ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lactococcus lactis subsp. *lactis* BLL27 SUŞUNDA FARKLI STRES KOŞULLARININ NİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Burcu Çağla YILMAZ

BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

ANKARA
2008

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Burcu Çağla Yılmaz Tarafından hazırlanan "*Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis* BLL27 Suşunda Farklı Stress Koşullarının Nisin Üretimi Üzerine Etkisi" adlı tez çalışması 18/07/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Biyoloji AnabilimDalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK,
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Lactococcus lactis subsp. *lactis* BLL27 SUŞUNDA FARKLI STRES KOŞULLARININ NİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Burcu Çağla YILMAZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanan iki adet *L. lactis* subsp. *lactis* suşunun nisin üretim karakteristikleri laboratuvar koşullarında gıda fermentasyonu benzeri stres ortamları (pH, sıcaklık, ozmotik basınç, safra tuzu) oluşturularak incelendi. Stres koşullarına bağlı olarak meydana gelen nisin üretimleri asit, safra tuzu, düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık, ozmotik stres uygulanan S102 suşunda logaritmik fazdaki hücrelerde sırasıyla 296, 216, 203, 147 ve 1502 IU/ml olarak belirlendi. Durağan fazda ise asit, safra tuzu, düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık, ozmotik stres uygulamaları sonucu sırasıyla 444, 108, 294, 147 ve 1277 IU/ml olarak belirlendi. BLL27 suşunda aynı stres uygulamaları için üssel fazda sırasıyla 660, 222, 202, 362, 908 IU/ml, durağan fazda ozmotik stres uygulamasında 752 IU/ml nisin üretimi belirlendi. İki suşta da baz stresine maruz bırakılan hücrelerde nisin üretimi belirlenemedi. Stres uygulamaları sonucunda suşların plazmid profillerine bakıldığında BLL27 suşunda safra tuzu stresinde 25.0, 19.9 ve 14.3, ozmotik streste 25.0, 19.9, 14.0, 8.7, 1.4, yüksek sıcaklıkta 25.0, 19.9, 18.2, baz stresinde 25.0, 19.9, 18.2, 16.2, 14.0, 3.7 kb plazmidler kaybedilirken, asit stresinde 2.6 ve 1.4 kb plazmidler dışında kalan tüm plazmidlerin stabilitelerini kaybettiği, düşük sıcaklık uygulamasında ise plazmid kaybı olmadığı belirlendi. S102 suşunda safra tuzu stresinde 18.9, 17.4, 13.4, ozmotik streste 16.2, 15.6, 13.4, 7.9, 3.8, 2.8, baz stresinde 18.9, 13.4, 7.9, 3.8, 2.8, asit stresinde 14.3, 13.4, 7.9, 3.8, 2.8 kb plazmidlerin stabilitelerini kaybettiği, düşük ve yüksek sıcaklık uygulamalarında ise plazmid kaybının olmadığı saptandı. SDS-PAGE analizleri sonucunda, BLL27 suşunda pH 3.5 asit stresi uygulamasının ardından 28.7 kDa büyüklükteki protein belirlenemezken 64.6 ve 53.8 kDa büyüklükte iki yeni protein tanımlandı. pH 11.8 baz stresinde suşun hücre duvarı protein içeriğinde yalnızca 39.8 kDa büyükülüğündeki major protein stabilitesini koruyabildiği belirlendi. Ozmotik stres koşulunda 18.1 kDa büyüklükte ilave bir protein tespit edildi. 5ºC'de 7.6 kDa büyüklükte bir proteinin ilave olduğu 45ºC'de ise 28.7 kDa protein dışındaki tüm proteinlerin kaybolduğu, 20.7 kDa büyüklükte yeni bir protein üretildiği belirlendi. % 0.2 safra tuzu stresinde 45ºC'de tanımlanan hücre duvarı protein içeriğinin tamamen aynısı tespit edildi.

Temmuz 2008, 77 sayfa

Anahtar Kelimeler: *L. lactis* subsp. *lactis*, nisin üretimi, stres.

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF NISIN PRODUCTION IN *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BLL27 STRAIN UNDER DIFFERENT STRESS CONDITIONS

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

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, nisin production characteristics of two *L. lactis* subsp*. lactis* strains, obtained from the culture collection of Ankara University, Faculty of Science, Deparment of Biology, were analyzed under the laboratory condition by exposing to stresses like food fermantation medium, e.g. pH, temperature, osmotic pressure, ox bile. Nisin production of pH, ox-bile, low teperature, high temperature and osmotic pressure stresses applied S102 cells which were in logarithmic pahse, were determined as 296, 216, 203, 147 and 1502 IU/ml respectively. In the stationary phase, nisin production of the S102 cells under the same stress conditions were determined as 444, 108, 294, 147 and 1277 IU/ml respectively. Same stress conditions were applied to BLL27 strain and obtained results have been given as follows: In the exponential phase nisin production of the BLL27 cells were determined as 660, 222, 202, 362, and 908 IU/ml respectively, in the stationary phase, nisin production of BLL27 cells under the osmotic pressure stress was determined as 752 IU/ml. Cells of both strain which were exposed to base stress did not produce nisin. Plasmid profile anaylsis of the strains were made after the stress applications. Plasmid profile analysis of the BLL27 strain showed that 25.0, 19.9 and 14.3 kb plasmids under the ox-bile stress, 25.0, 19.9, 14.0, 8.7, 1.4 kb plasmids under the osmotic pressure stress, 25.0, 19.9, 18.2 kb plasmids under the high temprature, 25.0, 19.9, 18.2, 16.2, 14.0, 3.7 kb plasmids under the base stress were lost. Under the acid stress all of the plasmids except 2.6 and 1.4 kb lost their stability. No plasmid loss occured under the low temperature stress. Plasmid profile analysis of S102 strain showed that 18.9, 17.4, 13.4 kb plasmids under the ox-bile stress, 16.2, 15.6, 13.4, 7.9, 3.8, 2.8 kb plasmids under the osmotic pressure stress, 18.9, 13.4, 7.9, 3.8, 2.8 kb plasmids under the base stress and 14.3, 13.4, 7.9, 3.8, 2.8 kb plasmids under the acid stress lost their stability. It was determined that low and high temprature stresses did not caused to plasmid loss. Results of SDS-PAGE analysis on BLL27 strain showed that the protein size of 28.7 kDa couldn't be defined but two new proteins size of 64.6 and 53.8 kDa have been defined after the 3.5 pH acid stress application. It was determined that only a protein size of 39.8 kDa in the cell wall protein content of the BLL27 strain exposed to 11.8 pH base stress could keep its stability. Another protein size of 18.1 kDa was detected under the osmotic pressure stress. At 5ºC, a protein size of 7.6 kDa was detected and at 45ºC, all the proteins except the 28.7 kDa were lost but it was determined that a new protein size of 20.7 kDa was produced. Completely same of the cell wall content defined at 45ºC was seen under the % 0.2 ox-bile stress.

