifiye amino asitlerin yapısı. A-E: lantionin halkası; Dha: dehidroalanin; Dhb: dehidrobütirin; Ala-S-Ala: lantionin; Abu-S-Ala: β -metillantionin (Gross and Morell 1971, Kellner *et al.* 1989, Kellner *et al.* 1991, Wirawan *et al.* 2006).

2.1.2.2.2 Nisinin etki mekanizması

Nisinin inhibisyon etkisi, ortamda bulunan bakteri yükü ve kullanılan nisinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Wiedemann *et al.* 2001). Nisinin mikromolar konsantrasyonlarda kullanımı halinde hedef bakterilerin hücre membranında rastgele bozulmalar meydana getirdiği, nanomolar konsantrasyonlarda kullanımı halinde ise lipit II molekülleri ile etkileşime girerek özel por oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir (Hsu *et al.* 2002, van Heusden *et al.* 2002). Nisinin oluşturduğu porlar membran geçirgenliğini artırarak, ATP ve amino asitler gibi yaşamsal öneme sahip olan

moleküllerin hücre dışına sızmasına ve otolize yol açmaktadır (Wiedemann *et al.* 2001, Hsu *et al.* 2002).

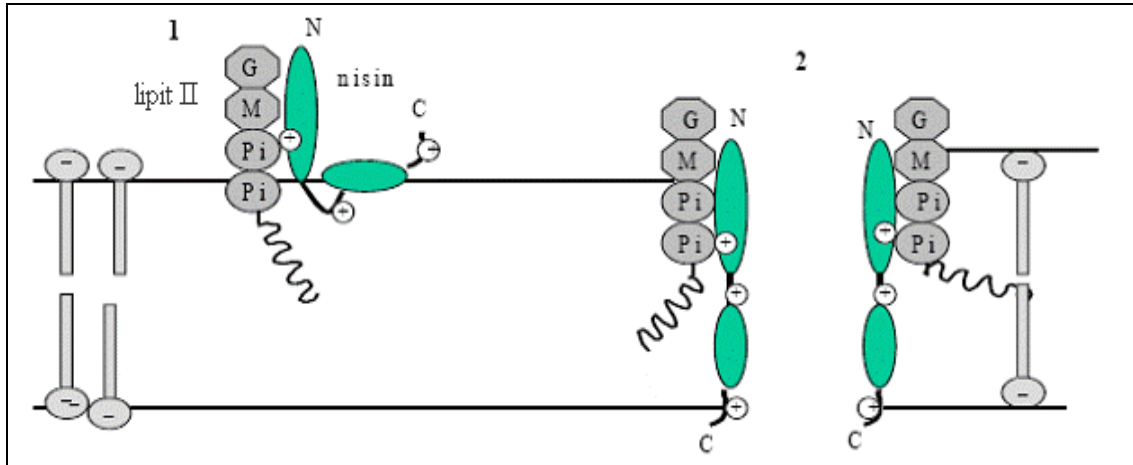
Değişik araştırmalarda, nisinin duyarlı hücrelere tutunması ve por yapısı oluşturması için; N-uç bölgesinin yanında, C-uç bölgesinin de negatif yüklü membran yüzeyi ile etkileşiminin gerekli olduğu belirlenmiştir (Demel *et al.* 1996, Breukink *et al.* 1997, van Kraaij *et al.* 1998, Breukink *et al.* 2003). Ayrıca, lipit II' nin sadece nisin bağlanma molekülü olmadığı, nisin porlarının oluşumuna da katkıda bulunduğu saptanmıştır. Nitekim Widemann ve ark. (2001) tarafından önerilen modelde lipit II, por kompleksinin dış sınırlarında yer almaktadır (Şekil 2.2). Duyarlı hücrelerde por oluşumu için 5 ile 8 adet arasında nisin ve aynı miktarda lipit II molekülüne gereksinim vardır (Breukink *et al.* 2003).

Nisin, “delme” ve “sıkıştırma” olarak adlandırılan iki modele göre por oluşumunu sağlamaktadır. “Delme” modelinde, her bir nisin molekülü dikey bir şekilde zara bağlanarak, zarda bir iyon kanalı oluşturulmaktadır. “Sıkıştırma” modelinde ise, belirli sayıda nisin molekülü fosfolipitlerin baş gruplarıyla interaksiyona girdikten sonra, lipitlerin sıkıştırılması sonucu, lipit-protein porları meydana getirilmektedir (Cleveland *et al.* 2001, Delves-Broughton 2005).

Yukarıda özetlenen etki mekanizmaları, nisini çok sayıda Gram-pozitif bakteriye karşı aktif hale getirmektedir. Hücre duvarı yapısal farklılığı nedeni ile, nisin Gram-negatif bakterilere karşı etkili değildir. Ancak bu bakterilerin hücre duvar yapısını nisin için geçirgen hale getiren her türlü işlem, söz konusu bakterilerde nisin duyarlılık oluşumuna yol açar. Bu tip işlemler; çelat oluşturan ajanlara maruz bırakma, öldürücü doz altı sıcaklık ve ozmotik şok uygulamalarını kapsamaktadır. Nitekim nisinin çelat oluşturan ajanlar olan; EDTA ya da yüksek ve düşük sıcaklık uygulamalarıyla beraber kullanımının, *Salmonella* ve *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilerin inhibisyonuna yol açtığı belirlenmiştir (Delves-Broughton 2005).

Nisin, vejetatif hücrelerin gelişiminin inhibisyonu yanında, bakteriyel sporların çimlenmesini de durdurmaktadır. Bu etkinin, çimlenen sporların membranlarında yer

alan proteinlerin yapısında bulunan sülfidril gruplarına, nisinın bağlanması sonucu meydana geldiği saptanmıştır. Ayrıca sporosidal etkide, nisin molekölü içindeki bir veya daha fazla dehidro amino asit yapısının da rol aldığı belirlenmiştir. Nitekim doğal nisin peptidinin 5. amino asidinin alaninle değiştirilmesi sonucunda, bakteriyel spora karşı etkinin yüksek oranda düştüğü tespit edilmiştir (Chan *et al.* 1996, Delves-Broughton 2005).



Şekil 2.2 Nisinın por oluşumu için önerilen lipit II modeli. Nisin ilk aşamada lipit II'nin karbohidrat parçasına dıştan yönelimli olarak bağlanır. N-terminal bölgesi bağlanma için gereklidir (1) C-terminal kısmı ise membranı geçerek por yapısını tamamlar (2) (van Kraaij *et al.* 1998).

2.1.2.2.3 Nisin biyosentezi

Nisinın biyosentezi; ribozomal olarak sentezlenen öncü peptitlerin translasyon sonrası modifikasyonları ile tamamlanmaktadır. 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 molekölü oluşturulmaktadır (Şekil 2.3). Değişik çalışmalarda, nisin biyosentezine katılan gen kümesinin (*nisA/Z/Q/BTCIPRKFEG*) sakkaroz fermentasyon yeteneği ile yakın ilişkili olduğu ve bu genlerin kromozomal DNA' daki konjugatif bir transpozon tarafından taşındığı saptanmıştır (Horn *et al.* 1991, Rauch and De Vos 1992, Kuipers *et al.* 1993, Kuipers *et al.* 1995, Immonen and Saris 1998). *NisA/Z/Q/BTCIPRKFEG* gen kümesi; nisin öncü proteininin (*nisA*) sentezini, proteinin translasyon sonrası modifikasyonunu, nisin

membranına bağılı kinaz (*nisK*) fosforilize edilerek aktif hale geçer. Daha sonra bu fosforil grubu *nisR* proteinine transfer edilir ve hücre içi yanıtı düzenleyici *nisR* proteini, *nisABTCIP* ve *nisFEG* genlerinin transkripsiyonunun başlamasını sağlar (Chandrapati and O’Sullivan 1999, Breukink *et al.* 2003).

Transkripsiyonel seviyede yapılan analizler sonucunda, nisin Z gen kümesinin; *nisZBTCIPRK* ve *nisFEG* olmak üzere, iki transkript ürettiği belirlenmiştir. Nisin A gen kümesinden ise; *nisABTCIP*, *nisRK* ve *nisFEG* olmak üzere üç adet transkripsiyon ünitesi üretilmektedir. Bu operonlardan genetik bilginin mRNA’ ya işlenme sırası *nisA/Z*, *nisBTCIPRK* ve *nisFEG* şeklinde olmaktadır. Yapısal gen *nisA/Z* ve *nisB* arasında “ters tekrar” serilerinin bulunması, genlerin ayrı promotorlar tarafından kontrol edildiğini akla getirmiştir. Ancak bu bölgelerde promotor serilerin tespit edilememesi nedeniyle, söz konusu dizilerin gen içi düzenleyici sinyaller olma olasılığını güçlendirmiştir (Buchman *et al.* 1988, Engelke 1992, Ra *et al.* 1996, Breukink *et al.* 2003).

2.1.2.2.4 Nisinin dirençlilik sistemi

Nisin üretici suşlar, kendi membranlarını nisinin etkisinden korumak için, karmaşık bir direnç mekanizması geliştirmiştir. Bu direnç mekanizmasında; *nisI*, *nisF*, *nisE* ve *nisG* genleri görev yapmaktadır. Genel olarak *nisFEG* genleri ABC sınıfı transport proteinlerini, *nisI* ise bir lipoproteini kodlamaktadır (Kuipers *et al.* 1993, Qiao *et al.* 1995, Stein *et al.* 2003). *NisI* hücreyi nisine karşı korur. Nisin-*nisI* etkileşimi sabit olmayan bir kompleksle son bulur (Stein *et al.* 2003). Nisin-*nisI* etkileşiminin doğası, *nisI*’ nın membran üzerindeki nisin moleküllerinin miktarını azaltan bir protein olarak işlev gördüğüne işaret etmektedir. Nitekim *nisI* geninin nisin üretici hücrelerde susturulması sonucunda, nisin direnç seviyesinde % 80 azalma tespit edilmiştir. Ancak aynı genin nisin üreticisi olmayan hücrelerde ifade edilmesi halinde sadece % 1-4 oranında direnç artışı sağlanmıştır. Bu nedenle, *nisI* ve *nisFEG* genlerinin nisin dirençlilik üzerinde sinerjetik bir etki gösterdiği yorumu yapılmıştır (Ra *et al.* 1999, Stein *et al.* 2003). *B. subtilis* ile yürütülen nisin dirençlilik çalışmaları sonucu ise, *nisI*

ve *nisFEG* sistemlerinin genetik regülasyonunun birbirinden bağımsız olduğu belirlenmiştir (Takala 2005).

2.1.2.2.5 Nisinin ticari önemi ve uygulamaları

Nisin, ticari uygulamalarda kullanılan tek lantibiyotiktir. İnsan dahil hiçbir memeliye toksik etkisi bulunmamaktadır. Zira α -kemotripsin tarafından sindirilerek inaktive edilir. Farelere ağızdan uygulanan nisinin toksik etkisinin, sofr tuzu gibi, çok düşük olduğu tespit edilmiştir (Hurst 1981). 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. Nisinin uygulama alanları Çizelge 2.1’ de özetlenmiştir (Hancock 1997, Hoffmann *et al.* 2002, Delves-Broughton 2005).

Çizelge 2.1 Nisinin uygulama alanları (Koponen 2004)

Gıdalar	Nisin tarafından inhibe edilen bakteriler
Peynir ürünleri	
İşlem görmüş peynirler	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
Sert ve yarı sert peynirler	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Süt	
Pastörize süt	<i>Clostridium botulinum</i>
Süt tozu	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>
Sütlü tatlılar	Termofilik ve sporlu bakteriler
Asitli konserve gıdalar	
Mantar, patates	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>
Bira ve Şarap	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp.
Et	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Tıbbi tedavi	
Peptik ülser hastalığı	<i>Helicobacter pylori</i>
Atopik dermatit	<i>Staphylococcus</i> spp.
Sığır mastitisi	<i>Staphylococcus</i> spp.

Nisinin etki spektrumu, diğer bakteriyosinlere kıyasla daha geniş olup, asidik gıdalarda yüksek düzeyde aktivite göstermektedir (Liu and Hansen 1990). *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* ve *Mycobacterium* cinslerine ait türler yanında *Bacillus* ve *Clostridium* gibi spor oluşturan bakterilere karşı da gıda sistemlerinin korunması amacı ile kullanılmaktadır (Klaenhammer 1988, Liu and Hansen 1993, Cleveland *et al.* 2001). Bugüne kadar nisin; işlenmiş peynirler (Ferreira and Lund 1996), yağsız süt (Wandling *et al.* 1999), sucuk-sosis (Davies *et al.* 1999), biftek (Cutter and Siragusa 1998), kimçi (Choi and Park 2000) ve balık (Nykänen 2001) gibi ürünlerde sorun yaratan bakterilerin inhibisyonunda başarı ile uygulanmıştır. Diğer yandan, pek çok işlenmiş gıdanın ısıtılma süresi ve ısıtılma düzeyi nisin kullanımı ile azaltılmaktadır. Böylece bu gıdaların organoleptik ve besinsel nitelikleri korunmaktadır. Emmental, İsviçre ve Gravyer peynir türlerinin gaz kusuru da, nisin kullanımı yolu ile önlenmektedir (Hirsch and Grinsted 1951, Kosikowski 1977, Tsai and Sandine 1987, Nykanen 2001).

1953 yılından beri nisin, Nisaplin (Applin-Barrett, UK) markası ile satılmaktadır. Nisaplin, yaklaşık % 2,5 oranında nisin içeren bir preparattır. Ürün, gram başına bir milyon uluslararası birim aktivitesinde standardize edilmiştir (Delves-Broughton 2005). Endüstriyel ürünlerde kullanılacak nisin konsantrasyonu ($100-4000 \text{ IU mL}^{-1}$), uygulanan gıdaya ve hedef organizmaya bağlı olarak değişim gösterir. Gıda uygulamalarına izin verilen maksimum nisin konsantrasyonu değişik ülkelerde büyük farklılıklar içermektedir (Cleveland *et al.* 2001). Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) yetişkinler için günlük kabul edilebilir nisin miktarını 2,9 mg olarak belirlemiştir (Gürsel 1999, Kurt ve Zorba 2005).

