ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pediococcus acidilactici PBF SUŞUNDA BAKTERİYOSİN ÜRETİMİNDEN SORUMLU GENİN AKTARIMI

Pelin DOĞAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2009

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Pediococcus acidilactici PBF SUŞUNDA
BAKTERİYOSİN ÜRETİMİNDEN SORUMLU GENİN AKTARIMI

Pelin DOĞAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaları, pilazmit tarafından kodlanan bakteriyosin üretim özelliklerinden dolayı gıdalarda raf ömrünü uzatmak için potansiyel biyolojik koruyucu rolüne sahip olmaları, probiyotik ürünlerin içeriğinde bulunmaları ile birlikte bazı LAB'lerinin gıdalarda bozulmaya sebep olmaları bu bakteri grubunu hem endüstriyel açıdan hem de bilimsel arenada üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı oldukça önemli bir grup haline getirmiştir.

Çalışmamızda, gıda-kaynaklı *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun birçoğu gıda bozulması ve gıda kaynaklı hastalıklar ile yakından ilişkili olan *Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Lactococcus, Staphylococcus, Enterococcus, Clostridium* ve başta *Listeria monocytogenes* olmak üzere *Listeria*'nın birçok türüne karşı antimikrobiyal bir madde ürettiği gösterilmiştir. Proteolitik enzimlere duyarlı, ısıya ve organik çözücülere karşı dirençli ve geniş bir pH aralığında aktif olan bu antimikrobiyal madde çalışmanın ilerleyen aşamalarında "anti-listerial bakteriyosin" olarak adlandırılmıştır. Agaroz jel elektroforezi ve pilazmit giderim ("curing") çalışmaları *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminin 9.42kbp moleküler ağırlığına sahip bir pilazmit DNA (pPF1.0) tarafından kodlandığını göstermiştir. Bakteriyosine karşı konukçu bağışıklığının pPF1.0 pilazmiti ile ilişkili olduğu bulunmuştur. *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminden sorumlu pilazmit DNA (pPF1.0) kit kullanımı ile jel üzerinden elde edilerek saflaştırılmış ve bakteriyosin üretmeyen *Pediococcus pentosaceus* LAB (Bac^-) suşuna elektroporasyon ile transforme edilmiştir. Elektrotransformasyon neticesinde artık bakteriyosin üretmeye/eksprese etmeye başlayan suş *Pediococcus pentosaceus* PG olarak isimlendirilmiştir.

Şubat 2009, 115Sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterisi, elektroporasyon, bakteriyosin, pilazmit DNA

ABSTRACT

Master Thesis

TRANSFER OF GENE RESPONSIBLE FOR BACTERİOCİN PRODUCTİON İN *Pediococcus acidilactici* AB6

Pelin DOĞAN

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Lactic acid bacteria are widely used as starter cultures in the food industry. Because of their plasmid-coded bacteriocin production speciality, they make expire date of the food longer and thought to be potential biopreservativies. This group of bacteria become very important both industrially and scientificaly in terms of their usage in probiotic products and some of them causes food spoilage.

A food-grade *Pediococcus acidilactici* PBF was shown to produce an antimicrobial agent active against several species of *Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Lactococcus, Staphylococcus, Enterococcus, Clostridium* and *Listeria*; many of which are associated with food spoilage and health hazards of food origin. This antimicrobial agent is named as anti-listerial bacteriocin as it was found to be sensitive to proteolytic enzymes, effective against food-borne pathogen *Listeria monocytogenes,* resistant to heat and organic solvents and active over a wide range of pH. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA and plasmid curing experiments suggested that bacteriocin production in *Pediococcus acidilactici* PBF was encoded on a plasmid with a molecular weight of 9.42 kbp. Host immunity to bacteriocin was also found to be linked to this plasmid, pPF1.0. Sensitive bacteriocin nonproducer *Pediococcus pentosaceus* LAB strain was transformed by electroporation with gel purified pPF1.0, a plasmid DNA responsible for bacteriocin production in *Pediococcus acidilactici* PBF and the strain which was then started to produce /express bacteriocin was named *Pediococcus pentosaceous* PG

February 2009, 115 pages

Key Words: Laktik Asit Bakterisi, elektroporasyon, bakteriyosin, pilazmit DNA

TEŞEKKÜR

Üç yıl süren tez çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, bilgisi ve deneyimleri ile beni sürekli aydınlatan, kızsa da bağırsa da sevgisini hiç eksiltmeyen, emeği ve desteğiyle iyi bir **"eğitmen"** olarak hayatım boyunca seveceğim ve saygı duyacağım çok değerli hocam Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU'na…

Deney aşamasında yardımseverliğini ve dostluğunu hiç esirgemeyen Fadime KIRAN'a…

Uzun bir yolculuğa çıktık. Zorlu ve keyifli günler geçirdik. Hep beraber güldük-ağladık. İyi ve kötü anlar paylaştık, hep gülümseyerek hatırlayacağım laboratuar arkadaşlarım; Burcu BİLER, Duygu AKKAYA, Başak ORAL, Zehra Betül ŞAHİN ve Elif YÜRÜMEZ'e…

Moralimi yüksek tutmamı sağlayan, manevi desteklerini hep hissettiren arkadaşlarım Özlem ÇAKAR ve Özden İNCE'ye…

Ve en büyük teşekkürü hak eden aileme… Bana en büyük desteği veren, benimle gülüp benimle ağlayan, dertlerimi hafifleten, hayata umutla ve azimle tutunmamı sağlayan annem Kübra DOĞAN, babam Kayhan DOĞAN, psikoloğum ablam Selin DOĞAN ÖZCAN, eniştem Atila ÖZCAN ve en sıkıntılı anlarımda beni gülümsetmeyi başaran sevgili yeğenim minik Ece ÖZCAN'a...

Teşekkürler
Pelin DOĞAN
Ankara, Şubat 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..…..... i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv

1. GİRİŞ…… 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 3
2.1 Laktik Asit Bakterileri..... 11
2.1.1 Laktik Asit Bakterilerinin özellikleri 13
2.1.2 Laktik Asit Bakterilerinin önemi..... 15
2.1.2.1 Starter kültür..... 16
2.1.2.2 Probiyotik. 17
2.1.2.3 Bakteriyosin üretimi 21
2.2 Bakteriyosinler 22
2.2.1 Bakteriyosinlerin sentezi 28
2.2.2 Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları..... 28
2.2.3 Bakteriyosinlerin sınıflandırılması..... 29
2.2.3.1 GRUP I Bakteriyosinler 29
2.2.3.2 GRUP II Bakteriyosinler..... 30
2.2.3.3 GRUP III Bakteriyosinler 31
2.2.3.4 GRUP IV Bakteriyosinler 31
2.2.4 Bakteriyosinlerin önemi 31
2.3 Pilazmitler..... 32
2.3.1 Seks pilazmitleri 35

2.3.2 R pilazmitleri 36
2.3.3 Col pilazmitleri 37
2.3.4 Penisillinaz pilazmitleri 37
2.3.5 Virulans pilazmitleri 37
2.3.6 Cryptic pilazmitleri 38
2.3.7 Laktik asit bakterilerinde pilazmitler 38
2.4 Gen Transformasyonu 39
2.4.1 Laboratuvar ortamında transformasyon 41
2.4.2 Doğal kompetentlik 41
2.4.3 Suni olarak oluşturulan kompetentlik 42
2.4.3.1 Üreme fazı ve üreme koşullarının transformasyon üzerindeki etkileri 43
2.4.3.2 Hücre duvarının muralitik muamelesinin transformasyon üzerindeki etkileri 44
2.4.3.3 PEG kullanılarak yapılan uygulamaların transformasyon üzerindeki etkileri 44
2.4.4 Elektroporasyon ile transformasyon 45
2.4.5 Elektroporasyon üzerinde etkili olan parametreler 46
2.4.5.1 Voltaj ve kapasitörün etkisi 46
2.4.5.2 Üreme fazının etkisi 47
2.4.5.3 Birden fazla uygulanan akımın etkisi 47
2.4.5.4 Divalent katyonlar 47
2.4.5.5 Hücre duvarını zayıflatan ajanların etkisi 47
2.4.5.6 Ortam sıcaklığının etkisi 47
2.4.5.7 Pilazmit DNA konsantrasyonunun etkisi 48
2.4.5.8 Hücre yoğunluğunun etkisi 48
2.4.5.9 Ortamın elektrik iletkenliği 48

3. MATERYAL VE YÖNTEM 50
3.1 Materyal 50
3.1.1 Bakteri izolatları 50
3.1.2 İndikatör bakteriler 50
3.1.3 Bakteri kültürleri ve besi ortamları 50
3.1.4 Tampon ve çözeltiler 51
3.1.5 Moleküler markör 51
3.1.6 Kimyasallar 51
3.1.7 Kullanılan solüsyon ve malzemelerin sterilizasyonu 51
3.1.8 Bakteri kültürlerinin saklanması 51
3.2 Yöntem 53
3.2.1 *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen bakteriyosin antimikrobiyal aktivitesi……..53
3.2.1.1 Bakteri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi 53
3.2.1.2 Ham (crude) bakteriyosin ekstraktının hazırlanması 53
3.2.1.3 Bakteriyosin üretiminin belirlenmesinde kullanılan temel yöntemler 53
3.2.1.4 Aktivite ünitesinin (AU) hesaplanması 54
3.2.1.5 Ham bakteriyosin ekstraktının antimikrobiyal spektrumu 54
3.2.2 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin stabilitesi 55
3.2.2.1 Sıcaklık ile muamelenin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi 55
3.2.2.2 pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi 55
3.2.2.3 Enzimler ile muamelenin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi 56
3.2.2.4 Organik çözücüler ile muamelenin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi 56
3.2.3 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genetik determinantların belirlenmesi 57
3.2.3.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminden sorumlu olan pilazmit DNA nın izolasyonu 57
3.2.3.2 Bakteriyosin üretim özelliğinin (Bac^+) pilazmit DNA varlığı ile korolasyonu (Plasmid curing) 58

3.2.3.3 Bakteriyosine direnci kodlayan immunity geninin pilazmit DNA ile bağlantısı 59
3.2.3.4 Agaroz jel elektroforez 59
3.2.3.5 Plazmit DNA ların moleküler ağırlıklarının belirlenmesi..... 60
3.2.3.6 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda sukroz fermentasyonu..... 60
3.2.4 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminden sorumlu genin elektroporasyon ile aktarımı..... 61
3.2.4.1 Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan pilazmit DNA nın agaroz jelden ekstraksiyonu 61
3.2.4.2 pPF1.0'ın elektroporasyon ile Bac⁻ *Pediococcus pentosaceous* LAB suşuna transformasyonu 62
3.2.4.3 Plazmit profillerinin karşılaştırılması..... 63
4. BULGULAR..... 64
4.1 Ham (crude) bakteriyosin ekstraktının hazırlanması 64
4.2 *Pediococcus acidilactici* PBFtarafından üretilen antimikrobiyal maddenin antimikrobiyal etki spektrumu 64
4.3 Antimikrobiyal maddenin tabiatı..... 65
4.3.1 Sıcaklık..... 65
4.3.2 pH……..69
4.3.3 Enzimler..... 69
4.3.4 Organik çözücüler..... 69
4.4 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda antimikrobiyal madde ("bakteriyosin") üretiminden sorumlu olan genetik determinantların belirlemesi..... 73
4.4.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretimi ile ilgisi olabilecek pilazmit DNA'nın izolasyonu 73
4.4.2 Bakteriyosin üretimin özelliğinin pilazmit varlığı ile korolasyonu 74
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 79
KAYNAKLAR 90
EKLER 106

EK 1 Bakteri izolasyonunda ve gelişiminde kullanılan kültür ortamları 108
EK 2 Tampon ve çözeltiler 109
EK 2.1 Pilazmit DNA izolasyonunda kullanılan çözelti ve tamponlar 109
EK 2.2 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözelti ve tamponlar 111
EK 2.3 Elektroporasyon çalışmasında kullanılan tamponlar 112
EK 3 DNA analizi için kullanılan moleküler markör 113
EK 4 Kimyasallar 114
ÖZGEÇMİŞ 115

SİMGELER DİZİNİ

Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenin Tri Phosphat
AU	Aktivite Ünitesi
BHI	Brain Heat Infusion
kbp	Kilo baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Sitozin
^{o}C	Santigrat Derece
Ca	Kalsiyum
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
$CaCl_2$	Kalsiyumklorür
CF	Compotence Factor
cfu	Colony Forming Unit
CH	Karbonhidrat
Cl_2	Klor
cm	Santimetre
CO_2	Karbondioksit
dk	Dakika
DNA	Deoksinükleikasit
DNaz	Deoksinükleaz Enzimi
DPC	Direct Plate Conjugation
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacedic acid
EtBr	Etidyumbromür
FDP	Fruktoz Di Fosfat
FDs	Florasan dekstran
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su

G	Guanin
GFP	Green Fluorescent Protein
gr	Gram
GRAS	Generally Regarded As Safe
HCl	Hidroklorik asit
HEPES	Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic Acid
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
H_2S	Hidrojen Sülfür
K^+	Potasyum iyonu
kb	Kilobaz
Kbp	Kilobaz çifti
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
kV	Kilovolt
LAB	Laktik Asit Bakterisi
Lan	Lanthionin
LiAc	Lityum Asetat
lt	Litre
M	Molarite
MDa	Megadalton
MeLan	Metil Lanthionin
MFC	Membrane Fitler Conjugation
mg	Miligram
Mg	Magnezyum
$MgCl_2$	Magnezyumklorür
MgSO4	Magnezyumsülfat
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
$MnCl_2$	Manganklorür

MnSO4	Mangansülfat
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe Broth
ms	Milisaniye
NaCl	Sodyumklorür
NaOH	Sodyumhidroksit
nm	Nanometre
ng	Nanogram
OD	Optik Dansite
PEG	Polietilenglikol
PMF	Proton Motive Force
Rep	Replikon
RNA	Ribonükleikasit
RNaz	Ribonükleaz Enzimi
RTF	Direnç Transfer Faktörü
SDS	Sodyom Dodesil Sülfat
sn	Saniye
SSC	Solid Surface Conjugation
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TES	Tris- EDTA -Sakkaroz
TGE	Tripton Glukoz Yeast Ekstrakt
US-FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
UV	Ultraviyole
V	Volt
µ	Mikro
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µs	Mikrosaniye

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bazı laktik asit bakteri genuslarına ait mikroskopik görüntüler 12

Şekil 2.2 Katı besiyeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu 23

Şekil 2.3 *Lactococcus lactis* tarafından üretilen ve bir lanthionine (Ala-S-Ala) olan nisin bakteriyosini ile üç nonlanthionine bakteriyosini 25

Şekil 2.4 Direnç transfer faktörünü ve çoklu antibiyotik direnç genini taşıyan pilazmiti gösteren şekil (Tc; tetrasiklin, Kan; kanamisin, Sm; strepotomisin, Su; sulfonamit, Amp; ampisilin ve Hg; civa) 36

Şekil 4.1 (a) *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin çeşitli indikatörlere karşı sergilemiş olduğu antimikrobiyal etki spektrumu (b) Ham ekstraktın kullanımı ile belirlenen Aktivite Ünitesi (AU) 67

Şekil 4.2 *Pediococcus acidilactici* PBF kolonileri tarafından üretilen bakteriyosinin indikatör *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı oluşturmuş olduğu inhibisyon zonları..... 68

Şekil 4.3 *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin değişik sıcaklıklar ile muamele neticesinde *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı sergilemiş olduğu aktivite 68

Şekil 4.4 Bazı enzim (a) ve organik çözücülerin (b) *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki inhibisyon etkileri 73

Şekil 4.5 A kuyucuğunda moleküler markör olarak kullanılan ve her bir bandın moleküler ağırlığının 16.2 kbp ile 2.1 kbp arasında olduğu DNA supercoiled DNA, B kuyucuğunda ise parental *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun pilazmit profili yer almaktadır 74

Şekil 4.6 (a) *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı bakteriyosin üreten *Pediococcus acidilactici* PBF kolonileri. (b) 20 µg /ml EtBr içeren TGE besi ortamında birbirini takip eden 3 aktifleştirme neticesinde *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda antimikrobiyal madde ("bakteriyosin") üretiminden sorumlu olan pilazmit DNA gideriminin *Lactobacillus plantarum N*CDO 955 suşunun indikatör olarak kullanıldığı çalışmada gösterimi 76

Şekil 4.7 *Pediococcus acidilactici* PBF suşundan elde edilen saflaştırılmış pilazmit DNA'nın agaroz jel elektroforezi..... 77
Şekil 4.8 (a) Bakteriyosin üretmeyen *Pediococcus pentosaceus* LAB, (b) elektroporasyon neticesinde saflaştırılmış pPF1.0 pilazmitine sahip olan ve bakteriyosin üretme yeteneğini kazanan *Pediococcus pentosaceous* PG suşu. 78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar 19
Çizelge 2.2 Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin sağlığa faydalı etkileri ve mekanizmaları 20
Çizelge 2.3 Laktik Asit Bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel özellikleri 24
Çizelge 2.4 Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri 34
Çizelge 3.1 Bakteriyal suşlar, gelişimlerinde kullanılan besi ortamları ve gelişim parametreleri 52
Çizelge 4.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivite spektrumu 66
Çizelge 4.2 Geniş bir skaladaki pH değerlerinin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri 70
Çizelge 4.3 Değişik enzimlerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri 71
Çizelge 4.4 Değişik organik çözücülerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri 72

1. GİRİŞ

İnsanların sağlıklı büyüme ve gelişmeleri için; tükettikleri gıdaların güvenilir olması oldukça önemlidir. Tüketici talebine bağlı olarak; birçok gıdanın fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin (raf ömrü) uzatılması için çeşitli katkı maddeleri (antioksidanlar, tatlandırıcılar, renklendiriciler vs.) kullanılmaktadır. Ancak yapılan son araştırmalarda; gıda katkı maddelerinin bazılarının sağlıksız oldukları ve kullanım oranına bağlı olarak kanserojenik ve toksik etki yaptıkları ortaya çıkmıştır. Bu da; doğal, güvenilir katkı maddelerinin elde edilmesini ve kullanımını gündeme getirmiştir.

Gıdaların korunması ve muhafaza sürelerinin uzatılması için; düşük sıcaklık veya ısıl işlem uygulaması, paketleme gibi yöntemlerin yanı sıra; gıdalara tuz, şeker ve antimikrobiyal katkı maddeleri de eklenebilmektedir. Gıdaların güvenliğinin sağlanmasında; mümkün olduğunca düşük sıcaklık veya ısıl işlem gibi uygulamalardan kaçınılması ve doğal katkı maddelerinin kullanılması gerekmektedir. Ayrıca; kimyasal formulasyona sahip gıda katkı maddelerine alternatif olarak doğal veya antimikrobiyal koruyucuların kullanımı tavsiye edilmektedir (de Martinis *et al.* 2002).

Uzun yıllardan beri; çeşitli fermente gıdaların üretilmesinde laktik asit bakterilerinden yararlanılmaktadır. Bazı gıdaların laktik asit fermentasyonu sonucu oluşan organik asitlerden dolayı raf ömrünün uzadığı bilinmektedir. Ayrıca, organik asitler dışında laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren hidrojen peroksit, serbest yağ asitleri, amonyak, diasetil ve bakteriyosin gibi inhibitör maddeleri de ürettiği saptanmıştır (Daeschel 1989, Vandenbergh 1993). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler; üretici bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal aktivite gösteren protein yapısındaki maddelerdir (Klaenhammer 1988). Bakteriyosinlerin protein yapısında antimikrobiyal bileşenler olması (Riley 1998, de Martinis *et al.* 2002) ve bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin fermente edilmiş gıda ürünlerinde doğal olarak bulunması bu bakterilerin bioprezervatif olarak potansiyel kullanımlarına olan ilgiyi arttırmıştır. Sonuç

olarak bakteriyosinler, kimyasal koruyucuların yerini alabilecek aday durumuna gelmişlerdir (de Vuyst and Vandamme 1994).

Fermente gıda ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterileri; gerek starter kültür olarak kullanılarak fermente ürünlerde tat, koku gibi organoleptik adı verilen özelliklerin kazandırılması gerekse bakteriyosin gibi gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilerin gelişimini engelleyen antimikrobiyal madde üretim yetenekleri ile gıda endüstrisi için büyük öneme sahiptirler. Bu gruba dahil olan *Pediococcus* türleri; gıdalarda raf ömrünü uzatmak ve mikrobiyolojik güvenilirliği arttırmak için potansiyel kullanıma sahip olan pediyosini üretmektedirler.

Bu çalışmada; bakteriyosin üretim genine sahip olmayan (Bac^-) bir bakteriye elektroporasyon yöntemi kullanılarak fermente gıda ürünlerinden izole edilen, laktik asit bakterilerine dahil olan, *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosin (pediyosin) üretim geninin aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda; laktik asit bakterilerinin sahip olduğu bakteriyosin üretim geni büyük hacim pilazmit izolasyonu ile elde edilerek bu geni taşımayan bir bakteriye elektroporasyon yöntemiyle transfer edilmiştir. Elektroporasyon aşamasından sonra gen aktarımı yapılan bakterinin bakteriyosin üretip üretmediği kontrol edilmiştir.

Böyle bir çalışma ile gıdalarda starter kültür olarak kullanılan ve gıdanın hem oluşumunda hem de yapısında etkili olan bakteri kültürlerinin aynı zamanda bakteriyosin üretme yeteneğini kazanması sağlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Streptococcus faecalis'den *Pediococcus pentosaceus* ve *Pediococcus acidilactici*'ye, geniş konak aralığına sahip pIP501 pilazmitinin transferi gerçekleştirilirken hücreler; DNaz ihtiva eden nitroselüloz filtre üzerinde sabitlenmişlerdir. pIP501 pilazmitine bağlı eritromisin ve kloramfenikol direnç faktörlerinin ifadesi (fenotipe yansıması) transkonjugantlarda gözlenmiştir. *Pediococcus pentosaceus* vericisinden (donöründen) çeşitli pediokok alıcılara pIP501 pilazmitinin türiçi transferi; transfer edilen hücre başına 10^{-4}-10^{-7} transkonjugant frekansında gerçekleşmiştir. *Pediococcus pentosaceus* vericisinden (donöründen) *Streptococcus faecalis, Streptococcus sanguis* (Challis) ve *Streptococcus lactis* alıcılarına pIP501 pilazmitinin türlerarası transferi de gözlenmiştir. Benzer denemelerde, geniş aralıktaki konak direncine sahip bir R-pilazmiti olan pAMβ1 pilazmitinin alıcı *Pediococcus* türlerine transferi gerçekleştirilememiştir (Gonzalez and Kunka 1983).

Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Listeria, Pediococcus, Bacillus, Staphylococcus, Enterococcus ve *Propionibacterium* türlerinde pilazmit DNA transformasyonu için kullanılan diğer yöntemlere alternatif olarak elektroporasyonla transformasyon denenmiştir. Bu alıcıların pilazmit içeren transformantlarında, pGK12 pilazmitinin transformasyon frekans aralığı 10^{1}-10^{5} transformant/μg^{-1} olarak belirlenmiştir. Bu yöntemin; DNA konsantrasyonunu, voltajı ve elektroporasyon tamponunu da içine alan birçok parametresi; *Lactobacillus acidophilus*'un transformasyon frekansını artıran koşulları belirlemek için kullanılmıştır. Koşullar optimize edildikten sonra pilazmitler *Lactobacillus acidophilus*'a şu sırayla aktarılmıştır: pAMB1, pC194, pGB354, pGKV1, pSA3, pTRK13, pTV1 ve pVA797. Pilazmit DNA'yı elektroporasyonla transfer etmek; - Gram-pozitif bakterileri kopyalamak için ve önemli genleri analiz edebilmek için- rekombinant DNA ve transpozon teknolojisinin uygulanmasıyla büyük ölçüde kolaylaşacaktır (Luchansky *et al.* 1988).

Streptococcus cremoris ve *Streptococcus lactis*'in bütün hücrelerinin pilazmit aracılığıyla genetik transformasyonu için bir elektroporasyon yöntemi uygulanmıştır. On farklı türde transformasyon gerçekleştirilmiştir. Yöntem; basit ve hızlıdır, 14-24 saat içinde

transformant koloniler oluşmuştur. Yöntem, *Streptococcus lactis* LM0230'a göre optimize edilmiştir ve saflaştırılmış pilazmitin (pMU1328) µg'ı başına $1x10^4$ - $5x10^5$ transformant arasındaki transformasyon frekansında rutine ulaşmıştır. Optimize edilmiş bu yöntem, hücrelerin lizozimle muamelesini gerektirmektedir. LM0230'un transformasyonu; pLS1 (4.4 kbp), pMU1328 (7.4 kbp) ve pAMβ1 (26.5 kbp) ile karşılaştırılabilir frekanslarda meydana gelmiştir. Transformantlardan izole edilen pilazmit DNA'da, saptanabilir oranda delesyon ya da yeni bir düzenlenme gözlenmemiştir. Restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesildikten sonra da pilazmit DNA ile transformasyon mümkündür. Ayrıca; *Streptococcus lactis* LM0230 ve *Streptococcus lactis* C6'nın faj DNA ile transfeksiyonu da yapılmıştır (Powell *et al.* 1988).

Laktokokların elektroporasyonla genetik transformasyonu için etkili bir yöntem bulunmaktadır. Elektrotransformasyon için yüksek verime sahip laktokoklar; yüksek konsantrasyonda glisin ve osmatik dengeleyici olarak 0.5 M sükroz içeren besiyerinde geliştirilerek elde edilmişlerdir. Bu hücreler; aktivasyonlarının kaybolmaması için -85^0C'de saklanmıştır. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* BC101'in pIL253 pilazmiti ile transformasyonundan $5.7x10^7$ transformant/µg ürün elde edilmiştir ki; bu hücrelerin hayatta kalma oranının % 5 olduğu saptanmıştır. Bütün laktokok türlerinin transforme edilebilirliği bu yöntemle test edilmiştir (Holo and Nes 1989).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* LM0230'un elektroporasyonla transformasyonunda büyüme koşullarının etkisi değerlendirilmiştir (önceden *Streptococcus* LM0230 üzerinde denenmiştir). Hücreler; % 0.5 glikoz içeren ve % 0.24 DL-treonin ya da % 0.5 glisin eklenmiş olan M17 sıvı besiyerinde (M17-Glu) ve aynı şekilde % 0.24 DL-treonin ya da % 0.5 glisin eklenmiş olan FMC ve RPMI 1640 olarak bilinen sentetik kimyasallar içeren besiyerlerinde geliştirilmiştir. Geliştirilen hücreler toplanmış, distile suda iki kez yıkanmış, dilue edilmiş ve DNA Transfector 100 (BTX, Inc., San Diego, Calif.) ya da Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond Calif.) ile 1 µg pGB301 pilazmiti transforme edilmiştir. FMC ve RPMI 1640 bulunan ortamda yetiştirilen hücrelerden elde edilen transformasyon verimi (µg DNA başına 10^3 -10^4 transformant), M17-Glu sıvı besiyerinde yetiştirilen

hücrelerin transformasyon veriminden daha yüksektir. Kimyasalların bulunduğu besiyerinde yetiştirilen *Lactococcus lactis* hücrelerinin elektroporasyonla transformasyonunu etkileyen diğer parametreler; hücrelerin üreme fazı, son konsantrasyonu, pilazmit DNA'nın konsantrasyonu, porasyon süresince verilen voltaj ve koşulların ekspresyonudur. -60°C'de dondurularak saklananan hücrelerin 30 gün sonraki elektroporasyon verimi üzerinde olumsuz bir etki gözlenmemiştir. Elektroporasyon; 0.2 cm'lik küvetlerde gerçekleştirilmiştir (McIntyre and Harlander 1989).

Pediococcus acidilactici M'in doğal ve mutant türlerinin pilazmit profilleri; sükroz hidrolizini kodlayan (Suc^+) pilazmitin 53.7 kb (pPR72) ve bakteriyosin üretimini (Pap^+) kodlayan pilazmitin 11.1 kb büyüklüğünde olduğunu göstermektedir. Bu pilazmitlerin her ikisi de; antibiyotik direncini, bakteriyosine karşı olan direnci ya da diğer karbonhidratların fermentasyonunu içeren özellikleri kodlamaz. *Enterococcus faecalis* tarafından üretilen; geniş konak aralığına sahip pAMβ1 ve pIP501 pilazmitleri ve *Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen pPR72 pilazmiti; filtre aracılığı ile *Pediococcus acidilactici*'nin iki türüne konjugasyonla transfer edilmiştir. Büyüklükleri 4.4-53.7 kb arasında değişen dört pilazmit; *Pediococcus acidilactici* türlerine elektroporasyonla da transfer edilebilmiştir. 4.4 kb büyüklüğünde olan pGK12 pilazmitinin optimum transformasyonu; 1 µg/220 µl DNA konsantrasyonunda elde edilmiştir. Pilazmit büyüklüğü arttığı zaman, aynı DNA miktarından daha düşük transformasyon frekansı elde edilmiştir. Bu çalışmalar göstermiştir ki; *Pediococcus acidilactici* türlerinin pilazmit-bağlı (plasmid-linked) özelliklerinin transferinde hem konjugasyon hem de elektroporasyon kullanılabilmektedir (Kim *et al.* 1992).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda; hücrelere elektrik akımıyla DNA transferinin; elektriksel alandaki DNA elektroforezi kadar hızlı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, membran elektroporasyonu ile DNA etkileşimine ve transformant hücrelerde DNA elektroforezinin temel teşkil edişine ilişkin elde edilen bulgular tanımlanmıştır. Florasan dekstran (FDs) ile kaplanan hücrelerde elektriksel akımın analizi; FDs $M < 20.000$ membran geçirgenliğinde keskin bir artışa sebep olan elektroporasyon süresince

besiyerindeki DNA'nın varlığını göstermiştir. DNA konsantrasyonuna bağlı olarak geçirgenlik artmıştır ve hücre süspansiyonuna eklenmiş olan FDs'in etkisi de akım uygulamasından birkaç dakika sonra görülmüştür. Daha uzun DNA parçalarında (fragment) geçirgenlikteki artış daha fazladır. Çift akım tekniği kullanıldığı zaman sağlanan etki; tek akım tekniği ile elde edilenden iki kat daha fazladır: membran elektroporasyonu ve DNA elektroforezi. İlk akım (6 kV/cm, 10 μs) por etkisi meydana getirirken transformasyon verimi düşüktür. Daha uzun süren, daha düşük şiddetteki (0.2 kV/cm, 10 ms) ikinci akım; tek başına por oluşumu ve transformasyon meydana getirememiştir fakat, büyüklüğün değiştirilmesiyle transformasyon verimi artırılmıştır. İki akımlık denemelerde, ikinci akımın süresinin uzamasıyla transformasyon verimi düzenli artış gösterir. İki akım arasındaki değişken gecikme süresi ile ikinci denemeden 10. elektroporasyon sonrasındaki yaşam süreleri ve elektriksel alandaki DNA geçirgenlikleri tahmin edilebilmektedir. Hücrelerin elektrotransformasyon mekanizması; membran porları boyunca DNA'nın elektroforetik hareketi ve elektriksel alandaki DNA etkileşimiyle büyüklüklerinin hesaplanmasına temel oluşturmaktadır (Sukharev *et al.* 1992).