July 2008, 77 pages

Key Words: *L. lactis* subsp. *lactis*, nisin production, stress.

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma ikanı sunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e;

Tüm yardımlarından ötürü laboratvuar çalışma arkadaşlarıma;

Teşekkürlerimi sunarım.

Burcu Çağla YILMAZ

Ankara, Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ v
ÇİZELGELER DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 3
2.1 Stres Koşulları ve Stres Yanıtı 3
2.1.1 Ozmotik stres 6
2.1.2 Safra tuzu stresi 7
2.1.3 Yüksek sıcaklık 8
2.1.4 Düşük sıcaklık 10
2.1.5 Düşük asitlik 12
2.2 Stres Yanıtının Oluşumunda Üssel ve Durağan Fazlar Arasındaki Farklar 13
2.3 Nisin 15
3. MATERYAL ve YÖNTEM 18
3.1 Materyal 18
3.1.1 Mikroorganizmalar ve gelişme ortamları 18
3.2 Yöntem 18
3.2.1 Farklı stres koşullarında letal ve subletal dozların belirlenmesi 18
3.2.2 Üssel fazda nisin üretim düzeyinin belirlenmesi 20
3.2.3 Üremenin durma fazında nisin üretim düzeyinin belirlenmesi 21
3.2.4 Nisin aktivitesinin belirlenmesi 21
3.2.5 Bakterilerin plazmid içeriklerinin tanımlanması 22
3.2.5.1 Plazmid izolasyonu 22
3.2.5.2 Elektroforez 25
3.2.5.3 Plazmid büyüklüklerinin saptanması 26
3.2.6 Hücre duvarı proteinlerinin izolasyonu 27
3.2.6.1 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) 28
3.2.7 Protein büyüklüklerinin saptanması 30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 31
4.1 Stres Koşullarının Belirlenmesi 31
4.2 Üssel ve Durağan Faz Hücrelerinin Stres Koşulları Altında Nisin Üretim Davranışlarının Belirlenmesi 42
4.3 Stres Uygulamalarının Bakterilerin İçerdiği Plazmidlerin Stabilitesi Üzerine Etkisi 46
4.4 Stres Koşullarının Hücre Duvarı Protein İçerikleri Üzerine Etkisi 54
5. SONUÇ 66
KAYNAKLAR 67
ÖZGEÇMİŞ 77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Nisin biyosentez aşamaları 16
Şekil 2.2 Nisin etki mekanizması modeli..... 17
Şekil 4.1 *L. lactis* subsp *lactis* S102 suşunda tuz konsantrasyonunun bakteriyel gelişme üzerine etkisi. 32
Şekil 4.2 *L. lactis* subsp *lactis* BLL27 suşunda tuz konsantrasyonunun bakteriyel gelişme üzerine etkisi. 33
Şekil 4.3 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda safra tuzu konsantrasyonun bakteriyel gelişme üzerindeki etkisi. 35
Şekil 4.4 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda safra tuzu konsantrasyonun bakteriyel gelişme üzerindeki etkisi. 36
Şekil 4.5 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda, pH'nın bakteriyel gelişim üzerine etkisi. 37
Şekil 4.6 *L. lactis* subsp *lactis* BLL27 suşunda, pH'nın bakteriyel gelişim üzerine etkisi. 38
Şekil 4.7 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda, inkübasyon sıcaklığının bakteriyel gelişim üzerine etkisi..... 39
Şekil 4.8 *L. lactis* subsp *lactis* BLL27 inkübasyon sıcaklığının bakteriyel gelişim üzerine etkisi. 40
Şekil 4.9 Üssel fazdaki *L. lactis* subsp. *lactis* S102 hücrelerinde subletal seviyelerde stres uygulaması sonucu belirlenen nisin üretim düzeyleri. 43
Şekil 4.10 Durağan fazdaki *L. lactis* subsp. *lactis* S102 hücrelerinde subletal seviyelerde stres uygulaması sonucu belirlenen nisin üretim düzeyleri. 44
Şekil 4.11 Üssel fazdaki *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 hücrelerinde subletal seviyelerde stres uygulaması sonucu belirlenen nisin üretim düzeyleri. 45
Şekil 4.12 Durağan fazdaki *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 hücrelerinde subletal seviyelerde stres uygulaması sonucu belirlenen nisin üretim düzeyleri. 46
Şekil 4.13 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BLL27 ve S102 suşlarında safra tuzu stresinin plazmid stabilitesi üzerine etkisi..... 49
Şekil 4.14 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BLL27 ve S102 suşlarında tuz stresinin plazmid stabilitesi üzerine etkisi. 50
Şekil 4.15 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BLL27 ve S102 suşlarında pH stresinin plazmid stabilitesi üzerine etkisi 52
Şekil 4.16 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BLL27 ve S102 suşlarında sıcaklık stresinin plazmid stabilitesi üzerine etkisi..... 53
Şekil 4.17 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda pH stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi..... 56
Şekil 4.18 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda tuz stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi..... 57
Şekil 4.19 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda sıcaklık stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi..... 58
Şekil 4.20 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda safra tuzu stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi..... 59
Şekil 4.21 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda pH stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi..... 61

Şekil 4.22 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda tuz stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi 62
Şekil 4.23 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda sıcaklık stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi..... 63
Şekil 4.24 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda safra tuzu stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi..... 64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *L. lactis*'te çevresel strese karşı geliştirilen yanıtın biyokimyasal esası 4
Çizelge 2.2 Çevresel stres koşullarında teşvik edilen genler 5

1. GİRİŞ

Lactococcus lactis, gıda üretimi ve korunmasında yaygın kullanım alanı bulan bir bakteridir. Bu bakteri suşlarının yönlendirdiği fermentasyonlar yolu ile gıda üretimi, insanlık için daima önemli bir yer tutmuştur. Özellikle dünyada en fazla tüketilen fermente gıda olan peynirin temel starter kültür suşlarını teşkil etmesi, *L. lactis*'in ekonomik değerinin açık bir göstergesidir.

L. lactis üyeleri karbon ve azot kaynağı açısından zengin bir substrat olan süt dışında, bitkisel materyallerin yüzeyinde de bulunabilmektedir. Bu bakteriler gerek doğal ortamlarında ve gerekse endüstriyel üretim süreçlerinde sıcaklık, pH ve ozmotik basınç gibi değişik stres koşulları ile karşılaşmaktadır. Örneğin doğal çevrede ya da bazı peynir türlerinin üretimi esnasında uygulanan pişirme sürecinde bakteri 40 ºC sıcaklığa maruz kalır. Diğer yandan endüstriyel starter kültürlerin dondurulmuş halde saklanmasının, düşük sıcaklık şokunun, 0.56 M konsantrasyonda ya da yukarısında NaCl varlığında peynirlerin preslenmesinin veya doğal çevrede çok az da olsa yağmur suyu yıkanmasının ozmotik şoka yol açtığı bilinmektedir. Bir çok stres koşulu eş zamanlı olarak ortaya çıkar. Bu durumun en tipik örneği, şeker fermentasyonu sonucu laktik asit düzeyinin yükselmesidir. Bu koşulda karbon kaynağı eksikliği ve asit stresi meydana gelir. Liyofilizasyon veya spreyleme yolu ile kurutulmuş hücrelerde ozmotik ve oksidatif stres söz konusu olurken, güneş ışığına maruz kalan hücrelerde yüksek sıcaklık ve ultraviyole (UV) radyasyonu ikili stres koşulunu oluşturur.