Değişik gıda sistemlerinde bulunan mikroflora üzerine nisinin etkisi tanımlanmış ve koruyucu olarak kullanım olanakları araştırılmıştır. Ogden ve Tubb (1985) tarafından yürütülen bir çalışmada, bira üretim ortamlarından izole edilen 149 bakteri suşu ve 12 bira mayasının nisin duyarlılığı, agar kuyu difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Araştırma sonucunda Gram-pozitif bakterilerinin % 92'sinin nisine (100 IU/mL) duyarlı olduğu, 32 Gram-negatif bakteri suşu ve bira mayalarının ise tam direnç gösterdiği belirlenmiştir. Nisinin kullanılması sonucu, sütlü tatlılar ve yoğurt gibi işlenmiş süt

ürünlerinin raf ömürlerinde artış sağlandığı saptanmıştır. Bu gıdalar için nisin endüstriyel süreçlerde kullanım olanakları araştırılmaktadır. Ayrıca nisin sıvı yumurta, balık ve unlu gıdalarda da uygulanabilirliği konusunda çalışmalar yürütülmektedir (Delves-Broughton 1990, Vanderbergh 1993, Kurt ve Zorba 2005).

Davies ve ark. (1999) Bolonya tipi sosislere, üretim aşamasında nisin (25µg/g) ile birlikte son konsantrasyonu 10⁴/g olacak şekilde laktik asit bakterisi (LAB) karışımı (*Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leu. carnosum*) ilave etmiştir. Sosis örnekleri vakum paketlenerek 8°C' de inkübe edildiğinde, nisin içermeyen kontrol örnekleri 7 gün içinde bozulurken, nisin içeren örneklerin 50 günden fazla bozulmadan kaldığı tespit edilmiştir. Nisin, et ve et ürünlerinde bulunan *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium botulinum* gibi çok sayıda patojen ve bozulma etmeni bakterinin gelişimini inhibe etme özelliği içermektedir (Pawar *et al.* 2000). Ayrıca *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens* ve *Listeria innocua*'nın sorun oluşturduğu karkas yüzeylerine nisin spreyleneceği, bu bakterilerin sayısını önemli düzeyde azaltmaktadır. *Brochothrix thermosphacta* üzerinde etkili nisin seviyesinin 400 IU/mL olduğu saptanmıştır (Cutter and Siragusa 1996, Kurt ve Zorba 2005). Bu özelliklerinden dolayı nisin, et ve et ürünlerinde birçok durumda nitritin alternatifi olarak görülmektedir.

Nisin gıdaların korunmasında uygulanan kullanım şekillerinden birisi de, yüzeysel biyofilmlere yüklenmesidir. Bu tür antimikrobiyel biyofilmler, temas ettikleri gıda yüzeyinde mikrobiyel gelişimi etkili bir şekilde inhibe etmektedir. Nisin, protein yapısındaki biyofilmlerin polimer yapısına doğrudan katılarak veya polietilen materyallerin yüzeyine tutundurulularak kullanılabilir (Kumar and Anand 1998, Dzung and Nes 2002, Kurt ve Zorba 2005).

2.1.2.2.6 Nisinin stabilitesi

Ender rastlanan amino asitlerin nisin molekülündeki fonksiyonu henüz tam anlamı ile açıklık kazanamamıştır. Ancak bu amino asitlerin, nisinin stabilitesini ve antibakteriyel aktivitesini güçlendirmek gibi bazı yapısal ve fonksiyonel işlevler ile ilişkili olduğuna

dair veriler tespit edilmiştir (Hansen 1994). Nisinin gıda sistemlerinde kullanımında, fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı stabilitesini koruması büyük önem taşımaktadır. pH ve sıcaklığın nisin üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, nisinin 121°C’de 15 dakika otoklav işlemine tabi tutulduktan sonra; pH 3’de aktivitesinin tamamını, pH 5’de % 35’ini, pH 7’de ise % 5’ini koruduğu saptanmıştır (Delves-Broughton 1990a). Başka bir çalışmada, pH 2’ de 115°C’ de 20 dakika otoklav işlemine tabi tutulan nisin çözeltisinin aktivitesinin kaybolmadığı belirlenmiştir (Piard *et al.* 1990). Isıl işlem dikkate alındığında, gıdalardaki nisin aktivesi kaybı, tampon çözeltilerde görülen kayba göre daha az olmaktadır (Delves-Broughton 1990b). Nisin aktivitesini etkileyen en önemli kriterlerden biri de, nisinin çözünürlük özellikleridir. Liu ve Hansen (1990) düşük pH değerlerinde nisinin çözünürlüğünün oldukça yüksek olduğunu (57 mg/mL, pH 2, 25°C), yüksek pH değerlerinde ise hızlı bir şekilde azaldığını (0.25 mg/mL, pH 8-12, 25°C) belirlemiştir.

Nisaplin, değişik fiziksel ve kimyasal uygulamalara karşı oldukça dayanıklı bir üründür. 25°C’nin altında, karanlıkta ve kuru yerde muhafaza edildiğinde, iki yıldan fazla aktivite kaybı göstermez. Gıdaların korunmasında düşük nisin konsantrasyonu kullanıldığı için, gıda sistemlerinde değişken pH düzeyleri önemli bir sorun oluşturmaz (Zezza *et al.* 1993, Delves-Broughton 2005). Pastörizasyon sıcaklıklarında, yüksek sıcaklıklara göre, nisinde daha düşük düzeyde aktivite kaybı meydana gelir (pH 5,6–5,8’ de standart işlenmiş peynir üretimi sırasında yaklaşık % 20 aktivite kaybı saptanmıştır). Diğer yandan, gıda bileşenleri nisini ısıl işleme karşı koruyabilirler. Gıda sistemindeki nisinin depo koşullarına dayanıklılığı, üç etkene bağlıdır. Bunlar; depolama sıcaklığı, depolama süresi ve pH’ dır. Düşük sıcaklıklarda daha fazla nisin birikimi elde edilir. Örneğin; pastörize bir işlenmiş peynir üretiminde (pH 5,6–5,8’de 85–105°C’de 5–6 dakika) ilk aşamada % 20 ile 30 arasında bir aktivite kaybı görülür. Ancak 20°C’de 30 haftalık depolama süresi sonunda % 80, 25°C’de % 60 ve 40°C’de % 40 nisin aktivite artışı meydana gelir. Depo sıcaklığı arttıkça nisin stabilitesi düşer. Bu nedenle yüksek depolama sıcaklıklarında nisin katkı oranı arttırılmaktadır. İşlem görmüş soğuk gıdalarda, proteolitik enzimler nisin dayanıklılığını etkileyebilir. Gıda katkı maddeleri olan titanyum dioksit ve sodyum metabisülfidin de nisinin stabilitesini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir (Delves-Broughton 2005).

Nisin aktivitesi üzerine değişik proteolitik enzimlerin etkisi, detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Bu araştırmalarda tüm nisin varyantlarının α -kemotripsin ve proteinaz K enzimleri tarafından inaktive edildiği, pepsin ve tripsin enzimlerinden ise etkilenmediği saptanmıştır (Klaenhammer 1988, Piard *et al.* 1990, Kojic *et al.* 1991, Uhlman *et al.* 1992, Zezza *et al.* 1993, Delves-Broughton 2005).

2.1.2.2.7 Nisin üretim özelliğinin genetik determinantları

Laktokoklarda nisin biyosentezinin genetik doğası üzerinde yürütölen öncü çalışmalarda, bu yeteneğin konjugasyon yolu ile aktarıldığı saptanmıştır. Bu bulgudan hareketle araştırmacılar, söz konusu özelliğin plazmit kodlu olduğunu öngörmüştür (Davey 1984, Gasson 1984, Kaletta and Entian 1989). Kaletta ve Entian (1989) tarafından yürütölen araştırmada, *L. lactis* subsp. *lactis* 6F3 suşunda nisin üretiminden sorumlu *nisA* geninin büyük bir konjugatif plazmit üzerinde bulunduğu belirlenmiştir. Nisin üretim özelliğinin genetik hareketliliğini esas alan benzer çalışmalarda, *L. lactis* subsp. *lactis*' in sekiz suşunda bulunan 30 MDa' luk ve *L. lactis* subsp. *lactis* 11454' deki 28 MDa' luk plazmitlerin nisin üretimi ve dirençliliğinde görev aldığı ileri sürölmüştür (Leblanc *et al.* 1980, Gasson 1984, Piard *et al.* 1993). Ancak nisin üretimi ile ilişkili genlerin klonlanması ve bu klonlanan genlerin prob (sonda) olarak kullanılması sonucunda, bakteriyosin biyosentez ve dirençlilik genlerinin kromozomal DNA ile ilişkili olduğu tanımlanmıştır. Dodd ve ark. (1990) tarafından yürütölen araştırmada, *L. lactis* subsp. *lactis*' de nisin üretiminin kromozomal DNA kökenli olabileceği belirlenmiştir. Araştırmacılar, nisin üretimi özelliğinin konjugal aktarımının gerçekteştirildiği alıcı suşlarda plazmit bulunmaması durumunu, konjugatif transpozonların varlığı ile açıklamıştır. İleri analizler sonucu aktarılan genler ile kromozomal DNA temas bölgelerinde insersiyon serilerinin (IS904) tespit edilmesi, bu transpozonların kompozit doğasına işaret etmiştir. Ancak söz konusu bölgelerde yürütölen DNA dizi çalışmaları, bu hareketli serinin Tn5301 olduğunu göstermiştir (Horn *et al.* 1991, Rauch and de Vos 1992). Dalgalı alan jel elektroforezi analizleri ile, nisin-sakkaroz gen blokunun taşındığı transpozonun 70 kb büyüklükte olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada seçilen 10 farklı transkonjugantın genetik yapısal analizi sonucu; transpozonların, alıcı suşların kromozomuna entegrasyonundan sonra, 5'-

TTTTTG -3' tekrar dizileri ile sonlandığı tespit edilmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* NCFB894, K1 ve ATCC11454' de gerçekleştirilen genetik analizler, bu suşlarda; sırasıyla Tn5301, Tn5306 ve Tn5307 olarak tanımlanan konjugal transpozonların nisin-sakkaroz gen blokunu içerdiğini göstermiştir (Thompson *et al.* 1991, Rauch and de Vos 1992). Ayrıca Gireesh ve ark. (1992) *L. lactis* subsp. *lactis* DL11 suşunda 68 kb büyüklükte başka bir konjugatif transpozonun nisin biyosentez genlerini taşıdığını saptamıştır. Günümüzde nisin üretimi ve dirençliliğinden sorumlu genlerin kromozomal DNA kökenli olduğu kesinlik kazanmıştır. Ancak bu genlerin çoğunlukla konjugatif transpozonlar ile ilgili olması, plazmitler üzerine taşınmasına olanak sağlamaktadır. Bu transpozisyon mekanizmasının konzervatif yolla gerçekleştiği suşlarda, nisin biyosentezi ve dirençlilik genleri sadece plazmitler üzerinde tespit edilebilmektedir (Piard *et al.* 1993, Twomey *et al.* 2002, Tükel ve Akçelik 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan doğal tip nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 ve 40 adet laktokok fajı Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan, 23 adet indikatör bakteri (*L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83, *Lactobacillus sake* NCDO 2714, *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403, *Enterococcus faecalis* LMG 2708, *Listeria innocua* LMG 2813, *L. lactis* subsp. *lactis* 105, *L. lactis* subsp. *lactis* 2908, *L. lactis* subsp. *lactis* T1, *L. lactis* subsp. *lactis* 731, *L. lactis* subsp. *lactis* 2, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2912, *Escherichia coli* LMG 3083 (ETEC), *Salmonella enterica typhimurium* SL1344, *Pseudomonas fluorescens* P1, *Lb. plantarum* LMG 2003, *L. lactis* subsp. *lactis* JC 17, *Bacillus cereus* LMG 2732, *Staphylococcus carnosus* LMG 2709, *Pediococcus pentosaceus* LMG 2001, *E. faecalis* NCDO 581, *Staph. aureus* LMG 3027, *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG 2132, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2088) Prof. Dr. Ingolf F. Nes' den (Department of Genetics and Biochemistry, Agricultural University of Norway, As/Norway) ve plazmit içermeyen *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 suşu Prof. Dr. Per Saris' den (Department of Applied Chemistry and Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki/Finland) sağlandı.

3.1.2 Mikroorganizmaların saklanma koşulları ve besiyerleri

Bakterilerin geliştirilmesinde; *Lactococcus* suşları için M17, GM17 ve Elliker broth ve agar, *Pediococcus* ve *Lactobacillus* suşları için MRS broth ve agar ve *Enterococcus*, *Listeria*, *Escherichia*, *Salmonella* ve *Staphylococcus* suşları için ise LB broth ve agar besiyerleri kullanıldı. Bakteriler, yukarıda belirtilen gelişme ortamlarına % 20 oranında steril gliserol ilave edilerek -20 °C' de saklandı. Fajlar M17 broth ortamında, % 40 steril gliserol ilave edilerek +4 °C' de korundu.

M17 Broth ve Agar

Polipepton	5	g
Fitopepton	5	g
Maya ekstraktı	2.5	g
Et ekstraktı	5	g
β -disodyum gliserofosfat	19	g
Laktoz (% 10)	50	mL
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 M)	1	mL
Askorbik asit	0.5	g
Agar	15	g
Destile su	950	mL

pH 7.15 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam içerikleri (laktoz hariç), 950 mL destile su içerisinde çözüldü ve sterilizasyon $121^\circ C$ ' de 15 dakika süre ile yapıldı. Ortam $45^\circ C$ ' ye kadar su banyosunda soğutulduktan sonra, ayrı sterilize edilen 50 mL laktoz çözeltisi ilave edildi (Terzaghi and Sandine 1975).