Sükrozu fermente edebilme yeteneği ve nisin üretim karakteri *Lactococcus lactis* suşlarına; doğrudan petri kojugasyonuyla (Direct Plate Conjugation-DPC), katı yüzeyde konjugasyonla (Solid Surface Conjugation-SSC) ve membran filtre konjugasyonuyla (Membrane Fitler Conjugation-MFC) $2.6 \times 10^{-6} - 8.9 \times 10^{-10}$ transkonjugant/donör (verici) cfu (colony forming unit) frekans aralığında transfer edilmiştir. pGK12 pilazmiti; pilazmit içermeyen *Pediococcus acidilactici* F3 türüne elektroporasyon aracılığıyla 49 transformant/μg DNA transformasyon frekansında transfer edilmiştir (Altay *et al.* 1994). *Pediococcus* cinsinin farklı türlerinde; geniş konak aralığına sahip pSA3 ve pUCB304 pilazmitlerinin lactococcal repliconu (Rep 22) kullanılarak yapılan elektroporasyon başarılı sonuç vermiştir. *Tetragenococcus* türlerinin elektroporasyonla transformasyondaki başarısızlığı; alternatif bir pilazmit DNA mekanizması olan konjugasyon kullanılarak tolere edilmiştir. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SL2/797A'dan izole edilen geniş konak aralığına sahip pVA797 pilazmitinin *Tetragenococcus halophilus* ve *Pediococcus pentosaceus* türlerinde konjugasyonla türiçi eşleşmesi; *Tetragenococcus* türlerinin pilazmit

DNA transferinden etkilenmediğini göstermiştir. *Pediococcus pentosaceus* NCDO990'ın yabanıl ve mutant türlerinin pilazmit ve metabolik profilleri; laktoz kullanımını da içine alan birçok metabolik karakterin pilazmit-bağlı olduğunu göstermiştir (Benachour *et al.* 1996).

Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular; *Lactobacillus plantarum*'un doğrusallaştırılmış pilazmit DNA'sındaki elektrotransformasyon yeteneğinin; ona eşdeğer kapalı halkasal molekülünden 500 frekans kat daha düşük olduğunu göstermiştir. *Lactobacillus plantarum*'un transformasyonunda; transformasyonla ilişkili olan doğrusallaştırılmış pilazmitin transformasyondaki verimi <10 kattan daha düşük olduğu zaman linear DNA'dan biraz daha etkili olan açık halkasal pilazmit kullanılması önerilmiştir (Thompson *et al.* 1997).

Ökaryot ve prokaryot hücrelere yabancı bir DNA'yı aktarmak için birçok yöntem bulunmaktadır. Genel olarak kullanılan en geçerli yöntem, diğerlerine göre daha kullanışlı olan elektroporasyondur. Bu çalışmada; gelecek vaadeden elektroporasyon yönteminin verimli oluşuna ve elde edilen verimin yüksek olduğuna dikkat çekilmiştir. Hücre tiplerinin elektroporasyonunu etkileyen koşullar ve çeşitli parametreler değerlendirilerek özetlenmiştir (Prasanna and Panda 1997).

Lactobacillus delbrueckii için uygulanan elektroporasyon yönteminin detayları tanımlanmıştır. Üç ayrı *Lactobacillus delbrueckii* türü başarılı bir biçimde transforme edilmiştir. Optimum koşullar altında transformasyon verimi; μg DNA başına 10^4 transformant olarak saptanmıştır. Bu yöntem kullanılırken, *Lactobacillus delbrueckii* türünde replike olabilen birçok pilazmit tanımlanmıştır ve bu pilazmitler *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kromozomuna entegre olabilmişlerdir. Bu çalışma, *Lactobacillus delbrueckii* türleri ile yapılan moleküler genetik çalışmalarının geliştirilmesini sağlamıştır (Serror *et al.* 2002).

Escherichia coli'den izole edilen pilazmit DNA'nın *Lactobacillus plantarum* CECT 220 (ATCC 8014)'ye elektroporasyonla tranferi için geliştirilmiş bir yöntem tanımlanmıştır. Minimal besiyerinde geliştirilmiş olan *Escherichia coli* JM110'dan izole edilen pilazmit DNA ve konak *Lactobacillus plantarum*'un hücre içermeyen ekstraktrarının in-vitro koşullardaki optimum elektrotransformasyonu; elektrot içi mesafesi (uzaklığı) 1 mm olan küvette, 13 kV cm^{-1} elektrik akımında, $6x10^9$ cfu ml^{-1} konsantrasyonunda, *Lactobacillus plantarum*'un üssel üreyen hücrelerinden elde edilmiştir. Alegre, Rodriguez ve Mesas bu çalışmada; *Lactobacillus plantarum*'un rutin manipulasyonu için kullanışlı bir alet meydana getirmeyi ve bunu diğer laktik asit bakterilerinde de uygulayabilecek kadar geliştirebilmeyi amaçlamışlardır (Alegre *et al.* 2004).

Yabancı bir pilazmit DNA'nın *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121'e elektroporasyonla transferi için gerekli koşullar belirlenmiştir. Transformasyon verimini artırmak için elektroporasyon koşulları optimize edilmiştir. Transformasyonda; birden fazla kopyalama bölgesini ve kloramfenikol direncini taşıyan pNZ123 pilazmiti kullanılmıştır. Maksimum transformasyon verimi için optimum elektroporasyon koşulları; 12.5 kV cm^{-1} akım gücü (gerilim), 10 akım miktarı, 500 ms akım aralığı ve 25 ng μl^{-1} pNZ123 pilazmit DNA konsantrasyonunda sağlanmıştır. Optimum koşullar altında *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121'in transformasyon verimi; μg pilazmit DNA başına $1.84 \pm 0.13 \times 10^4$ (± standart ölçüm sapması) cfu'dur. *Lactobacillus acidophilus*'un diğer türleri ile yapılan çalışmalar; bu koşullarda transformasyon verim aralığının $1.38 \pm 0.02 \times 10^4$ - $9.32 \pm 0.54 \times 10^4$ arasında olduğunu göstermiştir. pKU= *slp*A-GFP iken; florasan mikroskobu ile GFP (green fluorescent protein) başarılı bir şekilde saptanmıştır. GFP genini içeren pNZ123 pilazmiti, optimum koşullar altında *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 türüne transforme edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; *Lactobacillus* türlerinin transformasyon verimini tespit ederken; elektriksel parametreler, antibiyotik konsantrasyonu ve konak spesifitesi önemli rol oynamaktadır. Yabancı bir pilazmit DNA'nın *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121'e elektroporasyonla transferi için oluşturulan optimum koşullar, diğer laktobasillerin transformasyon verimini artırmak için de kullanılabilmektedir. Özetle;

elektrotransformasyon için sağlanan optimize koşullar; *Lactobacillus acidophilus*'a yabancı pilazmit DNA'nın girişini kolaylaştırmaktadır (Kim *et al.* 2005).

Lactococcus türlerinin geliştirilmesi ve yararlı özelliklerinin (karakterlerinin) stablize edilmesi gıda endüstrisinin amaçlarından birisidir. Bu laktik asit bakterilerinin manipulasyonu için genetik mühendisliği devreye girmektedir. Bununla birlikte; yabancı bir pilazmit DNA'nın hücrelere girişini sağlamak için elektroporasyon en yaygın kullanlan yöntemdir. Elektroporasyonun verimi; elektrikle sağlanan geçirgenliğin seviyesine (electropermeabilization) ve geçirgenliği etkileyerek değiştiren kimyasallar ile yapılan ön işleme bağlıdır. Bu da; transformasyonun bakterilerde uygulanmasının maya ve mantarlara tercihen daha da yaygınlaşması ve geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır. Bu çalışmada; erken log fazındaki *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* hücrelerinin pTRKH3 pilazmiti (7.8 kb) ile elektroporasyonu öncesinde hücreler; çeşitli kombinasyonlarda lityum asetat (LiAc) ve dithiothreitol (DTT) ile muamele edilmiştir. *Lactococcus lactis* subsp *lactis*'in iki türü kullanılmıştır: *Lc. lactis* subsp. *lactis* LM0230 ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454.

Lc. lactis subsp. *lactis* LM0230 için literatürde, elektroporasyon verimi µg DNA başına 10^5 transformant olarak rapor edilmiştir. Sadece LiAc ile muamele edilen ya da hiç muamele görmeyen hücrelerin transformasyon verimi µg DNA başına yaklaşık 1.2 +/- 0.5 x 10^5 transformant iken elektroporasyon öncesinde LiAc ve DTT ile muamele edilen hücrelerin transformasyon veriminin µg DNA başına 225 +/- 52.5 x 10^7 transformanta yükseldiği bildirilmiştir. *Lc. lactis* ATCC 11454'teki transformasyon verimi önemli ölçüde düşüktür buna rağmen; LiAc ve DTT muamelesi ile bu türden de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Elektroporasyon sonrasında, ön işlem gören hücrelerin yaşama oranlarında faklılık bulunmamıştır. Farklı hücre yoğunluklarında en yüksek transformasyon verimi 10^{10} hücre/ml olarak bulunmuştur. Elektrotransformasyon ardından, LiAc ve DTT ile muamele edilen hücrelerde, pTRKH3 pilazmitinin stabilitesi incelenmiştir. Bu yöntemin yüksek verim ile tekrarlanabilirliği kanıtlanmıştır. Bu araştırma; *Lc. lactis* subsp. *lactis* için güvenilir bir yöntemle yüksek transformasyon verimi sağlamak ve hali hazırdaki transformasyon verimini artırmak için yapılmıştır. Uygulanan bu yöntemle iyi bilinen iki

tür test edilmiştir. Ayrıca büyük rekombinant kütüphanelerinin oluşumu ve yüksek miktarlarda transformasyon verimi sağlanmıştır (Papagianni *et al.* 2007).

Pediococcus türlerine yabancı bir pilazmit DNA'nın elektrotransformasyonunda, özellikle yabanıl türler kullanıldığı zaman düşük miktarda transformant/µg DNA elde edilen yöntemler rapor edilmiştir. Bu çalışmada; *Pediococcus* türlerinin *Pediococcus acidilactici* P60 türünden izole edilen pRS4C1 pilazmiti ile elektrotransformasyonu için bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde; önceden rapor edilen yöntemlere oranla 2'den 3'e katlanan (log birim) transformant ürün elde edilmiştir. Optimum koşullar altında transfer edilen yabancı pilazmit DNA miktarı $9.1 \pm 1.3 \times 10^4$ transformant/µg olarak saptanmıştır. Önerilen en önemli değişiklik; elektroporasyon süresince elektriksel alan geriliminin 12.5 kV/cm'den 20 kV/cm'ye yükseltilerek elektrokompetent hücreler hazırlanırken eklenen lizozim konsantrasyonunun 4000 U/ml'den 2000 U/ml'ye düşürülmesidir. Bu iki değişiklik transformasyon veriminde büyük oranda artış sağlamıştır. Ayrıca bu değişikliklere ek olarak; hücre kültürünün 600 nm'de OD= 0.6'dan OD= 1.0-1.2 oluncaya kadarki süre artışı ve besiyerindeki di-treonin konsantrasyonunun 20 mM'dan 40 mM'a yükseltilmesi de transformasyon veriminin artırılmasına katkı sağlamıştır (Rodriguez *et al.* 2007).

Gen elektrotransferi; viral yöntemler kullanılmadan, yaşayan hücrelere yüksek voltajda elektrik akımıyla yapılan gen transferidir. Bir hücrenin elektrik akımı süresince yeterli miktarda akım şiddetine maruz kalması, membran geçirgenliğinde geçici bir artış ile sonuçlanmaktadır. Elektroporasyon ya da elektropermeabilizasyon (elektrik akımı ile geçirgenlik) adı verilen bu yöntem; pilazmit DNA'yı geçirgen olmayan membranlardan geçirerek pilazmit DNA'nın hücre içine girişini sağlamaktadır. Bu araştırmada; elektriksel alandaki doğrultunun (yön) elektrik akımına bağlı olarak değişmesi baz alınarak gen elektrotransfer sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için; EP-GMS 7.1 elektroporatörü kullanılmış ve yeni elektrotlar geliştirilmiştir. Bu yeni elektrotlar arasındaki elektriksel alan homojenitesini hesaplamak ve değerlendirmek için sınırlı element kullanılmıştır. Elektriksel alanının dağılımını göstermek için hücre kültürlerinde hızlı ve kullanışlı bir deney yapılmıştır. Bu şekilde; yeni yöntemin hücreler üzerindeki etkisi

deneysel olarak değerlendirilmiştir. *In vitro* ortamda gen elektrotransferi; elektrik akımı ile elektriksel alan doğrultusu arasındaki değişikliğin transforme edilen hücre frekansını arttırdığını göstermiştir. Transforme edilen ve hayatta kalan hücrelerin florasan şiddeti (yoğunluğu), elektriksel alana bağlı değildir. Diğer taraftan; araştırma süresince yeni bir gölgelenme gözlenmiştir. Şöyle ki; gen elektrotransferi süresince gözlenen gölge içerisindeki hücreler biraraya gelmeye başladığı zaman, sadece biraraya gelen hücrelerin negatif elektrik yüklü yüzeylerinde transformasyon meydana gelirken bu yüzeyin diğer tarafındaki hücrelerde transformasyon gerçekleşmemiştir. Elde edilen sonuçlar esas alındığında; hücreler üzerindeki hayatta kalma etkisi göz ardı edilerek, elektrik akımı ve elektriksel alan doğrultusu arasında oluşan değişiklik ile hücre transformasyonunu geliştirmek için *in vitro* ortamda gen elektrotransferindeki yeni yöntemin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Reberšek *et al.* 2007).

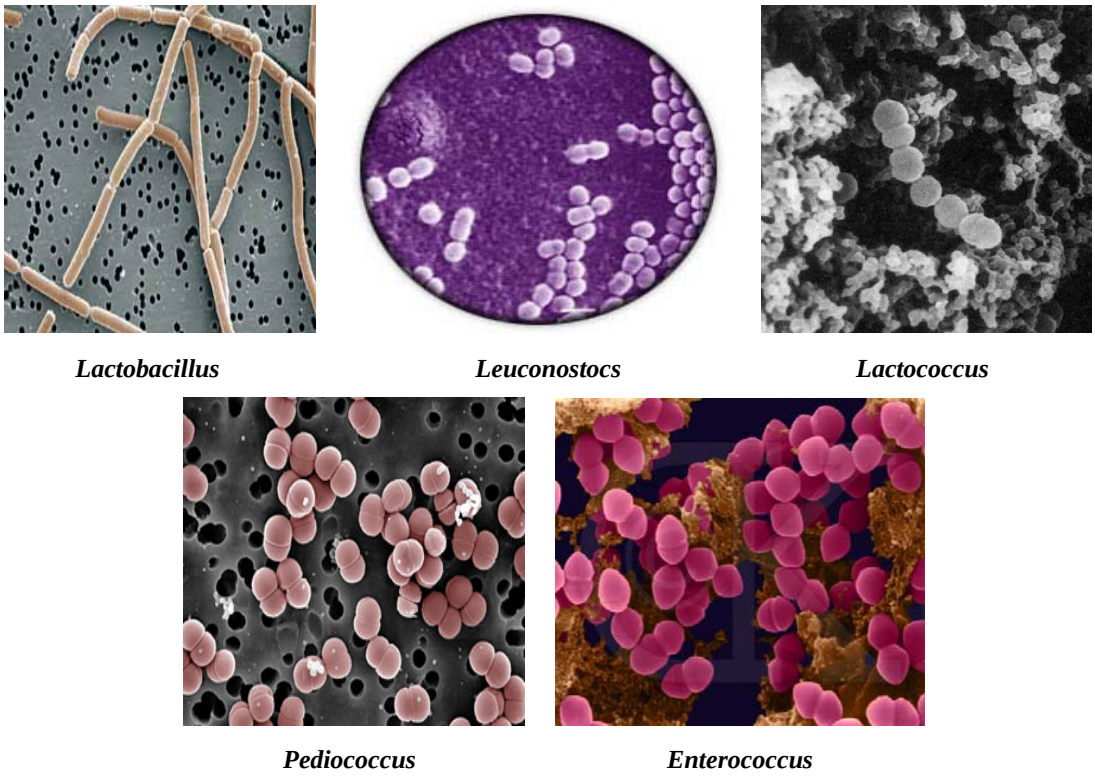
2.1 Laktik Asit Bakterileri

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, gıda endüstrisinde ekonomik öneme sahip olarak bilinen laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar da başlamıştır. İlk kez 19. yüzyıl sonlarında süt ve süt ürünlerinde fermantasyona yol açan bakteriler; laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda ***Lactobacillaceae*** familyası içinde sınıflandırılmışlardır.

Axelsson'un 1993'de yapmış olduğu sınıflandırmaya göre; laktik asit bakterileri grubuna dahil birçok cins olduğu saptanmıştır. Bunların arasında gıda ile ilişkisi olan bakteri cinsleri ise; *Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenecoccus, Vagococcus ve Wiessella* olarak bildirilmiştir (Stiles and Holzapfel 1997).

Laktik asit bakterileri grubunda; karbonhidrat metabolizması sonucunda şekeri parçalayıp son ürün olarak laktik asit oluşturan başlıca genuslar arasında *Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcus, Pediococcus ve Enterococcus* yer almaktadır (Şekil 2.1) (Klein *et al*. 1998,

Christensen *et al.* 1999). Yapılan genetik çalışmalara göre; yeni cins isimlerine rastlanmakta olduğu ve bu cinslerle ilgili taksonomik çalışmaların devam etmekte olduğu bildirilmektedir (Axelsson 1993, Low and Hansen 1997).



Şekil 2.1 Bazı laktik asit bakteri genuslarına ait mikroskopik görüntüler

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmalarında geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırmanın temeli; fizyolojik, morfolojik ve farklı sıcaklıklarda, pH değerlerinde, tuz konsantrasyonlarında gelişim, arjinin degredasyonu ve karbonhidrat katabolizması gibi metabolik/biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren fenotipik özelliklere dayanmaktadır (Kandler and Weiss 1986, Gobbetti *et al.* 2005).

2.1.1 Laktik Asit Bakterilerinin özellikleri

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması; Orla-Jensen (1919) ile başlamıştır. Laktik asit bakterileri, morfolojik açıdan değişken özellik göstermektedirler. Kok veya kısa-uzun çubuktan oluşan farklı uzunlukta zincir şeklinde bulunurlar. Morfolojik açıdan değişken özellik gösteren familya üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzer özellikler göstermektedirler. Tüm üyeler; Gram- pozitif ve katalaz-negatif reaksiyon verirler (düşük oranda şeker ihtiva eden ortamda pseudokatalaza sahip suşlar görülebilir). Fakültatif anaerobiktirler. *Sporolactobacillus imilinus* türü hariç hiçbiri spor oluşturmaz. Bazı istisnalar hariç hareketsizdirler. *Pediococcus* cinsi hariç hepsi tek düzlemde bölünürler (Sharpe *et al.* 1966). Laktik asit bakterileri, Gram- pozitif bakteriler içerisinde en düşük düzeyde guanin-sitozin (G+C) oranına sahiptir (Ludwing *et al.* 1993). Bu grup içerisinde yer alan bakterilerin genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp arasında değişmektedir (Davidson *et al.* 1996).

Laktik asit bakterileri; mutlak fermentatiftirler ve asıl fermantasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Hem grubu (katalaz, sitokrom) içermeksizin oksijen varlığında gelişebilen nadir mikroorganizmalardır (Schlegen 1986). Laktik asit bakterileri; su ve toprakta hemen hemen hiç bulunmazlar. Doğal ortamları süt ve süt ürünleri, fermente gıdalar, taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların bağırsak mukoza içerikleridir.

Çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunan ve başlangıç kültür olarak kullanılan birçok laktik asit bakterisinin, gıdayı bozucu mikroorganizmalar veya gıda kaynaklı patojenleri ihtiva eden bir grup mikoorganizmaya karşı antagonistik aktivite gösterdiği de bilinmektedir (Andersson 1989, Schillinger and Lucke 1989, Davidson and Hoover 1993). Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu antagonistik aktivite farklı mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Bunlar:

1. Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu; laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler üretilmekte ve ortamın pH'sı düşmektedir. Gıdalarda bulunan birçok mikroorganizma, bu üretilen organik asitlere karşı hassastır ve sonuçta laktik asit bakterilerinin düşürdüğü pH'yı da tolere edememektedirler (Okereke and Montville 1991).

2. Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme esnasında üretilen hidrojen peroksit (H_2O_2), birçok mikroorganizma üzerinde inhibitör etki gösterebilmektedir (Okereke and Montville 1991).

3. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve "bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitler" olarak isimlendirilen antimikrobiyal karakterli proteinler, özellikle üretici bakteriye yakın ilişkili bakteriler üzerinde bakteriyosidal aktivite göstermektedirler (Klaenhammer 1988).

4. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen, diasetil, alkol ve CO_2 gibi metabolitler de, bazı mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki gösterebilmektedir (Daeschel 1989, Vandenbergh 1993).

Tüm bu bileşenlerin ayrı ayrı inhibitör etkide bulunabilmesine rağmen laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etkisi, bunların yalnızca birisine bağlı olmayıp, aksine bunların kombinasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (Gilliland 1986, Davidson and Hoover 1993).

Laktik asit bakterileri, fermentasyon esnasında glukozun parçalanması sonucu oluşan ürünlerin miktarına ve cinsine göre iki ana gruba ayrılmaktadır: **Homofermentatif** ve **heterofermentatif** laktik asit bakterileri (Drinan *et al.* 1976).

Homofermentatif laktik asit bakterileri; fermentasyon sonucunda sadece laktik asit [($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2(CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH)$] oluştururken heterofermentatif laktik asit bakterileri; laktik asitin yanında yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz da oluştururlar (Drinan *et al.* 1976). Fermentasyon sonucunda oluşan bu farklılık, glukozun katabolizma sırasında kullandığı yolun değişik olmasından kaynaklanmaktadır:

a) **Homofermentatif laktik asit bakterileri**; glukozu Fruktoz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak saf veya hemen hemen saf (% 95-100 oranında) laktik asit üretmektedirler (Drinan *et al.* 1976). Fermentasyon işleminin son safhasında, pirüvik asitin laktik asite indirgenmesi için gliseraldehit 3-fosfat'ın dehidrogenasyonundan elde edilen NADH+H kullanılmaktadır. Ortamdaki oksijenin varlığına da bağlı olarak diğer bir reaksiyon serisinde pirüvatın yalnızca küçük bir kısmı dekarboksile edilmekte ve asetat, etil alkol, karbondioksit ve belki asetoine dönüştürülebilmektedir (Moat 1985, Schlegen 1986,). Homofermentatif laktik asit bakterilerine *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsleri örnek verilebilir.

b) **Heterofermentatif laktik asit bakterileri;** Fruktoz Di Fosfat (FDP) yolunun önemli enzimlerinden olan "aldolaz ve trioz-fosfat izomeraz" enzimlerine sahip değillerdir. Bu yüzden heterofermentatif türler, FDP yolunu kullanamamaktadırlar. Glukozun yıkımı; Hegoz Mono Fosfat yolu ile olmakta ve sonuçta laktik asit ile birlikte yaklaşık eşdeğer miktarda etil alkol ve karbondioksit üretilmektedir (Drinan *et al.* 1976). Bir kısım heterofermentatif laktik asit bakterileri ise Asetil-P'yi ya kısmen ya da tamamen asetik asite dönüştürebilmektedir. Heterofermentatif laktik asit bakterilerine *Leuconostoc* cinsleri örnek verilebilir.

2.1.2 Laktik Asit Bakterilerinin önemi

Uzun yıllardan beri laktik asit bakterilerinden çeşitli fermente gıdaların üretilmesinde yararlanılmaktadır. Çiğ materyalin laktik asit bakterileri ile fermente edilerek yeni gıdaların üretilmesi ve çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda muhafaza

metodlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Süt, bu bakteriler ile yoğurt, ekşi süt, peynir, tereyağı gibi ürünlere işlenmektedir. Tüm dünyada yaygın olarak tüketilen fermente et ürünleri ve farklı sebzelerden üretilen turşular laktik asit fermantasyonu ile hazırlanmakta ve muhafaza edilmektedir (Andersson 1989, Mayra-Makinen and Biret 1993). Bununla beraber laktik asit fermentasyonuna tabi tutulan bazı gıdaların üretilen organik asitlerden dolayı raf ömrünün uzadığı bilinmektedir. Ancak laktik asit bakterilerinin organik asitler dışında diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren hidrojen peroksit, serbest yağ asitleri, amonyak, diasetil ve bakteriyosin gibi inhibitor maddeleri ürettiği saptanmıştır (Daeschel 1989, Vandenbergh 1993).

Laktik asit bakterileri; üretimine katıldıkları gıdalarda aroma ve tekstürün oluşumundan sorumlu oldukları gibi kontamine oldukları bazı gıdalarda bozulmalara da neden olabilmektedirler. Diğer taraftan gıdalarda bazı patojenlerin gelişimini inhibe edebilme özelliklerinden dolayı da insan sağlığı açısından önemli bir yere sahiptirler (Gasson and de Vos 1994, Schleifer *et al.* 1995). *Laktik asit bakterilerinin; fermente besinlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaları, probiyotik olarak kullanılmaları ve bakteriyosin üretimi de bu bakterilerin endüstriyel açıdan önemini sergilemektedir*.

2.1.2.1 Starter kültür

Günümüzde fermente içecek ve gıdaların pek çoğu et, süt, sebze ve meyve gibi oldukça farklı çiğ tarımsal ürünlerden elde edilmektedir. Bu ürünlerin oluşumunda laktik asit bakterileri starter kültür olarak kullanılmaktadır ve bu da gıda üretim endüstrisi açısından önemli bir aşamayı oluşturmaktadır (Lhys 2002). Süt ürünlerinde yaklaşık 100 yıldan bu yana endüstriyel boyutta üretilmiş starter kültürler kullanılmaktadır. Her ne kadar yoğurt ve peynirle ilgili arkeolojik bulgular günümüzden 6000 yıl öncesine gitmekte ise de bilinçli starter kullanımı 19. yüzyılın sonlarında başlamıştır. Bugün başta laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, faj dirençliliği ve aroma oluşturma gücü gibi özelliklere göre seçilmiş starter kültürler süt ürünleri endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin karakteristik özelliklerinden biri de; süt şekeri olan laktozun fermentasyonu sonucunda laktik asit üretmeleridir ki; bu reaksiyonu başlatan ve kültür ürününe önceden verilmiş olan bakteri "**starter kültür**" adını alır. Starter kültürler, peynir, krema, tereyağı, yoğurt benzeri birçok ürünün hem organoleptik dediğimiz tat, koku, güzel görünüm gibi özelliklerin oluşumunu hem de fermantasyonu sağlarlar. Fermentatif özelliklerinin iyi bilinmesi ve pek çok alanı ilgilendiren özellikleri ile laktik asit bakterileri, fermente ürün eldesinde starter kültür olarak kullanılarak gıda üretim aşamalarında önemli bir görev üstlenmişlerdir (Wouters *et al.* 2002).

Starter kültürleri iki başlık altında incelemek mümkündür: Mezofilik starter kültürler ve termofilik starter kültürler.

a) *Mezofilik Starter Kültürler:* Bu bakteriler 26^{o}C civarında gelişebirler. Mezofilik starter kültürlerden *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* laktik asit üretirken *Lactococcus lactis* subsp. *lactis biovar diacetylactis* ve *Leuconostoc* spp. sitrik asit fermentasyonu yapmaktadır. Sonuçta, asetoin/diasetil ve CO_2 oluşmaktadır ki; diasetil süt ürünlerinde tat oluşumu için önem taşımaktadır (Cogan 1996).

b) *Termofilik Starter Kültürler:* Bu bakteriler 42^{o}C civarında gelişebilirler. *Streptococcus termophilus* ve *Lactobacillus helveticus* gibi termofilik starter kültürler, yüksek pişirme sıcaklıklarına maruz kalan peynir benzeri ürünlerin oluşumunda kullanılmaktadırlar (Cogan 1996).

2.1.2.2 Probiyotik

Probiyotikler insan sağlığı için yaralı olan mikroorganizmaları içeren diyet maddeleridir. Bunlar sindirim sisteminin sağlığını, dengesini koruyan ve verimliliğini artıran birtakım yararlı bakteri ve mayaları içeren yiyecekler olarak da adlandırılabilirler.

Probiyotiklerin tam olarak anlaşılması, Bulgar köylülerin uzun yaşamalarının fermente süt ürünleri tüketimlerinden kaynaklandığını savunan Nobel ödüllü Rus fizyolojist Metchnikoff (1845-1916)'un sayesinde gerçekleşmiştir. Metchnikoff'a göre bunun nedeni; bu ürünlerde bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus* spp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve toksik mikrobiyal aktiviteyi azaltmasıdır.

"Probiyotik" terimi ilk olarak; 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından patojen olmayan bakterilerin yararlı ("Probiotika") etkileri ile antibiyotik ve flora üzerindeki diğer antimikrobiyal maddelerin ilişkisinin anlatıldığı "Anti- und Probiotika" isimli makalede kullanılmıştır (Corthier 2004). Probiyotiklerin en çok kabul gören tanımları; Roy Fuller tarafından 1989 yılında "tüketici sağlığına bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır" şeklinde yapılmıştır (Fuller 1989). Bu tanım 1998 yılında Salminen ve arkadaşları tarafından "insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar" olarak değiştirilmiştir (Salminen *et al.* 1998).

Probiyotik terimi genellikle; fermente süt ürünleri ya da diyet katkısı olarak alınabilen, intestinal sistemde biyolojik aktiviteleri ve canlılıklarını sürdürerek yaşama kabiliyetleriyle tanımlanan *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. ve *Enterococcus* spp. gibi seçilmiş laktik asit bakterilerini ifade etmek için kullanılmaktadır (Rafter 2002).

Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığına katkıda bulunduğu en popüler etkiler; laktoz intoleransı ve kabızlık semptomlarının hafifletilmesi, çeşitli tip diyarelerin önlenmesi ve tedavisi, immün sistemin uyarılması, antitümör ve antikanserojen etkiler olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle intestinal sistem rahatsızlıklarında probiyotiklerin yararlı etkileri oldukça iyi bir şekilde tanımlanmıştır (Salminen *et al.* 1998). Probiyotiklerin karaciğer, *Helicobacter pylori*, ağız-diş sağlığı ve ürogenital rahatsızlıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanımı ile ilgili çalışmalar oldukça yenidir ve hala çalışılmakta ve de tartışılmaktadır.

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların sahip olması gereken özellikler kısaca; pankreatik enzimler, asit ve safra tuzlarına direnç, intestinal mukozaya tutunabilme, insan orijinli olma, dokümante edilmiş sağlık yararları, güvenlik ve iyi teknolojik özellikler gösterme olarak özetlenebilir (Salminen *et al.* 1998). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir (Alvarez-Olmos and Oberhelman 2001).

Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin sağlığa faydalı etkileri suşlara özgüdür. Bu etkilerin ortaya çıkışı Çizelge 2.2' de gösterildiği gibi farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Mercenier *et al.* 2003).

Çizelge 2.1 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

***Lactobacillus* Türleri**	***Bifidobacterium* Türleri**	**Diğerleri**
Lb. acidophilus	*B. bifidum*	*Bacillus cereus*
Lb. casei	*B. longum*	*Eschericia coli*
Lb. rhamnosus	*B. breve*	*Saccharomyces cerevisiae*
Lb. reuteri	*B. infantis*	*Saccharomyces boulardii*
Lb. bulgaricus	*B. lactis*	*Enterococcus faecalis*
Lb. plantarum	*B. adolescentis*	*Streptococcus thermophilus*
Lb. johsonii		
Lb. lactis		
Lb. gasseri		

Çizelge 2.2 Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin sağlığa faydalı etkileri ve mekanizmaları

Sağlığa faydalı oldukları alanlar	**Öne sürülen mekanizma(lar)**
Laktoz intoleransının hafifletilmesi	▪ Bakteriyal galaktosidaz'ın laktoz üzerine etki etmesi
Barsak florası üzerine olumlu etki	▪ Toksik metabolit üretiminin azaltılması yoluyla, aşırı gelişmiş olan floranın aktivitesinin etkilenmesi ▪ Antibakteriyal özellikler
İntestinal sistem infeksiyonlarının engellenmesi	▪ Sistemik veya salgısal immun cevap stimüasyonu ▪ Barsak koşullarının patojenlerin yaşamasına imkan vermeyecek şekilde değiştirilmesi (pH, kısa zincirli yağ asitleri, bakteriyosinler) ▪ Agregasyon, koagregasyon yetenekleri ▪ İntestinal mukozaya yapışmak suretiyle patojenlerin yapışmasının engellenmesi ▪ Besinler için rekabet
İmmün sistemin güçlendirilmesi	▪ Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitelerinin artırılması ▪ IgA üretiminin artırılması ▪ İntra-epitel lenfositlerin çoğaltılması
İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması	▪ Bağışıklık sisteminin dengesinin yeniden düzenlenmesi ▪ Sitokin sentezinin düzenlenmesi
Kolon kanseri riskinin azaltılması	▪ Mutajen bağlama ▪ Karsinojenlerin inaktif hale getirilmesi
Ürogenital infeksiyonlar	▪ Üriner ve vajinal kanal hürelerine yapışma ▪ İnhibitör maddelerin üretimi (H_2O_2 gibi)
Helicobacter pylori infeksiyonu	▪ Laktik asit üretimi ▪ *Helicobacter pylori'*nin üreaz aktivitesinin azaltılması
Kan lipidlerinin düşürülmesi ve kalp hastalığı riskinin azaltılması	▪ Kolesterol asimilasyonu ▪ Safra tuzu hidrolaz enzim aktivitesi

2.1.2.3 Bakteriyosin üretimi

Gıda kaynaklı pek çok laktik asit bakterisi (*Enterococcus, Lactococccus, Leuconostoc, Pediococococus, Streptococcus, Lactobacillus, Carnobacterium* ve *Propionibacterium*) gıda fermentasyonunda kullanılan antimikrobiyal özellikleri ile bilinmektedir. Bunlar, fermente gıdalarda güvenilirliği sağlayarak raf ömrünü uzatmaktadırlar. Bu bakterilere ait metabolitlerin binlerce yıldan beri farklı fermente gıdalarda sağlık için hiçbir tehlikesi olmadığı, Laktik Asit Bakterilerine (LAB) ait antimikrobiyal metabolitlerin düzenleyici ajanlar olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, fermente gıdaların ve bazı LAB'ların tüketici sağlığı açısından doğal, sağlıklı ve yararlı etkileri oldukları bilinmektedir. LAB'a ait bazı metabolitler ve diğer starter kültür bakterileri gıdalarda gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Örneğin, laktik asit, diasetil, propiyonik asit ve asetik asit. Bununla beraber, gıda kökenli pek çok LAB gıda bozulmalarına ve gıda kökenli enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal etki gösteren ve "bakteriyosin" olarak isimlendirilen protein yapısında ekstraselüler maddeler sentezlemektedir (Klaenhammer 1988, de Vuyst and Vandamme 1994, Hoover and Steenson 1993). *Bakteriyosinler, üretici suşun bazı özel bağışıklık mekanizma(lar) ile ilişkili olarak hücre dışına salınan birincil veya gelişmiş bakteriyel ribozomal sentez ürünleri olarak tanımlanmaktadır*. Bu bakteriyosinlerin çoğu küçük moleküler ağırlıklı proteinler olup bakterisidal etkilerini kendilerine yakın gruplara dahil bakteriler üzerinde göstermektedir. LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinler gıda bozulmalarına ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok gram pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki göstermekte ve "biyokoruyucu" olarak isimlendirilmektedir (Klaenhammer 1988, Ray 1992a,b).

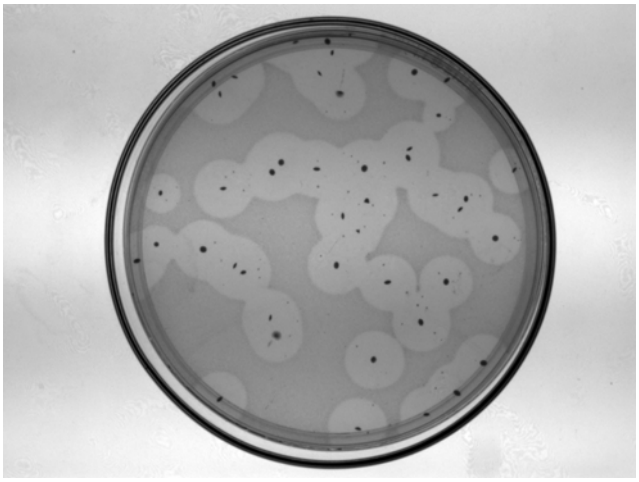
Günümüzde gıdaların raf ömrünü uzatabilmek için gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. FDA tarafından onaylı olmalarına rağmen yapılan son çalışmalarda tüketici sağlığında çeşitli problemlere neden oldukları belirlenmiştir. Çoğu kimyasal madde kökenli olan koruyucular insanlarda astım, damar problemleri gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle WHO tarafından belirlenen gıdalara yönelmişlerdir. Kimyasal gıda katkı

maddelerine alternatif olarak doğal koruyucular tercih edilmeye başlanmıştır. Bunların memeliler üzerinde herhangi bir yan etkisinin bulunmadığı kanıtlanmıştır. Bunun nedeni ise; protein yapısında olan bu madde, sindirim sisteminde bulunan ve proteinleri hidrolize eden enzimler tarafından parçalanmaktadır. Dolayısı ile uygun olan bakteriyosin ya da bakteriyosin üreten LAB'nin gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir. En iyi bilinen bakteriyosin Nisin olup; *Lactococcus lactis* tarafından üretilmektedir ve gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Pediocin de yine gıdalarda kullanılan biyolojik bir koruyucudur (Teuber 1995).

Laktik Asit Bakterilerine ait bakteriyosinler normalde sadece gram pozitif bakterileri inhibe ederler ve onların yaşam aralığı birbirinden oldukça farklıdır. Nisin ve pediocin AcH geniş inhibisyon spektrumunda etkin iken; sakacin ve leuconocin gibi diğerleri ise diğerlerine nazaran daha dar inhibisyon spekturumunda etkilidir. Gıdalarda bozulmaya ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan pek çok Gram-pozitif bakteriye karşı etki gösterirler (Ray 1992a,b). Bu bakterilerin bazıları doğada anaerobik, fakültatif anaerobik ve psikrotrofiktir.

2.2 Bakteriyosinler

Bakteriyosinler; çeşitli laktik asit bakterileri tarafından hücre dışına sentezlenen (Klaenhammer 1988), yakın akraba türler üzerine etkili, protein yapısında, hassas hücrelerdeki reseptörlere bağlanan ve üretimi büyük oranda pilazmit DNA tarafından kodlanan antimikrobiyal metabolitlerdir (Şekil 2.2) (Çizelge 2.3) (Haris *et al.* 1989, Okereke and Motville 1991).



Şekil 2.2 Katı besiyeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu

Farklı Gram-pozitif bakterilere ait bakterisidal proteinler, yapılarında mevcut olan modifiye amino asitlere göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; farklı aminoasitlerle tasarlanan "lantibiotikler" ve "nonlantibiotikler" (nonlanthionine bakteriyosinler) (Şekil 2.3). Lantibiotiklere örnek olarak nisin verilebilir. Yapısında translasyon sonrasındaki modifikasyon ile meydana gelmiş olan lanthionine (Ala- S-Ala), β-methyllanthionine (Abu-S-Ala) (Sülfür grubu içeren aminoasit) ile dehidroalanin (Dha) ve dehydrobutryic acid (Dhb) gibi dehidra formdaki sıra dışı amino asitler yer almaktadır. Nonlanthionine bakteriyosinler ise küçük, ısıya dayanıklı bakteriyosinler olup yapısında bu sıra dışı amino asitleri bulundurmaz. Bu gruba örnek olarak pediocin AcH/PA-1 lactococcin A, lactococcin B ve sakacin A verilebilir. Bununla beraber, molekülün yapısında lanthioninlerin varlığı veya yokluğu ile bakteriyosinlerin antimikrobiyal spektrumları arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır (Jack *et al.* 1995, Sahl *et al.* 1995).

Protein saflaştırılması ve gen teknolojisi ile nisin oluşumunun bazı moleküler detayları açığa kavuşmuştur (de Vuyst and Vandamme 1994). Bakteriyosinin yapısal genlerinin yönlendirilmiş mutasyon (site-directed) için uygun olması sebebiyle antimikrobiyal aktivite veya geliştirilerek dayanıklılık kazandırılmış yeni peptit familyalarının yapımı mümkün görünmektedir (Miller *et al.* 1998).

Çizelge 2.3 Laktik Asit Bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel özellikleri

- 34'den 57'ye kadar aminoasitten oluşan katyonik peptit içerirler.
- Gram pozitif bakterilere karşı duyarlı, bakterisidal etki gösterirler.
- Membran fonksiyonları stabilizasyonunu bozarak hücre ölümüne neden olurlar.
- Bakterisidal hareket genel olarak yüksek sıcaklık, geniş pH aralığına karşı dirençlidir.
- Bakterisidal hareket proteolitik enzimler tarafından kaybedilebilir.
- Bakterisidal spektrum azdan çoğa doğrudur.
- Bakteriyosine duyarlı gram pozitif bakteriler, kendi üretmiş olduğu bakteriyosine dirençlidir.
- Gram (+) suşa ait hücreler bir bakteriyosine duyarlı iken bir başkasına dirençli olabilirler.
- Üretici hücreler genetik olarak, kendi üretmiş oldukları bakteriyosinlere karşı bağışıklık kazanmıştır.
- Duyarlı bir suş bakteriyosin varlığında gelişirken geçici dirençlilik gösterebilir.
- Bakteriyosin molekülü, üretici hücreleri içeren gram pozitif bakterilerin hücre yüzeyinden absorbe edilmektedir.

Nisin A (34 amino acids)

Ile-Dhb-Ala-Ile-Dha-Leu-Ala-Abu-Pro-Gly-Ala-Lys-Abu-Gly-Ala-Leu-Met-Gly-Ala-Asn-Met-Lys-Abu-Ala-Abu-Ala-His-Ala-Ser-Ile-His-Val-Dha-Lys

Pediocin AcH or PA-1 (44 amino acids)

Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Thr-Cys-Gly-Lys-His-Ser-Cys-Ser-Val-Asp-Trp-Gly-Lys-Ala-Thr-Thr-Cys-Ile-Ile-Asn-Asn-Gly-Ala-Met-Ala-Trp-Ala-Thr-Gly-Gly-His-Gln-Gly-Asn-His-Lys-Cys

Leucocin A (37 amino acids)

Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-His-Cys-Thr-Lys-Ser-Gly-Cys-Ser-Val-Asn-Trp-Gly-Glu-Ala-Phe-Ser-Ala-Gly-Val-His-Arg-Leu-Ala-Asn-Gly-Gly-Asn-Gly-Phe-Trp

Sakacin A (41 amino acids)

Ala-Arg-Ser-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Tyr-Cys-Asn-Asn-Lys-Lys-Cys-Trp-Val-Asn-Arg-Gly-Glu-Ala-Thr-Gln-Ser-Ile-Ile-Gly-Gly-Met-Ile-Ser-Gly-Trp-Ala-Ser-Gly-Leu-Ala-Gly-Met

Şekil 2.3 *Lactococcus lactis* tarafından üretilen ve bir lanthionine (Ala-S-Ala) olan nisin bakteriyosini ile üç nonlanthionine bakteriyosini (*Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen pediocin PA-1/AcH, *Leuconostoc gelidum* tarafından üretilen leucocin A ve *Lactobacillus sake* tarafından üretilen sakacin A). Nonlanthionine bakteriyosinlerin tamamı yapılarında muhtemelen disulfide (-S-S-) bağlarına sahipler (Kaynak: Ray 1996a).

Tanımlanmış en yaygın kullanım alanına sahip bakteriyosin; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen "**Nisin**"dir. Nisin gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. "**Pediyosin**" de gıdalarda kullanılan bir koruyucudur (Teuber 1995).

a) Nisin: Nisin molekülü; aralarında *Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Micrococcus, Staphylococcus, Clostridium* ve *Listeria* suşlarının da olduğu birçok türe karşı aktivite gösteren, protein yapısında, antibakteriyel etkiye ve geniş etki spektrumuna sahip bir bakteriyosindir. Nisin molekülleri; *Staphylococcus. aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium botulinum'*un da dahil olduğu Gram-pozitif mikroorganizmalar ve pek çok asidik gıda üzerinde oldukça aktiftirler (Hansen 1994).

Aktif nisin molekülü; öncü nisin polipeptit molekülündeki sıradan amino asitlerin (serin, treonin, sistein) posttranslasyonel modifikasyonu ile oluşmaktadır. 34 amino asit içermektedir (dehidro amino asitleri ve tioesterleri bağları içerir) ve molekül ağırlığı yaklaşık olarak 3500 Dalton'dur. Doğada bulunan dimer ve tetramerlerinin ise molekül ağırlıkları sırasıyla; 7000 ve 14000 Dalton olarak değişmektedir (Hansen 1994).

Nisinin antibakteriyal etki mekanizması; membranda porlar oluşmasıyla başlayarak iyonların sitoplazmik membrandan dışarı çıkışıyla devam eder ve lizisle son bulur (Henning *et al.* 1986, Sahl *et al.* 1987). Nisin gibi bakteriyosinlerin birçoğu hücre zarını etkilerken spesifik reseptörlere bağlanma ihtiyacı duymadıklarından farklı bakteri türlerini inhibe edebilme yeteneğine sahiptirler (Chen and Hoover 2003). Nisinin pH: 2'deki çözünürlüğü ise pH: 8'e kıyasla 228 kez daha fazladır (Liu and Hansen 1990). Dolayısıyla pH yükseldikçe çözünürlük azalmaktadır.

Nisin, et ve et ürünlerinde bulunan birçok mikroorganizma üzerinde etkilidir. Örneğin; hastalık ve ölümlere yol açabilen *Listeria monocytogenes'*i inhibe edebilmektedir (Pawar *et al.* 2000). Yine nisin, et ve et ürünlerinde oldukça tehlikeli bir patojen olan *Clostridium botulinum* üzerinde de etki göstermektedir. Süt ve süt ürünleri üzerinde yapılan çalışmalarda, nisinin özellikle eritme peynirlerinde toksin üretebilen

Clostridium botulinum'u inhibe ettiği ve spor oluşumunu engellediği ifade edilmektedir. Bu ürünlerde inhibisyon etkisini gösterebilmesi için farklı seviyelerde kullanılabileceği, kullanım seviyelerinin pH, tuz ve fosfat içeriğine bağlı olarak değişebileceği ifade edilmektedir.

Nisinin gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanımına ilk kez krem peynirde izin verilmiştir. Günümüzde 47 ülke tarafından güvenli gıda koruyucusu olarak kabul edilerek kullanılmaktadır. Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) yetişkinler için günlük kabul edilebilir nisin miktarını 2.9 mg olarak belirlemiştir. Nisin birçok Avrupa ülkesinde ve Orta Doğu ülkelerinde başta peynir olmak üzere süt ve konserve gıdalar gibi çeşitli gıdalarda güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. 1988 yılından beri FDA tarafından pastörize işlem görmüş peynirlerde *Clostridium botulinum* sporlarının gelişmesini ve toksin oluşumunu önlemek amacıyla GRAS (Generally Regarded As Safe) olarak kullanımına izin verilmiştir (Daeschel 1989). Avrupa Birliği ülkelerinde ise irmikte, pudingde, ekşitilmiş kremada, olgunlaştırılmış ve işlem görmüş peynirlerde nisin (E 234) kullanımına izin verilmektedir (Roller and Lusengo 1997). Ülkemizde de halen Avrupa Birliği ülkelerinde geçerli olan gıdalarda kullanılmaktadır (Anonymous 1997). Son yıllarda peynir, süt ve konserve gıdalar dışında nisinin sütlü tatlılar, yoğurt, alkollü içecekler, et, balık, sıvı yumurta ve ekmek gibi çeşitli gıdalarda kullanımı ile ilgili çalışmalar bildirilmiştir (Delves-Broughton 1990, Radler 1990, Taylor *et al.* 1990, Delves-Broughton *et al.* 1992, Vandenbergh 1993).

b) Pediyosin: Laktik asit bakteri grubuna dahil olan *Pediococcus* türleri; gerek fermente ürünlerde starter kültür olarak kullanımları gerekse ''bakteriyosin'' gibi gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilerin gelişimini engelleyen antimikrobiyal madde üretim yetenekleri ile gıda endüstrisi açısından büyük öneme sahiptirler. *Pediococcus* türleri tarafından üretilen bakteriyosin "pediyosin" adını alır. Pediyosin, gıdalarda sağlığı tehdit eden patojenleri ve gıdalarda bozulmalara sebep olan mikroorganizmaları kontrol altında tutabilmek amacıyla kullanılan etkili bir gıda katkı maddesidir. *Pediococcus* türleri tarafından üretilen pediyosinin protein yapısında olduğu ve gıda kaynaklı patojen

ve spor oluşturan bakteriler ile kendi türlerine yakın bakterilerin de üremelerini inhibe ettigi birçok çalışmada gösterilmistir (Bhunia *et al.* 1988, Berry *et al.* 1990, Motlagh *et al.* 1991).

2.2.1 Bakteriyosinlerin sentezi

Bakteriyosinler; pilazmit kökenli olabildikleri gibi kromozomal kökenli de olabilmektedirler. Genel olarak bakteriyosinler; RNA tarafından kodlandıktan sonra öncü protein olarak ayrılırlar. Çeşitli modifikasyonların ardından sistein sayısına göre son şekillerini kazanarak hücre dışına (sec-dependent mekanizması yardımıyla) salgılanırlar.

2.2.2 Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları

Bakteriyosinler duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Hücrenin sitoplazmik zarına bağlanarak, hücre içerisine girip, zarda gözenekler oluştururlar. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açarlar. Bununla birlikte, iyonların, özellikle de ATP kaybı ve hücre içi pH dengesinin korunmasında etkili olan K^+ iyonunun hücre dışına sızması, hücrede enerji tüketimine neden olmaktadır (Twomey *et al.* 2002). Hücrede meydana gelen bu değişimler, DNA ve RNA gibi hücre için hayati önemi olan makro moleküllerin degredasyonuna, bu moleküllerle birlikte protein ve peptitoglikan gibi biyolojik proseslerin inhibisyonuna yol açmaktadır (de Martinis *et al.* 2002, Héchard and Sahl 2002).

Laktik asit bakteriyosinleri pozitif yüklü (katyonik) moleküller olduğu için sitoplazmik zar üzerine etki ederken sahip oldukları hidrofobik kısımlar önemli rol oynamaktadır. Duyarlı hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının etkisiyle ortaya çıkan elektrostatik etkileşim sonucu bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır (Nes and Holo 2000, Twomey *et al.* 2002). Böylece hidrofobik kısım zar yapısının içine girerek gözenek oluşumuna yol açmaktadır.

Gram-pozitif bakterilerde nisin, enerji yüklü membran keseleri üzerine etki ederek Proton Motive Force'u (PMF) bozar, amino asit alımını engeller ve birikmiş amino asitlerin bırakılmasına neden olur. Genel olarak lanthionin içermeyen bakteriyosinler, duyarlı hücrelerin hücre zarının dayanıklığını bozarak onların bakterisidal fonksiyonunu etkilerler (de Vuyst *et al.* 1996). Nisinin bakteri sporları üzerindeki inhibisyonunun etki mekanizması ise; nisinin dehidrobütirin ve dehidroalanin amino asitlerinin zarın sülfidril gruplarıyla reaksiyona girmesi ve sporun germinasyonunun önlenmesiyle gerçekleşmektedir (de Martinis *et al.* 2002). Gram-pozitif bakterilerde Pediosin PA-1, hücre zarına girmeden ve por oluşturmadan önce fosfolipid tabakaya bağlanır ve bu por formasyonu duyarlı hücrelerin hücre zarlarındaki protein alıcılarıyla çakışma oluşturur (de Vuyst *et al.* 1996).

2.2.3 Bakteriyosinlerin sınıflandırılması

Bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar yapılmaktadır. Bunlar arasında daha çok; Klaenhammer'in (1988) Gram-pozitif bakterileri dikkate alarak yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır. Bakteriyosinlerin biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada bakteriyosinler; molekül büyüklükleri, kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve ısı stabilitelerine göre 4 sınıfa ayrılmışlardır. Ancak, biyokimyasal tanımlanması bakımından ilk 3 sınıf dikkate alınmaktadır (Chen and Hoover 2003).

2.2.3.1 GRUP I Bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler, "**lanthionin**" içermeleri nedeniyle lantibiyotikler olarak adlandırılmakta ve yapılarında, bilinen amino asitlerden farklı olarak lanthionin (Lan) ve metil lanthionin (MeLan) amino asit türevlerini içermektedirler. Bununla birlikte; yapılarında biyokimyasal özelliklerini etkileyen dehidro-alanin ve dehidro-bütirin de bulunmaktadır (Twomey *et al.* 2002). Bu gruptaki bakteriyosinlerin; molekül ağırlıkları 5 kDa'dan düşüktür. Bu grupta yer alan nisin, lacticin 3147A ve 3147B ile plantaricin C'nin ısı stabiliteleri yüksek olup, asidik pH'da 100^{o}C'ye kadar stabilitelerini koruyabilmektedirler (Chen and Hoover 2003). Bu gruptaki bakteriyosinler kimyasal

yapılarına ve antimikrobiyal aktivitelerine göre IA ve IB lantibiyotikleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Grup IA Bakteriyosinler net pozitif yüke sahiptirler ve hidrofobik polipeptit yapısındadırlar. Membran aktif peptitler olup bakteri zarında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Grup IB bakteriyosinlerine kıyasla daha esnek bir yapıya sahiptirler (Twomey *et al.* 2002, Chen and Hoover 2003).

Grup IB Bakteriyosinler yüksüz veya negatif yüklü olup globüler peptit yapısındadırlar. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Twomey *et al.* 2002).

2.2.3.2 GRUP II Bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler, Grup I'den farklı olarak lanthionin içermezler. Molekül ağırlıkları 10 kDa'dan düşüktür. Amfilik helikse, değişik oranlarda hidrofobiteye ve β-tabakalı yapıya sahiptirler. Isıdan etkilenmezler. Hatta bu gruptaki bazı bakteriyosinler, 100^{o}C'den 121^{o}C'ye kadar olan sıcaklıklara karşı stabildir. Antimikrobiyal aktiviteleri, membran aktif olmalarından kaynaklanmaktadır. Çok sayıda bakteriyosin içeren bu grup 3 alt gruba ayrılmaktadır (de Martinis *et al.* 2002).

Grup IIA Bakteriyosinler özellikle *Listeria* suşlarına karşı aktiftirler. Yapılarında bulunan peptitin N-terminalinin sonunda, Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizisi bulunmaktadır (Chen and Hoover 2003).

Grup IIB Bakteriyosinler primer yapıları birbirinden farklı iki polipeptit içerirler. Bu polipeptitler ayrı ayrı aktivite gösterebilmektedirler. Etkin bir şekilde aktif hale gelebilmeleri için her ikisinin de aktif olması gerekmektedir. İki polipeptit aktif hale gelince, hücre membranında gözenekler oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Héchard and Sahl 2002).

Grup IIC Bakteriyosinlerin birçoğu sistein amino asit rezidüsü içermektedir ve bu bakteriyosinlere "**thiolbiyotik**"ler veya "**sistibiyotik**"ler denilmektedir. Bu gruptaki bakteriyosinler tiyo-aktif bakteriyosinler olup aktiviteleri için indirgenmiş sistin rezidüsüne gereksinim duymaktadırlar (de Martinis *et al.* 2002).

2.2.3.3 GRUP III Bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler, daha büyük molekül ağırlığına (>30 kDa) sahiptirler ve ısıya karşı duyarlı peptit zincirlerinden oluşmaktadırlar (de Martinis *et al.* 2002).

2.2.3.4 GRUP IV Bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler, büyük ve kompleks moleküller olup aktiviteleri için karbonhidrat veya lipit bileşenlerine gereksinim duymaktadırlar (Chen and Hoover 2003).

2.2.4 Bakteriyosinlerin önemi

Gıdaların korunması ve muhafaza sürelerinin uzatılması söz konusu olduğunda, fermente edilmiş gıda ürünlerinde doğal olarak bulunan laktik asit bakterilerinin üretmiş olduğu "**bakteriyosin"**lerin gıdalarda gelişen patojen bakteriler üzerinde etkili olması nedeniyle, bu bakterilerin dolayısıyla bakteriyosinlerin gıda güvenliğinde biyoprezervatif olarak kullanımının önemi gün geçtikçe artmaktadır ve bu bakteriyosinler, kimyasal koruyucuların yerini alabilecek aday durumuna gelmişlerdir (de Vuyst and Vandamme 1994). Bakteriyosinlerin gıdalarda antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra; doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları da ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir. Peptit veya protein yapısında olmaları ise; pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden, mide salgılarından etkilenebildiklerini ve insan vücudunda kolaylıkla sindirilebileceklerini göstermektedir. Ayrıca bazı bakteriyosinlerin (Grup II) ısı stabilitelerinin olması, bu bakteriyosinlerin yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır (Delves-Broughton *et al.* 1996, de Martinis *et al.* 2002). Hatta bazı

bakteriyosinler, otoklavlama sıcaklığında bile stabil kalabilmektedirler. Dolayısıyla bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır.

Gıdalarda bakteriyosinlerden yararlanma şekilleri farklı olabilir. Bakteriyosinler, doğrudan gıda maddesine eklenebilirler. Bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürler gıdaya inokule edilebilirler. Bakteriyosinlerin kullanımı gıdanın koruyucu ambalaj materyali ile birlikte olabilir. Sonuçta; uygun olan bakteriyosinin veya uygun olan bakteriyosini üreten laktik asit bakterisinin gıdaya eklenmesi; hem gıdanın raf ömrünü uzatacak hem de gıda sağlıklı kabul edilecektir. Bu amacın gerçekleştirilebilmesi için kullanılacak olan bakteriyosin molekülünün iyi bir şekilde tanımlanıp saflaştırılması gerekmektedir. Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri Çizelge 2.4'te verilmiştir (Cleveland *et al.* 2001).

2.3 Pilazmitler

Pilazmitler; bakteri hücresinin sitoplazmasında kromozomal DNA'dan bağımsız olarak bulunan (bakteri kromozomu ile birleşikse epizom adını alır) süper halkasal (sirküler) yapıda, çift sarmallı DNA içeren kromozom dışı genetik elementlerdir (Thompson 1986). Büyüklükleri 1-1000 kbp arasında değişmektedir. Bu da; kromozom büyüklüğünün yaklaşık 1/20'sine denk düşmektedir. Pilazmit DNA'ların süper halkasal konfigürasyonları hücre içindeki en stabil formlarıdır. Pilazmit DNA izolasyonu yapılırken; bu süper halkasal DNA molekülünün bazı fiziksel özellikleri kullanılmaktadır. Pilazmit DNA'nın süper halkasal yapısı; kromozomal DNA'nın izolasyonu esnasında meydana gelen kırılmalar nedeniyle bozulmakta ve değişik moleküler ağırlıklara-büyüklüklere sahip olan pilazmit DNA molekülleri agaroz jel üzerinde yapılan elektroforez işlemi ile birbirlerinden ayırdedilebilmektedirler (Watson *et al.* 1987, 1992).

Pilazmitler, hücreden bağımsız bir biçimde kendi kendilerine çoğalabilmektedirler. Replikasyon için bir orijine ve konakçı bakteri içinde devamlı kalabilmelerini kolaylaştıracak genlere ihtiyaç duymaktadırlar (Thompson 1986). Pilazmitlerin

replikasyonu, konakçı organizmanın kromozom replikasyonunu sağlayan enzim tarafından gerçekleştirilmekte ve pilazmitler hücre bölünmesi ile yavru hücrelere de geçebilmektedirler (Klug and Cummings 2002).

Bir bakteride spesifik bir pilazmitin birden fazla kopyası olabileceği gibi farklı birden fazla pilazmit de aynı bakteride bulunabilmektedir. Ancak birbiri ile yakın ilişkisi olan pilazmitler genellikle aynı bakteride bulunmazlar. Pilazmitler, bakterilere antibiyotik direncini, virülansını ve bakterinin metabolik kapasitesini değiştirebilecek fonksiyonlar da kazandırabilmektedirler (Thompson 1986).