L. lactis suşları hem doğal ortamlarında hem de fermentasyon süreçlerinde optimum gelişme koşulları ile çok nadir karşılaşır. Bu nedenle stres koşullarına karşı metabolik adaptasyonlar geliştirme yeteneği, starter kültür suşlarının seçiminde büyük önem kazanmıştır. Nisin üreticisi *L. lactis* suşlarının starter kültür bileşeni olarak kullanımı, fermente süt ürünlerinde kontamine floranın önemli bir bölümünü teşkil eden gram pozitif bakterilerin gelişimini etkin bir şekilde baskılaması nedeni ile tercih edilmektedir. Primer bir metabolit olan nisinin üretimi, bakteriyel gelişimi sınırlandıran

stres koşullarından olumsuz yönde etkilenmektedir. Ancak stres koşullarına karşı hızlı adaptasyon yeteneği içeren suşlarda hem fermentasyon süreçleri ve hem de nisin üretimi çok az zarar görmektedir. Bu suşların kullanımı halinde endüstriyel üretimlerde ürün miktarı ve kalitesi garanti altına alınabilir.

Bu araştırmada; starter kültür potansiyeli tanımlanmış nisin üreticisi *L. lactis* suşlarında endüstriyel fermentasyon süreçlerinde sıklıkla karşılaşılan stres koşullarına yanıt verme yeteneğinin, özellikle nisin üretimi dikkate alınarak tanımlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Stres Koşulları ve Stres Yanıtı

Endüstriyel önemi yanında bakteri fizyolojisinin anlaşılmasında taşıdığı kritik önem, stres yanıtı çalışmalarına büyük ivme kazandırmıştır. *L. lactis*, oldukça küçük bir genoma sahip olması (2.5 mega baz çifti) ve stres koşulları altında sporulasyon gibi farklılaşma yeteneği taşımaması nedeni ile stres yanıtı çalışmalarında gram pozitif model sistem olarak tercih edilmektedir (Van de Guchte *et al*. 2002). Stres koşullarında gerçekleşen genetik regülasyon oldukça karmaşık bir süreçtir. Zira stres yanıtı; transkripsiyon, translasyon, mRNA stabilitesi, translasyon sonrası modifikasyonlar (fosforilasyon gibi) ve protein parçalanması gibi gen ifadesi aşamalarının regülasyonu yolu ile gerçekleştirilmektedir (O'Driscoll *et al*. 2006). Bunun sonucu olarak, bazı proteinlerin üretimi baskılanırken, bazılarının üretimi teşvik edilmektedir. Stres koşulunun tipine bağlı olarak regüle edilen proteinler de değişmektedir. Özellikle teşvik edilen proteinlerin tanısı ve regülasyon mekanizmalarının analizi, starter kültür suşlarının fermentasyon süreçlerindeki işlevsel kontrolünü kolaylaştırmaktadır (Kilimann *et al*. 2007).

L. lactis'te stres koşullarının etkisi, toplam protein sentezi ve bakteriyel gelişme üzerinde meydana getirdiği değişmeler esas alınarak incelenmektedir. Bugüne kadar yürütülen çalışmalar sonucunda *L. lactis*'te stres koşulları altında regüle edilen birçok protein (Çizelge 2.1) ve teşvik edilen gen (Çizelge 2.2) tanımlanmıştır. Tanımlanan stres yanıt mekanizmaları esas alınarak geliştirilen gıda düzeyli vektör sistemleri, fermente gıda endüstrisinde ürün kalitesi ve standardizasyonu açısından büyük bir potansiyel taşımaktadır. Ayrıca bu sistemler sayesinde gıda üretim teknolojileri kolaylıkla modifiye edilebilmekte ve fonksiyonel gıdaların üretimi kolaylaşmaktadır.

Çizelge 2.1 *L. lactis*'te çevresel strese karşı geliştirilen yanıtın biyokimyasal esası (Van de Guchte *et al*. 2002)

Stres	Koşul	Protein Sayısı	
		Teşvik Edilen	Baskılanan
Isı şoku	42 ºC, 5-25 dk	12-16	Çok
Düşük sıcaklık	8 ºC, 1-10 saat	12	17
Düşük pH	pH 5.5, 30 dk	33	Çok
Besinsel Yetersizlik	Arjinin, galaktoz eksikliği, 3 saat	14	>45
Ultraviyole radyasyon	254 nm, 100 J/m^2	14	>30

Çizelge 2.2 Çevresel stres koşullarında teşvik edilen genler (Van de Guchte *et al*. 2002)

Gen	Protein Fonksiyonu	Stres Koşulu
groESL	Şaperon	Isı şoku, 43 ºC 15 dk
groES	Şaperon	Isı şoku, 43 ºC 30 dk Düşük pH, pH 5.5, laktik asit, 30 dk Ultraviyole, 254 nm, 100 J/m^2
groEL	Şaperon	Isı şoku, 37 ºC 30 dk Isı şoku, 42 ºC 30 dk Düşük pH, pH 5.5, 30 dk
dnaJ	Şaperon	Düşük pH, pH 5.5, 30 dk Isı şoku, 42 ºC 10 dk
ORF	Isı şok genlerinin negatif regülatörü	Isı şoku, 43 ºC 15 dk
grpE	Şaperon	Isı şoku, 43 ºC 10 dk Isı şoku, 37 ºC 60 dk
dnaK	Şaperon	Isı şoku, 43 ºC 15 dk Isı şoku, 37 ºC 60 dk
ftsH/hflB	Isı şok yanıtı regülatörü	Isı şoku, 43 ºC 10 dk Isı şoku, 37 ºC 60 dk
recA	SOS regülatörü	DNA hasarı, %0.01 metil metilen sülfonat veya 1 µg/ml mitomisin C
fp9	DNA tamiri	Havalandırma, oksidasyon
sodA	O_2	Havalandırma, oksidasyon
cspA		Soğuk şoku, 10 ºC, 4 saat
cspB		Soğuk şoku, 10 ºC, 2 saat
P170		Düşük pH, pH 5.2
gadCB		Klor, 0.5 M NaCl