MRS Broth

Kazein pepton	10	g
Et ekstraktı	10	g
Maya ekstraktı	5	g
D-glukoz	20	g
Dipotasyum hidrojen fosfat	5	g
Diamonyum sitrat	2	g
Sodyum asetat	5	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.2	g
Tween 80	1	g
Destile su	1000	mL

pH 5.7 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam içerikleri 1000 mL destile su içerisinde çözüldü ve sterilizasyon, 118°C’de 15 dakika süre ile yapıldı.

Luria Bertani Broth

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

pH 7.0 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam içerikleri 1000 mL destile su içerisinde çözüldü ve sterilizasyon, 121°C’de 15 dakika süre ile yapıldı.

Elliker Broth (Difco Manual, 1984)

Tripton	20	g
Maya ekstraktı	5	g
Jelatin	2.5	g
Dekstroz	5	g
Laktoz	5	g
Sakkaroz	5	g
Sodyum klorür	4	g
Sodyum asetat	1.5	g
Askorbik asit	0.5	g
Destile su	1000	mL

pH 6.8 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Jelatin, 100 mL destile su içerisinde kaynar su banyosunda eritildikten sonra soğutularak besiyeri ortamına ilave edildi. Ortam 121°C’de 15 dakika tutularak sterilizasyon gerçekleştirildi.

3.2 Yöntem

3.2.1 Nisin üretim özelliğinin belirlenmesi

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşunda nisin üretimi ve aktivitesinin belirlenmesinde van Belkum ve ark. (1989) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu, GM17 agar ortamına öze kullanılarak inoküle edildi ve 30°C'de 18 saat geliştirildi. İnkübasyon süresi bitiminde agar ortamında oluşan kolonilerden, steril kürdan aracılığı ile GM17 agar ortamı içeren petrilere nokta ekim yapıldı ve 30°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. MRS broth, LB Broth ve GM17 broth besiyerlerinde ve uygun sıcaklıklarda 18 saat geliştirilen indikatör bakterilerden 100'er µL alınarak, % 0.7 oranında agar içeren 3.5 mL yumuşak agar (MRS, LB, GM17) ortamlarına inoküle edildi. Bu şekilde hazırlanan yumuşak agar ortamı, nokta ekim yapılan GM17 agar üzerine ikinci bir tabaka halinde homojen bir şekilde yayıldı. Petriler indikatör bakterilerin gelişimi için uygun sıcaklıklarda 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda, indikatör bakterilere karşı nisinin meydana getirdiği inhibisyon zonları incelendi.

3.2.2 pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının nisin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

3.2.2.1 Ortam pH'nın nisin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

30°C'de 18 saat geliştirilen *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu 6000 devirde 15 dakika santrifüj edildi ve alınan üst sıvı pH' ları, 6 N NaOH veya 6 N HCl kullanılarak 2.0-11.0 değerleri arasında ayarlandı. pH'ları ayarlanan kültür üst sıvıları, 0.45 µm por çaplı membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilerek sterilize edildi. Bu şekilde hazırlanan ortamlar +4°C'de 24 saat bekletildi. pH değişimlerinin nisinin inhibisyon düzeyleri üzerindeki etkisi; membran filtrelerden geçirildikten sonra hiçbir işleme tabi tutulmayan kültür üst sıvısının inhibisyon etkinliğinin, pH düzeyleri ayarlanan kültür üst sıvılarının inhibisyon etkinlikleri ile karşılaştırılması sonucu tanımlandı. Değişik pH düzeylerinde nisin etkinliğindeki değişimler, duyarlı indikatör bakterilere karşı kritik

dilüsyon yöntemi kullanılarak saptandı. Nisin etkinlik düzeyi, inhibisyon zonu alınan en yüksek dilüsyon oranının, 1000/aktarılan miktar ile çarpımından elde edilen, arbitrary ünite (AU) cinsinden hesaplandı (Franz *et al.* 1997).

3.2.2.2 Sıcaklık uygulamasının nisin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşunun nötralize edilmiş ve nötralize edilmemiş kültür üst sıvılarında, nisin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi; söz konusu ortamların 100°C’ de 5, 10, 15, 20 dakika ve 121°C’de 15 dakika süreyle sıcaklığa tabi tutulmasından sonra, bu ortamlardan alınan örneklerin duyarlı indikatör bakterilere karşı denenmesi suretiyle saptandı. Kontrol olarak, sıcaklık uygulanmamış kültür üst sıvısı kullanıldı. Sıcaklık uygulamalarının nisin aktivitesi üzerinde yarattığı etki, kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi (Franz *et al.* 1997).

3.2.2.3 Enzim uygulamalarının nisin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Nisin aktivitesi üzerine değişik enzimlerin etkisi; pH ve sıcaklığın etkisinin saptandığı testlerde olduğu gibi, kültür üst sıvısı kullanılarak tanımlandı. Nötralize edilmiş ve nötralize edilmemiş kültür üst sıvılarına, son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde α -kemotripsin (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), tripsin (pH 7.0 Merck, Germany), pepsin (pH 3.0 Sigma Chem. Co., USA), α -amilaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), lipaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), katalaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), proteinaz K (Sigma Chem. Co., USA) ve lizozim (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA) enzimleri ilave edildi ve 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Enzim aktiviteleri, 100°C’de 5 dakika ısı uygulaması ile sonlandırıldı. Denemelerde kontrol olarak, enzim muamele edilmemiş kültür üst sıvısı kullanıldı. Nisin aktivite düzeyi kritik dilüsyon yöntemi esas alınarak saptandı (Franz *et al.* 1997).

3.2.3 Faj biyodenemeleri

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşunda faj duyarlılık testleri, Terzaghi and Sandine (1975) tarafından önerilen çift tabaka agar yöntemine göre yapıldı. Hazırlanan 3 saatlik bakteri kültürlerinden (aktif bakteri kültürlerinden Elliker broth ortamlarına % 1

oranında inokülasyon yapıldıktan sonra, 30°C'de 3 saat inkübasyona tabi tutularak geliştirildi) Elliker yumuşak agar üzerine 0.1 mL aktarılıp karıştırıldıktan sonra, bu ortam alt tabaka Elliker agar üzerine döküldü. Yumuşak agarın homojen bir şekilde dağılması sağlandı ve katılaşması için kısa bir süre bekletildi. Son aşamada üst tabaka üzerine, titreleri 10^7 plak oluşturma birimi/mL (pfu/mL) ya da yukarısında elde edilen faj lizatları mikropipet yardımıyla 10 µL olacak şekilde damlatıldı. Bu ortamlar 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda faj plak oluşumuna ve faj plak etkinliği düzeyine göre, denenen suş duyarlı ya da dirençli olarak tanımlandı.

Cift Tabaka Ortamların Hazırlanışı: Faj biyodenemelerinde kullanılan Elliker alt tabaka agar ortamı, ayrı sterilize edilen 1 M CaCl₂.6H₂O çözeltisinden 10 mL/L ilave edilerek petri kutularına aktarıldı (15–20 mL) ve 20–25°C'de 18 saat tutuldu. Üst tabaka ortamı, Elliker alt tabaka içeriklerinin tümünün katılması ile hazırlandı. Agar oranı % 0.45 olan üst tabaka 3,5 mL'lik hacimler halinde tüplere aktarıldı ve 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edildi (Terzaghi and Sandine 1975).

3.2.4 Nisin dirençlilik düzeyinin belirlenmesi

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 ve *L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83 (nisin üreticisi) ile *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 (nisin üreticisi değil) kontrol suşlarının nisin dirençlilik düzeyi, Ra ve ark. (1996) tarafından önerilen yöntemle göre belirlendi. Bunun için, ticari nisin preparatı (Nisaplin, Sigma Chem Co., USA) kullanılarak 100-10000 IU/mL arasında nisin konsantrasyonuna sahip 3'er mL Glukoz M17 (GM17) broth içeren tüpler hazırlandı. Daha sonra bu tüplere, 30°C'de 18 saat süreyle 2 kez aktiveleştirilen suş kültürlerinden % 1 oranında inoküle edilerek, 30°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda bakteriyel gelişimin görüldüğü en yüksek nisin konsantrasyonu, denenen hücrelerin nisin dirençlilik düzeyi olarak tanımlandı.

3.2.5 Nisin üreten suştan plazmitlerin giderilmesi ve plazmitleri giderilmiş mutantların seçimi

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşunda plazmit giderme ajanı olarak akriflavin kullanıldı. *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun gelişebildiği en yüksek akriflavin dozu deneysel olarak belirlendikten sonra, söz konusu suş bu akriflavin dozunda beş pasaj geliştirildi. Bu süre sonunda akriflavin içeren M17 broth besiyerinde geliştirilen kültürlerden hazırlanan seri dilüsyonlardan, laktoz indikatör agar ortamlarına ekimler yapıldı ve 30°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda, oluşturdukları laktik asit ile indikatör boya rengini sarıya çeviren koloniler, laktoz fermentasyon yeteneğini sürdüren (Lac⁺) koloniler olarak değerlendirildi. Yeterli asit oluşturamadığı için indikatör boya renginin dönüşümüne neden olamayan beyaz koloniler ise, laktoz fermentasyon yeteneğini kaybetmiş (Lac⁻) mutantlar olarak seçildi ve M17 broth ortamına alındı (McKay *et al.* 1972, Gasson and Davies 1980, Wolfe and McKay 1983). Seçilen mutantların plazmit içeriklerindeki değişimler, plazmit izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi yöntemi ile kontrol edildi.

Laktoz İndikatör Agar

Tripton	20	g
Jelatin	2.5	g
Dekstroz	2.5	g
Laktoz (%1)	100	mL
NaCl	4	g
Sodyum asetat	1.5	g
Askorbik asit	0.5	g
Brom krezol purpur (%0.004)	10	mL
Agar	15	g
Destile su	880	mL
pH 6.8 ± 0.02 (Sterilizasyondan önce)		

Ortam içerikleri (brom krezol purpur ve laktoz hariç) 880 mL destile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Hazırlanan temel besiyerine, ayrı sterilize edilen laktoz ve brom krezol purpur ilave edilerek 45 °C' ye kadar soğutuldu. Bu besiyeri, 15 mL' lik hacimler halinde petri kutularına döküldü.

3.2.6 *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu ve mutantlarının plazmit içeriklerinin tanımlanması

3.2.6.1 Plazmit izolasyonu

M17 broth ortamında 30°C'de 18 saat geliştirilen *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu ve mutantlarından, 10 mL' lik M17 broth ortamlarına birer mL inokülasyonlar yapılarak, tüpler 30°C'de 3–3.5 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda bakteri kültürleri 6000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Hücre çökeltisi kurutulduktan sonra, 379 µL sakkaroz tamponunda çözüldü. 37°C'ye kadar ısıtılan bu ortama 96.5 µL lizozim ilave edildi ve su banyosunda 37°C'de 5 dakika tutuldu. 48.2 µL Tris-EDTA-1 uygulamasından sonra tüplere % 20 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 27.6 µL aktarılarak karıştırıldı. Bu aşamada ortamda viskozitenin artışı lizinin başladığını göstermektedir. Lizinin tamamlanması için santrifüj tüpleri 37°C su banyosunda 10 dakika süre ile tutuldu. 10 dakika sonunda tüp içerikleri yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA' nın kırılması sağlandı. Ortama, yeni hazırlanan 3 N NaOH çözeltisinden 27.6 µL ilave edildi ve tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dakika süre ile yavaşça çevrilerek kromozomal DNA' in alkali denatürasyon koşulları oluşturuldu. Denatürasyon aşamasının sonunda santrifüj tüplerine 49.6 µL Tris-HCl çözeltisi aktarılarak, 3 dakika süre ile yine düz bir zeminde karıştırıldı. Ortam pH' sının 8.5-9 arasında düşüşü ile nötralizasyonun sağlandığı belirlendi. 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 uygulandı. Tüplerde oluşan üst faz, mikropipet yardımıyla yeni tüplere aktarıldı ve deproteinasyonun sağlanması için 700 µL kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi ilave edildi. Ortamlar +4°C'de 15000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek üst faz yeni tüplere alındı ve eşdeğer hacimde etil alkol ilave edildi. Bu ortam -20°C'de bir gece

bekletildikten sonra, 15000 devirde 15 dakika santrifüj edilmek suretiyle plazmit DNA çöktürüldü. Sıvı faz döküldü ve çökeltiler şeffaflaşınca kadar kurutuldu. Kurutulan izolatlar 20 µL Tris-EDTA-2 içerisinde çözüldü. Son aşamada ortama RNaz A stok çözeltisinden 2 µL ilave edildi ve 37°C'de 45 dakika inkübasyona tabi tutuldu (Anderson and McKay 1983).

Sakkaroz Çözeltisi

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

Lizozim Çözeltisi

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

Tris-EDTA-1

Tris	0.6	g
EDTA	9.31	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Tris-HCl

Tris-HCl	31.52	g
Destile su	100	mL
pH 7.0 ± 0.02		

SDS Cözeltisi

Tris	0.6	g
EDTA	0.74	g
SDS	20	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Tris-EDTA-2

Tris	0.121	g
EDTA	0.037	g
Destile su	100	mL
pH 7.5 ± 0.02		

% 3 NaCl ile Dovurulmuş Fenol Cözeltisinin Hazırlanışı: 100 g fenol üzerine 20 mL destile su ve 3 g NaCl aktararak, 45 °C su banyosunda çözüldü. Ortama 0.1 g hidroksiguinolin ilave edildi ve karıştırılarak oda sıcaklığında tutuldu.

RNaz A Cözeltisi: 5 mL steril destile su içerisinde hazırlanan 0.005 M sodyum asetat cözeltisinin pH'sı, asetik asit ile 5.0'a ayarlandı ve üzerine 5 mg RNaz A (Sigma, Chem. Co., USA) ilave edildi. Kaynar su içerisinde ortam 5 dakika tutulduktan sonra, -20 °C'de saklandı.