Pilazmitler genellikle az sayıda gen taşımaktadırlar. Pilazmitler üzerinde pek çok fenotipik özellik kodlanmaktadır (Daniel and Dykhulzen 1984). Bu özellikler, aşağıdaki gibi gruplandırılabilmektedir:

1- Antibiyotik ve ilaç dirençliliği; örneğin; sülfanomit, aminoglikosit, β-laktam ve tetrasiklin dirençlilikleri,
2- Ağır metal dirençliliği; örneğin; civa, nikel, kobalt, kurşun dirençlilikleri,
3- İyon dirençliliği; örneğin; arsenat ve tellürit dirençliliği,
4- UV ışınlarına direnç,
5- Çeşitli enzim ve toksinleri oluşturma,
6- Bakteryosin oluşturma,
7- Kolonize olma,
8- Çeşitli karbonhidratların fermentasyonu,
9- Patojenite oluşturan özellikler; örneğin; enterotoksin, hemolizin, kolisin üretimi,
10- Metabolik özellikler; örneğin; laktoz, sitrat kullanımı, üreaz aktivitesi, H_2S üretimi,
11- Konjugal fonksiyonlar; örneğin; seks pillisinin oluşturulması,
12- DNA restriksiyon ve modifikasyon enzimlerinin oluşturulması,
13- Pilazmitin inkompabilite fonksiyonları,
14- Konak hücreye adherans,
15- Konak spektrumu ile ilgili özellikler

Çizelge 2.4 Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri

Bakteriyosin	**Uygulanan gıda**	**Etkileri**
Nisin A	Yeniden şekillendirilen et ürünleri (formed meat products)	Bakteriyel inaktivasyon
Nisin A	Ricotta peynirinde *Lis. monocytogenes*'in kontrolü için kullanılmıştır	*Lis. monocytogenes*'i 8 hafta etkili bir şekilde inhibe etmiştir
Pediocin AcH	Pediocin AcH sentezleyen *Lb. plantarum* WHE 92, olgunlaşmanın başlangıcında Munstar peynirinin yüzeyine spreylenmiştir	*Lis. monocytogenes*'in gelişimini engellemiştir
Enterocin 4	Enterocin sentezleyen *Enterococcus faecalis* INIA4, Manchego peyniri üretiminde kullanılmıştır	*Lis. monocytogenes* Ohio'yu inhibe ederken, *Lis. monocytogenes* Scott A'yı inhibe etmemiştir
Linocin M-18	*Bifidobacterium lines* kırmızı peynir üretiminde starter olarak kullanılmıştır	*Lis. ivanovi* ve *Lis. monocytogenes*'te 2 log düşüşe neden olmuştur
Piscicolin 126	Jambonda *L. monocytogenes* kontrolü için kullanılmıştır	Ticari bakteriyosinlerden daha etkili bulunmuştur
Leucocin A	*Leu. Gelidium* UAL 187 vakum paketlenmiş sığır etinde bozulma kontrolü için kullanılmıştır	*Lb. sake*'in de etkisiyle bozulma 8 haftaya kadar geciktirilmiştir
Lactocin 705	Kıyılmış sığır etinde *Lis. monocytogenes*'in gelişimini önlemek için kullanılmıştır	*Lis.monocytogenes*'in kıyılmış etlerde gelişimini önlemiştir
Pediocin AcH	Tavuk eti sosisinde *Lis. monocytogenes*'i inhibe etmek için pediosin üreten *Ped. acidilactici* (Ped^+) kullanılmıştır	Etkili bir şekilde *Lis.monocytogenes* sayısını azaltmıştır
Pediocin	Şarap ve fırıncılık ürünlerinde kullanım potansiyeli araştırılmıştır	Bu tür ürünlerde kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir
Pediocin AcH	Tavuk etine pediosin preparatı ilave edilmiştir	5^0C'de 28 gün *Lis.monocytogenes* gelişimini konrol etmiştir
Pediocin PA-1	Fermente sosiste starter olarak *Ped. acidilactici* (Ped^+) kullanılmıştır	*Lis. monocytogenes*'i etkili bir şekilde kontrol etmiştir
Enterocin	Jambon, domuz eti, tavuk göğüs eti, pate ve sosiste kullanılmıştır	Çeşitli şartlar altında *Lis. monocytogenes* gelişimini kontrol etmiştir

Pilazmitler, DNA'larında taşıdıkları genetik bilgiler ve bakteriye kazandırmış oldukları karakterler göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadırlar. Bilinen pilazmitlere örnekler, aşağıdaki gibi gruplandırılabilmektedir:

- Seks pilazmitleri (F faktör)
- R pilazmitleri (Direnç pilazmitleri)
- Col pilazmitleri
- Penisillinaz pilazmitleri
- Virulans pilazmitler
- Cryptic pilazmitler

2.3.1 Seks pilazmitleri

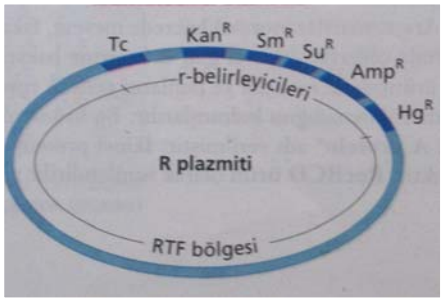
Seks pilazmitleri, cinsiyeti göstermektedir ve pilus oluşumu için gerekli genleri taşımaktadır. Kromozom parçalarının ya da tüm kromozomun bakteriden bakteriye aktarılmasını sağlayarak genetik rekombinasyona katkıda bulunmaktadırlar (Klug and Cummings 2002). Bu pilazmitler, *Escherichia coli'* de **F faktör** olarak incelenmiştir (Jawetz *et al*. 1977).

Genetik rekombinasyonda görev alan bu F faktör; kendi başına bir genetik birimdir. Bakteri sitoplazmasında bulunmaktadır; çift iplikli halkasal DNA molekülünden oluşmaktadır ve bakteri kromozomunun yaklaşık % 2'si kadardır (yaklaşık 100.000 nükleotit çifti). F faktörde, diğer genlerde olanların yanı sıra genetik bilgi transferinde görev alan 19 gen daha bulunmaktadır (**tra genleri**). Bu genler **F veya seks pilusları** denilen tüplerin oluşması için gereklidir. Bu pililer bakteride çok sayıda olabilmektedir. Bunlar hücreden tüp şeklinde uzanan mikroskobik yapılardır. Farklı tip pililer, farklı hücresel işlev görürler. Fakat bütün pililer yapışma ve tutunma olayı ile bir şekilde ilgilidirler (Klug and Cummings 2002). F pilileri, çiftleşecek olan suşlar arasında teması sağlayarak DNA aktarımını başlatmaktadırlar. F faktör; F^+ ve F^- hücreler olarak incelenmektedir. Bunlar konjugatif pilazmitlerdir. Kromozomun bir bölümünü ya da tamamını aktaran hücrelere $\mathbf{F^+}$

hücreler (F=fertilite: dölleme) denmektedir. F^+ hücreden gelen kromozom materyalini (DNA molekülü) alıp, kendi kromozomu ile birleştiren hücrelere de **F^- hücreler** denmektedir (Klug and Cummings 2002).

2.3.2 R pilazmitleri

R pilazmitleri çoğunlukla iki genden oluşmaktadır. Bu genler; **direnç transfer faktörleri (RTF**) ve **R-belirleyicileri**dir. **Direnç transfer faktörleri**, bakteriler arasında pilazmiti transfer eden genetik bilgiyi kodlamaktadır. **R-belirleyiciler** ise, antibiyotiklere karşı direnci kodlayan genlerdir. Direnç transfer faktörleri, farklı bakteri türlerinin farklı pilazmitlerinde oldukça benzer olmasına rağmen, R-belirleyiciler geniş çeşitlilik göstermektedir ve herbiri bir sınıf antibiyotiğe direnç için özelleşmiştir (Şekil 2.4). Bir bakteri hücresi, R-belirleyiciye sahip pilazmiti taşırken, direnç transfer faktörünü taşımazsa bu hücre antibiyotiklere direnç özelliği gösterirken direnci belirleyen genetik bilgiyi alıcı hücreye transfer edemez.



Şekil 2.4 Direnç transfer faktörünü ve çoklu antibiyotik direnç genini taşıyan pilazmiti gösteren şekil (Tc; tetrasiklin, Kan; kanamisin, Sm; strepotomisin, Su; sulfonamit, Amp; ampisilin ve Hg; civa).

En çok çalışılmış olan pilazmitler, bir veya birkaç R-belirleyiciye ilave olarak direnç transfer faktörünü de ihtiva edenlerdir. *Tetrasiklin, streptomisin, ampisilin, sulfonamit, kanamisin ve kloramfenikol* en çok rastlanan antibiyotik direnç genleridir. Bazen bu genler, sadece tek bir pilazmit üzerinde taşınmaktadır. Bu durum, çoklu antibiyotik direnci olarak

isimlendirilmektedir. Bu şekildeki bakteriler, sadece çoklu direnç açısından değil, diğer bakterilere pilazmitin kolayca taşınabilmesi açısından da tıbbi alanda oldukça önemli bir yere sahiptirler.

2.3.3 Col pilazmitleri

*Eecherichia coli'*den türemiş olan **coIE1** pilazmiti; **Col pilazmiti** olarak adlandırılmaktadır. Aynı pilazmiti taşımayan bakteri suşlarına karşı oldukça toksik olan protein(ler)i sentezlemektedir. Bu proteinler **kolisin** olarak isimlendirilmekte ve bakteride letal etki göstermektedir (Jawetz *et al.* 1977). Bu pilazmiti taşıyan bakteriler **kolisinojenik bakteriler** olarak isimlendirilmektedirler. Bir hücrede 10-20 kopya halinde bulunan bu pilazmit, aynı zamanda içinde bulunduğu konakçı organizmayı toksinin etkisinden koruyan ve bir çeşit bağışıklık sağlayan proteinleri kodlayan bir gen taşımaktadır. Col pilazmitleri, R pilazmitlerinin aksine diğer bakterilere taşınmazlar (Klug and Cummings 2002).

2.3.4 Penisillinaz pilazmitleri

Staphylococcus suşlarının birçoğunun penisilin grubu ilaçlara dirençli olduğu görülmektedir. Yapılan araştırmalarda, *Staphyllococcus* suşlarında bulunan bir pilazmitin, Gram-pozitif olan bu bakterilerde **β-laktamaz** enziminin salgılanmasına sebep olduğu gözlenmiştir. Bu enzim, bakterilerin penisilini parçalayarak etkisiz hale getirmelerini sağlamaktadır. Gram-pozitif bakterilerin konjugasyon yolu ile herhangi bir alış-veriş yapmadıkları bilinmektedir. Penisillinaz pilazmitlerinin, bakteriden bakteriye geçmesine fajlar aracılık etmektedir (Jawetz *et al.* 1977).

2.3.5 Virulans pilazmitler

Bakterinin patojen olmasına neden olarak girdiği konakçıda hastalık meydana getirmeyi sağlayan pilazmitlerdir. Bu pilazmitler, sulu ishal ile oluşan kilo kaybı sonucu ölüme kadar götüren, kişiden kişiye bulaşan enteropatolojik *Escherichia coli*'de bulunmakta ve

bakterilerin virülensliğini etkilemektedirler. Ayrıca bu pilazmitler, konakçının enterotoksin ve kolonizasyon antijeni oluşturmasına neden olmaktadırlar.

2.3.6 Cryptic pilazmitler

Hiçbir fenotipik karakteri olmayan pilazmitlere **cryptic** pilazmit adı verilmektedir (Daniel and Dykhulzen 1984). Bu tür pilazmitlerin fonksiyonu da bilinmemektedir.

2.3.7 Laktik Asit Bakterilerinde pilazmitler

Laktik asit bakterileri sınıflandırılırken; suş ayrımına gidildiğinde başvurulan güvenilir ve hızlı yöntemlerden biri pilazmit içeriklerinin tespit edilmesidir. Pilazmitler bakterilerin değişen çevresel koşullara karşı hızlı yanıt oluşturmalarını sağlayan temel genetik yapılardır. Genellikle bu adaptasyon; stres koşullarında pilazmit kaybı, yeni koşullara uygun metabolik özelliklerin kazanımında da pilazmit transferi yolu ile olmaktadır. Suş düzeyinde farklılaşmanın ana kaynağını; pilazmit içeriklerindeki değişimler ve bu değişimlerin yarattığı fenotipik uyum oluşturmaktadır (de Vuyst and Degeest 1999).

Laktik asit bakterileri değişen sayılarda ve farklı moleküler ağırlıklarında pilazmit içermektedirler. Bu bakterilerde; karbonhidrat metabolizması, proteolitik aktivite, faj dirençliliği, bakteriyosin ve ekzopolisakkarit üretimi gibi endüstriyel açıdan önemli özelliklerin pilazmitler tarafından kodlandığı fenotipik ve genotipik kanıtlarla tespit edilmiştir (Allison and Klaenhammer 1998).

Laktik asit bakterilerinin sahip olduğu pilazmitler ve kodladıkları özelliklere örnek olarak laktoz fermentasyonu gösterilebilir. Laktoz fermentasyonunu yöneten enzim sistemleri gen kodlu pilazmitler üzerinde bulunmaktadır (Wright *et al.* 1986). Laktoz metabolizmasından sorumlu genler aynı pilazmit üzerinde bulunabilmektedirler. Bununla birlikte; farklı suşlarda farklı pilazmitler tarafından da kodlanabilmektedirler. *Lactococcus lactis* suşları üzerinde yapılan bir çalışmada; ML3 suşunda 33 MDa, C10 suşunda 43 MDa ve LMO232

suşunda 36 MDa büyüklükte pilazmitlerin laktoz metabolizması genlerini taşıdığı belirlenmiştir (Harlander *et al.* 1984).

Laktik asit bakterileri ile yapılan çalışmalar sonucunda; birçok endüstriyel özelliğe sahip olmakla birlikte bakteriyosin üretimi ve dirençlilik sistemlerinin de pilazmit kodlu olduğu saptanmıştır. Laktik asit bakterilerinde endüstriyel öneme sahip özelliklerin büyük çoğunluğunun pilazmit kökenli genler tarafından kodlanması, bu bakteriler üzerindeki pilazmit biyolojisi çalışmalarının moleküler genetik araştırmaları arasında yer almasını sağlamıştır (Kok 1996, Wang and Lee 1997, Bellocine *et al*. 2005).

2.4 Gen transformasyonu

Bir hücrede ya da bir organizmada dışarıdan aktarılmış olan DNA molekülünden ötürü meydana gelen kalıtsal değişikliktir transformasyon olarak ifade edilmektedir. Herhangi bir aracı (ikinci bir canlı hücre veya bakteriyofaj) bulunmaksızın, verici bakteri tarafından ortama bırakılmış olan DNA molekülünün alıcı bakteri tarafından alınmasıyla oluşan bir rekombinasyon türüdür de denilebilir. Verici bakterinin DNA'sı, ortama genellikle bakterinin kendiliğinden parçalanıp erimesi veya bazı kimyasal maddeler aracılığı ile ekstraksiyonu sonucu salınmaktadır. Bu genetik materyalin alıcı hücre tarafından alınabilmesi için; DNaz (deoksiribonükleaz) enziminin etkisinden korunmuş olması ve alıcı hücrenin DNA moleküllerini hücre içine alabilecek yeteneğinin bulunması gerekmektedir. Transformasyon olayında; alıcı bakterinin ancak büyük DNA segmentlerini ($4x10^5$'den büyük) ortamdan alabildiği, çift iplikli DNA'nın tek iplikli DNA'ya oranla daha büyük bir sıklıkla hücre içine alınabildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca bu olayda, alıcı bakterilerin yüzeylerinde bulunan DNA tanıma bölgelerinin de rol oynadığı bildirilmiştir. Transformasyon sonunda, alıcı bakterilerde kapsül, flajella oluşumu ile değişik enzimatik reaksiyonlar gözlenebilmektedir (Klug and Cummings 2002). Bu konu ile ilgili çalışmaların çoğu pnömokoklar üzerinde yapılmış olmakla birlikte; *Haemophilus influenzae, Bacillus subtilis, Neisseria gonorrhoeae, Escherichia coli* gibi bakterilerde de transformasyon gözlendiği bildirilmiştir (Klug and Cummings 2002).

Transformasyon işlemi, iki ana basamakta meydana gelmektedir:

1) Verici hücreden gelen DNA'nın alıcı hücreye girişi,
2) Verici hücreden gelen DNA'nın alıcı hücrenin kromozomundaki homolog bölgesi ile rekombinasyonu (Klug and Cummings 2002).

Hücre populasyonları içinde uygun fiziksel durumda hazır olan kompetent (alıcı) hücreler DNA'yı hücre içine alabilmektedirler. DNA'nın girişi, bakteri hücresinin yüzeyinde bulunan sınırlı sayıdaki reseptörler yardımıyla gerçekleşmektedir. Bakteri hücre duvarı ve zarındaki bu geçiş için özel iletim molekülleri ve enerjiye ihtiyaç vardır. Alıcı hücrenin enerji üretimini ve protein sentezini baskılayan maddelerin tansformasyonu da baskılaması bu fikri desteklemektedir.

Giriş esnasında DNA molekülünün bir ipliği nükleazlarla kesilmekte ve sadece tek ipliğin transformasyonu gerçekleşmektedir. Transformasyona uğrayan DNA ipliği, bakteri kromozomundaki komplementer bölgesi ile karşı karşıya gelmektedir. Birkaç enzim aracılığı ile DNA parçası kromozomdaki homolog bölgesi ile yer değiştirmekte ve bu kromozom kısmı çıkarılarak parçalanmaktadır. Rekombinasyonun gözlenebilmesi için; aktarılacak DNA molekülünün genetik değişiklik taşıyan farklı bir bakteri suşundan alınması gerekmektedir. Kromozoma yabancı DNA katıldıktan sonra oluşan rekombinant bakteriyel DNA yapısında, kromozomal DNA'ya ait bir DNA ipliği bulunmakta ve diğer iplikte ise transforme edilen DNA parçası taşınmaktadır. Bu iki iplik genetik olarak birbirinin aynı olmadığı için sarmal bölge heterodubleks olarak isimlendirilmektedir. Replikasyondan sonra bir kromozom, alıcı hücrenin orjinal durumunu muhafaza etmektedir. Diğeri ise, transforme olmuş gen taşımaktadır. Hücre bölünmesi ile bir konakçı hücre ve bir de transforme olmuş hücre oluşmaktadır.

2.4.1 Laboratuvar ortamında transformasyon

Bakteriler, transformasyon için kendiliğinden kompetent olabildikleri gibi, Tris tamponları veya divalent metal iyonları gibi kompetentliği uyarıcı etkileri olan çeşitli ajanlar kullanılarak da kompetent hale getirilebilmektedirler. Transformasyon aynı zamanda, transforme edilebilecek bir DNA'nın varlığında PEG'li ortamda üretim veya elektroporasyon gibi yöntemlerle de gerçekleştirilebilmektedir.

Transformasyon yeteneği olmayan bir bakteride taransformasyon sistemi kurmak için; alıcı bakteri suşunun ve DNA molekülünün dikkatli bir şekilde seçilmiş olması gerekmektedir. Çünkü bazı önemli bakteri suşları için hangi transformasyon metodunun başarılı olacağını kestirmek mümkün görünmemektedir. Bununla beraber, transformasyon sisteminde üzerinde durulan bazıbaşlıklar aşağıda listelenmiştir.

2.4.2 Doğal kompetentlik

Doğal transformasyon sistemleri, en az on beş farklı türde tespit edilmiştir. Detaylı olarak çalışılan bakteriler arasında; *Haemophilus influenzae, Bacillus subtilis, Neisseria gonorrhoeae, Escherichia coli,* ve *Streptococcus pneumoniae* sayılabilmektedir. Bütün bu bakterilerde tespit edilen transformasyon sistemlerinde aşağıda sıralanan olaylar ortak gözükmektedir:

1. DNA molekülünün gönderilmesi için kompetent hücrenin hazır hale gelmesi
2. DNA molekülünün kompetent hücreye bağlanması
3. DNA molekülünün kompetent hücreye girişi
4. İntegrasyon sonunda DNA molekülünün kompetent hücre içinde işlenmesi

Kompetentlikte hücre içinde ve dışında cereyan eden olaylar önemli rol oynamaktadır. Örneğin; *Streptococcus pneumoniae'*de genom tarafından tayin edilen kompetentliğin ekspresyonu; pH, üreme fazı, besiyerinin bileşimi ve hücre yoğunluğu gibi faktörlerin etkisine bağlıdır (Mercenier and Chassy 1988).

Kompetentlikte proteinler de rol oynamaktadır. Örneğin; CF yani Compotence Factor, hücre kompetent hale geçmeden önce mutlaka sentezlenmesi gereken bir proteindir (Chandler and Morrison 1987). Örneğin; *Streptococcus pneumoniae'*de genetik yapıya bağlı olarak oluşturulan kompetentlik proteinlerinden en az iki tanesi DNA'ya bağlanmadan ve DNA molekülünün nükleolitik olarak parçalanmasından sorumludur (Lacs and Neuberger 1975, Lacs 1977, Smith and Clewell 1984). Benzer bir örnek de *Bacillus subtilis'*te görülmektedir (Vanema 1979). *B. subtilis* zarından DNA'ya bağlı, nükleaz aktivitesi gösteren 75 kDa'lık bir protein kompleksi izole edilmiştir (Smith *et al.* 1985). Bu kompleksin olmaması halinde hücre transforme olmamaktadır. Bu kompleksin 17 ve 18 kDa'lık altünitelerden oluştuğu saptanmıştır. 17 kDa'lık altünite, nükleaz aktivitesine sahipken 18 kDa'lık altünite, modülatör veye nükleaz inhibitörü olarak iş görmektedir (Wosman 1987).

Tek zincirli DNA molekülü, hücre dışında bulunan nükleaz aktivitesine dayanıklı bir protein kompleksi içinde tutulmaktadır (Vanema 1979). Enzimatik parçalanmadan korunabilmiş olan bu DNA molekülü hücre içine girebilmektedir. Diğer yandan; transformasyon sırasında DNA molekülünün kompetent hücre içine girebilmesi için kompetent hücrede, hücresel bir otolizin sebep olduğu kısmi hücre duvarı parçalanması zorunludur (Mercenier and Chassy 1988).

2.4.3 Suni olarak oluşturulan kompetentlik

Escherichia coli hücreleri, doğal olarak kompetent hale geçemezler. Mandel ve Higa (1970), *E. coli* hücrelerini; $CaCl_2$ çözeltisi ile muamele ettikten sonra 42ºC'de ısı şokuna maruz bırakarak bakteriyofaj lamda DNA'sına karşı kompetent hale getirmişlerdir. Ca^{+2} iyonu, DNA fosfatlarının ve membran fosfolipidlerinin negatif yükünü nötralize ederken ısı şoku, hücre membranının geçirgenliğini artırmaktadır.

Ca^{+2}-ısı şoku, Gram-negatif bakterilerinin transformasyonunda uygulanmıştır. Gram-pozitif bakterilerinden sadece bir bakteri türü bu yolla transforme edilememiştir. O da;

Staphlococcus aureus' tur (Rudin *et al.* 1974). Kimyasal yolla oluşturulan kompetenslikte Ca tuzlarının yerine strontium, baryum ve magnezyum tuzları da kullanılabilmektedir. Bu tuzlar, özellikle *Salmonella* ve *Pseudomonas* türlerinde verimlilik sağlamaktadır. Diğer yandan hücreler; rubidium tuzları, hexamin kobalt, dithiotreitol ve dimetilsülfoksit gibi bileşiklerle muamele edildiğinde 10^8 transformant/μg DNA'dan daha fazla transformasyon verimi elde edilebilmektedir (Mercenier and Chassy 1988).

*E. coli'*de, Vitamin B12-koenzim sistemi, hücre içine giriş mekanizmasında rol oynamaktadır. Hücre içine giriş mekanizmasında; süpercoil, sirküler ve tek zincirli sirküler DNA'ların hepsi verimli bir şekilde transforme edilebildiği halde aynı başarı lineer DNA'lar için söz konusu değildir. Hücre içine giriş mekanizmasında DNA'lar arasında homolojiye ya da sekans spesifitesine gerek yoktur (Mercenier and Chassy 1988).

Dondurup-çözme tekniği kullanılarak *E. coli'* de transformasyonun verimi artırılabilmektedir. Dondurup-çözme tekniği, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Rhizobium meliloti* türlerinde de olumlu sonuçlar vermiştir. Diğer yöntemlerle bu bakterilerde transformasyon yapmak oldukça zordur. Dondurup-çözme tekniği ile hücre duvarında bir zayıflık oluşturulmakta ve DNA'nın hücre içine girişi kolaylaştırılmakdır (Mercenier and Chassy 1988).

Diğer bir teknik de; polietilenglikol (PEG) kullanılarak kimyasal yolla indüklenen transformasyondur. Bu yöntemde hücreler, tris tamponunda yıkanarak PEG'li ortamda DNA molekülleri ile karıştırılmaktadır. Bu karışımın kısa bir süre inkübe edilmesiyle oluşan transforme hücreler uygun bir besiyerine ekilerek izole edilebilmektedirler (Fornari and Kaplan 1982). Bunlara ek olarak;

2.4.3.1 Üreme fazı ve üreme koşullarının transformasyon üzerindeki etkileri

Üreme fazı, transformasyon yüzdesi üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Kültür şartları da, ne çeşit bir hücre duvarı parçalanması gerektiği konusunda bilgi vermektedir. Örneğin;

bazı bakteri suşları için muralitik muameleden önce hücre duvarının zayıflatılması gerekli görülmektedir. Bunun için, *Streptococcus lactis'*in üretildiği besiyerine DL-Threonine; *Streptomyces*, *Corynebacterium, Clostridium* suşlarının *ve Streptococcus faecalis lactis'*in üretildiği besiyerlerine de Glisin ilave edilmektedir. Ayrıca hücreleri önceden Penicilin G ile muamele etmek veya lizozimle muamele etmeden önce dondurup çözmek *Streptococcus faecalis* gibi bakteriler için tavsiye edilmektedir (Hopwood 1981, Ozaki *et al.* 1984).

2.4.3.2 Hücre duvarının muralitik muamelesinin transformasyon üzerindeki etkileri

Osmotik bakımdan hassas olan hücreler; mutanolizin, lizozim veya bu iki enzimin kombinasyonları kullanılarak DNA'ya karşı geçirgen hale getirilebilmektedirler (Woskow and Kondo 1987). Mutanolizin üreten firmalar bu enzimin; deoksiribonükleaz enziminden ve proteolitik aktivitelerden olumsuz yönde etkilendiğini ve bu yüzden de, transformasyon yüzdelerinde değişikliğe yol açabileceğini belirtmişlerdir (Wirth *et al.* 1986, Woskow and Kondo 1987). Bu problem, hüre tamponlarına BSA (Bovine Serum Albumin), jelatin veya kimotripsin gibi proteolitik enzimler ilave edilerek giderilebilmektedir (Woskow and Kondo 1987). Lizozime oldukça dirençli görünen suşlarda hassasiyet; ortama NaCl gibi spesifik iyonların veya alfa-amilaz gibi enzimlerin eklenmesiyle artırılabilmektedir. Ancak *Streptococcus faecalis'*te ortama tripsin enziminin ilave edilmesi otolizi aktive etmektedir (Mercenier and Chassy 1988). Ortama eklenen tamponlar genellikle; BSA, $CaCl_2$, $MgCl_2$ veya her ikisinin 1-25 mM'lık konsantrasyonlarından oluşmaktadır.

2.4.3.3 PEG kullanılarak yapılan uygulamaların transformasyon üzerindeki etkileri

Hücrelerin PEG bulunan ortamda DNA ile birlikte inkubasyonu transformasyon için gerekli bir aşamadır. Ancak, *Streptococcus faecalis* gibi istisnai bazı bakteriler ortamda PEG olmasa bile transforme edilebilmektedirler (Wirth *et al.* 1986). Bununla birlikte PEG; DNA moleküllerinin Gram-pozitif bakteri hücrelerine başarılı bir şekilde girebilmesi için elzem olan bir füzyon maddesidir. Optimal PEG konsantrasyonunun % 15-40 olduğu saptanmıştır (Mercenier and Chassy 1988). İnkubasyon zamanı genellikle çok kısa tutulmaktadır (1-5

dk.). Bir istisna olarak, *Streptococcus lactis'*in PEG ile yapılan 20 dk. ve üzeri inkubasyon sürelerinde transformasyon veriminin maksimuma ulaştığı gözlenmiştir (Kondo and Mc Kyle 1984, Woskow and Kondo 1987).

PEG'in moleküler ağırlığının transformasyon frekansına olan etkisi pek önemli bir faktör değildir. Yine de, ortalama moleküler ağırlıkları 3500-6000 kDa olan bileşikler daha etkili sonuçlar vermiştir (Mercenier and Chassy 1988). PEG'in otoklav yerine filtre ile steril edilerek hazırlanan solüsyonları *Streptococcus faecalis* hücrelerinin canlılığını artırmaktadır. PEG'in kimyasal saflığı ise; transformasyon verimi üzerinde etkili değildir (Wirth *et al.* 1986, Mercenier and Chassy 1988). Bazı transformasyon deneylerinde deneyin başarısızlığı, DNaz aktivitelerinin oluşturduğu karışıklıklardan veya hücre içine giren DNA molekülünün konak içerisinde parçalanmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin; ısıyla muamele DNaz enzimlerini ve endojen restriksiyon sistemlerini inaktive etmektedir (Mercenier and Chassy 1988). DNaz enzimlerinin oluşturduğu bu potansiyel problemi çözmek için lipozom kullanılmaktadır. Lipozomlar, yapay olarak üretilen fosfolipid veziküllerdir. Bu veziküller biyolojik materyali çepeçevre kuşatmaktadırlar (Hopwood 1981). Çeşitli bakterilerle yapılan çalışmalarda; lipozomlarla korunmuş olan DNA moleküllerindeki transformasyon veriminin çıplak DNA moleküllerine oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak; lipozomlar tarafından nükleaz aktivitesinden korunmuş olan DNA moleküllerinin alıcı hücrelere girişi bu şekilde kolaylaştırılmaktadır (Mercenier and Chassy 1988).