2.1.1 Ozmotik stres

Gıda endüstrisindeki çeşitli uygulamalarda ürüne önemli miktarlarda tuz ve şeker ilave edilmesi laktik asit bakterilerini ozmotik strese maruz bırakabilmektedir. Bakteriyel hücre zarı suyu geçirme yeteneğindedir. Bu nedenle gelişme ortamının ozmolaritesindeki artış, suyun sitoplazmadan hızla hücre dışına akışıyla sonuçlanır. Suyu hücrede tutmak ve böylece turgor basıncını korumak için bakteriler hücre fizyolojisini engellemeyen belirli çözünenleri depolayacak sistemlere sahiptirler (Csonka and Epstein 1996). Uyumlu çözünenler, ozmotik dengeye etkilerinin yanı sıra enzimleri de stabilize edebilir. Bu şekilde hücreler, sadece ozmotik strese karşı değil; yüksek sıcaklığa, dondurma çözme uygulamasına ve kurutmaya karşı da koruma sağlamaktadır (Kets *et al.* 1996, Poolman *et al.* 1998, Panoff *et al.* 1994). Bakteriler tarafından çoğunlukla kullanılan uyumlu çözünenlerden biri glisin betaindir. *L. lactis*'in gelişmesi, %2.5 NaCl varlığında %25-50 oranında azalmaktadır. Bu koşullar altında gelişmenin sürdürülebilmesi, sıvı besin ortamında betain bulunmasıyla gerçekleşmektedir. 0.5 M KCl ilave edilen ve kimyasal olarak tanımlanmış (CDM) sıvı besi yerinde geliştirilen *L. lactis* hücrelerin yüksek oranda prolin ve aspartat depoladığı belirlenmiştir. Aynı ortamda betain varlığında hücreler aspartat ve glutamatı da biriktirmiş, ancak prolin alımı durdurulmuştur. Daha sonra yürütülen çalışmalarda prolinin stres koşullarında betaine dönüştürülerek hücreye alındığı saptanmıştır (Molenaar *et al.* 1993, Kilstrup *et al.* 1997, Van de Guchte *et al.* 2002).

Değişik araştırıcılar, %2.5 NaCl stresine maruz bırakılan hücrelerde toplam protein sentezinin, stres uygulanmamış hücrelerle kıyaslandığında yaklaşık %50 oranında düştüğünü göstermiştir. Stres uygulamasından sonra 12 adet proteinin sentezinde artış görülmüştür. Bu proteinlerden biri olan Ssp21'in ifadesi, stres uygulamasının 40 dk sonrasında kademeli olarak 35 kat artmıştır (Sanders *et al.* 1998). Tuz stresi ile indüklenen proteinlerin çoğu ısı şokuyla da indüklenmiştir. DnaK, GroEL ve GroES ısı şoku proteinleri düzeylerinin %2.5 NaCl uygulamasıyla 10 dakikada 5-9 kat arttığı saptanmıştır. ClpP üretim düzeyi ise aynı koşullar altında 4 kat artmıştır (Nilsson *et al.* 1994, Kilstrup *et al.* 1997, Redon *et al.* 2005). Ozmotik stres dirençliliği bulunan *L.*

lactis suşlarında, hücre içi proteaz FtsH ve hücre dışı proteaz HtrA (Foucaud-Scheunemann *et al.* 2002) membranla ilişkili diğer iki protein olarak tanımlanmıştır. Proteaz mutantlarında ise NaCl stresine karşı duyarlılığın arttığı ve *htrA* transkripsiyonunun geçici olarak indüklendiği bulunmuştur (Van de Guchte *et al.* 2002, Cortes-Perez *et al.* 2006).

L. lactis'te çevresel etkilere bağlı olarak düzenlenen genler için yapılan bir araştırmada ortam ozmolaritesinden bağımsız olarak NaCl tarafından indüklenebilen fakat bunun için klora gerek duyan bir promotor yapısı tanımlanmıştır (Sanders *et al.* 1998). Bu promotordan, düşük pH da hayatta kalma işlevini yerine getiren iki adet gen transkribe edilmiştir. Bunlardan biri olan *gadC*, glutamat-γ-aminobütirat antiporter genini kodlamaktadır. Fakat bu genlerin ozmoregülasyondaki gerekliliği hala açıklanamamıştır (Kilimann *et al.* 2007).

2.1.2 Safra tuzu stresi

Safra , yağların ayrılmasında ve emiliminde rol oynayan kompleks bir sindirim salgısıdır. Safranın yapı taşı olan safra asidi, kolesterolden sentezlenen kolik asit (CA) türevidir. Bazı safra asitleri, karaciğerde taurin veya glisinle birleşirler (Russel *et al*. 1992). Safra asitlerinin bakteri hücreleri için toksititesi tamamen anlaşılamamasına rağmen, kuvvetli antimikrobiyel aktivite içeren amfipatik moleküller olduğu tanımlanmıştır. Akışkan bir bariyer oluşturan diğer membranlardan yoksun gram pozitif bakteriler çevrelerinde bulunan toksik ajanlara karşı gram negatif bakterilerden daha duyarlıdır (Thanassi *et al.* 1997). Gram negatif ve gram pozitif bakteriler safranın toksik etkisine direnç gösterebilmek ve sindirim sistemi gibi safra bakımından zengin ortamlarda yaşayabilmek için özgül mekanizmalar geliştirmiştir (Gunn 2000).

Bağırsak florası, safra asitlerini metabolize edebilen bazı laktik asit bakterilerini içerir. Laktobasillerde safra tuzu hidrolazları (BSH), safra asidinin çekirdeğinde bulunan glisin veya taurin amino asitlerini hidrolize ederek safra asidini dekonjuge hale getirebilir. Bu

hidroliz safranın özelliklerini değiştirerek deterjan aktivitesinde ve düşük pH'daki çözünürlüğünde dikkate değer düşüşler gerçekleştirir (Adamowicz *et al*. 1991, De Smet *et al.* 1995, Moser and Savage 2001).

L. lactis ssp *cremoris*'te (Kim *et al*. 1999); safraya, konjuge olmamış safra asitlerine (kolik asit), konjuge olmuş safra asitlerine (glikokolik asit (GCA)) veya taurodeksikolik aside (TDCA) karşı adaptif yanıt oluşturulduğu gözlenmiştir (Kim *et al*. 2001). Safra tuzu adaptasyonu esnasında sentezlenen proteinler iki yönlü elektroforez temeline dayanan bir proteomik yaklaşım kullanılarak incelenmiştir. Membran proteinleri, safra tuzunun membran bozucu etkisine karşı oluşturulan yanıta adaptasyon esnasında indüklenmiş olsa da, bu teknikle saptanamamıştır.

Safra asit dirençliliği için karakterize edilmiş tek makanizma; gram negatif bakterilerde safranın hücre dışına taşınmasıdır (Lomovskaya and Lewis 1992, Thanassi *et al*. 1997, Nishino and Yamaguchi 2001). Bu taşıma, çoklu ilaç dirençlilik (MDR) taşıyıcıları ailesine ait olan dışa akış sistemi aracılığıyla olmaktadır. MDR sistemi, antibiyotikleri, boyaları, organik çözücüleri deterjanları, safra asitlerini ve diğer çoğu hidrofobik ajanları içeren çeşitli toksik bileşenlere karşı dirençten sorumludur. Bakteriyel MDR taşıyıcılarının çoğunun aktivitesi proton motivasyon gücüne (pmf) veya ATP hidrolizine bağlıdır (Miyoshi *et al*. 2003). Bakterilerde safra tuzuna karşı oluşturulan yanıtı kontrol eden düzenleyici izyolları ile ilgili bilgiler halen yetersizdir (Zhang *et al.* 2008).