3.2.6.2 Elektroforez

Plazmit DNA örneklerinin elektroforezi, % 0.7 agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapıldı (Meyers *et al.* 1976). Yatay jel sistemleri için agaroz, kullanılan jel plaka sisteminin hacmine göre 30-35 ya da 150-200 mL tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde kaynar su banyosunda çözüldü. 45°C'ye kadar soğuması beklenen ortam, elektroforez plakalarına döküldü ve jel tarakları yerleştirilerek 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin üzerini kapatacak biçimde tampon cözelti ilave edildi ve jelin zedelenmemesine dikkat edilerek, taraklar ortamdan alındı. 37°C'de 45 dakika inkübe edilen DNA örnekleri su banyosundan alınarak 2 µL marker boya

çözeltisi ile karıştırıldı ve mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına 20 µL olacak şekilde aktarıldı. Elektroforez, 100 voltta 3-3.5 ya da 5-5.5 saat süreyle yapıldı. Marker boyanın jel sistemini terk etmesinden sonra elektrik akımı kesildi ve ortamdan alınan jeller, 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren elektroforez tampon çözeltisinde 1 saat boyandı. Bu süre sonunda jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışık altında incelendi ve Kodak Gel Logic 200 Imaging System’de fotoğrafları alındı (Macrina *et al.* 1982).

Tris-Asetat Tampon

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

Marker Boya

Bromfenol blue	0.25	g
Sakkaroz	40	g
Destile su	100	mL

3.2.6.3 Plazmit büyüklüklerinin saptanması

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşu ve bu suşun mutantlarından izole edilen plazmitlerin büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler büyüklükleri bilinen ccc DNA marker’larının elektroforetik hareketlilikleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanıldı (Macrina *et al.* 1978, Southern 1979, Schaffer and Sederoff 1981). Marker ccc DNA moleküllerinin agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğrileri çıkarıldı. İstatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek, bakterilerden izole edilen plazmitlerin büyüklükleri saptandı (Campbell 1974, Elder *et al.* 1983, Elder and Southern 1983).

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

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

$$\text{Moleküler Büyüklük (W)} = \text{Antilog}_{10} [I \cdot (\alpha - G) + H]$$

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

Y = Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

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

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

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

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

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

$$G = \text{Ortalama X} = \frac{A}{N}$$

$$H = \text{Ortalama Y} = \frac{C}{N}$$

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

3.2.7 Kromozomal DNA izolasyonu

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşu M17 broth ortamında (5 mL) 30°C'de 18 saat süre ile geliştirildi. Bu ortam 14000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek, hücreler çöktürüldü. Elde edilen çökelti üzerine 450 µL STE tamponu (100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris pH 7.5) ve 50 µL lizozim (100 mg/mL) çözeltisi aktarılarak karıştırıldı. Bu

şekilde hazırlanan hücre süspansiyonu, liziz işleminin tamamen gerçekleşebilmesi için 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 10 µL proteinaz K (20 mg/mL) ve 50 µL SDS (% 20) çözeltisinden ilave edilerek karıştırıldı ve tekrar 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kromozomal DNA' nın hücre duvarı kalıntıları ve diğer proteinlerden ayrılması amacıyla ortama 70 µL 5 M NaCl ve 630 µL fenol çözeltisi ilave edilerek, 14000 devirde 10 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Ortamdan alınan üst faz üzerine 630 µL kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi eklendi. İkinci kez 14000 devirde 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Üst faz yeni bir mikrofüj tüpüne alındı ve aynı hacimde izopropanol ile karıştırıldı. Karışım 14000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvı uzaklaştırıldı. Elde edilen çökelti -20°C'de muhafaza edilen 500 µL etanol ile çözüldü ve son kez 14000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek alkol tamamen uçuncaya kadar çökelti kurutuldu. Son aşamada DNA çökeltisi TE tampon içerisinde çözüldü ve -20 °C'de saklandı (van der Meer *et al.* 1993).

3.2.8 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) denemeleri

PZR çalışmaları, izole edilen plazmit DNA ve kromozomal DNA örnekleri üzerinde ve Techne A512 model thermal cyclers (England) kullanılarak yapıldı. Çalışmalarda Akçelik ve ark. (2006) tarafından önerilen ve bir çevrimi 94 °C'de 45 saniye, 52.5 °C'de 45 saniye ve 72 °C'de 1 dakika ile tanımlanan, toplam 30 çevrimlik protokol uygulandı. Nisine özgü primerler (ileri: 5'ATG AGT ACA AAA GAT TTT AAC TTG 3', geri: 5' ATT TGC TTA CGT GAA TAA TAC AA 3') temel nisin genini içine alan 179 bazlık bölgeden oluşturuldu (Choi *et al.* 2000). Elde edilen PZR fragmentleri % 1 agaroz içeren jelde yürütüldü. Fragment büyüklükleri O'rangeruler 100 bp marker (Fermentas, Finland) kullanılarak tanımlandı.

3.2.9 Konjugasyon

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşunda nisin genlerinin konjugal süreçlerle aktarımı, *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 alıcı suşu kullanılarak araştırıldı. Aktif verici ve alıcı suş kültürleri; 2 mL alıcı ve 3 mL verici olacak şekilde karıştırdıktan sonra, steril şırıngalar kullanılarak membran filtre (0.45 µm, Sartorius, Germany) üzerinde toplandı. Alıcı ve

verici suş kültürlerini içeren filtreler M17 agar ortamlarına yerleştirilerek, 30°C'de 18 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda M17 agar ortamlarından alınan filtreler, 1 mL steril fizyolojik tuzlu su içerisinde karıştırıldı ve 10⁻⁵ düzeyine kadar seri dilüsyonlar hazırlandı. Her dilüsyondan 5'er µg/mL eritromisin içeren M17 agar ortamına 0.1 mL aktarılarak yayma ekimler yapıldı ve 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, M17 agar ortamında tespit edilen nisin üretme yeteneğindeki koloniler konjugant olarak tanımlandı. Konjugasyon sıklığı; 1 mL için saptanan konjugant sayısının, 1 mL' de bulunan verici suş sayısına oranlanması sonucu belirlendi. Hiçbir muameleye tabi tutulmadan M17 agar ortamlarında geliştirilen verici suş kültürleri, kontrol olarak kullanıldı (Gasson and Davies 1980).

3.2.10 Nisin üretme yeteneğinin stabilite düzeyinin saptanması

Nisin üretme yeteneğindeki doğal suş ve konjugantlarda, bu özelliğin stabilitesi; suşların herbirinin % 10 skim milk (Oxoid Ltd., England) ortamında 10 pasaj (~70 generasyon) geliştirilmesinden sonra seçilen kolonilerin, nisin üretim yetenekleri yönünden tekrar test edilmesi suretiyle saptandı (Coakley *et al.* 1997). Nisin üretim yeteneğini sürdüren kolonilerin popülasyondaki oranı, yüzde stabilite cinsinden ifade edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* EYL 38 Suşu Tarafından Üretilen Nisinin Etki Spektrumunun Belirlenmesi

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşu tarafından üretilen nisinin antimikrobiyel etki spektrumu; 23 farklı indikatör bakteriye karşı, van Belkum ve ark. (1989) tarafından önerilen yöntem esas alınarak belirlendi. Çalışmalar sonucunda, söz konusu suşun 17 indikatör bakteriye karşı farklı düzeylerde inhibitör etkiye sahip olduğu saptandı (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). Antibakteriyel aktivite testleri, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 tarafından üretilen nisinin; *Lactobacillus sake* NCDO 2714, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403, *Enterococcus faecalis* LMG 2708, *Listeria innocua* LMG 2813, *Lb. plantarum* LMG 2003, *L. lactis* subsp. *lactis* JC17, *Pediococcus pentosaceus* LMG 2001 suşlarına yüksek (10-25 mm arası inhibisyon zonu), *L. lactis* subsp. *lactis* 105, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2908, *L. lactis* subsp. *lactis* 2, *Staphylococcus carnosus* LMG 2709 ve *E. faecalis* NCDO 581 suşlarına orta (6-8 mm arası inhibisyon zonu), *L. lactis* subsp. *lactis* T1, *L. lactis* subsp. *lactis* 731, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2912, *Bacillus cereus* LMG 2732, ve *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG 2132 suşlarına ise düşük seviyede (4-5 mm arası inhibisyon zonu) inhibisyon etkinliği gösterdiğine işaret etti. *L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83, *Staph. aureus* LMG 3027, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2088, *Escherichia coli* LMG 3083 (ETEC), *Salmonella enterica* Typhimurium SL1344 ve *Pseudomonas fluorescens* P1 suşları ise, EYL 38 tarafından üretilen nisine karşı tam dirençlilik özelliği gösterdi. *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun ürettiği nisin ile, kontrol suşu (*L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83) tarafından üretilen nisinin aktivite etkinliği ve spektrumu bakımından büyük oranda benzerlik bulundu. Bu iki suş tarafından üretilen antibakteriyel proteinler arasında en belirgin farklılık, SIK-83 nisininin *Staph. aureus* LMG 3027 suşunun gelişimini düşük düzeyde inhibe etmesi olarak tespit edildi (Çizelge 4.1).

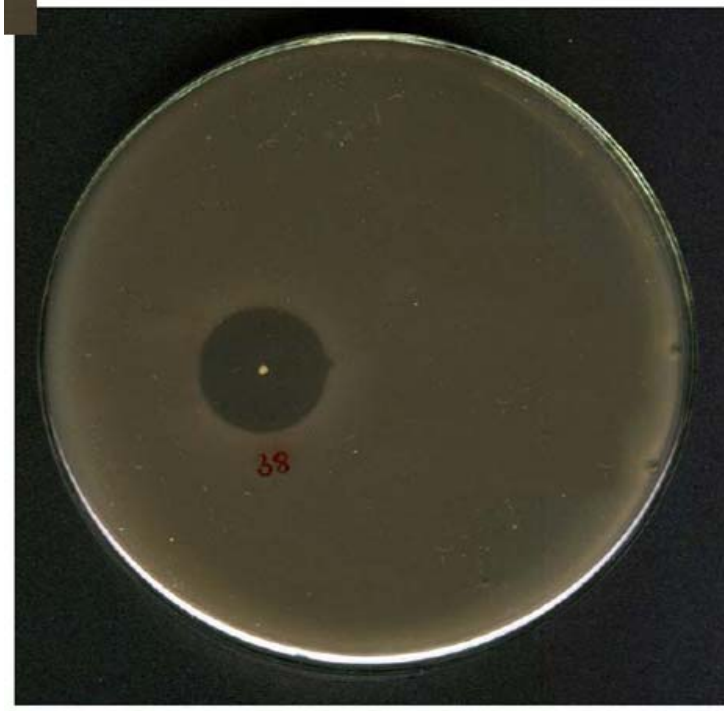
Çizelge 4.1 *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun indikatör suşlara karşı gösterdiği inhibisyon etkinliği

İndikatör Bakteriler	Nisin inhibisyon zonu çapı (mm)*	
	EYL 38	SIK-83
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> SIK-83 (Nisin üreticisi)	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (Nisin duyarlı)	21	22
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL 1403 (Nisin duyarlı)	10	12
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2708 (Nisin duyarlı)	10	9
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (Nisin duyarlı)	10	13
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 105 (Laktisin üreticisi)	6	7
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2908	6	9
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> T1	4	5
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 731 (Laktisin 3147 üreticisi)	5	7
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2 (Laktisin 3147 üreticisi)	7	7
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2912 (Laktisin 3147 üreticisi)	5	8
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium SL1344	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	25	29
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JC 17 (Laktisin 481 üreticisi)	12	14
<i>Bacillus cereus</i> LMG 2732	4	6
<i>Staphylococcus carnosus</i> LMG 2709	7	10
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LMG 2001 (Pediocin üreticisi)	12	18
<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	8	10
<i>Staphylococcus aureus</i> LMG 3027	-	6
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG 2132 (Laktokoksin A+B üreticisi)	5	8
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2088 (Laktokoksin G üreticisi)	-	-

EYL 38: *L. lactis* subsp. *lactis*

SIK-83: *L. lactis* subsp. *lactis* (nisin üreticisi kontrol)

* Zon çapı; 1-5 mm: düşük düzeyde duyarlı, 6-9 mm: orta düzeyde duyarlı, 10≥: yüksek düzeyde duyarlı



Şekil 4.1 *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu tarafından üretilen nisinin *Lactobacillus plantarum* LMG 2003 suşuna karşı oluşturduğu inhibisyon zonu.

Antibakteriyel aktivite karakteristikleri üzerinde yürütülen çok sayıda araştırmada, laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerin; yakın akraba türler yanında, farklı Gram-pozitif bakterilere karşı da inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir (Geis *et al.* 1983, Ryan *et al.* 1996, Mao *et al.* 2001). Laktokok bakteriyosinleri içerisinde en geniş etki spektrumuna sahip olan nisinin; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* ve *Listeria* gibi birçok cinse ait türe karşı antibakteriyel aktivitesi tanımlanmıştır (Hurst 1981, Stevens *et al.* 1991). Nisinin etki spektrumu, üretici suşların özgül üretim oranlarına bağılı olarak değişebilmektedir. Bu nedenle farklı etki spektrumu içeren üretici suşlar tanımlanabilmektedir (Moreno *et al.* 2000, Noonpakdee *et al.* 2003, Mirhosaini *et al.* 2006, Stoyanova *et al.* 2006).

Araştırmamızda da, Türkiye kökenli suş ile kontrol suş arasında belirlenen düşük düzeydeki nisin etkinlik farklılıkları, büyük bir olasılıkla söz konusu bakterilerin değişik özgül üretim oranlarından kaynaklanmaktadır. Türkiye kökenli EYL 38 suşu da, yukarıda özetlenen literatür verilerinde olduğu gibi geniş bir antibakteriyel aktivite spektrumuna sahip bir nisin tipi üretmektedir.

Bakteriyosin üreticisi suşlarda biyosentez ve dirençlilik genleri operonlar halinde organize olmaktadır. Dirençlilik genleri, aynı bakteriyosini üretme yeteneğinde olan farklı suşların birbirinin gelişimini engelleme yeteneğini sınırlandırmaktadır (Engelke *et al.* 1994, Siegers and Entain 1995). Bu araştırmada da, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu ile bakteriyosin üreticisi *L. lactis* kontrol suşlarına karşı yürütülen çapraz etkinlik denemeleri, literatür verilerini desteklemiştir. EYL 38 suşunda; nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83 ve laktokoksin üreticileri *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG 2132 ve *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2088 suşlarının kültür üst sıvılarına karşı tam direnç özelliği saptanırken, laktisin üreticisi beş adet suşa karşı yüksek düzeyde duyarlılık tespit edildi (Çizelge 4.2). Etki spektrumunun belirlenmesini esas alan testler ve üretici organizmalar arasında yürütülen çapraz denemeler sonucunda, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun tipik nisin üreticisi davranışına sahip olduğu saptandı.