2.4.4 Elekroporasyon ile transformasyon

Elektrotransformasyon; birçok türde uygulanan ve türlerin sahip oldukları özellikleri değiştirmek -yeni özellikler eklemek ya da bulunan özellikleri çıkarmak- için kullanılan kolay ve verimli bir tekniktir (Holo and Nes 1989). Elektroporasyon, çok kısa aralıklı ve yüksek voltajlı elektriksel uyarımlarla hücre membranında geçici porlar oluşturarak hücre membranını geçirgen hale getirip makromoleküllerin sitoplazma içine girmesini amaçlayan bir (Zimmermann and Vienken 1982, Holo and Nes 1989). Oluşan geçici porlar, birbirine

temas eden iki hücre arasında meydana gelirse bu durum hücre-hücre füzyonuyla sonuçlanmaktadır. Hücrenin dışından mikrosaniyede geçen elektrik akımı ile yağ membranı içinde kırılma ve gözeneklerde açılma meydana gelmektedir. Bu gözeneklerden makromoleküllerin içeri girmesi sağlanmaktadır. Geçici delikler oluşturan kritik voltaj değerinin üzerine çıkıldığında membranda geri dönüşümsüz hasarlar meydana gelebilmektedir. Bazı hücreler açılan bu gözenekleri kendiliğinden onarabilmektedirler. Bazı hücreler ise zarar görmekte, açılan gözenekleri onaramamakta ve ölmektedirler (Holo and Nes 1989).

Elektriksel alanların hücreler üzerinde olan etkisi ilk kez Zimmermann tarafından çalışılmıştır (Zimmermann and Vienken 1982). Elektroporasyonda hücre membranının büyüklüğü ve biçimine bağlı olarak voltaj belirlenmektedir (Holo and Nes 1989). Transformasyon deneylerinde, hücrelerde porlar oluşturmak için hücre süspansiyonuna uygulanan voltaj şarjının etkisi kullanılan cihaza göre değişmektedir.

2.4.5 Elektroporasyon üzerinde etkili olan parametreler

Elektroporasyon üzerinde etkili olan parametreler bakteriden bakteriye ve hatta suştan suşa değişiklik gösterebilmektedirler (Mercenier and Chassy 1988).

2.4.5.1 Voltaj ve kapasitörün etkisi

Voltaj ve kapasitans ayarları, elekroporasyonda hücre canlılığı üzerine etki eden faktörlerdendir. *Streptococcus thermophilus'*un ST128 suşu ile yapılan çalışmalar, 25 μF'lık bir kapasitörde, 2.5 kV değerinde tek bir akım ile muamele edilen hücrelerin canlılığında değişiklik olmadığını göstermiştir. Ancak, daha yüksek voltajlara çıkıldığında hücre ölümlerinde artış gözlenmiş, 5 kV/cm'de hücre ölümlerinin % 92'ye ulaştığı saptanmıştır (Somukuti and Steinberg 1988).

2.4.5.2 Üreme fazının etkisi

Erken veya geç üreme fazındaki bakteri kültürlerinden rütin olarak 10^7 transformant/µg'dan daha düşük transformasyon verimi sağlanmaktadır. Üreme fazının iyi ayarlanması transformasyon verimini yaklaşık 3 kat artırmaktadır (Calvin and Hanawalt 1988).

2.4.5.3 Birden fazla uygulanan akımın etkisi

Birden fazla akım uygulanması hücre ölümlerinde artış meydana getirmektedir. Optimum transformasyon frekansı için tek akım önerilmektedir (Calvin and Hanawalt 1988).

2.4.5.4 Divalent katyonlar

$CaCl_2$, $MgCl_2$ ve $MnCl_2$ bulunan ortamlarda yapılan deneylerde transformasyon veriminde düşüş gözlenmektedir (Miller *et al.* 1988).

2.4.5.5 Hücre duvarını zayıflatan ajanların etkisi

Lizozim, glisin ve treonin gibi hücre duvarını zayıflatan ajanlar tranforme hücre miktarını artırmaktadırlar (Aymerich *et al.* 1993).

2.4.5.6 Ortam sıcaklığının etkisi

Enterococcus faecalis türleri ile yapılan elektroporasyon deneylerinde ortam sıcaklığının artırılması (soğutulmuş örneklere kıyasla) hücre canlılığında belirgin bir azalmaya yol açmaktadır (Fiedler and Wirth 1988).

2.4.5.7 Pilazmit DNA konsantrasyonunun etkisi

Transformasyon verimi büyük ölçüde DNA konsantrasyonuna bağlıdır. DNA konsantrasyonu sabit tutulduğunda transformasyon verimi, ortamdaki hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Dower *et al.* 1988).

2.4.5.8 Hücre yoğunluğunun etkisi

Elektrporasyonda hücre konsantrasyonunun artışına paralel olarak transformasyon verimi de artmaktadır. Hücre konsantrasyonunun artışı elektriksel gerilimi de yüksettiği için transformasyon verimi artarken canlı hücre sayısı azalmaktadır. Etkili alan geriliminin hücre konsantrasyonuna paralel olan bu artışı, bakterilerin içerisindeki iyonik kuvvetlerin dışarıdakinden çok daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Calvin and Hanawalt 1988).

2.4.5.9 Ortamın elektrik iletkenliği

Elektroporasyonda kullanılan hücre süspansiyonlarının elektriksel iletkenliğinin çok düşük olması gerekmektedir. Örneğin; *Escherichia coli* ile yapılan deneylerde, elektriksel iletkenliği düşürmek için hücre süspansiyonları, HEPES veya bidistile su ile yıkanmaktadır (Dower *et al.* 1988).

Elektroporasyon, bugüne kadar pek çok bakteride uygulanmıştır. Bu yöntemin en büyük avantajı, herhangi bir şekilde (kimyasal olarak vs.) muamele görmemiş bakteri hücreleri ile bile yapılabilmesidir. Elektrporasyon, diğer methodlarla transforme edilemeyen bakteriler için alternatif bir transformasyon sistemidir. Ancak; optimal şartlar bakteriden bakteriye hatta suştan suşa değişiklik göstermektedir. Kültür ortamı ve üreme fazı, transformasyon frekansını etkilemektedir. Skloserin, penisilin, DL-treonine, glisin ve muramidaz gibi hücre duvarını zayıflatan ajanların ortama ilave edilmesi transformasyon verimini artırmaktadır. Ortamın iyonik kuvveti ve pH'sı, metal iyonlarının ve DNaz inhibitörlerinin ilave edilmesi elektroporetik verimi etkilemektedir. Ancak bakteriler için en önemli parametreler;

elektriksel alan kuvveti, akım süresi ve akımın yani elektriksel uyarının şeklidir. Elektroporasyon, DNA'nın bakteriyel hücrelere aktarılması için pek çok yönteme göre önemli avantajları olan bir sistemdir. Örneğin; kolaydır, hızlıdır, hücreler dondurulup ileriki bir tarihte yeniden kullanılabilmektedir. Ligasyon karışımları ve küçük DNA molekülleri, yüksek frekanslarda transforme edilebilmektedir. Birçok durumda, özel besiyerlerine ve osmotik stablizerlere gerek yoktur (Mercenier and Chassy 1988).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 MATERYAL

3.1.1 Bakteri izolatları

Bu çalışmada kullanılan ve bakteriyosin üreten *Pediococcus acidilactici* PBF suşu ile birlikte çalışma boyunca kullanılan diğer bütüm suşlar Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiş ve Çizelge 3.1 de verilmiştir.

3.1.2 İndikatör bakteriler

Pek çok genus'a ait Gram-pozitif bakteriler çalışma süresince indikatör bakteri olarak kullanılmıştır. Bunların arasında *Lactobacillus, Pediococcus, Enterococcus, Lactococcus,* ve *Leuconostoc* genus'larına ait *Lactobacillus plantarum* NCDO 955*, Pediococcus acidilactici* PedL*, Enterococcus faecalis* MB1, *Leuconostoc mesenteroides* Ly, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* OZ1 gibi patojen olmayan tür ve suşlar bulunmaktadır (Tablo 3.1). *Leuconostoc mesenteroides* Ly *ve Enterococcus faecalis* MB1 gibi patojen olmayan bu suşların çoğu et ve süt ürünlerinin bozulmalarından sorumludur. Bununla beraber gıda kökenli hastalıklara sebep olan ve yine bu çalışmanın bazı aşamalarında indikatör olarak kullanılan suşlarda Çizelge 3.1 de yer almaktadır.

3.1.3 Bakteri kültürleri ve besi ortamları

Bakteriyosin üretimi için kullanılan gıda-kökenli *Pediococcus acidilactici* PBF, bakteriyosin üretmeyen gıda-kökenli *Pediococcus pentosaceous* PD ve Laktik Asit Bakterisi (LAB) genusuna ait diğer tüm suşlarının (*Lactobacillus plantarum* NCDO 955, *Pediococcus acidilactici* PedL, *Enterococcus faecalis* EM1, *Leuconostoc mesenteroides* Ly, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* OZ1) gelişimleri için içerikleri **EK 1**'de verilmiş olan

TGE (trypticase-glucose-yeast extract) besi yerleri kullanılmış ve inkübasyonları 35°C de gerçekleştirilmiştir. LAB generasına ait olmayan, gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan suşların gelişimi için ise içeriği **EK 1** de verilen TE besi yeri kullanılmıştır.

3.1.4 Tampon ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve solüsyonların isimleri ve hazırlanışları **EK 2** de verilmiştir.

3.1.5 Moleküler markör

Çalışmada kullanılan DNA markörı **EK 3**'de verilmiştir.

3.1.6 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları **EK 4**'de verilmiştir.

3.1.7 Kullanılan solüsyon ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışma süresince kullanılan tüm cam malzemelerin sterilizasyonu için pastör fırını (180^oC'de 3 saat), solüsyon ve besi ortamlarının sterilizasyonu için ise otoklav (121^oC'de 15 dakika) kullanılmıştır.

3.1.8 Bakteri kültürlerinin saklanması

İzolatlar uygun sıvı besi ortamında 18 saat geliştirildikten sonra 1ml steril Eppendorf santrifüj tüplerine aktarılarak 10.000 rpm'de 75 sn santrifüj edilir, ardından pellet 1 ml steril distile su ile yıkanarak % 50'lik steril gliserol çözeltisinde -86^oC'de saklanır (Biswas *et al*., 1991).

Çizelge 3.1 Bakteriyal suşlar, gelişimlerinde kullanılan besi ortamları ve gelişim parametreleri

Suşlar	Besi ortamı	Gelişim koşulları
Pediococcus acidilactici PBF (Bac^+)	TGE	35°C, 18 h
Pediococcus pentosaceus LAB (Bac^-)	TGE	35°C, 18 h
Pediococcus pentosaceus PG (Bac^+)	TGE	35°C, 18 h
Pediococcus acidilactici PedL	TGE	35°C, 18 h
Lactobacillus plantarum NCDO 955	TGE	30°C, 24 h
Enterococcus faecalis MB1	TGE	30°C, 24 h
Leuconostoc mesenteroides Ly	TGE buffer	30°C, 24 h
Lactococcus lactis subsp. *lactis* OZ1	TGE buffer	30°C, 24 h
Lactococcus lactis OZ1	TGE buffer	30°C, 24 h
Lactococcus lactis 1403	TGE buffer	30°C, 24 h
Micrococcus luteus RSKK 736	TGE	30°C, 24 h
Listeria innocua	NB	37°C, 24 h
Listeria monocytogenes RSKK 96475	NB	37°C, 24 h
Listeria monocytogenes RSKK 96040	NB	37°C, 24 h
Staphylococcus aureus (GATA1)	NB	37°C, 24 h
Staphylococcus aureus (GATA2)	NB	37°C, 24 h
*Bacillus sphericus*RSKK 382	NB	37°C, 24 h
Bacillus cereus RSKK 709	NB	37°C, 24 h
MRSA 13274 *(Methicillin Resistant Staphylococcus aureus)*	NB	37°C, 24 h
MRSA 13240 *(Methicillin Resistant Staphylococcus aureus)*	NB	37°C, 24 h
Salmonelle enteritidis (GATA)	NB	37°C, 24 h
Escherichia coli RSKK 234	NB	37°C, 24 h
Candida albicans RSKK 02007	NB	37°C, 24 h

3.2 YÖNTEM

3.2.1 *Pediococcus acidilactici* PBF TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

3.2.1.1 Bakteri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi

-86ºC'de %50 gliserol içerisinde muhafaza edilen bakteri stok kültürlerinden uygun besi yerlerine uygun koşullarda ardı ardına 2 kere aktifleştirme işlemi gerçekleştirildikten sonra sıvı besiyerinde gelişen kültürlerin saflığı katı besiyerine çizgi ekim yapılmak suretiyle kontrol edilir ve suşlar *karakterizasyon* ve *DNA izolasyon çalışmaları* için hazır hale getirilir.

3.2.1.2 Ham (crude) bakteriyosin ekstraktının hazırlanması

Pediococcus acidilactici PBF suşuna ait süpernatant sıvısı bir gece inkübasyona bırakılan TGE kültürünün (35ºC'de 18 saat) santrifügasyonu neticesinde (12.000 rpm'de 10 dakika) ve süpernatantın gözenek çapı 0.22 µm olan Sartorius Millipore membrandan filtre edilmesiyle elde edilir. Steril, hücresi-uzaklaştırılmış filtrat içerisinde düşük pH, hidrojen peroksit ve bakteriyofaj'dan kaynaklanabilecek antagonistik etkiyi ortadan kaldırmak için adı geçen sıra dahilinde ısıtılır (95°C de 5 dk), kültür süpernetantının pH sı 1N NaOH ile pH 7.0 ye ayarlanır, katalaz ile muamele edilir ve otoklavlama işlemine tabi tutulur. ***Ham (crude) bakteriyosin ekstraktı*** olarak isimlendirilen bu ekstrakt kullanılacağı zamana kadar -20°C de saklanır.

3.2.1.3 Bakteriyosin üretiminin belirlenmesinde kullanılan temel yöntemler

Bakteriyosin üretiminin gözlemlenmesi için, (i) petri plakada hazırlanan TGE katı agar (TGE broth + 1.5% agar) yüzeyine, içerisine 5µl indikatör bakterinin (*Lactobacillus plantarum* NCDO 955) inoküle edildiği 5 ml TGE yarı katı (soft) agar (TGE broth + 0.75%

agar) yayılır. Her bir dilüsyondan 5µl alınarak **"spot on lawn"** adı verilen nokta ekim metoduyla, önceden indikatörle yüzeye yayma yöntemi (overlay) uygulanmış olan TGE katı agar yüzeyine ekilir veya (ii) **"pour-plate"** yöntemi kullanılarak TGE agar ile karıştırılarak petri plakalara dökülen suşlar yine içerisine 5µl indikatör bakterinin (*Lactobacillus plantarum* NCDO 955) inoküle edilmiş olan 5 ml TGE soft agar ile overlay edilir. Her iki yöntemde de, bir gecelik 35ºC'deki inkübasyonun ardından petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilir (Bhunia *et al.*1991; Biswas *et al.* 1991; Ray, B. 1992a,b).

3.2.1.4 Aktivite ünitesinin (AU) hesaplanması

pHsı nötralize edilen, ısıtılan ve katalaz ile muamele edilen ham (crude) bakteriyosin ekstraktı bakteriyosine hassas indikatör bakteriye (*Lactobacillus plantarum* NCDO 955) karşı essey edilir (Bhunia *et al.*1991; Biswas *et al.* 1991). Bu ekstraktta bakteriyosinin AU/ml değerini belirlemek için bakteriyosin preparasyonu steril deiyonize su ile **1:10 - 1:250** aralığında seri dilüsyona tabii tutulur. 3.2.1.4 de verilen bakteriyosin üretim tespit yöntemlerinden her hangi birinin kullanımı ile ekim yapılır. Bir gecelik 35ºC'deki inkübasyonun ardından her bir kültür ortamına ait AU/ml değeri petri plakada 2mm veya daha fazla büyüme inhibisyon zonu veren en yüksek dilüsyon değerinin 200 (1000 µl/5 µl) ile çarpımı ile hesaplanmaktadır (AU/ml = dilüsyon faktörü x 1000 µl/5 µl) (Yang *et al.* 1992).

3.2.1.5 Ham bakteriyosin ekstraktının antimikrobiyal spektrumu

Pediococcus acidilactici PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin antimikrobiyal aktivite spektrumu ham (crude) bakteriyosin ekstraktının kullanımı ile *Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus* ve *Leuconostoc* genusuna ait patojen olmayan türler ve suşlar ile birlikte gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan ve isimleri Tablo 4.1 de verilmiş olan suşlara karşı 3.2.1.4.de verilen yöntemlerden her hangi birinin kullanımı ile tespit edilmiştir. İnkübasyon koşulları kullanılan indikatör suşa göre değişiklik gösterebilmektedir.

3.2.2 *Pediococcus acidilactici* PBF SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN STABİLİTESİ

Pediococcus acidilactici PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosin molekülünün geniş skalada pH değerleri, ısı, organik çözücüler ve enzimlere karşı stabilitesi "ham (crude) bakteriyosin" kullanımı ile gerçekleştirilmiştir (Bhunia *et al.* 1988).

3.2.2.1 Sıcaklık ile muamelenin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Her ne kadar pek çok çalışma Laktik Asit Bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesinin ısıya-dirençli olduğunu vurgulasa da uzun süre yüksek sıcaklık ile muamele bakteriyosinlerin aktivitelerini düşürmektedir. Bakteriyosinlerin termal-stabilitesi ham (crude) bakteriyosin preparasyonunun 95ºC'de 5 dk, 15 dk, 30 dk, 60 dk ve 121ºC'de 15 dk olmak üzere farklı sıcaklık uygulamalarına tabi tutulması ile belirlenmiştir. Değişik koşullar altında sıcaklığa maruz bırakılan bakteriyosin ekstraktlarının aktiviteleri 3.2.1.4.de verilen yöntemlerden her hangi birinin kullanımı ile 35ºC'de 18 saat inkübasyonun ardından petrilerde inhibisyon zonunun varlığı/yokluğu dahilinde tespit edilmiştir.

3.2.2.2 pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Ham (crude) bakteriyosin preparasyonu de-iyonize su içerisinde konsantrasyon 50mg/ml olacak şekilde çözülür. Bu preparasyonlardan elde edilen numunelerin pH değeri steril 10mM NaOH veya 10mM HCl kullanımı ile 3-12 aralığında ayarlanır ve final bakteriyosin konsantrasyonu 10mg/ml olarak ayarlanır. Numuneler daha sonra (i) 2 saat 25ºC de, (ii) 24 saat 25ºC de ve (iii) 20 dk. 100ºC de inkübe edilir. Her bir numunenin pH değeri steril 4mM fosfat tampon kullanımı ile pH 7.0 olacak şekilde ayarlanır ve antimikrobiyal aktivite için test edilir (Tablo 4.2) (Bhunia *et al.* 1987, Bhunia *et al*., 1988).

3.2.2.3 Enzimler ile muamelenin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Bakteriyosin preparasyonunun proteolitik ve diğer enzimlere karşı hassasiyetini belirlemek için Tablo 4.3 de isimleri verilen enzimler steril 4mM fosfat tamponu, pH 7.0, içerisinde konsantrasyon 200µg/ml olacak şekilde çözdürülür. 10µl ham (crude) bakteriyosin preparasyonu 10µl enzim solüsyonuna eklenir. Kontrol numuneleri sadece tampon solüsyonu içermektedir. Numuneler 35ºC de 1 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra "spot-on-lawn" yöntemi ile bakteriyosin aktivitesi belirlenir.

3.2.2.4 Organik çözücüler ile muamelenin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Tablo 4.4 de isimleri verilen organik çözücülerinin bakteriyosin aktivitesi üzerindeki etkilerine bakılmıştır. 10µl ham (crude) bakteriyosin preparasyonu 10µl organik çözücü ile çözülür. Numuneler 1 saat 25ºC de inkübe edildikten sonra çözücüler uçurulur. Kurutulan numuneler steril de-iyonize su ile tekrardan konsantrasyon 10mg/ml olacak şekilde çözünür ve antimikrobiyal aktivite için test edilir

3.2.3 *Pediococcus acidilactici* PBF SUŞUNDA BAKTERİYOSİN ÜRETİMİNDEN SORUMLU OLAN GENETİK DETERMİNANTLARIN BELİRLENMESİ

3.2.3 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminden sorumlu olan pilazmit DNA nın izolasyonu

Pediococcus acidilactici PBF suşuna ait CCC (Covalently Closed Circular) pilazmit DNA formu Ray ve ark. (Ray *et al*. 1989b) tarafından kullanılan ve Anderson-McKay (1983) ve Klaenhammer (1984) yöntemlerinin modifikasyonu olan yöntem kullanılarak gerçekleştirildi.

Bakteri kültürleri 1 gece öncesinden 5 ml besiyerine aktifleştirilmiştir. Besiyerinde uygun koşullarda 18 saat geliştirilen kültürler tekrar sıvı besiyerine %10 oranında inoküle edilmiştir. Uygun koşullarda tekrar 3–3.5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda steril 2 ml'lik Eppendorf santrifüj tüplerine sıvı kültürden aktarıldıktan sonra 10.000 devir/dk hızda santrifüj yapılmış ve elde edilen hücre çökeltisi kurutulmuştur. Daha sonra pellet üzerine pH 8.0 olan **sakkaroz tamponundan** 379µl ilave edilir ve pellet bu solüsyonda çözülmüştür. Örnekler 37^{o}C'de 5 dakika bekletildikten sonra 96.5µl **lizozim çözeltisi** ilave edilmiş ve tekrar 37^{o}C'de 5 dakika bekletilmiştir. 48.2µl **Tris-EDTA-1** uygulamasından sonra **%20 SDS** çözeltisinden 27.6µl eklenmiştir. Hafif bir karıştırma ardından 37^{o}C'de 10 dakika inkübasyona bırakılarak lizisin tamamlanması sağlanmıştır. Sürenin bitiminde yüksek devirde 30 sn vortekslenen örneklere yeni hazırlanmış **3N NaOH** den 27.6µl ilave edilmiştir. Düz bir zemin üzerinde 10dk. boyunca yavaşça ters düz edilerek karıştırılan örnekler 49.6µl 2 M **Tris-HCl** ilavesi yapıldıktan sonra 3 dk süre ile yine düz bir zeminde karıştırılmıştır. +4^{o}C'de tutulan 5M NaCl çözeltisinden 71.7µl ve **%3 NaCl ile doyurulmuş fenol** çözeltisinden 700µl eklenmiş ve +4^{o}C'de 15.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Steril bir Eppendorfa alınan üst faza 700µl **kloroform/izoamilalkol** eklenmiş ve santrifüj işemi tekrarlanmıştır. Santrifüj bitiminde üst faz alınmış ve eş hacimde izopropanol ile muamele edilmiştir. Ekstraktlar -20^{o}C'de 1 gece bekletilmiş daha sonra 15.000 rpm'de 20 dk. santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Sonuçta oluşan DNA çökeltisi kurutulmuş ve 20µl **Tris-EDTA–2** içerisinde çözülmüş elektroforez

işlemine kadar -20^{o}C'de saklanmıştır. Elektroforez işleminden önce **RNazA** stok çözeltisinden 2µl ilave edilerek 37^{o}C'de 45 dk dry block içerisinde inkübe edilerek yüklemeye hazır hale getirilmiştir (Maniatis *et al.* 1986).

3.2.3.2 Bakteriyosin üretim özelliğinin (Bac^{+}) pilazmit DNA varlığı ile korolasyonu (PLASMID CURING)

Bu aşamada; bakteriyosin üretme özelliğini (Bac^{+}) spesifik bir pilazmit DNA'nın varlığına bağlayabilmek için standart **"pilazmit giderim" (curing)** çalışmaları yapılmıştır. Bakteriyosin aktivitesinin eliminasyonu bakteriyosin üreten suşun acriflavine (25 µg/ml'a kadar), ethidium bromide (3-25 µg/ml) veya novabiocin (25 µg/ml'a kadar) içeren TGE besi ortamında 24 saat aralıklarla ardı ardına gerçekleştirilen 3 transferin ardından (Miller 1972) ya da kültürlerin 50°C de 24 saat gelişimi neticesinde sağlanmaktadır (Ray *et al.* 1989b). Çalışmamızda bu amaçla TGE sıvı besi yeri hazırlanmış, 121°C'de 15 dakika sterilizasyondan sonra bu ortama 25µg/ml olacak şekilde EtBr eklenerek 0.22µm lik membran filtreden geçirilmiştir. Bakteriyosin üretme özelliğini elimine edebilmek için *Pediococcus acidilactici* PBF suşu EtBr lü besi ortamına inoküle edilmiş ve 35°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Bu işlem 3 kez ardı ardına tekrar edilmiştir. 3. günün sonunda gelişen kültürden seyreltmeler yapılmış ve seyreltilen hücrelerin petrilerdeki katı besi yerine ekimi **"pour plate" (dökme)** yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 35°C'de 1 gece inkübasyonun ardından içlerinde yaklaşık 50-100 koloni içeren petrilere indikatör bakteri *Lactobacillus plantarum NCDO 955* ekilerek 1 gün inkübasyona bırakmış ve indikatör bakteriye karşı önceden var olan bakteriyosin üretme aktivitesinin kaybı kontrol edilmiştir. Bu tür hücreler daha sonra bakteriyosin-negatif veya bakteriyosin-üretmeyen (Bac^{-}) mutant olarak isimlendirilir.

Petriden alınan Bac^{-} hücreleri agaroz jel elektroforez üzerinde Bac^{+} olan hücrelerle beraber koşturularak her iki hücre arasındaki pilazmit bantları kıyaslanarak bakteriyosin üretiminden sorumlu olan gen tespit edilerek moleküler ağırlığı belirlenmiştir. Yatay agaroz

jel elektroforez üzerinde koşturulan örnekler EtBr ile boyanarak UV transilluminatör üzerinde gözlemlenir ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere fotoğrafı çekilir.

3.2.3.3 Bakteriyosine direnci kodlayan immunity geninin pilazmit DNA ile bağlantısı

İki özelliğin birbiri ile bağlantılı olabilme olasılığı, bakteriyosin üretimi (Bac^+) ve konukçu hücrenin bakteriyosine direnci (immünitesi) (Imm^+), bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Yüzeyine "overlay" yöntemi ile Bac^- mutantların yayılmış olduğu TGE katı besi yeri üzerine taze gelişmiş kültürden 5 µl alınarak "spot-on-lawn" yöntemi ile nokta ekim yapılır. 35°C de bir gece inkübasyondan sonra bakteriyosin üreten suşun (Bac^+) bakteriyosin üretmeyen suş (Bac^-) üzerindeki etkisi Bac^- suştaki gelişim inhibisyonunun varlığı/yokluğu şeklinde kontrol edilir.

3.2.3.4 Agaroz jel elektroforez:

Pilazmit DNA örneklerinin elektroforezi % 0.7 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Meyers *et al.* 1976; Maniatis *et al.* 1986). Yatay jel elektroforezi için agaroz, kullanılan sistemin büyüklüğüne göre 100-150ml **Tris-Borik asit-EDTA (TBE)** elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. 45^oC' ye kadar soğutulan jele 5µl miktarda Etidyum bromit solüsyonundan eklenmiş ve homojen karışım sağlandıktan sonra elektroforez plakalarına aktarılıp, taraklar yerleştirilmiş, bir saat jelin donması için beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin yüzeyini kapatacak şekilde tampon çözelti ilave edilmiştir. Jelin hasar görmemesine dikkat edilerek tarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. RNaz ile muamele edilmiş DNA örneği (20 µl) dry bloktan alınarak 5µl **yükleme boya çözeltisi** ile karıştırılmış ve mikropipet yardımı ile kuyucuklara yüklenmiştir (Walsh and McKay, 1980). Elektroforez 90V'da 1-1.5 saat süreyle yapılmıştır. Markör olarak "**supercoiled DNA ladder"** kullanılmıştır. 3µl DNA ladder 2µl yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme boyası jeli terk ettikten sonra akım kesilmiş ve agaroz jeli, KODAK jel görüntüleme cihazına yerleştirilerek 366nm dalga

boyunda UV ışığı altında incelenmiştir (Macrina *et al*. 1982; Sambrook and Russell 2001). Fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.5 Pilazmit DNA ların moleküler ağırlıklarının belirlenmesi

Pediococcus acidilactici PBF suşundan izole edilen pilazmidlerin büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler büyüklükleri bilinen CCC (covalently closed circular) DNA markörünün (Supercoiled DNA ladder) elektroforetik hareketleri ile büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanıldı. Kullanılan CCC DNA markörünün agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğrileri çıkarılmıştır. İstatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek agaroz jeldeki fragmentlerin büyüklükleri saptanmıştır (Macrina *et al.* 1978, Elder and Southern 1983). Bunlar dikkate alınarak hazırlanan KODAK GL200 software analiz proğramının yardımı ile bilinmeyen fragmentlerın büyüklükleri hesaplanmıştır.

3.2.3.6 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda sukroz fermentasyonu

Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan *Pediococcus acidilactici* PBF'nın sükroz testinde; TGE sıvı besiyerinden farklı olarak, glukoz yerine sükroz kullanılan "Tripton-Sükroz Sıvı" besiyeri hazırlanmıştır. Bu besiyerine indikatör boya olarak fenol red eklenmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu, 5 ml tripton-sükroz sıvı besiyerine 5 µl olacak şekilde aktifleştirilerek 35ºC'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bununla birlikte, deneyin kontrölünün sağlanması amacıyla bir diğer tripton sükroz sıvı besiyeri aktifleştirme yapılmadan inkübe edilmiştir. Bir gecelik 35ºC'deki inkübasyonun ardından tüplerde renk değişimi olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.4 *Pediococcus acidilactici* PBF SUŞUNDA BAKTERİYOSİN ÜRETİMİNDEN SORUMLU GENİN ELEKTROPORASYON İLE AKTARIMI

3.2.4.1 Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan pilazmit DNA nın agaroz jelden ekstraksiyonu

Laktik asit bakterilerinden olan *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun pilazmit DNA'sı, % 0.7 agaroz içeren jelde 90V'da 1-1.5 saat süreyle yürütülmüştür. UV transsimilatör cihazı altında, ilgilenilen bantlar tek tek jelden kesilerek alınmıştır. Jelden alınan bantlar, önceden tartılmış ve bu şekilde darası alınmış olan steril Eppendorf santrifüj tüplerine aktarılarak hassas terazide tartılmıştır. Bundan sonraki aşamalar "**ROCHE-Agarose Gel DNA Extraction Kit"** kullanım kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. Her 100 mg'lık agoroz jel miktarına 300 µl olacak şekilde **agaroz çözme tamponu** eklenmiştir. Ardından **silika süspansiyonu**ndan 10 µl eklenerek 56-60°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Her 2-3 dakikada bir vortekslenerek karıştırılmıştır. Süre bitiminde karışım, 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üst faz atılmış, matriks üzerine 500 µl **nükleik asit bağlanma çözeltisi** ilave edilmiş ve vortekslenerek homojenizasyon sağlanmıştır. Karışım tekrar 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Bu kez pellet, önceden 80 ml saf etanol eklenmiş olan **yıkama solüsyonu**nun 500 µl'si ile yıkanmış ve 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir. Santrifüj işleminin bitiminde, süpernatant uzaklaştırılmış ve kuruması için pellet 15 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Pellet üzerine, 40 µl TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH: 8.0) tamponu eklenmiş ve 56-60°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İçerik, her 2-3 dakikada bir vortekslenerek karıştırılmıştır. Ardından, 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 30 µl yeni bir Eppendorf tüpüne alınmıştır. Bunun 20 µl'si % 0.7 oranında agaroz içeren jelde 90V'da 1-1.5 saat süreyle yürütülmüştür. Bu şekilde; saflaştırma işlemi doğrulanmıştır. *Pediococcus acidilactici* PBF suşundan jel pürifikasyon yöntemi ile saflaştırılan pilazmit preparasyonu **"pPF1.0"** olarak isimlendirilmiş ve çalışmaların ileriki aşamalarında kullanılana kadar -20^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.4.2 pPF1.0'ın elektroporasyon ile Bac$^-$ *Pediococcoccus pentosaceous* LAB suşuna transformasyonu

Laktik asit bakterilerinden olan *Pediococcus pentosaceous* LAB suşu (Bac$^-$ Bac^S), bakteriyosin üretmediği için bakteriyosin üretimini kodlayan genin (pPF1.0) aktarımının yapılacağı hücre olarak seçilmiş ve saflaştırılmış pPF1.0 (bakteriyosin üretimi neden sorumlu olan pilazmit) geni elektroporasyon ile alıcı *Pediococcus pentosaceous* LAB suşuna aktarılmıştır.