2.1.3 Yüksek sıcaklık

Hücrelerin yüksek sıcaklık koşullarında karşılaştıkları ana sorun protein denatürasyonudur (Somero 1995). Ayrıca, ribozomlar ve RNA gibi makro moleküllerde ve membran akışkanlığında değişmeler de tanımlanmıştır (Earnshaw *et al.* 1995, Teixera *et al.* 1997, Hansen *et al.* 2001). Bir *L. lactis* kültürünün gelişme sıcaklığının,

optimum gelişme sıcaklığı olan 30ºC'den 42ºC'ye yükseltilmesi durumunda hücrelerin gelişmesi durmaktadır. Sıcaklık tekrar 30ºC'ye düşürüldüğünde ise bir saat içinde sıcaklık stresi uygulaması öncesi gelişme oranına ulaşılabilmektedir. 42ºC'nin üzerindeki sıcaklık uygulamalarında, çeşitli *L. lactis* suşlarında 12-17 adet arasında hücresel proteinde ifade artışı gözlenmiştir (Whitaker and Batt 1991, Kilstrup *et al.* 1997, Even *et al.* 2003).

Detaylı immünolojik ve genetik analizler *L. lactis*'te; DnaK, DnaJ, GroEL, GroES ve GrpE ısı şoku proteinlerinin (HSP) bulunduğunu doğrulamıştır. Bu ısı şoku proteinleri, yeni veya denatüre proteinlerin olgunlaşmasında ve katlanmasında görev yapan protein şaperonlarıdır. Bu proteinleri kodlayan genlerin *L. lactis*'teki genetik organizasyonu diğer bakterilerden kısmen farklıdır. *L. lactis*'te çeşitli ısı şoku proteinlerinin indüksiyonu hem transkripsiyonel ve hem de translasyonel seviyelerde gözlenmiştir. Bu çalışmalarda ısı şoku proteinlerinin birden fazla indüksiyon sınıfına dahil olduğu saptanmıştır (Van Asseldonk *et al.* 1993, Arnau *et al.* 1996, Van de Guchte *et al*. 2002, Folgering *et al*. 2005, O'Driscoll *et al.* 2006).

L. lactis MG1363 suşunda ısı şoku proteinlerinin ifadesi üzerine yapılan çalışmada, bu suşun 15 dk boyunca 42ºC sıcaklık uygulamasına tutulması durumunda *dnaK*'ya özgü mRNA düzeyinin 100 kat arttığını göstermiştir. Aynı sıcaklık uygulamasında *hcrA* ve *grEp'*ye özgü mRNA'ların düzeyinde ise ısı şoku uygulamasının 10 dk sonrasında 5 kat artış gözlenmiştir. Isı şoku uygulamasının 15. dakikasında üretilen *groEL* ve *groES* genlerinin birbiri ile belirli oranda hibridizasyon vermesi söz konusu genlerin operon teşkil ettiğinin kanıtı olarak kabul edilmiştir (O'Driscoll *et al.* 2006).

Sıcaklık stresi uygulamasında üretilen ısı şoku proteinlerinin indüksiyonu iki yönlü poliakrilamit jel elektroforezi tekniği (2D-PAGE) kullanılarak tanımlanmıştır. 42ºC sıcaklık uygulamasında ısı şokunun ilk 10 dakikasında DnaK üretimi 35 kat artmış ancak stres uygulamasının devam etmesiyle beraber üretim düzeyi tekrar azalmıştır. Oysa aynı koşullarda GroEL ve GroES proteinlerinin üretim düzeylerinde sırasıyla 45

ve 35 kat artma belirlenmiştir. Aynı çalışmada fonksiyonları henüz tanımlanmamış diğer bir grup ısı şoku proteini daha düşük seviyelerde indüklenmiştir (Kilimann *et al.* 2007).

Şimdiye kadar *L. lactis* suşlarında sıcaklık stresi yanıtından sorumlu bir merkezi regülasyon sistemi tanımlanamamıştır. Stres yanıtından sorumlu şaperon operonlarının ifadesinin regülasyonu odaklı yoğun araştırmalar gerçekleştirilmektedir. *L. lactis* suşlarında ısı şoku genlerinin diğer bir regülatörünün RecA olabileceği düşünülmektedir. Bir *recA* mutant kültürünün gelişme sıcaklığı 37ºC'ye yükseltildiğinde gelişme başlamadan önce 8 saatlik bir lag fazı gözlenmiş ve DnaK, GroEL ve GroE şaperonlarının üretim düzeyinde 2-3 kat azalma gerçekleşmiştir (Duwat *et al.* 1999, Drews *et al.* 2004, Kilimann *et al.* 2007).

E. coli'de çoğu ısı şoku proteininin ifadesi transkripsiyon faktörü σ^{32} tarafından kontrol edilmektedir. σ^{32} nin negatif regülasyonunda bir ısı şoku proteini de olan HflB rol almaktadır. *L. lactis*'te, ifadesi yüksek sıcaklıkta indüklenen bir HflB homologu saptanmış ve bunun *recA* proteini olduğu ileri sürülmüştür. Ancak şu durumda *L. lactis*'te böyle bir pozitif faktörün varlığına dair bir delil yoktur. Bu nedenle, *L. lactis*'te ısı şoku proteinlerinin ifadesini düzenleyen diğer kontrol devrelerinin ve RecA ve HflB'nin asıl rollerinin ne olduğu hala açık değildir. Isı şoku proteinlerinin ifadesi düşük pH, yüksek tuz konsantrasyonu ve UV radyasyonu gibi diğer stres koşulları altında da gerçekleşmekte, fakat faj enfeksiyonundan etkilenmemektedir (Nilson *et al.* 1994, Duwat *et al.* 1995, Herman *et al.* 1995, Drews *et al.* 2004, Kilimann *et al.* 2007).