Çizelge 4.2 Bakteriyosin üreticisi bazı laktokok suşlarının, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL38 suşu üzerine inhibisyon etkinlikleri

Referans Bakteriler	Nisinin inhibisyon zonu çapı (mm)
	EYL 38
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> SIK-83 (Nisin üreticisi)	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 105 (Laktisin üreticisi)	17
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 731 (Laktisin 3147 üreticisi)	18
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2 (Laktisin 3147 üreticisi)	16
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2912 (Laktisin 3147 üreticisi)	16
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JC 17 (Laktisin 481 üreticisi)	10
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG 2132 (Laktokoksin A+B üreticisi)	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2088 (Laktokoksin G üreticisi)	-

EYL 38: *L. lactis* subsp. *lactis*

4.2 pH, Sıcaklık ve Enzim Uygulamalarının Nisin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşunun kültür üst sıvılarında kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak yürütülen testler sonucunda, üretilen nisin aktivitesi 3200 AU/mL düzeyinde tespit edildi. EYL 38 suşu tarafından üretilen nisin; pH 2.0-4.0 arasında aktivitesinin arttığı, pH 5.0-8.0 arasında stabilitesini koruduğu; pH 9.0'da % 50, pH 10.0'da % 75 ve pH 11.0'de % 87.5 oranında aktivite kaybı gösterdiği saptandı (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2). Enzim uygulamalarında, söz konusu suşun ürettiği nisin; α -kemotripsin ve proteinaz K tarafından tamamen inaktive edildiği, lipaz ve α -amilaz uygulamaları sonucu, sırasıyla % 50 ve % 87.5 oranında aktivite kaybına uğradığı belirlendi. EYL 38 tarafından üretilen nisin; tripsin, pepsin, katalaz ve lizozim enzimlerine karşı tam direnç gösterdi (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2). Test edilen suş tarafından üretilen nisin 100°C'de 5, 10, 15, 20 dakika sıcaklık uygulamalarına karşı stabilitesini koruduğu, 121°C'de 15 dakika sıcaklık uygulamasında ise aktivitesinin % 97 oranında azaldığı saptandı (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2). Kontrol amacıyla kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83 suşu tarafından üretilen nisin de pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarına benzer yanıtlar verdiği tespit edildi (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4).

Asidik ortamların nisin molekülünün çözünürlüğünü artırdığı ve bu nedenle inhibisyon etkinliğini yükselttiği bilinmektedir. Liu ve Hansen (1990) tarafından yürütülen araştırmada; nisin çözünürlüğü pH 2'de (25°C) 57 mg/mL, pH 8'de (25°C) ise 0.25 mg/mL olarak belirlenmiştir. Doğal nisin varyantları kullanılarak gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise; nisin Z'nin, nötral pH değerlerinde nisin A'ya göre daha fazla çözünürlüğe sahip olduğu saptanmıştır (Sonomoto *et al.* 2000). Benzer şekilde, farklı kaynaklardan izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* suşları tarafından üretilen doğal nisin peptitlerinin aktivitelerinin asidik pH değerlerinde arttığı, alkali pH değerlerinde ise azaldığı tespit edilmiştir (Olasupo *et al.* 1999, Noonpakdee *et al.* 2003, Park *et al.* 2003, Mitra *et al.* 2005, Akçelik *et al.* 2006). Bu çalışmaların bazılarında nisin aktivitesinin pH 7'den sonra (Park *et al.* 2003, Mitra *et al.* 2005, Akçelik *et al.* 2006), bazılarında ise pH 9'dan sonra (Olasupo *et al.* 1999, Noonpakdee *et al.* 2003) önemli ölçüde düştüğü saptanmıştır. Ancak hiçbir çalışmada alkali koşulda aktivitenin tamamen kaybı tespit

edilememiştir. Araştırmamızda elde edilen sonuçlar bu literatür verileri ile büyük ölçüde benzerlik taşımaktadır.

Endüstriyel üretimi yapılan standart nisinin, proteinaz K ve α -kemotripsin enzimleri ile tamamen inaktive edildiği, α -amilaz, lipaz, lizozim, tripsin ve katalaz enzim uygulamalarından ise etkilenmediği saptanmıştır (Delves-Broughton 1990). Bu araştırmada, söz konusu verilerden farklı olarak, EYL 38 suşu tarafından üretilen nisinin α -amilaz enzimi uygulamasıyla aktivitesini kısmen kaybettiği tanımlandı. Tüm bakteriyosinlerin temel yapı ve fonksiyonları peptitlerden ileri gelmektedir. Ancak bazı bakteriyosinlerin karbonhidrat ve lipit molekülleri ile büyük kompleks yapılar oluşturduğu ve birçok durumda bu yan grupların bakteriyosinin aktivitesi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Klaenhammer 1993). Enzim aktivite testleri ilave moleküllere işaret etse de; nisin ve benzeri lantibiyotikler kullanılarak gerçekleştirilen yapısal analizler sonucu, herhangi bir karbonhidrat ya da lipit yan grubu tanımlanmamıştır. Nisin molekülünün üç boyutlu yapısını aydınlatmak için yapılan çalışmalarda, su ve dimetilsulfoksit (DMSO) solüsyonu içerisinde kesin bir yapısal model belirlenememiş ve katlanma şekilleri açıklanamamıştır (Ra *et al.* 1999, Koponen 2004). Diğer yandan, son yıllarda değişik kaynaklardan izole edilen suşların; amino asit dizisi ve molekül içi bağ özellikleri bakımından düşük düzeyde farklılıklar içeren nisin A ve nisin Z dışında da nisin varyantları (nisin Q ve nisin U) üretebildikleri tespit edilmiştir (Twomey *et al.* 2002, Papagianni 2003, Zendo *et al.* 2003, Wirawon *et al.* 2006).

Araştırma bulguları literatür verileri ile birlikte değerlendirildiğinde; *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu tarafından üretilen nisinin, karbonhidrat yan grubu içeren ve bu nedenle farklı protein katlanma yapısına sahip yeni bir varyant olma olasılığı öne çıkmaktadır.

Çizelge 4.3 Nisin aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

pH	Nisin Aktivitesi (AU mL ⁻¹)	
	EYL 38	SIK-83
2	6400	12800
3	6400	12800
4	6400	12800
5	3200	6400
6	3200	6400
7	3200	6400
8	3200	6400
9	1600	3200
10	800	1600
11	400	800

EYL 38: *L. lactis* subsp. *lactis*

SIK-83: *L. lactis* subsp. *lactis* (nisin üreticisi kontrol suş)

AU: Arbitrary unit

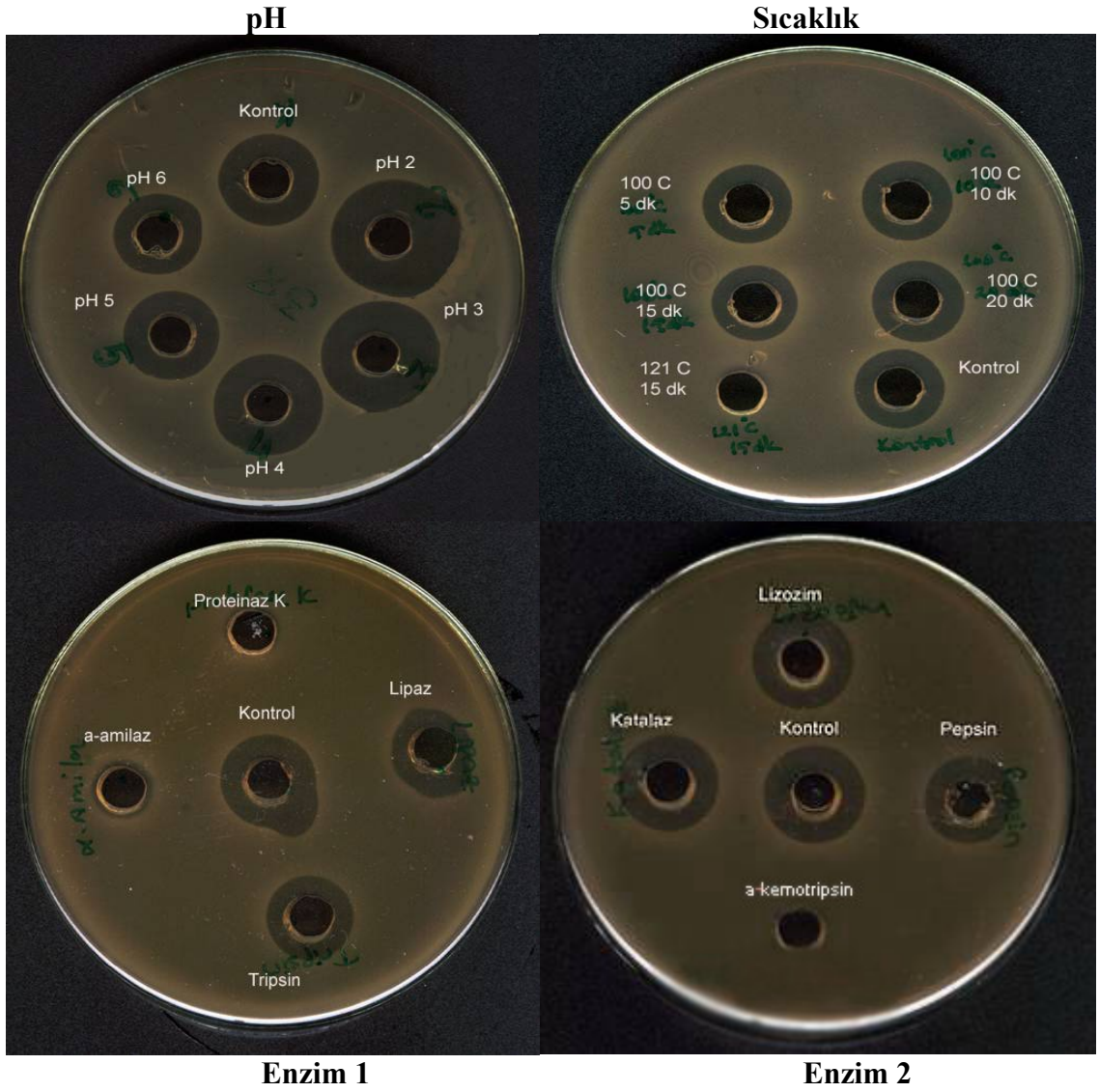
Çizelge 4.4 Nisin aktivitesi üzerine enzim ve sıcaklığın etkisi

Muamele	Nisin Aktivitesi (AU mL ⁻¹)	
	EYL 38	SIK-83
Kontrol	3200	6400
Tripsin	3200	6400
α -kemotripsin	0	0
Pepsin	3200	6400
α -amilaz	400	6400
Lipaz	1600	6400
Katalaz	3200	6400
Lizozim	3200	6400
Proteinaz K	0	0
100°C 5 dk	3200	6400
100°C 10 dk	3200	6400
100°C 15 dk	3200	6400
100°C 20 dk	3200	6400
121°C 15 dk	100	100

EYL 38: *L. lactis* subsp. *lactis*

SIK-83: *L. lactis* subsp. *lactis* (nisin üreticisi kontrol suş)

AU: Arbitrary unit



Şekil 4.2 *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun ürettiği nisin üzerine pH, sıcaklık ve enzimlerin etkisi.

4.3 Nisin Üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 Suşunun Faj Duyarlılık Düzeyinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun faj duyarlılık düzeyi, 40 adet laktokok fajı kullanılarak belirlendi. Homolog konakçı bakterilere denenerek titreleri 10^7 pfu/mL ve yukarısına çıkarılan fajlar, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşuna karşı çift tabaka agar ortamlarında test edildi. Testlerde faj bakteri dinamik dengesi (pfu/cfu=1) esas alındı ve sonuçlar faj plak oluşumuna göre değerlendirildi. Bu testler sonucunda, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu tüm fajlara karşı direnç fenotipi gösterdi (Çizelge 4.5).

Türkiye kökenli *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda tespit edilen yüksek faj direnç fenotipi, ülkemizde yürütülen daha önceki çalışmaların sonuçları ile paralellik taşımaktadır (Akçelik and Tunail 1992, Akçelik 1998, Akçelik 1999, Akçelik *et al.* 2000, Tuncer and Akçelik 2002, Tükel and Akçelik 2003, Şanlıbaba and Akçelik 2005). Bu güçlü faj dirençlilik fenotipi, Türkiye kökenli nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunu starter kültür programları için çok önemli kılmaktadır. Zira bu iki özellik sayesinde fermente süt endüstrisinin temel sorunları olan kontaminant floranın inhibisyonu ve faj saldırısı sonucu starter kültürlerin parçalanarak aktivitelerini kaybetmesi, EYL 38 suşunun kullanıldığı üretim süreçlerinde engellenebilecektir. Ancak bu suşun endüstriyel üretim süreçlerinde kullanımının önerilebilmesi için; laktik asit üretimi düzeyi ve proteolitik aktivite etkinliği yanında tuz, sıcaklık ve pH değişimleri sonucu meydana gelen stres koşullarına dirençlilik özellikleri de detaylı bir şekilde araştırılmalıdır. Diğer yandan, EYL 38 suşunun Türkiye’den izole edilen 40 adet dominant faj tipine karşı gösterdiği dirençliliğin genetik esası belirlendikten sonra, bu özelliğin endüstriyel starter kültür suşlarına konjugatif yollarla aktarımı da, ticari suş geliştirme çalışmaları açısından büyük değer taşıyacaktır.