Pediococcus pentosaceous LAB suşunun aktarım yapılacak hücre olarak hazırlanması için öncelikle; bakteri kültürleri 1 gece öncesinden 5 ml TGE sıvı besiyerine 5 µl olacak şekilde aktifleştirilmiştir. Besiyerinde 35ºC'de 18 saat geliştirilen kültürler, TGE sıvı besiyerine 100 ml'ye 5 µl olacak şekilde inoküle edilmiş ve OD_{600}= 0.6 olana kadar (yaklaşık 5 saat) 35ºC'de inkübe edilmiştir. OD_{600}= 0.6'ya ulaştığında kültür falcon tüplerine aktarılarak 4.000 g. hızda 10 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletler 10 ml **elektroporasyon tamponunda** 3 kez yıkanmıştır ve son pellet, 1 ml elektroporasyon tamponunda çözülmüştür. Ardından, steril Eppendorf marka santrifüj tüpüne (2 ml'lik) aktarılmış, üzerine 500 µl filtre ile steril edilmiş **lizozim** eklenerek 37ºC'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, 4.000 g. hızda 10 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletler 400 µl **elektroporasyon tamponunda** 3 kez yıkanmıştır. Elektroporasyon küvetine transfer edilen hücre süspansiyonu 5 dk buzda bekletildikten sonra yaklaşık 1-10 µg DNA içeren 40µl buzda soğutulmuş saf pilazmit (pPF1.0) preparasyonu ile karıştırılmıştır.

Pilazmit içermeyen *Pediococcus pentosaceus* LAB/saflaştırılmış pPF1.0 karışımına en yüksek değerde (2.5 kV, 25µF, ve 200 ohms) tek bir pulse verildi. Hemen 1 ml TGE sıvı besi yeri küvete eklendi, pipet ile resuspend edildi ve steril bir tüpe aktarılarak 37ºC'de 1 saat inkübe edildi. pPF1.0 ile elektrotransforme edilen *Pediococcus pentosaceus* LAB suşu *Pediococcus pentosaceous* PG olarak isimlendirildi ve bu suşa ait hücreler seri dilüsyona tabi tutularak TGE katı besi yerine ekildi (Bukhtiyarova *et al.* 1994).

Transformantların (pPF1.0 taşıyan) bakteriyosin üretme becerisi TGE katı besi yerinde indikatör *Lactobacillus. plantarum* NCDO 955 suşuna karşı test edilmiştir. Bakteriyosin üreten koloniler saflaştırılarak pilazmit profillerine bakılmıştır.

3.2.4.3 Pilazmit profillerinin karşılaştırılması

Bac^+ *Pediococcus acidilactici* PBF, Bac^- *Pediococcus pentosaceous* PD ve Bac^+ *Pediococcus pentosaceous* PG (Elektrotransfer sonrası pPF1.0 taşıyan *Pediococcus pentosaceous* LAB) suşları TGE besi yerinde OD değerleri 0.55-0.6 olana kadar geliştirildi. Hücreleri lize etmek için solüsyona lizozim ve mutanolizin ilave edildi ve bakteriyosin üretiminden sorumlu olan pilazmit DNA nın izolasyonu için kullanıldı. DNA örneklerine (20µl) 5µl yükleme boya çözeltisi eklenerek mikropipet yardımı ile kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez 90V'da 1-1.5 saat süreyle yapılmıştır. Markör olarak **"supercoiled DNA ladder"** kullanılmış. 3µl DNA ladder 2µl yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme boyası jeli terk ettikten sonra akım kesilmiş ve agaroz jeli, KODAK jel görüntüleme cihazına yerleştirilerek 366nm dalga boyunda UV ışığı altında incelenmiştir (Macrina *et al*. 1982; Sambrook and Russell 2001). Fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Ham (crude) bakteriyosin ekstraktının hazırlanması

Pediococcus acidilactici PBF suşuna ait süpernatant sıvısı bir gece inkübasyona bırakılan TGE kültürünün (35ºC'de 18 saat) santrifügasyonu neticesinde (12.000 rpm'de 10 dakika) ve süpernatantın gözenek çapı 0.22 µm olan Sartorius Millipore membrandan filtre edilmesiyle elde edilir. Steril, hücreden-uzaklaştırılmış filtrat içerisinde düşük pH, hidrojen peroksit ve bakteriyofaj'dan kaynaklanabilecek antagonistik etkiyi ortadan kaldırmak için adı geçen sıra dahilinde ısıtılır (95°C de 5 dk), kültür süpernetantının pH sı 1N NaOH ile pH 7.0 ye ayarlanır, katalaz ile muamele edilir ve/veya otoklavlama işlemine tabi tutulur. ***Ham (crude) bakteriyosin ekstraktı*** olarak isimlendirilen bu ekstrakt kullanılacağı zamana kadar -20°C de saklanır.

4.2 *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin antimikrobiyal etki spektrumu

Pediococcus acidilactici PBF tarafından üretilen antimikrobiyal madde isimleri Tablo 4.1 de verilen ve gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok farklı Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriye karşı denenmiş ve bu çalışmanın sonucunda bu suş tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok Gram-pozitif bakteriye karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, *Escherichia coli* ve *Yersinia enterocolitica* gibi çalışmada kullanılan Gram-negatif bakteriler bu suş tarafından üretilen antimikrobiyal maddeden etkilenmemiştir (Çizelge 4.1).

Laktik asit bakterilerine ait *Lactobacillus plantarum* NCDO 955, *Pedioocus acidilactici* Ped L, *Lactococcus lactic* subsp. *lactis* OZ 1, *Enterococcus faecalis* MB1 ve *Leuconostoc mesenteroides* Ly gibi değişik indikatör suşlar *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddeye karşı duyarlılıkları açısından test edilmiş ve çalışmada kullanılan tüm laktik asit bakteriyal indikatör suşları *Pedioocus acidilactici*

PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddeye karşı duyarlı bulunmuştur (Şekil 4.1a). Bu veriler *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşunun çalışmanın geri kalanında indikatör olarak seçilmesine olanak sağlamıştır. Ham hücresiz supernatat kültür sıvılarında antimikrobiyal madde ekstraktının aktivitesi 30,000 AU/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.1b).

4.3 Antimikrobiyal maddenin tabiatı

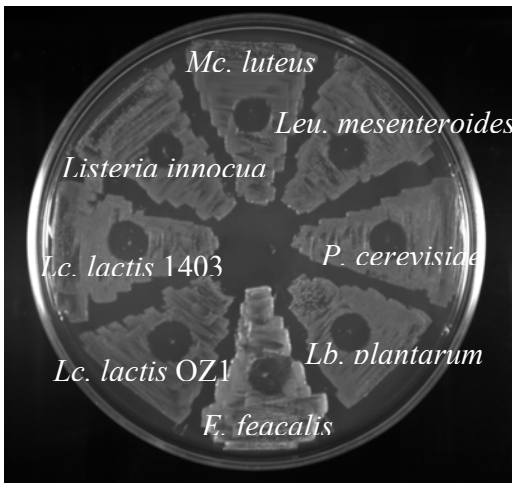
Pediococcus acidilactici PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin *Lactobacillus plantarum N*CDO 955 suşuna karşı sergilemiş olduğu inhibisyon etkisi Şekil 4.2 de verilmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bu antimikrobiyal maddenin bakteriyosin olup olmadığını belirlemek için ham ekstrakt çeşitli muamelelere maruz bırakılarak aktivitede bir kayıp olup olmadığı kontrol edildi.

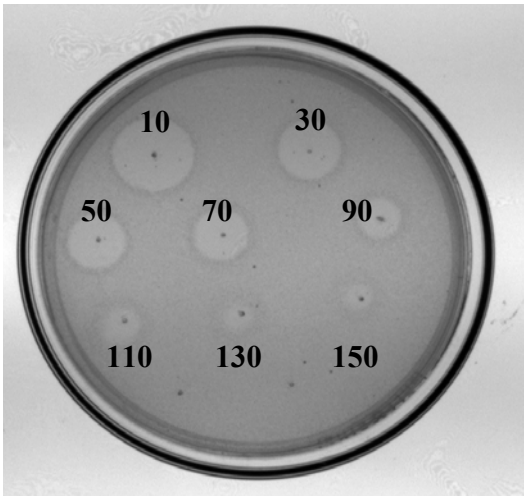
4.3.1 Sıcaklık

Pediococcus acidilactici PBF tarafından üretilen antimikrobiyal madde sıcağa karşı oldukça dirençli olup 121°C de 15 dk muamele neticesinde bile oldukça yüksek antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Bununla beraber, otoklavlama işleminden sonra suş tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesinde bir miktar azalma söz gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Bununla beraber, 90°C de 5, 15, 30, 60 dk ve 121°C de 15 dk muamele neticesinde antimikrobiyal aktivite kaybı gözlenmemiştir.

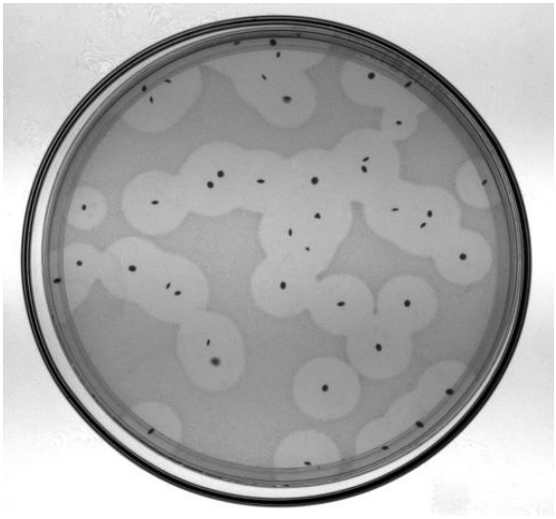
Çizelge 4.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivite spektrumu

Bakteri türleri	Antimikrobiyal madde aktivitesi
Lactobacillus plantarum NCDO 955	+
Pediococcus acidilactici Ped L	+
Enterococcus faecalis MB1	+
Leuconostoc mesenteroides Ly	+
Lactococcus lactis subsp. *lactis* OZ1	+
Lactococcus lactis OZ1	+
Lactococcus lactis 1403	+
Micrococcus luteus RSKK 736	+
Listeria innocua	+
Listeria monocytogenes RSKK 96475	+
Listeria monocytogenes RSKK 96040	+
Listeria ivanovii	+
Staphylococcus aureus (GATA1)	+
Staphylococcus aureus (GATA2)	+
Bacillus sphericus RSKK 382	+
Bacillus cereus RSKK 709	+
MRSA 13274 *(Methicillin Resistant Staphylococcus aureus)*	+
MRSA 13240 *(Methicillin Resistant Staphylococcus aureus)*	+
Salmonelle enteritidis (GATA)	+
Staphylococcus aureus (gıda izolatımız)	+
Clostridium perfringens (gıda izolatımız)	+
Bacillus subtilis (gıda izolatımız)	+
Bacillus cereus (gıda izolatımız)	+
Yersinia enterocolitica (gıda izolatımız)	-
Escherichia coli RSKK 234	-
Candida albicans RSKK 02007	-

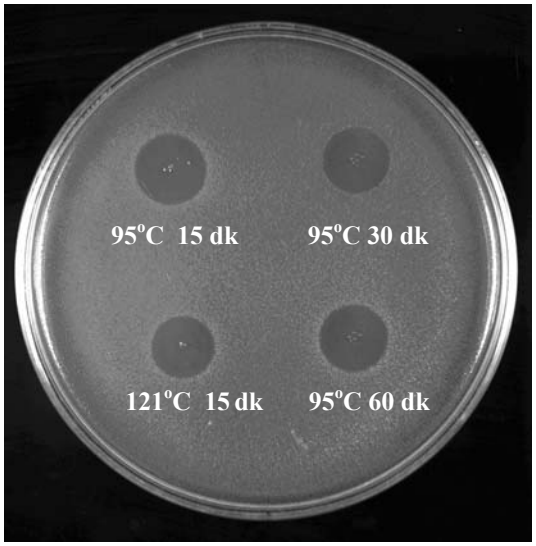




Şekil 4.1 **(a)** *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin çeşitli indikatörlere karşı sergilemiş olduğu antimikrobiyal etki spektrumu **(b)** Ham ekstraktın kullanımı ile belirlenen Aktivite Ünitesi (AU). Sıcaklık ile muamele edilen ham ekstrakt steril su ile 1:10-1:250 arasında seri dilüsyona tabi tutuldu ve her bir dilüsyondan alınan 5µl yüzeyi *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 ile overlay edilmiş katı besi ortamının yüzeyine nokta-ekim yapıldı. Bir gece inkübasyondan sonra, plakalar noktaların etrafında zon oluşumu açısından gözlemlendi ve net bir zon oluşumu sağlayan en yüksek dilüsyon preparasyondaki AU/ml değerini belirleyebilmek için 200 (1000 µl/5 µl) ile çarpıldı. *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin AU değeri 1:150 dilüsyonunda zon oluştorduğu için 30.000 AU/ml olarak belirlendi.



Şekil 4.2 *Pediococcus acidilactici* PBF kolonileri tarafından üretilen bakteriyosinin indikatör *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı oluşturmuş olduğu inhibisyon zonları



Şekil 4.3 *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin değişik sıcaklıklar ile muamele neticesinde *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı sergilemiş olduğu aktivite

4.3.2 pH

Pediococcus acidilactici PBF tarafından üretilen antimikrobiyal madde etkisinin pH 3 ile 7 arasında en etkili olduğu, pH 3 altında ve 7 üzerinde kısmen kaybolduğu, pH 9 ve 10 üzerinde ise tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.2). Yüksek pH'da aktivitenin kaybolması moleküllerin degredasyonuna bağlı olabilir. pH 6-7 altında gözlenen yüksek aktivitenin ise bu katyonik moleküllerde pozitif yüklerin sayısındaki artıştan kaynaklanan agregasyondaki azalmadan kaynaklandığı düşünülebilir. Bu durum ise bakterisidal etki için mevcut daha fazla sayıda molekül sağlayabilmektedir. Hazırlanan antimikrobiyal madde preparasyonunun antimikrobiyal aktivitesinin (AU/ml) düşük pH'da yüksek, pH 6.0 ve altında ise düşük olduğu gözlenmiştir. Düşük pH'da ki (pH 5.0 ve altında) yüksek aktivite, düşük pH'da yüksek antimikrobiyal madde çözünülürlüğüne veya yine düşük pH da bakteriyal suşların antimikrobiyal maddeye duyarlılığının yüksek olmasına bağlı olabilir. pH 10 ve üzerindeki inkübasyon haricinde gerçekleştirilen inkübasyonlar neticesinde antimikrobiyal aktivitede kayıp gözlenmemiştir (Tablo 4.2).

4.3.3 Enzimler

Pediococcus acidilactici PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesi α-kemotripsin, tripsin, papain, fisin ve IV, XIV, XXIV proteazları gibi proteolitik enzimler ile inkübasyon neticesinde tümüyle kaybolmuştır (Şekil 4.4a). RNaz, DNaz, lizozim, lipaz, fosfolipaz C ve katalaz ile muamele bu suş tarafından üretilen antimikrobiyal aktiviteyi etkilememiştir (Şekil 4.4a ve Çizelge 4.3). Çalışmada kullanılan proteolitik enzimlerin tamamı *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal aktivitesinin kaybına sebep olmuştur. *Protezlarla antimikrobiyal aktivitenin inaktivasyonu suş tarafından üretilen ve antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olan bu maddenin antimikrobiyal peptit ya da bakteriyosin olabileceğini göstermektedir.*

4.3.4 Organik çözücüler

Pediococcus acidilactici PBF tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesi aseton, asetonitril, kloroform, etilalkol, formaldehit, hekzan ve izopropanol gibi organik çözücüler ile inkübasyon neticesinde kaybolmamıştır (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4b).

Çizelge 4.2 Geniş bir skaladaki pH değerlerinin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri

	Aktivite*		
pH	25°C de 2 saat	25°C de 24 saat	121°C de 15 dk
3.0	+	+	+
4.0	+	+	+
5.0	+	+	+
6.0	+	+	+
7.0	+	+	+
8.0	+	+	+
9.0	+	+	+
10.0	+	-	-
11.0	-	-	-
12.0	-	-	-

* *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşunun indikatör olarak kullanıldığı ve nokta-ekim yöntemi ile aktivitenin kontrol edildiği çalışma neticesinde +, antimikrobiyal aktivitenin varlığını; - , aktivitenin kaybını ifade etmektedir.

Çizelge 4.3 Değişik enzimlerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri

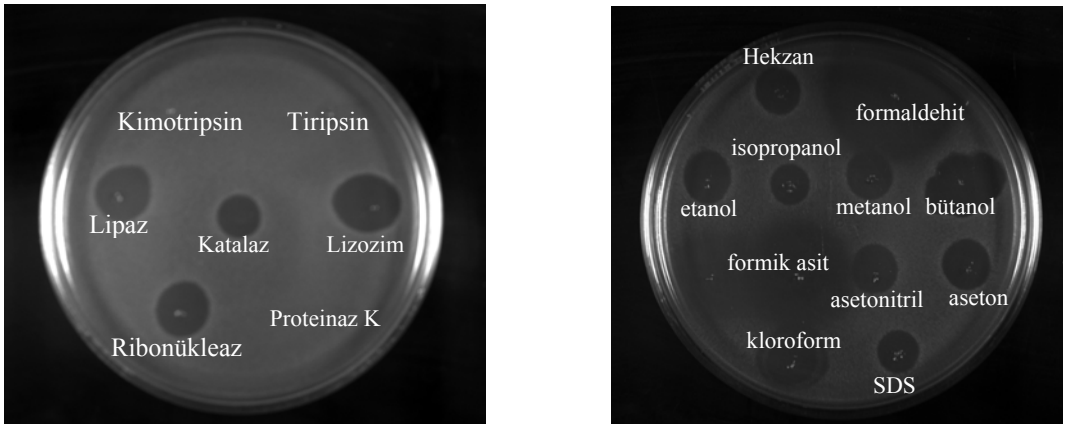
Yapılan işlem	Bakteriyosin aktivitesi
Chymotrypsin	-
Catalase	+
DNase	+
Ficin	-
Lipase	+
Lysozyme	+
Papain	-
Protease K	-
RNase	+
Trypsin	-

* *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşunun indikatör olarak kullanıldığı ve nokta-ekim yöntemi ile aktivitenin kontrol edildiği çalışma neticesinde +, antimikrobiyal aktivitenin varlığını; - , aktivitenin kaybını ifade etmektedir.

Çizelge 4.4 Değişik organik çözücülerin *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki etkileri

Yapılan işlem	Bakteriyosin aktivitesi
Acetone	+
Acetonitrile	+
Chloroform	+
Formaldehyde	+
Hexane	+
Isopropanol	+
Formik asit	+
Etanol	+
Metanol	+
Bütanol	+
SDS	+

* *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşunun indikatör olarak kullanıldığı ve nokta-ekim yöntemi ile aktivitenin kontrol edildiği çalışma neticesinde +, antimikrobiyal aktivitenin varlığını ifade etmektedir.



Şekil 4.4 Bazı enzim (a) ve organik çözücülerin (b) *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyal madde üzerindeki inhibisyon etkileri

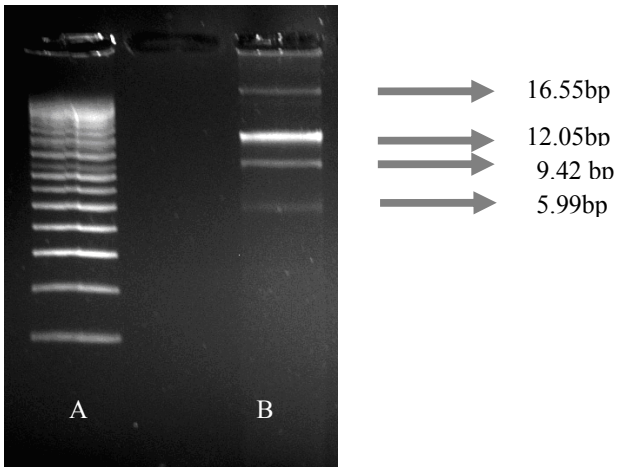
4.4 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda antimikrobiyal madde ("bakteriyosin") üretiminden sorumlu olan genetik determinantların belirlenmesi

Laktik asit bakterileri genelde bakteriyosin üretmek ve bakteriyosin üreten hücrelerin üretmiş oldukları bakteriyosinlere karşı immünitelerini muhafaza etmek için pilazmit-kökenli genetik belirleyicilere sahiptir (Klaenhammer 1993). Biz de çalışmamıza izole ettiğimiz *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda antimikrobiyal madde ("bakteriyosin") üretiminden sorumlu olan genin pilazmit DNA üzerinde olduğunu düşünerek başladık.

4.4.1 *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretimi ile ilgisi olabilecek pilazmit DNA'nın izolasyonu

Pediococcus acidilactici PBF suşuna ait CCC (Covalently Closed Circular) pilazmit DNA formu Ray ve ark. (Ray *et al*. 1989b) tarafından kullanılan ve Anderson-McKay (1983) ve Klaenhammer (1984) yöntemlerinin modifikasyonu olan yöntem kullanılarak yapılmıştır. Suş pilazmit DNA varlığının test edilebilmesi için lizozim karışımı ile lize edilmiş ve jel üzerinden pürifiye edilmiş pilazmit DNA nın elektroforezi % 0.8 agaroz içeren jelde TBE elektroforez tamponu kullanılarak yapılmış ve agaroz jeli KODAK jel görüntüleme

cihazına yerleştirilerek 366 nm dalga boyunda UV ışığı altında incelenmiştir. Fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Çalışmanın neticesinde Pediococcus acidilactici PBF suşunda moleküler ağırlıkları toplam 4 adet pilazmit DNA varlığı tespit edilmiştir* (Şekil 4.5).



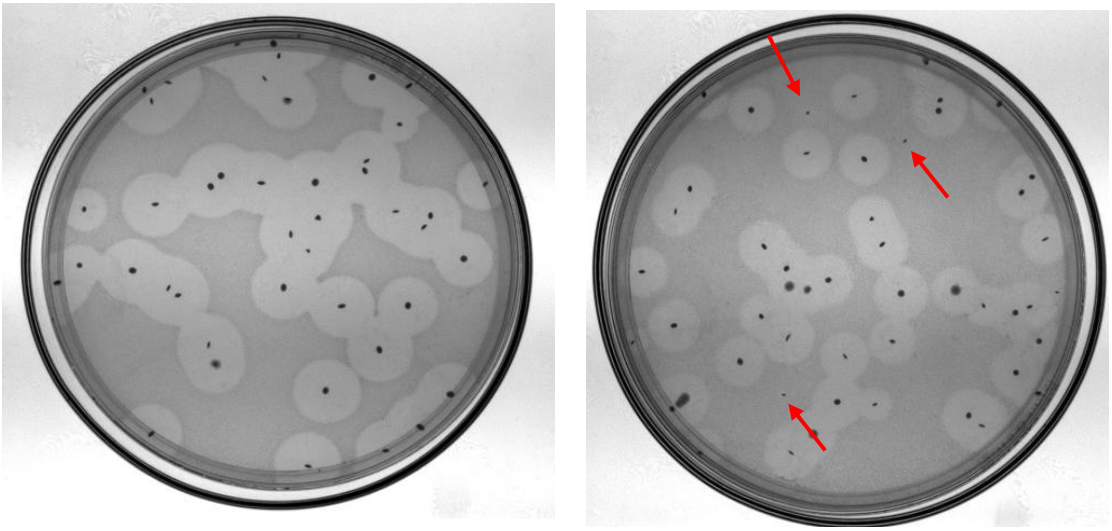
Şekil 4.5 A kuyucuğunda moleküler markör olarak kullanılan ve her bir bandın moleküler ağırlığının 16.2 kbp ile 2.1 kbp arasında olduğu DNA supercoiled DNA, B kuyucuğunda ise parental *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun pilazmit profili yer almaktadır

4.4.2 Bakteriyosin üretim özelliğinin pilazmit varlığı ile korolasyonu:

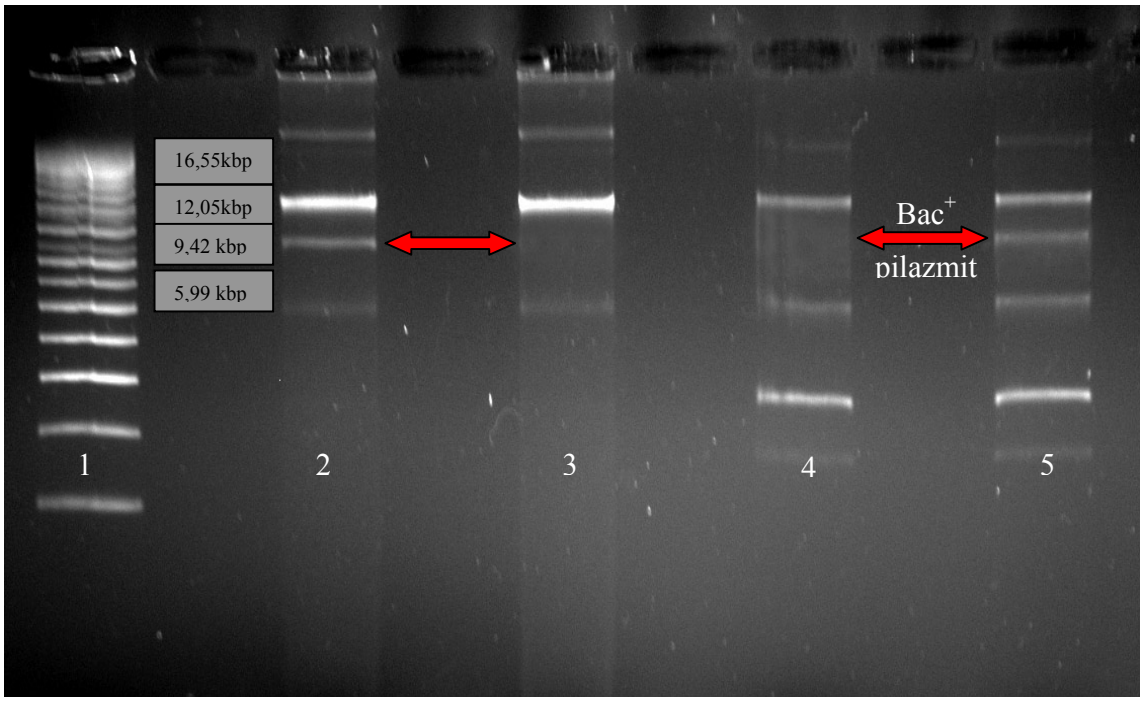
Bakteriyosin üretme özelliğini (Bac^+) spesifik bir plazmit DNA'nın varlığına bağlayabilmek için standart plazmit giderim (curing) çalışması yapılmıştır. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde (bakteriyosin) üretme özelliğini elimine edebilmek için suş EtBr içeren TGE besi yerinde inkübasyona bırakılmış, daha sonra seyreltilen hücrelerin petrilerdeki katı besi yerine ekimi "pour plate" yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlemi takiben, içlerinde 50-100 koloni içeren petrilere indikatör bakteri (*Lactobacillus plantarum* NCDO 955) ekilerek 1 gün inkübasyona bırakılmış ve

indikatör bakteriye karşı önceden var olan bakteriyosin üretme aktivitesinin kaybı kontrol edilmiştir. Bu arada suşa ait her bir koloninin bakteriyosin üretme özelliği belirlendikten sonra (Şekil 4.6a) bu tür bakteriyosin üretme özelliğini kaybetmiş olan koloniler *Bac*$^-$ veya *mutant* olarak isimlendirilmiştir (Şekil 4.6b). Petriden alınan Bac$^-$ hücreleri agaroz jel elektroforez üzerinde Bac$^+$ olan hücrelerle beraber koşturularak her iki hücre arasındaki plazmit bantları kıyaslanmış ve bakteriyosin üretiminden sorumlu olan gen tespit edilerek moleküler ağırlığı 9.42 kbp olarak belirlenmiştir.