2.1.4 Düşük sıcaklık

Optimal gelişme sıcaklıkları dikkate alındığında, laktik asit bakterileri hem mezofilik hem de termofiliktir. Endüstriyel süreçlerde laktik asit bakterileri, starter kültürlerin dondurlarak depolanması, peynir olgunlaşmasındaki düşük sıcaklık fermentasyonu ve

fermente ürünlerin dondurularak depolanması gibi kendi gelişme sıcaklıklarının çok aşağısındaki sıcaklıklara maruz kalmaktadır. Laktik asit bakterilerinin dondurma işlemi sırasında ve düşük sıcaklıklarda hayatta kalması, suşların endüstriyel performansına katkıda bulunmaktadır. Canlı hücreler düşük sıcaklığa maruz kaldığında, membran akışkanlığı azalır ve translasyon, transkripsiyon ve DNA replikasyon etkinliği düşer. Mikroorganizmalar bu etkilerin üstesinden gelmek için soğuk şoku yanıtı olarak adlandırılan geçici bir adaptif yanıt geliştirirler (Van de Guchte *et al.* 2002). Bu süreçte, (i) membran akışkanlığını, (ii) düşük sıcaklığa hücresel adaptasyonda gerekli olan transkripsiyon ve translasyonu, (iii) negatif süper sarmalı indirgeyerek DNA süper sarmal yapısını sürdürmek amacıyla soğuk etkisiyle indüklenen proteinler (CIP) sentezlenmektedir. Oldukça güçlü bir şekilde indüklenen proteinler, soğuk şoku proteinleri (Csp) olarak adlandırılan düşük moleküler ağırlıklı (~7.5 kDa) yakın ilişkili bir protein ailesini içerir. Soğuk şoku proteinlerinin mRNA ikincil yapılarının oluşumunu önleyerek düşük sıcaklıklarda transkripsiyon ve translasyonu kolaylaştırmak için RNA şaperonları gibi hareket ettiği önerilmiştir (Graumann *et al.* 1997, Viang *et al.* 1997, Phadtare *et al.* 2000, Gregus and Nemeti 2005).

Laktokok suşlarında hücre sayısının iki katına ulaşması için gerekli süre 30ºC'de ortalama 48 dk iken, inkübasyon sıcaklıklarının 16ºC, 8ºC ve 4ºC olması durumunda, bu sürenin sırasıyla 3,5 saat, 57 saat ve 7 güne çıktığı saptanmıştır. Bu sıcaklık düşüşünden sonra lag periyodu gözlenmemiştir. Log fazı hücreleri dondurma çözme uygulamasına durağan gelişme fazındaki hücrelerden daha fazla direnç göstermektedirler (Kim and Dunn 1997, Janowiak and Griffith 2005).

Transkripsiyonel analizler ve iki yönlü jel elektroforezi tekniği (2D-PAGE) analizleri, *L. lactis* suşlarında CspA, CspB, CspC, CspD, CspF olarak adlandırılan beş adet Csp geninin, ısı şoku uygulaması ile indüklendiğini göstermiştir. CSP'lerin azami indüksiyon etkinliği 10ºC'de, en az üretimi ise 20 ve 4ºC'de gözlenmiştir. CspE, 30ºC'de bulunan ana CSP olarak öne çıkmaktadır. Soğuk şoku proteinleri, RNA şaperonları veya alternatif taranslasyon başlatma gibi fonksiyonları ve spesifik olmayan bağlanma ile hücreleri korumaktadır (Wouters *et al.* 1999, Li *et al.* 2005).

2.1.5 Düşük asitlik

L. lactis, süt fermentasyonlarında laktozu, gelişme ortamının pH'sının kademeli olarak düşmesine yol açan laktata dönüştürür. Bu işlem sonucu sütün pH'sı yaklaşık olarak 4.5'e kadar düşer. Bu noktada ya düşük pH, ya da yüksek laktat konsantrasyonu sonucu gelişme durur. Hücre içi pH'nın nötrale yakın tutulmasının esas önemi, düşük hücre dışı pH'da hücrelerin yaşayabilmesini sağlamasıdır. Fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan çoğu laktik asit bakterisi nötrofilik özelliktedir. Laktokoklar da diğer laktik asit bakterileri gibi, fermentasyon ortamında hücre dışı pH düşerken, hücre içi pH'yı düşürürler (O' Sullivan and Condon 1999). Laktik asit zayıf bir organik asit olması sebebiyle düşük pH seviyelerinde elektron yükü değişimine uğramaz ve protonlanmış halde hücre membranından kolayca geçebilir. Ancak laktik asit sitoplazmik pH'da çözünmekte ve bu durum hücrede etkili bir stres yaratmaktadır. Laktokoklar, gelişme esnasında organik asit birikmesinden dolayı gelişme ortamlarının pH'sını yaklaşık olarak 4.5'e düşürüler. *L. lactis*'in hücre içi pH düzeyi; hücrelerin içinde bulunduğu gelişme ortamının pH'sının HCl ile 6,75'ten 5'e düşürülmesi durumunda az bir miktar azalma gösterirken (pH 7'den 6'ya düşer), hücre dışı pH'sı laktik asit ile ayarlandığında hücre içi pH'sı daha yüksek oranda azalmaktadır (pH 7'den 5,25'e düşer) (Cook and Russel 1994, Frees *et al*. 2003). Asit stresinin bakteri fizyolojisine etkisi detaylı olarak bilinmemekle beraber, asitlerin geçirgen olmayan hücre membranına pasif olarak diffüze olup sonrasında sitoplazmaya girerek protonlarına ve yüklenmiş türevlerine ayrıldıkları tespit edilmiştir (Presser *et al.* 1997, Even *et al*. 2003).

L. lactis, dış ortam pH'sının 6.3-6.9 aralığında olması durumunda optimum gelişme gösterir. Fermentasyon esnasında gelişme ortamının pH'sı düşer. Hücre dışı pH değeri 5'in üzerindeyken, *L. lactis*'te hücre içi ve hücre dışı pH düzeylerindeki farklılık (ΔpH) 1 civarında korunabilir. Bu değerin aşağısında ise, ΔpH daralmaya başlar. En az 72 saatlik süt fermentasyonun sonunda hücre dışı pH 4.5 civarındadır ve ΔpH 0.6 civarında korunur. Besin konsantrasyonunun sınırlanmamış olmasına rağmen, hücre içi pH konsantrasyonunun düşük olması, gelişmenin durmasına sebep olmaktadır. Ancak

laktokokların asidik pH'ya yanıt oluşturabildiği bilinmektedir (Nannen and Hutkins 1991, Kim *et al*. 1999, Madsen *et al*. 2005). Bu bakteriler karbon kısıtlanması durumunda asit stresine karşı daha dirençli hale geçer, ılımlı asidik ortamda adaptif yanıt indüklenir (Hartke *et al.* 1996, Rallu *et al.* 1996, O'Sullivian and Condon 1999, Redon *et al.* 2005). İndüklenme protein sentezine neden olur. *L. lactis* IL1403 suşunda asit adaptasyonu beş ısı şoku ve UV-etkisiyle indüklenen proteinleri de içeren 33 proteini eyleme geçirmektedir (Redon *et al.* 2005).