Çizelge 4.5 *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun faj direnç profili

Faj Kod No	Bakteri Kod No	Faj Kod No	Bakteri Kod No
	EYL 38		EYL 38
Ø Epld 67.37	-	Ø Epll 98.30	-
Ø Epld 67.38	-	Ø Epll 98.32	-
Ø Epld 67.39	-	Ø Yplc 61.38	-
Ø Epld 67.40	-	Ø Yplc 61.51	-
Ø Epld 67.41	-	Ø Ypld 66.54	-
Ø Epld 67.42	-	Ø Ypld 67.41	-
Ø Epld 67.43	-	Ø Ypld 67.43	-
Ø Epld 67.44	-	Ø Ypld 67.26	-
Ø Epld 67.45	-	Ø Ypld 67.28	-
Ø Epld 67.46	-	Ø Ypld 67.57	-
Ø Epll 10.5	-	Ø Ypll 35.47	-
Ø Epll 36.17	-	Ø Ypll 36.2a	-
Ø Epll 98.22	-	Ø Ypll 36.30	-
Ø Epll 98.23	-	Ø Ypll 36.33	-
Ø Epll 98.24	-	Ø Ypll 36.35	-
Ø Epll 98.25	-	Ø Ypll 36.48	-
Ø Epll 98.26	-	Ø Ypll 36.4a	-
Ø Epll 98.27	-	Ø Ypll 36.52	-
Ø Epll 98.28	-	Ø Ypll 98.31	-
Ø Epll 98.29	-	Ø Ypll 98.55	-

- : dirençli

4.4 Nisin Üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda Nisin Dirençlilik Düzeyinin Belirlenmesi

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşunun dirençlilik düzeyi, farklı oranlarda nisin içeren (100-10000 IU/mL) 3 mL'lik GM17 ortamlarındaki hücresel gelişim tespit edilerek belirlendi. Kontrol olarak, nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83 ve nisin üreticisi olmayan *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 suşları kullanıldı. Yapılan denemede *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda en son 5500 IU/mL, *L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83 suşunda 4000 IU/mL ve *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 suşunda ise 200 IU/mL nisin içeren besiyeri ortamında bakteriyel gelişme tespit edildi. Bu değerlerin aşılması durumunda her üç suşta da bakteriyel gelişim sağlanamadı.

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşunda, özellikle kontrol nisin üretici suş SIK-83'e oranla saptanan yüksek nisin dirençlilik düzeyi, bu bakterinin nisin üretiminde kullanımının önemli bir avantaj oluşturacağına işaret etmektedir. Zira nisin üretimi üzerinde etkili kriterlerden biri de, üretici suşun dirençlilik düzeyidir. Nisin üretici suşlarda ortalama nisin dirençlilik seviyeleri 1000 IU/mL civarında tespit edilmiştir. Bu suşların bazılarında dirençlilik genlerinin kopya sayılarının arttırılması sonucu, nisin üretiminde % 20 oranına varan yükselmeler belirlenmiştir (Qiao *et al.* 1997, Kim *et al.* 1998). *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda da nisin dirençlilik genlerinin moleküler analizi sonucu elde edilecek veriler ışığında, benzer çalışmalar yapılabilir ve nisin üretimi geliştirilebilir.

4.5 *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 Suşunda Nisin Üretim Yeteneğinin Genetik Determinantının Saptanması

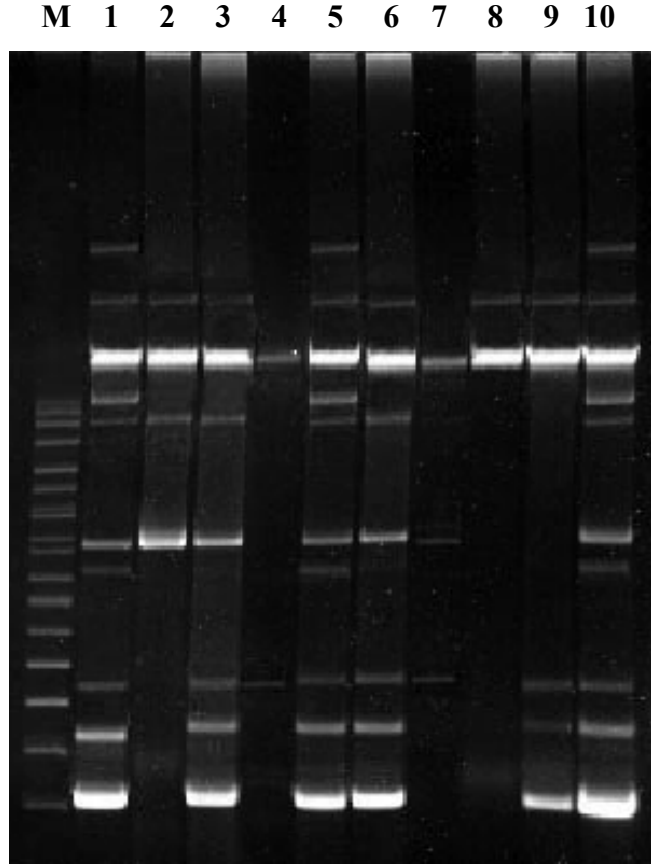
Nisin üretim yeteneğinin genetik doğasının belirlenmesi amacıyla *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda mutasyonel analiz, konjugal aktarım ve nisin temel genine özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmaları yapıldı. Mutasyonel analizlerde, mutajen ajan olarak akriflavin kullanıldı. Minimum üremenin gerçekleştiği akriflavin dozunda (30°C’de 10 µg/mL ve 37°C’de 5 µg/mL) 5 pasaj geliştirilen suştan laktoz indikatör agar ortamlarına yayma ekim yöntemi kullanılarak inoküle edildi (0.1 mL) ve 30°C ve 37°C’de ayrı ayrı 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda küçük ve beyaz koloniler seçildi ve nisin üretim yetenekleri, duyarlı indikatör bakteriler kullanılarak, GM17 agar ortamında araştırıldı. Nisin üretim yeteneğini sürdüren (Nis⁺) ve nisin üretim yeteneğini kaybeden (Nis⁻) mutantların plazmit içeriklerindeki değişim, % 0.7 agaroz içeren jellerde belirlendi (Şekil 4.3). Bu çalışmalar sonucu *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun, moleküler büyüklükleri 33.1, 28.7, 23.7, 20.0, 18.3, 9.9, 8.7, 4.4, 3.3, 2.1 kb (kilobaz) olarak tanımlanan 10 adet plazmit içerdiği saptandı. EYL 38-1, EYL 38-9, EYL 38-19, EYL 38-33 ve EYL 38-36 mutantlarındaki değişik plazmit kombinasyonlarında 33.1, 20.0, 18.3, 9.9, 8.7, 4.4, 3.3, 2.1 kb’lık plazmitlerin bulunmamasının Nis⁺ fenotipin sürmesi için bir engel teşkil etmediği belirlendi. Ancak bu mutantlardan farklı olarak, EYL 38-17 ve EYL 38-22 mutantlarında Nis⁻ fenotipin meydana gelmesi; söz konusu mutantlarda 28.7 kb büyüklükteki plazmidin nisin üretiminden sorumlu olabileceğine işaret etti (Şekil 4.3).

L. lactis subsp. *lactis* EYL 38 suşunda klasik mutasyon analizlerinden elde edilen verilerin doğruluğunun test edilmesi ve nisin üretim yeteneğinin konjugatif özelliğinin araştırılması amacıyla, konjugal aktarım çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalarda Nis⁺ eritromisine duyarlı (Em^s) *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 verici suşu ile, eritromisine dirençli (Em^r, 5 µg/mL) ve Nis⁻ *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 alıcı suşunun membran filtre üzerinde eşleştirilmesi yöntemi kullanıldı. Nis⁺ ve Em^r kriterlerine göre seçilen konjugantlarda plazmit analizleri ile, aktarımı sağlanan özelliği kontrol eden plazmit tanımlanmaya çalışıldı (Şekil 4.4). Konjugasyon denemeleri sonucunda, nisin üretme yeteneği kazanan tüm konjugantlarda yalnız 8.7 kb büyüklükteki plazmidi içerdiği tespit

edildi. Bu veri klasik mutasyon çalışmalarının işaret ettiği 28.7 kb büyüklükteki plazmidin nisin üretimi genlerini taşıma olasılığını çürüttü. Diğer yandan konjugantlarda saptanan yegane plazmidin (8.7 kb) bulunmadığı mutantlarda nisin üretim yeteneğinin devam etmesi (Şekil 4.3), *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda bu plazmidin de nisin üretimi ile ilişkilendirilemeyeceğini gösterdi.

Doğal suştan plazmitlerin giderilmesini esas alan klasik mutasyon çalışmaları ve elde edilen bulguların kontrolü amacı ile yürütülen konjugal aktarım testlerinin birbiri ile çelişmesinden dolayı, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda nisin üretiminin genetik determinantı PZR yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bu doğrultuda, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşundan izole edilen plazmit ve kromozomal DNA örnekleri kullanıldı. Nisin spesifik primerler kullanılarak yürütülen PZR denemeleri sonucunda; kromozomal DNA üzerinde 179 kb'lık nisin genine özgül bölgenin çoğaltımı gerçekleştirildi. Ancak plazmit DNA örnekleri üzerinde yürütülen PZR çalışmaları, söz konusu suşun plazmidlerinin nisin spesifik primerler ile interaksiyon vermemesinden dolayı, herhangi bir bölge çoğaltımına yol açmadı (Şekil 4.5).

Bu bulgular, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda nisin üretiminin gen kodunun kromozomal DNA üzerinde bulunduğunu ve konjugatif transpozonlarla ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır. Çok sayıda araştırmada, bu çalışmada da belirlendiği gibi, nisin üretimi ve regülasyondan sorumlu genlerin kromozomal DNA üzerinde bulunan konjugatif transpozonlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Dodd *et al.* 1990, Horn *et al.* 1991, Thompson *et al.* 1991, Rauch and de Vos 1992, Akçelik 1999, Twomey *et al.* 2002, Tükel and Akçelik 2004, Akçelik *et al.* 2006). *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda nisin üretimi özelliklerinin gen kodunun konjugal aktarım sıklığı yüksek (verici hücre başına $\sim 10^{-3}$) bir konjugatif transpozon üzerinde bulunduğunun tespiti, bu suşun genetik manipülasyonlar için uygun bir bakteri olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.3 *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 doğal suşunun nisin üretimini sürdüren (Nis⁺) ve nisin üretimini kaybeden (Nis⁻) mutantların plazmit içerikleri

M ccc Plazmit DNA Marker (kb): 16.2, 14.1, 12.2, 10.2, 8.0, 7.2, 6.0, 5.0, 4.0, 2.9, 2.1

1 (EYL 38, Doğal suş, Nis⁺) (kb): 33.1, 28.7, 23.7, 20.0, 18.3, 9.9, 8.7, 4.4, 3.3, 2.1

2 (EYL 38-1, Mutant, Nis⁺) (kb): 28.7, 23.7, 18.3, 9.9

3 (EYL 38-9, Mutant, Nis⁺) (kb): 28.7, 23.7, 18.3, 9.9, 4.4, 3.3, 2.1

4 (EYL 38-17, Mutant, Nis⁻) (kb): 23.7, 4.4

5 (EYL 38, Doğal suş, Nis⁺) (kb): 33.1, 28.7, 23.7, 20.0, 18.3, 9.9, 8.7, 4.4, 3.3, 2.1

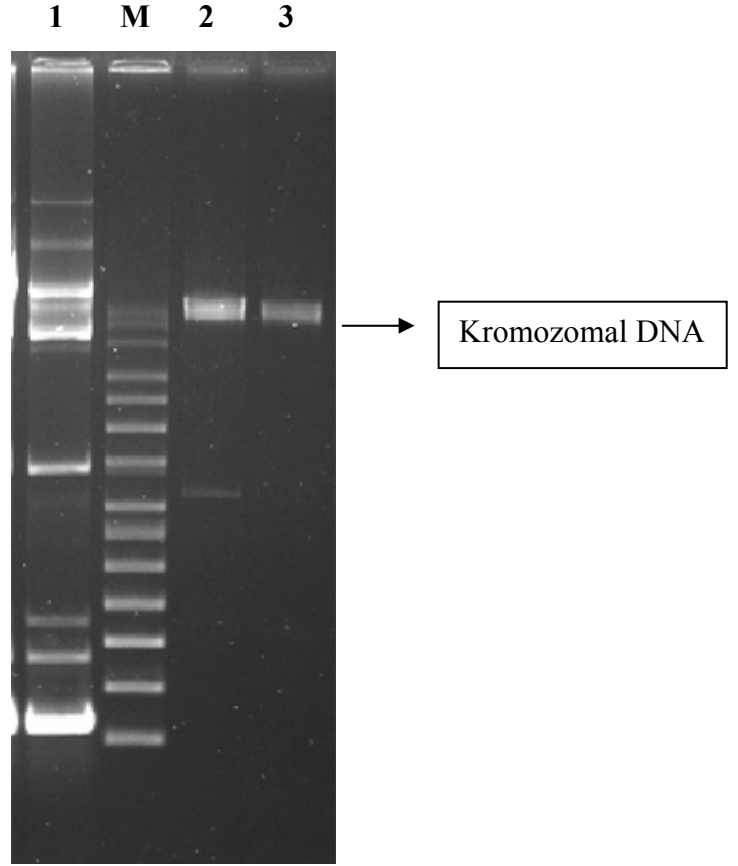
6 (EYL 38-19, Mutant, Nis⁺) (kb): 28.7, 23.7, 18.3, 9.9, 4.4, 3.3, 2.1

7 (EYL 38-22, Mutant, Nis⁻) (kb): 23.7, 9.9, 4.4

8 (EYL 38-33, Mutant, Nis⁺) (kb): 28.7, 23.7

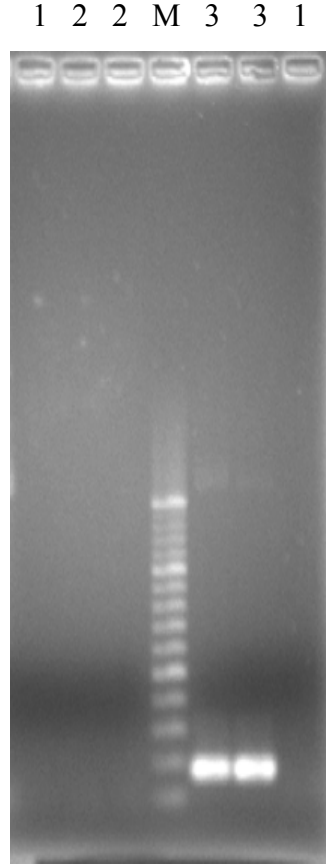
9 (EYL 38-36, Mutant, Nis⁺) (kb): 28.7, 23.7, 4.4, 3.3, 2.1

10 (EYL 38, Doğal suş, Nis⁺) (kb): 33.1, 28.7, 23.7, 20.0, 18.3, 9.9, 8.7, 4.4, 3.3, 2.1



Şekil 4.4 *L. lactis* subps. *lactis* EYL38 doğal suşu ve nisin üretim yeteneği kazanmış konjugantın plazmit içerikleri

M ccc Plazmit DNA Marker (kb): 16.2, 14.1, 12.2, 10.2, 8.0, 7.2, 6.0, 5.0, 4.0, 2.9, 2.1
1 (EYL38, Nis⁺, Em^s; Verici suş) (kb): 33.1, 28.7, 23.7, 20.0, 18.3, 9.9, 8.7, 4.4, 3.3, 2.1
2 (EYL 38C59, Nis⁺, Em^r; Konjugant) (kb): 8.7
3 (MG1363, Nis⁻, Em^r; Alıcı suş)



Şekil 4.5 *L. lactis* subps. *lactis* EYL38 suşunda nisin temel geninin kromozomal ve plazmid DNA kullanılarak PZR amplikasyonu

1 Negatif Kontrol

2 *L. lactis* subps. *lactis* EYL38 suşunun plazmit DNA'sı

2 *L. lactis* subps. *lactis* EYL38 suşunun plazmit DNA'sı

M O'rangerular Marker: 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500,
400, 300, 200, 100 bp.