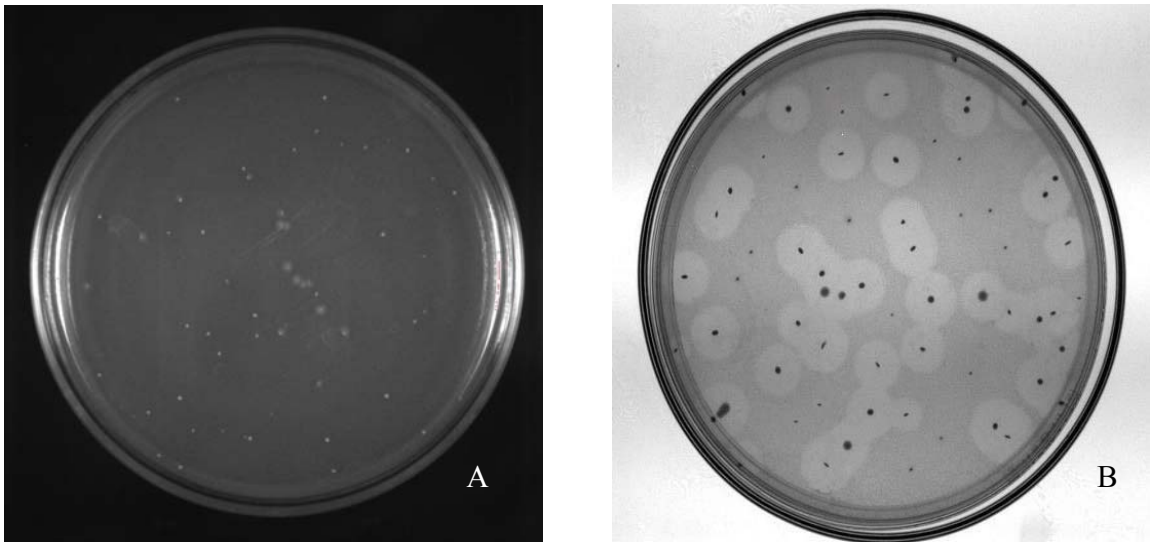
Çalışmamızda aynı zamanda iki özelliğin birbiri ile bağlantılı olabilme olasılığı da, bakteriyosin üretimi (Bac$^+$) ve bakteriyosine karşı konukçu hücre direnci (immunite) (Imm$^+$) çalışıldı. *Pediococcus acidilactici PBF suşundan elde edilen Bac$^-$ mutantın gelişimi parental suş tarafından inhibe edilmemiştir.*



Şekil 4.6 **(a)** *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 suşuna karşı bakteriyosin üreten *Pediococcus acidilactici* PBF kolonileri. **(b)** 20 µg /ml EtBr içeren TGE besi ortamında birbirini takip eden üç aktifleştirme neticesinde *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda antimikrobiyal madde ("bakteriyosin") üretiminden sorumlu olan pilazmit DNA gideriminin *Lactobacillus plantarum N*CDO 955 suşunun indikatör olarak kullanıldığı çalışmada gösterimi. Net, şeffaf bir zon tarafından çevrilen koloniler Bac^+ olarak isimlendirildi ve bakteriyosin üretiminden sorumlu olan 9.42 kbp ağırlığında pilazmit DNA ya sahip olduğu gösterildi. Bununla beraber oklar ile de gösterildiği gibi bakteriyosin üretme aktivitesini kaybeden suşlar Bac^-, olarak isimlendirildi ve çalışmanın bir sonraki aşamasında 9.42 kbp lik bu pilazmit DNA ya sahip olmadığı gösterildi.



Şekil 4.7 *Pediococcus acidilactici* PBF suşundan elde edilen saflaştırılmış pilazmit DNAnın agaroz jel elektroforezi. Kuyu 1; supercoiled ladder DNA, Kuyu 2; parental *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda pilazmit profili, Kuyu 3; pilazmit giderim çalışması neticesinde (Bac^-) mutant koloniden elde edilen pilazmit DNA profili, Kuyu 4; Bakteriyosin üretmeyen *Pediococcus pentosaceous* LAB suşuna ait pilazmit profili, Kuyu 5; Elektroporasyon neticesinde saflaştırılmış pPF1.0 pilazmitine sahip olan ve bakteriyosin üretme yeteneğini (Bac^+) kazanan *Pediococcus pentosaceous* PG suşu.



Şekil 4.8 (a) Bakteriyosin üretmeyen *Pediococcus pentosaceus* LAB, (b) elektroporasyon neticesinde saflaştırılmış pPF1.0 pilazmitine sahip olan ve bakteriyosin üretme yeteneğini kazanan *Pediococcus pentosaceous* PG suşu. Çalışmada indikatör olarak *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 kullanılmış ve bazı kolonilerin etrafında zon oluşturduğu gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde gıdaların raf ömrünü uzatabilmek için gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar gıda katkı maddelerinin (antioksidanlar, tatlandırıcılar, renklendiriciler vs.) tüketici sağlığında çeşitli problemlere sebep olduğunu göstermiştir. Çoğu kimyasal madde kökenli olan gıda katkı maddeleri insanlarda özellikle allerji, astım, ürtiker, damar problemleri ve hatta kansere sebep olmaktadır. Bu nedenle tüketiciler katkısız ya da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen standartlardaki gıdaları tercih etmektedirler. Bazı gıda katkı maddelerinin kanserojen özelliklerinin ortaya çıkmasından dolayı birçok ülke ekolojik tarıma yönelmiş ve katkısız doğal ürünler elde etmeye başlamıştır. Ancak bu ürünlerin maliyetinin çok yüksek olması tüketici talebini azaltmaktadır.

Tüketicilerin son zamanlarda ticari olarak üretilen ve gıda kökenli olmayan koruyucularla saklanmş gıdalara olan tepkisi biyolojik kökenli olan sağlıklı ve gıda orjinli (doğal) koruyucuların (biyoprezervatif) keşfine ait bir yol oluşturmuştur. Doğal koruyucuların memeliler üzerinde herhangi bir yan etkisinin olmaması bunların güvenilir bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır.

Antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılan maddelerden biri de Laktik Asit Bakterileri (LAB) tarafından üretilen **bakteriyosin**dir. Laktik Asit Bakterileri gıda fermentasyonunda önemli rol oynayan Gram-pozitif bakterilerdir. *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus, Enterococcus* ve *Leuconostoc* grupları ile temsil edilmektedir. LAB'leri, gıda ürünlerinin tat, lezzet, yumuşaklık/sertlik ve sıklıkla da besin değerlerine katkıda bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların sahip oldukları ekonomik önem hem endüstri hem de bilim dünyasında artan bir ilgi yaratmıştır. Özellikle son yıllarda LAB'nin bazı önemli özelliklerini hem genetik hem de moleküler bakımdan açıklığa kavuşturabilmek için çalışmalar devam etmektedir. *LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinin protein yapısında olması ve bakteriyosin üreten LAB'lerinin fermente edilmiş gıda ürünlerinde doğal olarak*

bulunması bu bakterilerin ***"bioprezervatif"*** *olarak potansiyel kullanımlarına olan ilgiyi arttırmıştır ve kimyasal koruyucuların yerini alabilecek aday durumuna gelmişlerdir*.

Bakteriyosin üreten LAB'lerinin gıdalardaki varlığı son derece yaygındır. İnsanlar tarafından hiç bir yan etkisi olmaksızın yıllardır kullanılmaktadır. Bakteriyosinler protein yapısında oldukları için insanların mide ve bağırsak sistemlerinde bulunan ve proteini hidrolize eden enzimler tarafından hidrolize edilmektedirler. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sınırlı olmakla beraber bakteriyosinin güvenilir olduğunu göstermiştir. Örneğin yoğurt yiyen bir kişi farkında olmadan içeriğinde bulunan bakteriyosinden dolayı zararlı mikrorganizmalara karşı korunmaktadır. Dolayısıyla bakteriyosinin veya homofermentatif olup düşük ısıda bakteriyosin üretebilen LAB'lerinin başlangıçta düşük sayıda da olsa gıdalara eklenmesi vakum ile paketlenerek buzdolabında saklanan ürünlerde raf ömrünü uzatabilir (gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan orgtanizmaların gelişimine engel olarak) ve raf ömrünün bu şekilde bir biyolojik kontrol sistemi sonucu uzatılması da son derece sağlıklı ve güvenilir kabul edilir. Bunun en güzel örneği nisin olarak isimlendirilen ve *Lactococcus* tarafından üretilen bakteriyosindir. Oldukça geniş bir aktivite spektrumuna sahip olan nisin yaklaşık 40'dan fazla ülkede gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla gıda kökenli LAB tarafından üretilen bazı bakteriyosinler vakum ile paketlenerek buzdolabında saklanan ürünlerde raf ömrünü artırmaktadır Bu suretle güvenilirliliği sağlamak ve bozulmalardan dolayı ortaya çıkabilecek ekonomik (maddi) kaybı ve patojenlerin varlığından dolayı oluşabilecek insan zehirlenmelerini (manevi kaybı) engellemek için kullanılmaktadır.

Böylece *(i)* saflaştırılarak karakterize edilen bakteriyosin gıdaların korunmasında ve raf ömrünün uzatılmasında biyolojik kontrol olarak ekonomik bir şekilde kullanılabilir. Bununla beraber *(ii)* plazmid analizi, gen transferi ve gen klonlama teknikleri gibi gelişmiş tekniklerin kullanımı ile genetik olarak inşa edilmiş ve istenilen çok değişik özelliklere (güzel tat, lezzet, istenilen yumuşaklık/sertlik derecesi, anti-listerial bakteriyosin üretimi gibi) sahip olan starter kültürler genetik mühendisliği yöntemleri ile yaratılarak bu süper

kültürler biyolojik kontrol sistemi şeklinde gıdaların raf ömrünü uzatmak için sağlıklı ve güvenilir bir şekilde kullanılabilirler.

Bakteriyosinin gıda sanayindeki uygulamalarda kullanımına geçilmeden bu bakteriyosinin antimikrobiyal spektrumu, biyokimyasal ve genetik özellikleri, gıda sistemindeki etkisine ait verilere sahip olunması gerekmektedir Düşünülmesi gereken diğer önemli faktör ise bakteriyosini gıdalarda kullanımının doğuracağı ekonomik yöndür. Maliyeti düşürmek için yapılması gereken ise bakteriyosin üretemi için optimum parametrelerin (besiyerinin içeriği, ortamın pH'ı, inkübasyon zamanı, inkübasyon sıcaklığı vb.) belirlenmesi gerekmektedir. Dolayısıyla bakteriyosinlerin kimyasal ve antibakteriyal özelliklerini çalışabilmek ve gıda sistemlerinde etkinliği tespit etmek için bu peptidlerden saf ve konsantre bir şekilde ekonomik kullanımları için oldukça fazla miktarda üretilmeye çalışılacaktır.

İnhibisyona sebep olan maddenin bakteriyosin olup olmadığına ait kriterler hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler için oldukça iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Tagg ve ark (1976) Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin bakteriyosin olarak ifade edilmesi için *(i)* biyolojik olarak aktif bir protein olması ve *(ii)* bakterisidal etki mekanizmasına sahip olması gibi temel minimal kriterleri karşılaması gerektiğini önermektedir. Bakteriyosinler protein olmaları bakımından ve birkaç genusun türleri ile sınırlandırılmış dar bir antimikrobiyal etki spektrumuna sahip olmaları bakımından "klasik", mikrobiyal şekilde üretilen antibiyotiklerden farklılık göstermektedir. Bakteriyosin üreten suşlar kendi üretmiş olduğu bakteriyosinin etkilerine genelde immune oldukları için bu maddelerin ekolojik önemi, tıpkı antibiyotiklerde olduğu gibi, net değildir.

Pediococci çoğunlukla sebze materyalleri üzerinde çürükçül olarak bulunan gram-pozitif homofermentatif LAB'ların bir grubudur (Gonzalez and Kunka 1987, Mundt 1986). Turşu ve fermente sosis gibi kültür içeren gıdalardaki pediococci aktivitesi tamamen onaylanmaktadır. Pediococci ticari olarak et (Smith and Palumbo 1981) ve sebze (Pederson 1949) fermentasyonunda kullanılmaktadır. Her ne kadar, tıpki lactococci gibi besinsel

gereksinimler bakımından müşkülpesent olsa da, pediococci, fermente et ve sebzeler dışındaki kaynaklardan da izole edilebilmektedirler. *Pediococcus* genusuna ait türler bitkilerden (Mundt 1986), bitki ürünlerinden (örneğin, silaj) ve aynı zamanda insanlardan da (Ray and Hoover 1993) izole edilebilirler. Pediococci, bakteriyosin üretim aktiviteleri ve bu amaçla kullanımları dışında pek çok alanda aktivite göstermektedir: et-kökenli ve bitki-kökenli gıdaların biyolojik olarak işlenmesi ve biyolojik olarak muhafazasında, olgunlaşmış peynir ve mayalı ekmekte lezzet geliştirilmesi ve vitaminlerin biyoanalizi gibi. Pediococci alkollü içeceklerin bozulmasıyla da ilgilidir. Pediococci'lerin çiğ etlerde varlığı bir problem olarak görülmemektedir çünkü fermente edilebilir karbonhidratların yokluğunda pediococci gelişememektedir ve etlerde de bu karbonhidratlardan yeterli miktarlarda yoktur. Pediococci çiğ sosis, taze balık ve kümes hayvanlarının yanı sıra büyükbaşların işkembesi ve hindi dışkısından da izole edilebilmektedir (Ray 1992a, Ray and Hoover 1993, Ray 1994.).

Daha önceki çalışmalarda fermente sosis örneklerinden izole edilmiş olan *Pediococcus acidilactici* PBF suşunun bu çalışmada hücre dışı (ekstraselüler) bir peptit ürettiği tespit gösterilmiştir. Suş tarafından bakteriyosin üretiminin tespitinde her ne kadar şeffaf inhibisyon zonu kesin olmayan bir şekilde bakteriyosin üretiminin bir belirtisi olsa da bakteriyosin üretiminin pozitif bir şekilde konfirme edilmesinden önce pek çok faktörün elimine edilmesi gerekmektedir. Bu faktörler arasında, üretici suş tarafından üretilen organik asitlerin, hidrojen peroksitin ve bakteriyofajların olası inhibisyon etkileri yer almaktadır. Çalışmamızda, yukarıda bahsi geçen olası inhibisyon etkenlerinin ortadan kaldırılması için adı geçen sıra dahilinde ısıtılarak hücrelerin-uzaklaştırıldığı aktif kültürün pH'sı nötralize edilmiş, katalaz ile muamele edilmiş ve ısıtılmış kültür süpernatantları kullanılır ve neticede gözlemlenen ve inhibisyondan sorumlu olan etki **"bakteriyosin"** olarak konfirme edilir.

Pediococcus acidilactici PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal aktivitenin organik asitler, hidrojen peroksit veya bakteriyofaj kaynaklı olmadığı bu çalışmada gösterilmiştir çünkü ısıtılan ve hücrelerinden uzaklaştırılan kültür ortamının antimikrobiyal aktivitesi pH değerinin 7.0 ye nötralizasyonu, katalaz ile muamelelesi ve DNAaz veya otoklavlama işlemi neticesinde kaybolmamıştır. Bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi pek çok fiziksel ve kimyasal ajan ile muamele neticesinde korunmuş ancak proteolitik enzimler ile muamele neticesinde kaybolmuştur

Pediococcus acidilactici suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin sıcaklık ile muameden sonra aktif kaldığı ancak proteolitik enzimler ile inaktive edildiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Gonzalez and Kunka 1987, Graham and McKay 1985, Piva and Headon 1994, Spelhaug and Harlender1989). Lipaz ve organik çözücüler ile muamele neticesinde aktivitede bir kayıp olmaması muhtemelen molekülde lipit bileşenlerinin olmamasından kaynaklanmaktadır. Bununla beraber, proteolitik enzimler ile muamele neticesinde antimikrobiyal aktivitenin kaybı hücre dışına sentezlenen aktif bileşenin protein yapısında bir bileşen olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda ham bakteriyosin ekstraktının DNaz, RNaz, lizozim, lipaz, ve katalaz ile muameleleri neticesinde antimikrobiyal aktivitesinde her hangi bir kayıp gözlenmemiştir. Bununla beraber, organik ve inorganik kimyasallarla işlem neticesinde de antimikrobiyal aktivitede bir kayıp gözlenmemiştir. Bu verilere dayanarak, *molekülün konjüge bir protein olmasından ziyade saf bir protein olduğu ve yapısında karbonhidrat ve lipit bileşenleri olmadığı düşünülmektedir*. Pediococcus acidilactici PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde oldukça stabil bir moleküldür; 121°C de 15 dak ısıtıldıktan sonra aktivitesini kaybetmemiştir. Bu açıdan pediocin PA-1 (Gonzalez and Kunka 1987), pediocin A (Daeschel and Klaenhammer 1985), lactacin B (Barefoot and Klaenhammer 1983, 1984), lactocin 27 (Upreti and Hinsdill 1975), diplococcin (Davey and Richardson 1981) ve brevicin 37 (Rammelsberg and Radler 1990) gibi Laktik Asit Bakterileri tarafından üretilen diğer bazı bakteriyosinlere benzerlik göstermektedir. Pediococcus acidilactici PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal aktivite formaldehit, kloroform ve etanol gibi organik çözücüler ile inaktif olmamaktadır. Formaldehit veya yüksek sıcaklık ile muamele neticesinde antimikrobiyal

aktivitenin muhafaza edilmesi molekülün oldukça küçük olduğunu vurgulamaktadır. Antimikrobiyal madde oldukça yüksek sıcaklık ve oldukça düşük pH değerlerinde aktivitesini muhafaza etmekte bununla beraber 9'un üzerindeki pH değerlerinde bu biyolojik aktivite kaybolmaktadır. *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen antimikrobiyal madde bazik koşullara kıyasal asidik koşullarda daha stabil veya kararlıdır. Benzer türde sonuçlar Laktik Asit Bakterileri tarafından üretilen diğer bakteriyosinler için de bulunmuştur (Bhunia *et al.,* 1988; Hurst 1981). Oldukça geniş bir pH skalasında gözlemlenen bu stabilite bahsi geçen bakteriyosinin gıda ürünlerinde antimikrobiyal madde olarak kullanılacağı durumlarda oldukça faydalı olabilmektedir. pH 9 ve yukarısında gözlemlenen aktivite kaybı molekülün sahip olmuş olduğu ikincil yapının sergilemiş olduğu antimikrobiyal aktivite için özel bir yapı olabileceğini ortaya koymaktadır ve bu durumda alkaline ile muamele antimikrobiyal aktivite kaybına sebep olacak şekilde yapının bozulmasına sebep olmaktadır. Bu durum diğer laktik asit bakterileri tarafından üretilen pediocin AcH (Bhunia *et al*., 1987), pediocin PA-1 (Gonzalez and Kunka 1987), pediocin A (Daeschel and Klaenhammer1985), lactacin (Barefoot and Klaenhammer 1983, 1984), lactocin 27 (Upreti and Hinsdill 1973, 1975), nisin (Hurst 1981, Hurst and Hoover 1983) and diplococcin (Davey and Richardson 1981) bakteriyosinler için rapor edilen özelliklere benzerlik göstermektedir.

Fermente sosis kaynaklı *Pediococcus acidilactici* PBF suşu gıdalarda yaygın olarak bulunan pek çok laktik asit bakterisi ile birlikte gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok bakteriye karşı inhibisyonik etki gösteren antimikrobiyal peptidi üretmektedir. Bununla beraber Gram–negatif bakterilere (*Yersinia enterocolitica* ve *Escherichia coli* RSKK 234) ve *Candida albicans* RSKK02007 karşı etki göstermemiştir. *Bu aktif maddenin sahip olmuş olduğu geniş aktivite spektrumu ve protein doğası (proteolitik enzimler ile inaktivasyonu molekülün protein yapısında olduğunu ifade etmektedir) bu aktif maddenin "bakteriyosin" olduğunu göstermektedir.*

Gıdalarda mevcut patojenik olmayan ancak çoğu et ve süt ürünlerinin bozulmaları ile ilişkilendirilen bakteriler arasında *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostocs, Enterococcus, Pediococcus* ve *Listeria*'ya (*Listeria monocytogenes* haricinde) ait tür ve suşlar bulunmaktadır. Bununla beraber *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus* ve en önemlisi *Lis. monocytogenes* gıdalarda mevcut patojenik suşlar arasında yer almaktadır. Gıdalarda enfeksiyona sebep olan mikroorganizmalar arasında *Listeria monocytogenes* oldukça önemli bir yer işgal etmektedir. *Lis. monocytogenes* suşlarına; çiğ materyallerden yapılan peynir, yoğurt, süt, et ve et ürünleri gibi fermente edilmiş ürünlerde rastlamak mümkündür. Bu suşu toplumsal bir tehtit haline getiren en önemli özelliği buzdolabı sıcaklığında (+4ºC) gelişebiliyor olmalarıdır. Bununla beraber, gıdaların muhafazası için kullanılan geleneksel yöntemler (düşük pH, düşük saklama sıcaklığı, LAB'leri tarafından üretilen organik asit vs) *Lis. monocytogenes* suşlarının gıdalarda üremesini engellemek için yeterli değildir. Bununla beraber, laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler istenmeyen bakteriyal kontaminasyonu özellikle *Lis. monocytogenes* gibi insan patojenlerininin gelişimlerini kontrol altına almak için doğal ve güvenilir bir yol olarak kabul edilmektedirler. *Dolayısıyla, Lis. monocytogenes gibi gıda kökenli patojenlerin üremelerini engelleyen bakteriyosinlere (anti-listerial) ait çalışmalar ve bu bakteriyosinlerin süt, et ve diğer gıda ürünlerinde bu patojenin gelişimini kontrol etmek amacı ile biyoprezervatif olarak kullanımı gıda endüstrisi için özellikle cazip bir konuma gelmiştir*. Bununla beraber, fermente et ürünlerinde staphylococcal türlerinin sebep olduğu gıda zehirlenmeleri oldukça yaygındır (Smith and Pintauro 1981). Bakteriyosin üreten LAB'lerin, gıdaların muhafazasında potansiyel bir uygulamaya sahip olmalarından dolayı bakteriyosin türü maddelerin identifikasyonuna ve karakterizasyonuna ait ilgi ve çalışmalar son yıllarda logaritmik bir hızla artmıştır. Laktik asit üreten bakteriyal starter kültürler tarafından üretilen bakteriyosinler bazı doğal fermente gıda ürünlerinde mevcut olduğu için gıdalara saflaştırılmış bakteriyosinin ilavesi tüketici için herhangi bir risk içermemektedir. Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olan ve starter kültür olarak kullanılan *Pediococcus* tür ve suşları fermente ürünleri kontamine eden, gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli hastalıklara sebep olabilen *Listeria*, *Leuconostoc ve Staphylococcus* tür ve suşlarının

gelişimini kontral altında tutabilmek için oldukça faydalıdırlar. Bu suş tarafından üretilen aktif proteinler aynı zamanda geniş çeşitlilikteki çabuk bozulabilen gıdalarda biyoprezervatif olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler.

Farklı araştırma grupları tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda suş tarafından üretilen bakteriyosinin hassas bakterilere karşı bakterisidal etkisini ölçmek için standart yöntem kullanılmaktadır (TGE katı besi yerinde *Lactobacillus plantarum* NCDO955 bakterisine karşı AU/ml) (Biswas *et al.*, 1991). *Pediococcus acidilactici* suşları tarafından üretilen bakteriyosin preparasyonunun AU değerinin belirlenmesinde *Listeria monocytogenes* bakterisinin farklı suşlarını indikatör olarak kullanan ve sonuçlarını rapor eden diğer pek çok araştırıcı bulunmaktadır (Nielsen *et al*., 1990, Yıldırım and Johnson 1998). Ancak farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilen çalışmalarda *Pediococcus* suşları tarafından üretilen bakteriyosin preparasyonunun antimikrobiyal özelliklerini karşılaştırabilmek için tek bir assay yöntemi kullanmak oldukça önemlidir, yani aynı indikatör suşun kullanılarak aynı yöntem ile belirlenmiş AU değeri. Biswas ve ark (1991) tarafından önerilen yöntem kullanıldığında *Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosin preparasyonunun AU değeri 30,000 AU/ml olarak belirlendi. Bu değer kendi başına oldukça aktif kabul edilse de pediocin AcH ile kıyaslandığında daha az aktif kabul edilmektedir (Bhunia *et al*., 1987).

Her ne kadar bilimsel taramalarda bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genin ağırlıklı olarak pilazmit DNA üzerinde bulunduğu veya pilazmit DNA tarafından kodlandığı belirtilse de (Klaenhammer 1993) genleri kromozomal DNA üzerinde kodlanan birkaç tane de olsa bakteriyosin bilinmektedir, nisin, lactocin 27 veya lactocin F gibi (Barefoot and Klaenhammer 1983; Joerger and Klaenhammer 1986; Kawai *et al*., 1998, 2000). Çeşitli araştırma grupları tarafından gerçekleştirilen çalışmalar *Pediococcus* tür ve suşlarında bakteriyosin üretiminden sorumlu fenotipin pilazmit DNA üzerinde kodlandığını vurgulamaktadır (Daeschel and Klaenhammer 1985, Graham and McKay 1985, Gonzalez and Kunka 1987, Hoover *et al.*, 1988, Osmanağaoğlu 1999). Bununla beraber, pilazmit DNA lara ait büyüklüklerin farklı çalışmalarda 5.5MDa - 13.6 MDa arasında (8.35 kbp -

19.5 kbp) oldukça geniş bir varyasyon gösterdiği belirtilmiştir (Daeschel and Klaenhammer 1985, Gonzalez and Kunka 1987, Hoover *et al.,* 1988, Ray *et al*., 1989a,b, Osmanağaoğlu 1999). Bakteriyosin üretiminden sorumlu olan pilazmit DNA molekülünün moleküler ağırlığındaki bu farklılığın sebebi net oılarak bilinmese de farklı laboratuvarlarda kullanılan farklı teknikler veya farklı standart moleküler ağırlıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Bakteriyosin üreten *Pediococcus acidilactici* PBF suşu (Bac^+) 0.8% agaroz jel üzerinde moleküler ağırlıkları 5.99 kbp ile 16.55 kbp arasında değişen toplam 4 pilazmit DNA içermektedir. Bu pilazmit DNA bantlarından her hangi birinin *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretim fenotipi ile ilişkisini ortaya koyabilmek için standart pilazmit giderim (curing) çalışması gerçekleştirildi. EtBr ile pilazmit giderim çalışması bakteriyosin üretme özelliğinin kaybedildiği (Bac^-) pek çok varyant yarattı. Bac^- ve Bac^+ parental suşlardan elde edilen pilazmit DNA ların agaroz jel elektroforez üzerinde yürütülmesi ve çıkan pilazmit DNA bant profillerin birbirleri ile karşılaştırılması neticesinde gıdalarda bozulmalara ve/veya gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok Gram-pozitif bakterinin gelişimine engel olan bu antimikrobiyal aktivitenin *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda pPF1.0 olarak isimlendirilen 9.42 kbp lik bir pilazmit DNA tarafından kodlandığı belirlenmiştir ki bu moleküler ağırlıkta diğer *Pediococcus* tür ve suşlarında bakteriyosin üretiminden sorumlu pek çok diğer pilazmit ile aynı moleküler ağırlık aralıklarında bulunmaktadır. 9.42 kbp lik pilazmit DNA nın kaybı aynı anda bakteriyosin üretim yeteneğinin kaybı ile sonuçlanmaktadır. Rapor edilen diğer *Pediococcus* tür ve suşlarında bakteriyosin üretimi ile ilişkilendirilen pilazmit DNA ların moleküler ağırlıkları aşağıda verildiği gibidir: *Pediococcus pentosaceus* FBB61 and L7230 (Daeschel and Klaenhammer 1985) suşlarında 13.6 MDa'luk pilazmit DNA pediosin A üretimini, *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 (Gonzalez and Kunka 1987) suşunda 6.2 MDa'luk pilazmit DNA pediosin PA-1 üretimini, *Pediococcus cerevisiae* FBB63 (Graham and McKay 1985) suşunda 10.5 MDa'luk pilazmit DNA bakteriyosin üretimini, *Pediococcus pentosaceous* MC-03 (Hoover *et al*., 1988) suşunda 5.5 MDa'luk pilazmit DNA pediosin üretimini, *Pediococcus acidilactici* H (Ray *et al*., 1989a,b) suşunda 7.4

MDa'luk pilazmit DNA pediosin AcH üretimini ve *Pediococcus acidilactici* M (Wang-June *et al.,* 1991) suşunda 16.6 MDa'luk pilazmit DNA pediosin üretimini kodlamaktadır.

Bakteriyosin üretim fenotipinin pilazmit DNA-bağlantılı olduğu pek çok suşta gerçekleştirilen genetik analizler bakteriyosin üretiminden sorumlu olan gen bölgesinin (Bac^+) ve bu bakteriyosine karşı sergilenen immunitenin (Imm^+) birbirlerine yakın bir şekilde lokalize olduklarını göstermektedir (Hastings and Stiles 1991). *Pediococcus* tür ve suşlarında bakteriyosin üretimi ve immunitenin genelde pilazmit genleri ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Ray 1996b). Bakteriyosin üretimi (Bac^+) ve üretilen bakteriyosine konukçu hücrenin direnci (immunitesi) (Imm^+) gibi iki özelliğin birbiri ile bağlantılı olabilme özelliği bizim çalışmamızda da gerçekleştirildi. Bac^+ suş kendi üretmiş olduğu bakteriyosine karşı hassas değilken *Pediococcus acidilactici* PBF suşundan türeyen Bac^- mutantın gelişimi parental suş tarafından inhibe edilmiştir. *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminden sorumlu olan pilazmit DNA nın giderilmesi bakteriyosin üretmeyen varyantları (mutantları) bakteriyosine karşı hassas duruma getirmiştir. Elde edilen bu veriler, *Pediococcus acidilactici PBF suşunda bakteriyosin immunitesinden sorumlu olan genin (Imm^+) bakteriyosin üretimini kodlayan ve pPF1.0 olarak isimlendirilen aynı pilazmit DNA üzerinde olduğunu açığa çıkarmaktadır.* Bac^+ ve Imm^+ özellikleri arasındaki bu bağlantı *Pediococcus pentosaceous* FBB61 (Daeschel and Klaenhammer 1985), *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 (Ray 1996b) ve *Pediococcus acidilactici* H (Ray *et a*l., 1989a) suşunda da rapor edilmiştir. Gonzalez ve Kunka (1987) tarafından gerçekleşen çalışmanın ilk verilerinde *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 suşunda pediyosin üretimini kodlayan pilazmidin giderimi pediyosin üretmeyen varyantları (mutantları) pediyosine karşı hassas hale getirmediği için pediyosin immunite geninin kromozom üzerinde bulunduğu önerilmiştir. Bununla beraber, Ray ve ark. (1989a,b) yaptıkları çalışmada bakteriyosin üretim fenotipini kodlayan pilazmitin gideriminin pediyosin üretmeyen varyantları (mutantları) pediyosine karşı hassas hale getirdiğini göstermişler ve akabinde *Pediococcus acidilactici* suşunda pediosin üretiminden sorumlu olan genin pediyosin immunitesini kodlayan gen ile aynı pilazmit DNA üzerinde olduğunu

önermiştir. Daha sonraki genetik çalışmalar pediyosin PA-1/AcH için yapısal gen ile pediyosine karşı immunite geninin aynı pilazmit DNA üzerinde olduğunu kanıtlamıştır.