Laktokoklarda şimdiye kadar pH homeostasisi ile ilgili üç fonksiyon karakterize edilmiştir. (i) H^+-ATPaz, (ii) arjinin deaminaz izyolu ve (iii) glutamat dekarboksilaz. H^+-ATPaz, protonları ATP hidrolizi yoluyla hücre dışına çıkarır. pH düşüşüyle artan bu aktivite sırasında ATP harcanır ve bu durum gelişmeye zarar verir . Arjinin deaminaz izyolu (ADI); arjinin deaminaz, ornitin karbamil transferaz ve karbamat kinaz enzimleri ile karakterize edilmektedir. Arjinin, 1 mol ATP harcanarak amonyağa, ornitine veya karbondiokside dönüştürülür. Amonyak üretimi, düşen hücre dışı pH'sını nötralize ederek hücrenin hayatta kalmasına yardım edebilir. *L. lactis* MG1363 suşunda tanımlanan glutamat dekarboksilaz (GadB), glutamatı bir proton ekleyerek γ-aminobütirat ve karbon dioksite çevirir ve bu yolla pH homeostasisini bozar. Bu üç mekanizma, hücre içi asidifikasyonunu azaltır ve böylece asit dirençliliğini sürdürmede önemli rol oynar (Rallu *et al.* 2000, Blank *et al.* 2001, Duwat *et al.* 2001, Madsen *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2008).

2.2 Stres Yanıtının Oluşumunda Üssel ve Durağan Fazlar Arasındaki Farklar

Hücrelerin strese karşı hayatta kalmaları fizyolojik durumlarına bağlıdır ve stres durumlarında üssel ve durağan faz hücreleri arasında belirgin farklar vardır (Foster and Spector 1995). Üssel ve durağan faz hücreleri aynı stres uygulamasına maruz bırakıldıklarında üssel faz hücrelerinin hayatta kalmaları, stres uygulamalarının şiddetine bağlı olarak, yüksek oranda değişkenlik gösterir. Ancak durağan faz hücreleri şiddetli stres koşullarına dahi dayanıklıdır. İki gelişme fazı arasındaki diğer bir fark ise;

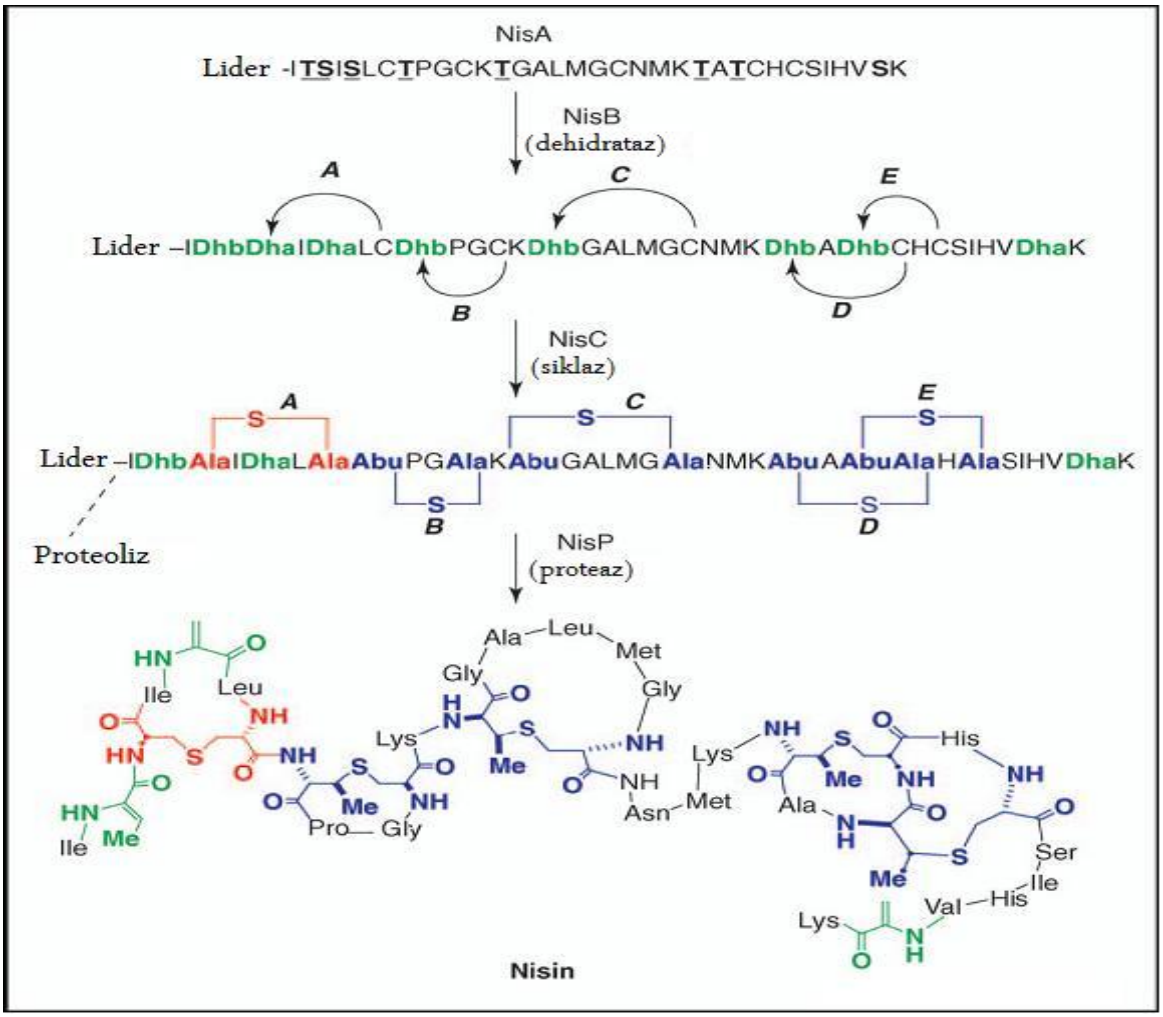
üssel faz hücrelerinin adaptif yanıt oluşturabilme yeteneğinde olmalarıdır (Kim *et al.* 2002).

Belirli bir koşula yanıt oluşturmada hücrenin davranışı, o organizmanın sadece genetik yapısına değil aynı zamanda uygulama sırasındaki hücrelerin fizyolojik durumuna da bağlıdır (Cutler and Evans 1966, Kim *et al.* 2002). Durağan fazdaki hücrelerin çoğunun hücre döngüsünün aynı aşamasında olması beklenir. Bundan dolayı bir durağan faz kültürü yüksek oranda homojen bir hücre kültürünü temsil etmektedir. Buna uygun olarak, herbir hücredeki proteinlerin seviyesi ve protein bileşimi aynı veya benzer bir pozisyon sergilemektedir (Kim *et al.* 2002, Miyoshi *et al.* 2003). Bir üssel faz kültüründeki hücreler, hücre gelişiminin rastgele doğası sebebiyle hücre döngüsünün farklı aşamalarında bulunur. Üssel faz esnasında belirli herhangi bir zamanda kültür, fizyolojik olarak heterojen bir hücre grubunu temsil etmektedir. Hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücreler genetik olarak özdeş olsalar dahi, fizyolojik olarak farklıdırlar. Bu nedenle, üssel fazda protein bileşiminin veya proteinlerin ifade seviyelerinin hücrelerin, hücre döngüsünün hangi aşamasında olduğuna bağlı olarak farklı veya hücreden hücreye değişken olması beklenir (Even *et al.* 2003).