3 *L. lactis* subps. *lactis* EYL38 suşunun toplam genomik DNA'sı

3 *L. lactis* subps. *lactis* EYL38 suşunun toplam genomik DNA'sı

1 Negatif Kontrol

4.6 *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 Suşunda ve Konjugantlarında Nisin Üretim Yeteneğinin Stabilitesi

Starter kültür suşlarında endüstriyel öneme sahip özelliklerin yüksek düzeyde ifadesi yanında, bu özelliklerin stabilitesi de ürünün kalitesi ve ekonomisini doğrudan etkilemektedir (Hugenholtz *et al.* 2000, Mills *et al.* 2006). Bu nedenle, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu ve genetik aktarım çalışmalarından elde edilen konjugantların nisin üretimi açısından stabilitesi takip edildi. Bu amaçla, skim milk ortamında 10 pasaj (~70 generasyon) geliştirilen doğal suş ve konjugantlar daha sonra agar ortamına inoküle edildi ve 20'şer adet koloni seçildi. Bu kolonilerin nisin üretim özellikleri incelenerek, fermentasyon süreçlerine uygunluğu % stabilite cinsinden tanımlandı.

Nisin üretim özelliğinin stabilitesi, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunda % 90, konjugantlarında ise; % 50 (EYL 38C59), % 55 (EYL 38C60) ve % 45 (EYL 38C61) olarak belirlendi (Çizelge 4.7). Endüstriyel fermentasyon süreçlerine uygunluk esas alındığında, test edilen özelliğin ~70 generasyon sonundaki stabilitesi için en düşük oran % 50 olarak tanımlanmaktadır (Picon *et al.* 2005). Bu veriler nisin üretim özelliği açısından değerlendirildiğinde; *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşunun endüstriyel kullanım için uygun, konjugantlarının ise sınır değerlerde olduğu anlaşılmaktadır. Ancak stabilite bulguları, söz konusu suşlar ile yürütülecek pilot üretim denemeleri ile desteklenmelidir. Diğer yandan, *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu ve konjugantlarının ~70 generasyon sonundaki nisin üretim düzeyleri de belirlendi. Bu testlerde, ~70 generasyon sonunda doğal suş ve konjugantların nisin üretim yeteneğini sürdüren kolonilerinin başlangıçta belirlenen oran ile aynı düzeyde nisin ürettiği tespit edildi (Çizelge 4.6). Endüstriyel özelliklerin konjugasyon yolu ile aktarımı, laktokok starter kültür suşlarının geliştirilmesi çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Nisin üreticisi olmayan suşlara, bu yeteneğin kazandırılmasında konjugasyon pratik kullanım olanağı bulan etkin bir yöntemdir. Ancak bu çalışmalarda da bizim araştırmamızda olduğu gibi, nisin üretim miktarı açısından verici suşu geçen varyant tespit edilememiştir. Yine bu çalışmalarda, nisin üretim yeteneğinin alıcı suшта stabil olmadığı gözlenmiştir (Akçelik vd. 1996, Kim *et al.* 1998, Picon *et al.* 2005). Konjugantlarda nisin stabilitesi üzerinde etkili unsurların tanımlanması, nisin transpozonunun detaylı analizi ile mümkün

olacaktır. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, konjugantlarda yürütülecek regülasyon ve ileri analiz çalışmaları, fermentasyon süreçlerinde stabil nisin üreticilerinin geliştirilmesini beraberinde getirecektir.

Çizelge 4.6 Doğal *L. lactis* subsp. *lactis* EYL 38 suşu ve konjugantlarının nisin üretim düzeyi ve stabilitesi

Doğal suş ve konjugantlar	% Stabilite	Nisin Üretim Düzeyi (AU/mL)
EYL 38 (Nis ⁺ , Em ^s)	90	3200
EYL38C59* (Nis ⁺ , Em ^r)	50	800
EYL38C60* (Nis ⁺ , Em ^r)	55	1600
EYL38C61* (Nis ⁺ , Em ^r)	45	800

* : Konjugant

KAYNAKLAR

- Akçelik, M. and Tunail, N. 1992. A 30 kd cell wall protein produced by plasmid DNA which encodes inhibition of phage adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P25. *Milchwissenschaft*, 47; 215-217.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Durlu, F., Demircan, S. ve Tunail, N. 1996. Türkiye’den izole edilen *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* LL37 suslarında nisin üretim özelliğinin genetik determinantlarının belirlenmesi. *Doga. Tr.J.of Biology*, 20; 9-18.
- Akçelik, M. 1998. A phage DNA injection-blocking type resistance mechanism encoded by chromosomal DNA in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *Milchwissenschaft*, 53; 619-622.
- Akçelik, M. 1999. The conjugal plasmid pLL10236 encodes lactose fermentation ability, restriction/modification activity, bacteriocin production and immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102. *Food Microbiology*, 16; 487-494.
- Akçelik, M., Şanlıbaba, P. and Tükel, Ç. 2000. Phage resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from traditional fermented milk products in Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, 35; 473-481.
- Akcelik, O., Tükel, C., Özcengiz, G. and Akcelik, M. 2006. Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50(3); 306-313.
- Anderson, D. G. and McKay, L. L. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from *lactic streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46; 549-552.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D. E. and Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of Lactic Acid Bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21; 579-588.
- Breukink, E., van Kraaij, C., Demel, R. A., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and de Kruijff, B. 1997. The C-terminal region of nisin responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*, 36; 6968-6976.
- Breukink, E., van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A. J. and de Kruijff, B. 2003. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J. Biol. Chem.*, 278; 19898-19903.

- Buchman, W. B., Banerjee, S. and Hansen, J. R. 1988. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.*, 263; 16260-16266.
- Campbell, R.C. 1974. *Statistics for biologists*. Cambridge University Press, Second Edition, 385p.
- Chan, W. C., Dodd, H. M., Horn, N., Maclean, K., Lian, L. Y., Bycroft, B. W., Gasson, M. J. and Roberts, G. C. 1996. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (8); 2966-2969.
- Chandrapati, S. and O'Sullivan, D. J. 1999. Nisin independent induction of the *nisA* promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170 (1); 191-198.
- Chatterjee, C. Paul, M., Xie, L. and van der Donk, W. A. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.*, 105; 633-684.
- Chen, H. and Hoover, D. G. 2003. Bacteriosins and their food applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety.*, 2; 82-100.
- Choi, M. H. and Park, Y. H. 2000. Selective control of lactobacilli in kimchi with nisin. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30; 173-177.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S, Hernández, P. E. and Nes, I. F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 4321-4330.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71; 1-20.
- Coakley, M., Fitzgerald, G., Ross, R. P. 1997. Application and evaluation of the phage resistance-and bacteriocin-encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4); 1434-1440.
- Cutter, C. N. and Siragusa, G. R. 1996. Reduction of *Brochothrix thermosphacta* on beef surfaces following immobilization of nisin in calcium alginate gels. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23(1); 9-12.

- Cutter, C. N. and Siragusa, G. R. 1998. Incorporation of nisin in to a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27; 19-23.
- Davey, G. P. 1984. Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48; 895-896.
- Davies, E. A., Milne, C. F., Bovis, H. E., Potter, R. W., Haris, J. M., Williams, G. C., Thomas, L.V. and Delves-Broughton, J. 1999. Effective use of nisin to vacuum-packed bologna-type sausage. *J. Food Prot.*, 62; 1004-1010.
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its use as a food preservative. *Food Technol.*, 40; 100-117.
- Delves-Broughton, J. 1990a. Nisin and its application as a food preservative. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 43(3); 73-76.
- Delves-Broughton, J. 1990b. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology.*, 44(11); 100-117.
- Delves-Broughton, J. 2005. Nisin as a food preservative. Feature paper. *Food Australia*, 57 (2); 525-527.
- De Martinis, E. C. P., Alves, V. F. and Franco, B. D. G. M. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, 18 (2-3); 191-208.
- Demel, R. A., Peelen, T., Siezen, R. J., de Kruijff, B. and Kuipers, O. P. 1996. Nisin Z. Mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. *Eur. J. Blochem.*, 235; 267-274.
- de Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Microbiology, genetics and applications*, pp. 539, Chapman & Hall. New York.
- Diep, D. B., Havarstein, L. S. and Nes, I. F. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, 178; 4472-4483.
- Dodd, H. M., Horn, N. and Gasson, M. J. 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.*, 136; 555-566.
- Dzung, B. D. and Nes, I. F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. *Current Drug Targets*, 3; 107-122.

- Elder, J. K., Amos, A., Southern, E. M. and Shippey, G. A. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. I: Improved accuracy of mobility measurements using a digital microdensitometer and computer processing. *Anal. Biochem.*, 128(1); 223-226.
- Elder, J. K. and Southern, E. M. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis II: Comparison of methods for relating mobility to fragment length. *Anal. Biochem.*, 128(1); 227-231.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelmann, M. and Entian, K. D. 1992. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the *nisB* protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 8(11); 3730-3743.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M. and Entian, K. D. 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3); 814-825.
- Ferchichi, M., Frere, J., Mabrouk, K. and Manai, M. 2001. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205(1); 49-55.
- Ferreira, M. A. and Lund, B. M. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22; 433-438.
- Franz, C. M., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. 1997. Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J. Basic Microbiol.*, 37(3);187-196.
- Gasson, M. J. and Davies, F. L. 1980. High-frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. *J. Bacteriol.*, 143(3); 1260-1264.
- Gasson, M. J. 1984. Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiol. Lett.*, 21; 7-10.
- Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. 1983. Potential of lactic *Streptococci* to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45; 205-211.
- Gillor, O., Nigro, L. M. and Riley, M. A. 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.*, 11(8); 1067-1075.

- Gireesh, T., Davidson, B. E. and Hillier, A. J. 1992. Conjugal transfer in *Lactococcus lactis* of a 68-kilobase-pair chromosomal fragment containing the structural gene for the peptide bacteriocin nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(5); 1670-1676.
- Gorris, L. G. M. 1994. Bacteriocins potential applications in food preservation. *Kitap. Food preservation by combined processes. Final Report Flair. Concerted Action No: 7 Subgroup B.*
- Graeffe, T., Rintala, H., Paulin, L. and Saris, P. 1991. A natural nisin variant. In: *Nisin and novel lantibiotics*. Eds. Jung, G. and Sahl, H.-G. ESCOM Science Publishers, pp. 260-268, Leiden, the Netherlands.
- Gross, E. and Morell, J. L. 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.*, 93; 4634-4635.
- Gürsel, A. 1999. Laktik ve propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler ve süt teknolojisi alanındaki uygulamaları. *Gıda*, 24(6); 399-410.
- Hancock, E. W. 1997. Peptide antibiotics. *Lancet*, 349; 418-422.
- Hansen, J. N. 1994. Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(1); 69-93.
- Hécharde, Y. and Sahl, H-G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriosins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84; 545-557.
- Hickey, R. M., Twomey, D. P., Ross, R. P. and Hill, C. 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology*, 149; 655-664.
- Hirsch, A. and Grinsted, E. 1951. The differentiation of the *lactic streptococci* and their antibiotics. *J. Dairy Res.*, 18; 198-204.
- Hoffmann, A., Pag, U., Wiedemann, I. and Sahl, H-G. 2002. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *II Farmaco*, 57; 685-691.
- Horn, N., Swindell, S., Dodd, H. and Gasson, M.J. 1991. Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol.Gen. Genet.*, 228; 129-135.
- Hsu, S. T., Breukink, E., de Kruijff, B., Kaptain, R., Bonvin, A. M. and Nuland, N. A. 2002. Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solition NMR: the nisin Z end lipid II interaction in SDS micelles. *Biochemistry*, 41; 7670-7676.

- Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., de Vos, W. and Hols, P. 2000. *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66; 4112-4114.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27; 85-123.
- Hurst, A. 1983. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In *Antimicrobials in Foods* ed. Branen, A. L. and Davidson, P. M., pp. 327-352., New York: Marcel Dekker.
- Immonen, T. and Saris, P. E. J. 1998. Characterization of the *nisFEG* operon of the nisin Z producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 strain. *DNA Sequence*, 9; 263-274.
- Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Holo, H., Nes, I. F., Sletten, K. H. and Warner, P. J. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61; 4459-4463.
- Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, 167; 439-446.
- Kaletta, C. and Entian, K-D. 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and post-translational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.*, 171; 1597-1601.
- Kellner, R., Jung, G., Josten, G., Kaletta, C., Entian, K-D. and Sahl, H-G. 1989. Pep5: structure elucidation of a large lantibiotic. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 28; 616-619.
- Kellner, R., Jung, G., and Sahl, H-G. 1991. Structure elucidation of the tricyclic lantibiotic Pep5 containing eight positively charged amino acids. In: Jung, G., and Sahl, H-G. (ed.), *Nisin and novel lantibiotics*. Escom Publishers, pp. 141-158, Leiden, The Netherlands.
- Kim, W. S., Hall, R. J. and Dunn, N. W. 1998. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50; 429-433.
- Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie*, 70; 337.

- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12; 39-86.
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. L. and Topisirovic, L. 1991. Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57; 1835-1837.
- Koponen, O. 2004. Studies of producer self-protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*. Institute of Biotechnology and Department of Applied Chemistry and Microbiology, Doctoral dissertation. Helsinki.
- Kosikowski, F. 1977. Process cheese and related types. Cheese and fermented milk foods. Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor, Mich., p. 396.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Vos, W. M. and Siezen, R. J. 1993. Biosynthesis and secretion of a precursor of nisin Z by *Lactococcus lactis* directed by the leader peptide of the homologous lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis*. *FEMS Lett.*, 330(1); 23-27.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G., Luesink, E. J. and de Vos, W. M. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 270(45); 27299-27304.
- Kumar, C. G. and Anand, S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 42; 9-22.
- Kurt, Ş. ve Zorba, Ö. 2005. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. *YYÜ Vet. Fak. Derg.*, 16(1); 77-83.
- Leblanc, D. J., Crow, V. L. and Lee, L. N. 1980. Plasmid mediated carbohydrate catabolic enzymes among strains of *Streptococcus lactis*. In: Stuttard, C. and Roze, K. R. (ed.), *Plasmids and transposons: environmental effects and maintenance mechanisms*. Academic Press, Inc., pp. 31-41, New York.
- Lee, N. K. and Paik, H. D. 2001. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiology*, 18; 17-24.
- Liu, W. and Hansen, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56; 2551-2558.

- Liu, W. and Hansen, J. N. 1993. The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(2); 648-651.
- Macrina, F. L., Kopecko, D. J., Jone, K. R., Ayers, D. J. and McCowen, S. M. A. 1978. multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*, 1(3); 417-420.
- Macrina, F. L., Kopecko, D. J., Jones, K. R., Evans, R. P. and Clewell, D. B. 1982. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*, 19; 345-353.
- Mao, Y., Muriana, P. M. and Cousin, M. A. 2001. Purification and transpositional inactivation of Lacticin FS92, a broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* FS92. *J. Food Microbiol*, 18; 165-175.
- Martínez, B., Suárez, J. E. and Rodriguez, A. 1996. Lactococcin 972, a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiology*, 142; 2393-2398.
- McAuliffe, O., Ross, R. P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25; 285-308.
- McKay, L. L., Baldwin, K. A. and Zottola, E. A. 1972. Loss of lactose metabolism in *lactic streptococci*. *Appl Microbiol.* 23(6); 1090-1096.
- Meyers, J.A. Sanches, D., Elwell, L.P. and Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127; 1529-1537.
- Mills, S., Coffey, A., Hill, C., Fitzgerald, G. F, McAuliffe, O. and Ross, R. P. 2005. Insertional Inactivation of the determinants for Mg²⁺/Co²⁺ transport, as a tool for screening recombinant clones in *Lactococcus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71; 4897-4901.
- Mills, S., McAuliffe, O. E., Coffey, A., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. 2006. Plasmids of lactococci genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol. Rev.*, 30; 243.
- Mirhosaini, M., Nahvi, I., Kasra-Kermanshahi, R. and Tavassoli, M. 2006. Isolation of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strain from dairy products. *International Journal of Dairy Science*, 1(1); 51-56.

- Mitra, S., Chakrabartty, P. K. and Biswas, S. R. 2005. Production and characterization of nisin-like peptide produced by a strain of *Lactococcus lactis* isolated from fermented milk. *Curr Microbiol.*, 51(3); 183-187.
- Moreno, I., Lerayer, A. L. S., Baldini, V. L. S. and Leitão, M. F. de F. 2000. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31; 184-192.
- Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. and de Vos, W. M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201; 581-584.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. "Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria" *Antonie van Leeuwenhoek*, 70; 113-128.
- Nes, I. F. and Tagg, J. R. 1996. Novel lantibiotics and their pre-peptides. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69; 89-97.
- Nes, I. F., Holo, H., Gunnar Fimland, Håvard Hildeng-Hauge, and Nissen-Meyer, J. 2001. Unmodified peptide-bacteriocins (Class II) produced by lactic acid bacteria. In: *Peptide Antibiotics*. Eds. Dutton, Haxell, McArthur & Wax. Marcel Decker, pp. 81-115, Inc. New York.
- Nilsen, T., Nes, I. F. and Holo, H. 2003. Enterolysin A, a cell walldegrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69; 2975-2984.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 81(2); 137-145.
- Nykänen, A. 2001. Use of nisin lactic acid/lactate to improve the microbial and sensory quality of rainbow trout products. PhD theses. Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Turku. 72s.
- Ogden, K. and Tubb, R. S. 1985. Inhibition of beer-spoilage Lactic Acid Bacteria by nisin. *J. Inst. Brew.*, 91; 390-392.
- Olasupo, N. A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H. and Holzapfel, W. H. 1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from

- wara, a traditional Nigerian cheese product. *Int. J. Food Microbiol.*, 53(2-3); 141-152.
- O'Sullivan, L., Ryan, M. P., Ross, R. P. and Hill, C. 2003. Generation of food-grade lactococcal starters which produce the lantibiotics Lacticin 3147 and Lacticin 481. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6); 3681-3685.
- Pag, U. and Sahl, H. G. 2002. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics? *Curr. Pharm. Des.*, 8; 815-833.
- Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.*, 21; 465-499.
- Park, S. H., Itoh, K., Kikuchi, E., Niwa, H. and Fujisawa, T. 2003. Identification and characteristics of nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Kimchi. *Curr. Microbiol.*, 46(5); 385-388.
- Pawar, D. D., Malik, S. V. S., Bhilegaonkar, K. N. and Barbuddhe, S. B. 2000. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Science*, 56; 215-219.
- Piard, J. C., Delorme, F., Giraffa, G., Commisaire, J. and Desmazeaud, M. 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *L. lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk Dairy J.*, 44; 143-158.
- Piard, J. C., Kuipers, O. P., Rollema, H. S., Desmazeaud, M. J. and de Vos, W. M. 1993. Structure, organization and expression of the *lct* gene for Lacticin 481, a novel lantibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 268;16361-16368.
- Picon, A., de Torres, B., Gaya, P. and Nuñez, M. 2005. Cheesemaking with *Lactococcus lactis* strain expressing a mutant oligopeptide binding protein as a starter results in a different peptide profile. *International Journal of Food Microbiology*, 104; 299-307.
- Qiao, M., Immonen, T., Koponen, O. and Saris, P. E. J. 1995. The cellular location and effect on nisin immunity of the NisI protein from *Lactococcus lactis* N8 expressed in *Escherichia coli* and *L. lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 131; 75-80.

- Qiao, M., Omaetxebarria, M. J., Ra, R., Oruetaebarria, I. and Saris, P. E. J. 1997. Isolation of a *Lactococcus lactis* Strain with high resistance to nisin and increased nisin production. *Biotechnol. Letters*, 19; 199-202.
- Ra, S. R., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I. and Saris, E. J. 1996. Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology*, 142(5); 1281-1288.
- Ra, R., Beerhuyzen, M. M., de Vos, W. M., Saris, P. E. and Kuipers, O. P. 1999. Effect of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology*, 145; 1227-1233.
- Rauch, P. J. and de Vos, W. M. 1992. Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 174(4);1280-1287.
- Riley, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu Rev. Genet.*, 32; 255-278.
- Rogers, L. A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, 16; 321-325.
- Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S. M., Ryan, M. P., Twomey, D. P., Meaney, W. J. and Hill, C. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1-4); 337-346.
- Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C. and Ross, R. P. 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62; 612-619.
- Sahl, H. G, Jack, R. W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, 230; 827-853.
- Sahl, H. G and Bierbaum, G. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52; 41-79.
- Schaffer, H. E. and Sederoff, R. R. 1981. Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Anal. Biochem.* 115(1); 113-122.
- Schillinger, U. and Lücke, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55; 1901-1906.

- Siegers, K. and Entian, K. D. 1995. Gene involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61; 1082-1089.
- Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N. and Ishizaki, A. 2000. Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10; 325–334.
- Southern, E. M. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 100(2); 319-323.
- Stein, T., Heinzmann, S., Solovieva, I. and Entian, K. D. 2003. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 278; 89-94.
- Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T. R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(12); 3613-3615.
- Stoddard, G. W., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J. and McKay, L. L. 1992. Molecular analysis of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58; 1952-1961.
- Stoyanova, L. G., Sul'timova, T. D., Botina, S. G. and Netrusov, A. I. 2006. Isolation and identification of new nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from milk. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(5); 492-499.
- Şanlıbaba, P. and Akçelik, M. 2005. Classification of virulent lactococcal bacteriophages based on protein composition and restriction endonuclease analysis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29: 865-871.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40; 722-756.
- Takala, T. M. 2005. Nisin immunity and food-grade transformation in Lactic Acid Bacteria. division of microbiology. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Academic Dissertation in Microbiology. Viikki Biocenter, University of Helsinki. Finland.
- Terzaghi, B. E. and Sandine, W. E. 1975. Improved medium for *lactic streptococci* and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29(6); 807-813.

- Thompson, J., Sackett, D. L. and Donkersloot, J. A. 1991. Purification and properties of fructokinase I from *Lactococcus lactis*. Localization of *scrK* on the sucrose-nisin transposon Tn5306. *J. Biol. Chem.*, 266(33); 22626-22633.
- Tsai, H. J. and Sandine, W. E. 1987. Conjugal transfer of nisin plasmid genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Leuconostoc dextranicum* 181. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(2); 352–357.
- Tuncer, Y. and Akcelik, M. 2002. A protein which masks galactose receptor mediated phage susceptibility in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MPL56. *International Journal of Food Science & Technology*. 37(2); 139-144.
- Tükel, Ç. ve Akçelik, M. 2003. “*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA83 suşunda aktif bir faj dirençlilik sisteminin genetik ve biyokimyasal doğası”, *Gıda*, 28; 235-239.
- Tükel, Ç. and Akçelik, M. 2004. Plasmid encoded lacticin 481 production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41. *Milchwissenschaft*, 59; 601-604.
- Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meany, B. and Hill, C. 2002. Lantibiotics produced by acetic acid bacteria: structure, function and application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82; 165-185.
- Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J. R. and Holzapfel, W. H. 1992. Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. *Int. J. Food Microbiol.*, 16; 141-151.
- van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(5); 1187-1191.
- van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N. and Abee, T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.*, 17; 37934 -37941.
- Vandenbergh, P. A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. 12; 221-237.
- van der Meer, J. R., Polman, J., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and De Vos, W. M. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor

- processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175(9); 2578-2588.
- van de Ven, F. J. M., van den Hooven, H. W., Konings, R. N. H. and Hilbers, C. W. 1991. NMR studies of lantibiotics. *Eur. J. Biochem.*, 202; 1181-1188.
- van den Hooven, H. W., Fogolari, F., Rollema, H. S., Konings, R. N. H., Hilbers, C. W., and van de Ven, F. J. M. 1993. NMR and circular dichroism studies of the lantibiotic nisin in non-aqueous environments. *FEBS Lett.*, 319;189-194.
- van Heusden, H. E., de Kruijff, B. and Breukink, E. 2002. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry*, 41; 12171-12178.
- van Kraaij, C., Breukink, E., Noordermeer, M. A., Demel, R. A., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and de Kruijff, B. 1998. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. *Biochemistry*, 37; 16033-16040.
- Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., Kok, J., Konings, W. N. and Venema, G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiolactivated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59; 1041-1048.
- Venema, K., Venema, G. and Kok, J. 1995. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiol.*, 3(8); 299-304.
- Xie, L., and van der Donk, W. A. 2004. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 8; 498-507.
- Wandling L. R., Sheldon, B. W. and Foegeding, P.M. 1999. Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. *J. Food. Prot.*, 62; 492-498.
- WHO Expert Committee on Food Additives. 1969. Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antibiotics. Twelfth Report. WHO Technical Report Series No. 430.
- Wiedemann, E., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. and Sahl, H.G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.*, 3; 1772-1779.

- Wirawan, R. E., Klesse, N. A., Jack, R. W., and Tagg, J. R. 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. American Society for Microbiology., 72; 1148-1156.
- Wolfe, T. W. and McKay, L. L. 1983. Isolation and partial characterization of lactose-negative mutants from *Streptococcus lactis* C2 defective in the phosphotransferase system. J. Dairy Sci., 67; 950-959.
- Yarmus, M., Mett, A. and Shapira, R. 2000. Cloning and expression of the genes involved in the production of and immunity against the bacteriocin lacticin RM. Biochem. Biophys. Acta., 1490(3); 279-290.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2003. 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., 67; 1616-1619.
- Zeza, N., Pasini, G., Lombardi, A., Mercenier, A., Spettoli, P., Zamorani, A. and Nutti, P. 1993. Production of a bacteriocin active on lactate-fermenting clostridia by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in coated alginate beads. J. Dairy Res., 60; 581-591.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine ANAYOL
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 1976
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ankara Yenimahalle Yahya Kemal Beyatlı Lisesi (1993)
Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü (1997)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(Ocak 2005- Ocak 2007)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Sakarya Tarım İl Müdürlüğü : 2000-2002
Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü: 2002-
sürüyor