Pediococcus tür ve suşlarında elektroporasyon ile transformasyon gerçekleştirilmiştir (Gonzalez and Kunka 1983, Kim *et al*., 1992, Luchansky *et al*., 1988). Çalışmamızda pPF1.0 olarak isimlendirilen ve bakteriyosin üretiminden sorumlu olan 9.42 kbp ağırlığındaki pilazmit DNA elektroporasyon ile fermente et ve süt ürünlerinde ticari anlamda starter olarak kullanılan Bac$^-$ *Pediococcus pentosaceous* LAB suşuna başarılı bir şekilde aktarıldı. Transformasyon sonrası bakteriyosin üretim özelliğini kazanan bu yeni suş *Pediococcus pentosaceous* PG olarak isimlendirildi ve katı besi yerinde gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde bu suşun artık bakteriyosin ürettiği ve agaroz jel elektroforez çalışmaları neticesinde ise bu üretimden sorumlu olan pPF1.0 pilazmit DNA ya artık sahip olduğu da gösterilmiştir.

Bakteriosin üretiminden sorumlu olan gen bölgesinin pilazmit DNA üzerinde yer almasının ve bu genin aktarılabilir olmasının biyoteknolojik çalışmalarda oldukça önemi bulunmaktadır. Örneğin bakteriyosin üretim özelliği pilazmit-kodlu olduğunda bakteriyosin üretiminden sorumlu olan genin süper fermentasyon karakterine sahip seçilmiş bir Laktik Asit Bakteri starter suşuna genetik transferi direk antagonizm göstererek bulunduğu doğal floraya hakim olma yeteneğine sahip istenilen özellikte yeni bir suşun geliştirilmesine neden olmaktadır. Bununla beraber, istenilen özelliklere sahip yeni starter suşlar tasarlamak için ideal pilazmit klonlama vektörleri de yapılabilir.

KAYNAKLAR

Alegre, M.T., Rodriguez, M.C. and Mesas, J.M. 2004. Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with in-vitro modified plasmid DNA. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters, 241; 73-77.

Allison, G.E. and Klaenhammer, T.R. 1998. Phage resistance mechanism in lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 8; 207-226.

Altay, G., Bozoğlu, F. and Ray, B. 1994. Efficiency of gene transfer by conjugation and electroporation in *Lactococci* and *Pediococci*. Food Microbiology, 11 (4); 265-270.

Alvarez-Olmos, M.I and Oberhelman, R.A. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. Clinical Infectious Diseases, 32; 1567-76.

Anderson, D.G. and McKay, L.L. 1983. A simple and rapid method for isolation large plasmid DNA from lactic *Streptococci*. Applied and Environmental Microbiology, 46; 549-552.

Andersson, R. 1989. Food processing, Lactic Acid Bacteria in the production of food. SIK-Publication, Food Laboratory Newsletter, 14-17.

Anonymous. 1997. Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB). International Dairy Federation (IDF) Standart, Standart of Identity, 149 A.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology, lactic acid bacteria. Salminen, S., Vonwright, A. (eds), Marcel Dekker, Inc., 433, Newyork.

Aymerich, M.T., Hugas, M., Garriga, M., Vogel, R.F. and Monfort J.M. 1993. Electrotransformation of meat *Lactobacilli.* Effect of several parametres on their efficiency of transformation. Journal of Applied Bacteriology, 75; 320- 325.

Barefoot, S. F., and Klaenhammer, T. R. 1983. Detection and activity of lactocin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. App. Environ. Microbiol. 45: 1808-1815.

Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 26; 328-334.

Bellocine, K., Yam, K.K. and Causineau, B. 2005. Conjugative transfer of the *Lactococcus lactis* chromosomal sex factor promotes dissemination of the group II intron. Journal of Bacteriology, 187; 930-939.

Benachour, A., Flahaut, S., Frere, J. and Novel, G. 1996. Plasmid transfer by electroporation and conjugation in *Tetragenococcus* and *Pediococcus* genera and evidence of plasmid-linked metabolic traits. Current Microbiology, 32; 188-194.

Berry, E.D., Lieven, R.W., Mandigo, R.W. and Hutkins, R.W. 1990. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacterocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semi-dry sausage. Journal of Food Protection, 54; 194-197.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1987 Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Industrial Microbiology, 2; 319-322.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1988. Purification characterisation and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici.* Journal of Applied Bacteriology, 65; 261-268.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. Journal of Applied Bacteriology, 70; 25-33.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. Applied and Environmental Microbiology, 57; 1265-1268.

Bukhtiyarova, M., Yang, R. and Ray, B. 1994. Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. Applied and Environmental Microbiology, 60; 3405-3408.

Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C. 1988. High efficiency transformation of bacterial cellis by electroporation. Journal of Bacteriology, 170; 2796-2801.

Chandler, M.S. and Morrison, D.A. 1987. Competece for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Molecular cloning of com, a competence control locus. Journal of Bacteriology, 169; 2005-2011.

Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. Comphrehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2; 82-100.

Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.R. and Steele, J.L. 1999. Peptitases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 76; 217-246.

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.

Cogan, T.M. 1996. History and taxonomy of starter cultures in dairy starter cultures. Wiley-VCH Inc. 1-25.

Corthier, G. 2004. The health benefits of probiotics. Danone Nutritopics No: 29. March, 2004. Route Departementale 128, 91767. Palaiseau Cedex, France, 17p.

Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technology. January; 164-167.

Daeschel, M.A. and Klaenhammer, T.R. 1985. Association of an 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Applied and Environmental Microbiology, 50; 1538-1541.

Daniel, L.H. and Dykhulzen, E.D. 1984. The population genetics of *E. coli*. Annual Review of Genetics, 18; 31-68.

Davey, G.P. and Richardson, B.C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus ceremoris* 346. Applied and Environmental Microbiology, 41; 84-89.

Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. “Salminen, S. and von Wright, a. (ed): Lactic Acid Bacteria”. Marcel Dekker Inc. New York, 127.

Davidson, B.E., Kordias,N., Dobos,M. and Hillier, A. J. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria, Antonie Van Leeuwenhoek, 70; 161-183.

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technology, 44; 100-117.

Delves-Broughton, J., Williams, G.C. and Wilkinson, S. 1992. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in pasteurized liquid whole egg. Letters in Applied Microbiology, 15; 133-136.

Delves-Broughton, J., Blackburn, J., Evans, R.J. and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin; nisin. Antonie van Leewenhoek, 69; 193-201.

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.

de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Lactic acid bacteria and bacteriocins: Their practical importance. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. Chapter 1; 1-11.

de Vuyst, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 23; 153-177.

de Vuyst, L., Callewaert, R. and Crabbe, Â.K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by Lactobacillus amy-lovorus and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. Microbiology, 142; 817-827.

Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research, 16; 6127-6145.

Drinan, D.F., Tobin,S. and Cogan, T.M. 1976. Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 31 (4); 481-486.

Elder, J.K. and Southern, E.M. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis: comparison of methods for plating mobility of fragment length. Analytical Biochemistry, 170; 38-44.

Fiedler, S. and Wirth, R. 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. Analytical Biochemistry, 170; 38-44.

Fornari, C.S. and Kaplan, S. 1982. Genetic transformation of *Rhodopsesdomonas sphaeroides* by plasmid DNA. Journal of Bacteriology, 152; 89-97.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66; 365-378.

Gasson, M.J. and de Vos, W.M. 1994. Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, 398, London.

Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. 1983. Potential of lactic *Streptococci* to produce bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology, 45; 205-211.

Gilliland, S.E. 1986. Role of starter culture bacteria in food preservation. "Gilliland, S. E. (ed): Bacterial starter cultures for foods." CRC Press, Inc. Boca Raton Florido, 175.

Gobbetti, M., Angelis, M., Corsetti, A. and Cagno, R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science & Technology, 16; 1-13.

Gonzalez, C.F. and Kunka, B.S. 1983. Plasmid transfer in *Pediococcus* spp: intergeneric and intrageneric transfer of pIP501. Applied and Environmental Microbiology, 46; 81-89.

Gonzalez, C.F., and Kunka, B.S. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. Applied and Environmental Microbiology, 53; 2534-2538.

Graham, D.C. and McKay, L.L. 1985. Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. Applied and Environmental Microbiology, 53; 2534-2537.

Hansen, J.N. 1994. Nisin as a model food preservative. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34 (1); 69-93.

Haris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. and Klaenhammer, T.R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogens*. Journal of Food Protection, 52; 384-387

Harlander, S.K., McKay, L.L. and Schactele, C.F. 1984. Molecular cloning of lactose metabolizing genes from *Streptococcuse lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 48 (2); 347-351.

Hastings, J.W. and Stiles, M.E. 1991. Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. Journal of Applied Bacteriology, 70; 127-134.

Héchard, Y. and Sahl, H.G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. Biochimie, 84; 545-557.

Henning, S., Metz, R. and Hammes, W.P. 1986. Studies on the mode of action of nisin. International Journal of Food Microbiology, 3; 121-134.

Holo, H. and Nes, I.F. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. Applied and Environmental Microbiology, 55; 3119-3123.

Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (eds). 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press Inc., San Diego, CA.

Hoover, D. G., Walsh, P. M., Kolaetis, K. M., and Daly, M. M. 1988. A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with a 5.5-megadalton plasmid. J. Food. Protect. 51: 29-31

Hopwood, D.A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. Annual Reviews of Microbiology, 35; 237-272.

Hurst, A. 1981. Nisin. Advances in Applied Microbiology, 27; 85-123.

Hurst, A. and D. C. Hoover. 1983. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. p. 327-351. *In* A. L. Branen and P.M. Davidson (ed.), Antimicrobial in Food. Marcel Dekker, New York.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiology Reviews, 59; 171-200.

Jawetz., E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. 1977. Medizinische Mikrobiologie. Springer–Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 56-57.

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. Journal of Bacteriology 167; 439-446.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Section 14. regular nonsporing Gram positive rods. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2; 1208-1234.

Kawai, K., Saito,T., Suzuki, M. and Itoh, T. 1998. Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericin A, a hydrophobic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 62; 887-892.

Kawai, K., Saitoh, B., Takahashi, O., Kitazawa, H., Saito, T., Nakajima, H. and Itoh, T. 2000. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 64; 2201-2208.

Kim, W.J., Ray, B. and Johnson, M.C. 1992. Plasmid transfers by conjugation and electroporation in *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology, 72; 201-207.

Kim, Y.H., Han, K.S., Oh, S., You, S. and Kim, S.H. 2005. Optimization of technical conditions for the transformation of *Lactobacillus acidophilus* strains by electroporation. Journal of Applied Microbiology, 99; 167-174.

Klaenhammer, T.R. 1984. A general method for plasmid isolation in lactobacilli. Current Microbiology, 10; 23-28.

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie, 70; 337-349.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12:39-86.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 41; 103-125.

Klug, W. S. and Cummings, M. R. 2002. *Concepts of Genetics* (7th ed.). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Kok, J. 1996. Inducible gene expression and environmentally regulated genes in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70; 129-145.

Kondo, J.K. and McKyle, L.L. 1984. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: Optimization and use in molecular cloning. Applied and Environmental Microbiology, 48; 252-259.

Lacs, S. and Neuberger, M. 1975. Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. Journal of Bacteriology, 124; 1321-1329.

Lacs, S. 1977. Microbial interactions (Reissing, J. L., ed.). Chapman and Hall Ltd. London, pp. 179-232.

Lhys, U. 2002. Lactic acid bacteria associated with spoilage of fish pucts. Acedemic Dissertation, University of Helsinki, Finland.

Liu, W. and Hansen, J.N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis.* Applied and Environmental Microbiology, 56; 2551-2558.

Low, B.A. and Hansen, E. B. 1997. Microbiology and biochemisty of cheese and fermented milk. Low, B. A. (eds), Blackie Academic and Professional, 337, London.

Luchansky, J.B., Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R. 1988. Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Listeria, Pediococcus, Bacillus, Staphylococcus, Enterococcus* and *Propionibacterium*. Molecular Microbiology, 2 (5); 637-646.

Ludwing, W., Neumaier, J., Klugbayer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schaachtner, I., Ludwigsen, A., Wallner, G., Bachleitner, M., Fischer, U. and Scheleifer, K.H. 1993. Phylogenetic relationships of bacteria, Antonie Van Leeuwenhoek, 64; 285-304.

Macrina, F.L., Kopecko, D.J., Jones, K.R., Ayers, D.S. and McCoven, S.M. 1978. A multiple plasmid containing *Escherichia coli* strain: Conveinent source of size reference plasmid molecules. Plasmid, 1; 417-420.

Macrina, F.L., Tobian, J.A., 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.

Mandel, M. and Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. Journal of Molecular Biology,53(1): 159-162

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrock, J. 1986. Moleculer cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory (CSH), New York

Mayra-Makinen, A. and Biret, M. 1993. Industrial use and production of lactic acid bacteria. "Salminen, S. and Von Wright, A. (ed), Lactic Acid Bacteria.", 65. Marcel Dekker Inc., New York.

McIntyre, D.A. and Harlander, S.K. 1989. Improved electroporation efficiency of intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells grown in defined media. Applied and Environmental Microbiology, 55; 2621-2626.

Mercenier, A. and Chassy, B.M. 1988. Strategies for the development of the bacterial transformation systems. Biochimie, 70; 503-517.

Mercenier, A., Pavan, S. and Pot, B. 2003. Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. Current Pharmaceutical Design, 9(2); 175-191.

Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. and Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. Journal of Bacteriology, 127; 1529-1537.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics, p. 54. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Miller, J.F., Dower, W.J. and Tomkins, L. 1988. High voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 85; 856-860.

Miller, KW., Schamber., R, Osmanağaoğlu, Ö. and Ray, B. 1998. Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. Applied and Environmental Microbiology, 64 (6); 1997-2005.

Moat, A.G. 1985. Biology of the lactic, acetic and propionic acid bacteria. "Demain, A. L. and Solomon, N. A. (ed): Biology of Endustrial Microorganisms". The Benjamin/Cummins Publishing Company, Inc. Menlo Park, 143, California.

Motlagh, A.M., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites. Journal of Food Protection, 54; 873-878.

Mundt, J.O. 1986. Lactic acid Streptococci. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. p.1065-1066. P.H.A. Sneath (ed.), Vol.2, Williams and Wilkins, Baltimore.

Nes, I.F. and Holo, H. 2000. Class II Antimicrobial peptites from lactic acid bacteria. Biopolymers (Peptite Science), 55; 50-61.

Nielsen, J.W., Dickson, J.S., and Crouse, J.D. 1990. Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Applied and Environmental Microbiology, 56; 2142-2145.

Okereke, A. and Montville, T.J. 1991. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, 54; 349-353.

Orla-Jensen S. 1919. In S. Orla-Jensen (Ed.), The lactic acid bacteria. P 1-196. Copenhagen: A.F. Host and Son.

Osmanağaoğlu, Ö. 1999. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceous*. PhD thesis, METU.

Ozaki, A., Katsumata, R., Oka, M. and Furuya, A. 1984. Protoplast transformation of glutamat-producing bacteria with plasmid DNA. Journal of Bacteriology, 159; 306-311.

Papagianni, M., Avramidis, N. and Filioussis, G. 2007. High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. BMC Biotechnology, 7 (15); 1472-6750.

Pawar, D.D., Malik, S.V.S., Bhilegaonkar, K.N. and Barbuddhe, S.B. 2000. Efect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw bufalo meat mince. Meat Science, 56; 215-219.

Pederson, C.S. 1949. The genus Pediococcus. Bacteriological Reviews, 13; 225-232.

Piva, A. and Headon D.R. 1994. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. Microbiology, 140: 697-702.

Powell, I.B., Achen, M.G., Hillier, A.J. and Davidson, B.E. 1988. A simple and rapid method for genetic transformation of *Lactic streptococci* by electroporation. Applied and Environmental Microbiology, 54; 655-660.

Prasanna, G.L. and Panda, T. 1997. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. Bioprocess Engineering, 16; 61-264.

Radler, F. 1990. Possible use of nisin in winemaking. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. American Journal of Enology and Viticulture, 41 (1); 7-11.

Rafter, J. 2002. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. British Journal Nutrition, 88 (Suppl. 1); 89-94.

Rammelsberg, M. and Radler, F. 1990. Antimicrobial polypeptides of *Lactobacillus species*. Journal of Applied Bacteriology, 69; 177-184.

Ray, S. K., Kim, W. J., Johnson, M. C., and Ray, B. 1989a. Conjugal transfer of a plasmid encoding bacteriocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* H. J. Appl. Bacteriol. 66: 393-399.

Ray, S.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1989b. Bacteriocin plasmids of *Pediococcus acidilactici*. Journal of Industrial Microbiology, 4; 163-171.

Ray, B. 1992a. Pediocin(s) of *Pediococcus acidilactici* as a food biopreservative: an overview. pp 267-319. *In* Food biopreservatives of microbial origin. Bibek Ray and Mark Daeschel (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Ray, B. 1992b. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives: an overview. pp 177-206. *In* Food biopreservatives of microbial origin. Bibek Ray and Mark Daeschel (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Ray, B. and Hoover, D.G. 1993. Pediocins: an overview. pp 181-210. *In* Bacteriocins of lactic acid bacteria. D.G. Hoover and L.R. Steenson (eds.), Academic Press Inc.

Ray, B. 1996a. Lactic acid bacteia: Current Advances in Metabolism Genetics and Applications T.F. Bozoğlu and B. Ray (eds.), p: 101-136 Springer, Verlag, Berlin.

Ray, B. 1996b. Characteristics and applications of pediocin(s) of *Pediococcus acidilactici*: Pediocin AcH/Pediocin PA-1: an overview. pp 155-197. *In* Lactic acid bacteria: current advances in metabolism, genetics and applications. T. Faruk Bozoğlu and Bibek Ray (eds.), NATO ASI Series, Springer Press, Germany.

Reberšek, M., Faurie, C., Kandušer, M., Жorović, S., Teissié, J., Rols, M.P. and Miklavčič, D. 2007. Electroporator with automatic change of electric field direction improves gene electrotransfer *in-vitro*. BioMedical Engineering OnLine, 6; 25.

Riley, M.A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annual Review of Genetics, 32; 255-278.

Rodriguez, M.C., Alegre, M.T. and Mesas, J.M. 2007. Optimization of technical conditions for the transformation of *Pediococcus acidilactici* P60 by electroporation. Plasmid, 58 (1); 44-50.

Roller, S. and Lusengo, J. 1997. Developments in natural food preservatives. Agro-Food-Industry Hi-Tech. July/August; 22-25.

Rudin, L., Sjöström, J.E., Lindberg, M. and Philipson, L. 1974. Factors affecting competence for transformation in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 118(1); 155-164.

Sahl, H.G., Kordel, M. and Benz, R. 1987. Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. Archievs of Microbiology, 149; 120–124.

Sahl, H-G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translation modifications. European Journal of Biochemistry, 230; 827-853.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Salminen, S., Bouley, M.C., Boutron-Rualt, M.C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M. and Rowland, I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition, Suppl. 1; 147–171.

Schillinger, U. and Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* ısolated from meat. Applied and Environmental Microbiology, 55(8); 1901-1906.

Schlegen, H.G. 1986. General Microbiology. Cambridge University Press, 587, Cambridge.

Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwing, W. and Aman, R. 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 5; 1081-1094.

Serror, P., Sasaki, T., Ehrlich, D. and Maguin, E. 2002. Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. Applied and Environmental Microbiology, 68; 46-52.

Sharpe, M.E., Fryer, T.F. and Smith, D.G. 1966. Identification of lactic acid bacteria. Identification Methods for the Microbiologistseds. Gibbs, B. M. and Skinner, F.K. Academic Press, 145, London.

Smith, M. D. and Clewell, D. B. 1984. Retrun of *Streptococcus faecalis* DNA cloned in *E. coli* to its original host via transformation of *Streptococcus sanguis* followed by conjugative mobilization. Journal of Bacteriology, 160; 1109-1114.

Smith, J.L. and Palumbo, S.A. 1981. Microorganisms as food additives. Journal of Food Protection, 46; 997-1006.

Smith, J.L. and Pintauro, N.D. 1981. New preservatives and future trends. p.137-160. *In* Development in Food Preservatives. R.H.Tilbury (ed.). Barking, England, Applied Science Publishers Ltd.

Smith, H., Wiersma, K., Venema, G. and Bron, S. 1985. Transformation in *Bacillus subtillis*: Further characterization of a 75.000-dalton protein complex involved in binding and entry of donor DNA. Journal of Bacteriology, 164; 201-206.

Somukuti, G.A. and Steinberg, D.H. 1988. Genetic transformation of *Streptococcus thermophilus* by electroporation. Biochimie, 70; 579-589.

Spelhaug, S.R. and Harlender, S.K. 1989. Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. Journal of Food Protection, 52; 856-862.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36; 1-29.

Sukharev, S.I., Klenchin, V.A., Serov, S.M., Chernomordik, L.V. and Chizmadzhev, Y.A. 1992. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells :The effect of DNA interaction with electropores. Biophysical Society, 63; 1320-1327.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriological Rewievs, 40; 722-756.

Taylor, L.Y., Cann, D.D. and Welch, B.J. 1990. Antibotulinal properties of nisin in fresh fish packaged in an atmosphere of carbon dioxide. Journal of Food Protection, 53 (11); 953-957.

Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*, in the lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria. Blackie Academics and Professionals, 2; 173-235.

Thompson, R.R. 1986. Plasmid transfer. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 18 (Suppl. C); 13-23.

Thompson, J.K., McConville, K.J., McReynolds, C. and Collins, M.A. 1997. Electroporation of *Lactobacillus plantarum* Using Linearized Plasmid DNA. Letters in Applied Microbiology, 25; 419-425.

Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meany, B., Hill, C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and application. Antonie van Leeuwenhoek, 82; 165-185.

Upreti, G.C. and Hinsdill, R.D. 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 4; 487-494.

Upreti, G.C. and Hinsdill R.D. 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7; 139-145.

Vandenbergh, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Reviews, 12; 221-237.

Vanema, G. 1979. Bacterial transformation. Advances in Microbial Physiology, 19; 245-331.

Walsh, P.M. and McKay, L.L. 1980. Restriction endonuclease analysis of the lactose plasmid in *Streptococcus lactis* ML3 and two recombinant lactose plasmid. Applied and Environmental Microbiology, 43; 1006-1010.

Wang, T.T. and Lee, B.H. 1997. Plasmids in *Lactobacillus*. Critical Rewiews in Biotechnology, 17 (3); 227-272.

Wang-June, K., Ha, D. and Ray, B. 1991. Plasmid linkage of bacteriocin production and sucrose fermentation phenotypes in *Pediococcus acidilactici* M. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1; 169-175.

Watson, J.D., Hopkins, M.A., Roberts, J.W., Steitz, A.J. and Weiner, A.M. 1987. Molecular biology of the gene. Benjamin Cummings Co. Fourth Edition, 1163 p, USA.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkovski, J. and Zoller, M. 1992. Recombinant DNA. Scientific American Books, USA.

Wirth, R., An, F.Y. and Clewell, D.B. 1986. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *E. coli-Streptococcus faecalis* shuttle vector. Journal of Bacteriology, 165; 831-836.

Woskov, S.A. and Kondo, J.K. 1987. Effect of proteolytic enzymes on transfection and transformation of *Streptococcus faecalis* protoplasts. Applied and Environmental Microbiology, 53; 2583-2587.

Wosman, 1987. Doctoral dissertation. Rijksuniversiteit te Groningen, pp. 7-96.

Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz J. and Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal, 12; 91–109.

Wright, A., Suominen, M. and Sivela, S. 1986. Identification of lactose fermentation plasmids of streptococcal dairy starter strains by southern hybridization. Letters in Appllied Microbiology, 2; 73-76.

Yang, R, Johnson, M. C. and Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocin from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 58; 3353-3359.

Yıldırım, Z. and Johnson, M.G. 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. Journal of Food Protection, 61; 47-51.

Zimmermann, U. and Vienken, J. 1982. Electric field-induced cell to cell fusion. Journal Membrane Biology, 67; 165-187.

EKLER

EK1: BAKTERİ İZOLASYONUNDA ve GELİŞİMİNDE KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI

EK 2: TAMPON ve ÇÖZELTİLER

EK 3: DNA ANALİZİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖR

EK 4: KİMYASALLAR

EK 1 BAKTERİ İZOLASYONUNDA ve GELİŞİMİNDE KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI

TGE	**%(gr)**
Tripton	1.0
Glukoz	1.0
Maya Ekstraktı	1.0
Tween- 80	0.1
$MnSO_4$	0.005
$MgSO_4$	0.005

Sıvı besiyeri (TGE broth) için; bütün materyaller 100 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda homojenize oluncaya kadar karıştırılmıştır. Daha sonra pH 6.8'e ayarlanmıştır. Karışım 5'er ml olacak şekilde tüplere dağıtılarak 121^oC'de15 dakika steril edilmiştir.

Yarı katı besiyeri (TGE soft-agar) için; bütün materyaller 100 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda homojenize oluncaya kadar karıştırılmıştır.pH 6.8'e ayarlanlandıktan sonra 0.75 gr agar ilave edilmiştir. Karşım, ısısı artırılmış manyetik karıştırıcıda 10 dakika süre ile tekrar karıştırılmış ve sonrasında 5'er ml olacak şekilde tüplere dağıtılarak 121^oC'de15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonunda agarın dibe çökmemesi amacıyla tüpler vortekslenerek donmaya bırakılmıştır.

Katı besiyeri (TGE hard agar) için; bütün materyaller 100 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda homojenize oluncaya kadar karıştırılmıştır. pH 6.8'e ayarlanlandıktan sonra 1.5 gr agar ilave edilerek çalkalanmış sonrasında da 121^oC'de15 dakika steril edilmiştir.

EK 2

EK 2.1 : PİLAZMİT DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİ ve TAMPONLAR

Sakkaroz çözeltisi:	**% (gr)**
Tris	0.655
EDTA	0.0372
Sakkaroz	6.7
Distile su	100 ml
pH	8.0

Lizozim çözeltisi:	**% (gr)**
Tris	0.3
Lizozim	0.1
Distile su	10 ml
pH	8.0

Tris-EDTA:	**% (gr)**
Tris	0.6
EDTA	9.31
Distile su	100 ml
pH	8.0

SDS çözeltisi:	**% (gr)**
Tris	0.6
EDTA	0.74
SDS	20
Distile su	100 ml
pH	8.0

Tris-HCl:	**% (gr)**
Tris-HCl	31.52
Distile su	100 ml
pH	7.0

Tris-EDTA-1:	**% (gr)**
Tris	0.121
EDTA	0.037
Distile su	100 ml
pH	7.5

%3 NaCl ile Doyurulmuş Fenol çözeltisi:	**% (gr)**
Fenol	100
NaCl	3
Distile su	20 ml

İçerik 45^0C' ye ayarlanmış su banyosunda çözülmüş ve karanlık şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

RNaz A Stok çözeltisi:	**% (gr)**
Sodyum asetat	0.05M
RNaz A	5 mg
dH_2O	5 ml

0.05 M sodyum asetat çözeltisi 5ml olarak hazırlanmış pH'sı 5.0'a ayarlanmıştır. RNaz A ilavesinden sonra kaynar su içerisinde 5 dk beklenmiş ve -20^0C'de saklanmıştır.

EK 2.2 : AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİ ve TAMPONLAR

Tris-Borik asit –EDTA (TBE) Tamponu (5X):	**gr/lt**
Tris	54
Borik Asit	27.5
EDTA (0.5M) pH:8	20 ml
Distile su	1 lt
pH: 8.3	

Yükleme boyası:	**(%) gr**
Brom fenol blue	0,25
Sakkaroz	40
Distile su	100 ml

İçerik 100ml de çözüldükten sonra 0.22 µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilmiş ve buzdolabı ısısında saklanmıştır.

Etidyum Bromit solüsyonu:	**(%) gr**
Etidyum Bromit	1
Distile su	100 ml

İçerik 100ml de çözüldükten sonra 0.22 µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilmiş ve buzdolabı ısısında karanlık bir şişede saklanmıştır.

% 0.7 lik agaroz jel:	**(%) gr**
Agaroz	0.7
10X TBE	100 ml
EtBr	%1

EK 2.3 : ELEKTROPORASYON ÇALIŞMASINDA KULLANILAN TAMPON

Elektroporasyon Tamponu:	**%(gr)**
Sükroz	0.6 mmol
Potassium phosphate	7 mmol
Magnesium chloride	1 mmol

Son hacim distile su ile 1 lt ye tamamlanır ve tamponun pH değeri 7.5 olarak ayarlanır

EK 3

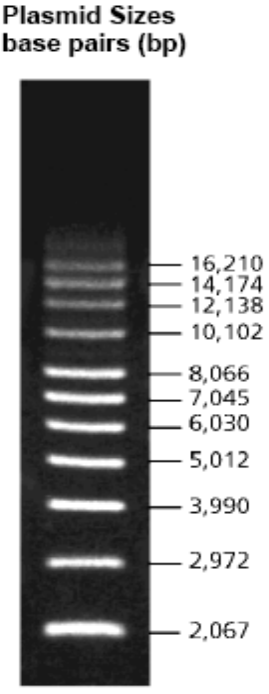
DNA ANALİZİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖR

“DNA supercoiled ladder” (SIGMA) 16210 bp-2067bp

DNA Ladder, Supercoiled
11 Supercoiled fragments, 2–16 kb

Product Number **D5292**
Storage Temperature –20 °C

Product Description
The Supercoiled DNA Ladder contains 11 supercoiled fragments (2,067–16,210 bp) and is suitable for use as an electrophoresis marker for supercoiled DNA.



EK 4

KİMYASALLAR

Kimyasal Adı	**Marka**
Agaroz, Tris-HCl, Rnaz A, Lizozim, Glukoz, EDTA, Trisma base, SDS,	**Sigma**
0.22 ve 0.45 -mikron por çaplı membran filtre	**Sartorius**
Maya ekstraktı, Pepton, Yeast ekstraktı, Agar	**Oxoid**
Supercoiled DNA ladder	**Sigma**
Tripton, $MnSO_4$, $MgSO_4$, Tween 80, Lizozim, Fenol, NaCl, EtBr, Borik asit, Sukroz, HCl, Etanol	**Merck**
Elektroporasyon küveti	**Bio-rad**

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Pelin DOĞAN

Doğum Yer : Karaman

Doğum Tarihi : 07.09.1981

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Kurtuluş Süper Lisesi (1995-1999)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji. (2000-2005)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı, (BİYOTEKNOLOJİ).
(Şubat 2006- Şubat 2009