Üssel gelişme fazını, durağan faza girmeden önce kısa bir geçiş fazı takip eder. Kompleks ortamda (%1 glukoz ilave edilmiş M17) geçiş fazı, *L. lactis* için genel olarak kabul edilenden (OD 600 nm'de ~1) daha erken başlamaktadır (OD 600 nm'de ~0.3). *L. lactis* MG1363 suşunda gerçekleştirilen çalışmada, 55ºC'de 15 dk uygulama sonrasında OD ~0.3'ün üzerindeki farklı OD değerlerinde (OD 0.5, 0.8) strese karşı direnç oluşturmada genel bir artış gözlenmiştir (Duwat *et al.* 1999). Başlangıç kültürde OD 0.3'ten büyük veya hücre yoğunluğu yüksek (10^6 hücre/ml) olduğunda *recA* suşunun ısı duyarlılığı saptanmamıştır (Duwat *et al.* 1995, Duwat *et al.* 2000, Hammes and Hertel 2003, Egervarn *et al.* 2007).

2.3 Nisin

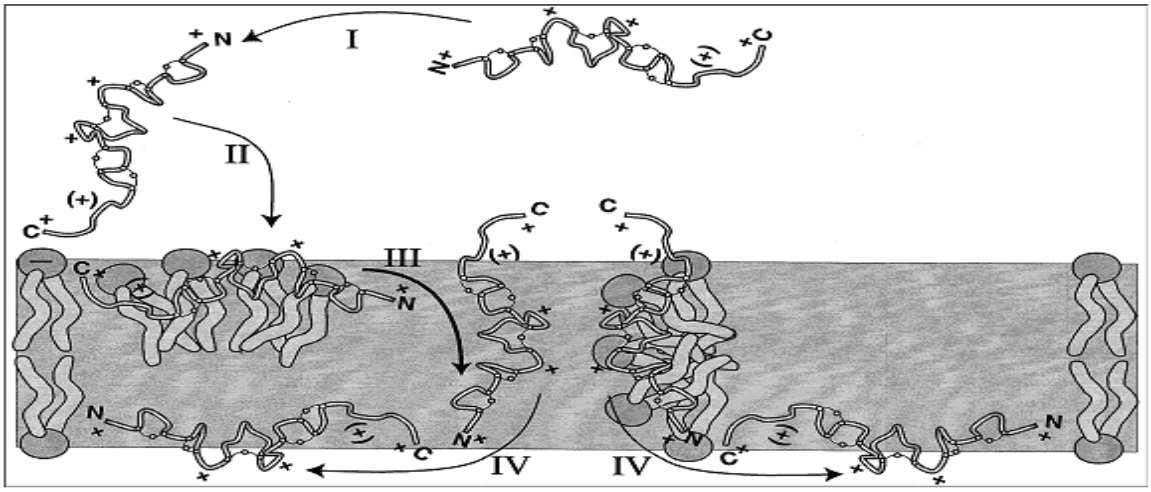
Nisin, *L. lactis*'in bazı suşları tarafından üretilen ve translasyon sonrası modifikasyonlarla aktif formu oluşturulan bir polipeptittir. Lantibiyotik grubunun en bilinen üyelerinden biri olan nisin, gıda koruyucusu olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir (Klaenhammer 1993, Nes *et al.* 1996). Nisin, 3353 Dalton moleküler ağırlıkta, katyonik ve hidrofobik bir moleküldür. Bir lantiyonin, dört β-metillantiyonin halkası ve nadir amino asitlerden olan dehidroalanin ve dehidrobütirini içeren 34 amino asitlik bir peptittir (de Vos *et al.* 1995, Kuipers *et al.* 1995). Tanımlanan iki doğal nisin varyantı; nisin A ve nisin Z olarak adlandırılmıştır. İkisi de benzer yapıya ve antimikrobiyel etkiye sahiptir. Ancak nisin A, 27. pozisyonda asparajin yerine histidin amino asiti bulundurması ile nisin Z'den ayrılmaktadır (Şekil 2.1). Nisinin *L. lactis* tarafından üretimi, birincil metabolik kinetikler göstermekte ve gelişme fazına bağımlı biçimde düzenlenmektedir (de Vuyst and Vandamme 1994, Cheng *et al.* 2002). Kromozomda yer alan nisin gen kümesi (*nisA(Z)BTCIPRKFEG*), nisin öncü proteininin sentezini, proteinin translasyon sonrası modifikasyonunu, nisin dirençliliğini, transkripsiyonel regülasyonu, peptit transferini ve öncü proteinin işlenmesini gerçekleştiren proteinleri kodlamaktadır (Engelke *et al.* 1992, Kuipers *et al.* 1993, Siegers and Entain 1995, Ra *et al*. 1996, Zendo *et al.* 2003). Nisin gen kümesi iki promotor içermektedir. İlki *nisA* geninin üst akış yönünde, ikincisi *nisP* ve *nisR* genleri arasında bulunur. NisA ve NisB genleri arasında bulunan genin dönüş yapmış tekrar serisinin rho'ya bağlı terminatör olarak görev yapması, nisin gen kümesi içinde yer alan genlerin ifadesinin düzenlenmesinin karmaşık olduğunu düşündürmektedir (Dimov *et al.* 2005).



Şekil 2.1 Nisin biyosentez aşamaları (Patton and Donk 2005)

Bazı lantibiyotikler gelişme fazına bağımlı biçimde üretilir ve biyosentezleri, bir reseptör histidin kinaz ve bir yanıt regülatöründen oluşan bakteriyel iki bileşenli düzenleyici sistemin kontrolü altındadır. Daha önce de ifade edildiği gibi, *L. lactis*'te nisin üretimi gelişmeye bağlıdır ve birincil metabolik kinetikler sergiler. Bu kinetikler şu başlıklar altında toplanabilir; (i) nisin aktivitesi gelişmenin başında zayıftır; (ii) üssel gelişme fazı esnasında nisin üretiminde güçlü bir artış gerçekleşmektedir, (iii) nisinin en yüksek aktivitesi üssel gelişme fazının sonunda (veya durağan fazın başında) belirlenmiştir, (iv) hücre durağan faza girdiğinde nisin üretimi tamamen durdurulur (Cheigh and Pyun 2005).

Nisin, “delme” ve “sıkıştırma” olarak adlandırılan iki modele göre por oluşumunu sağlamakta ve antibakteriyel aktivitesini göstermektedir. “Delme” modelindeki her bir nisin molekülü dikey bir şekilde zara bağlanarak, zarda bir iyon kanalı oluşturmaktadır. “Sıkıştırma” modelinde ise, belirli sayıda nisin molekülü fosfolipidlerin baş gruplarıyla interaksiyona girdikten sonra, lipitlerin sıkıştırılması sonucu, lipit-protein porları meydana getirmektedir (Delves-Broughton 1990, Cleveland *et al*. 2001) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Nisin etki mekanizması modeli (Breukink and Kruijff 1999)

(I) nisinin C-ucuyla bağlanması, (II) nisinin membrana girişi, (III) nisin tarafından por oluşturulması ve (IV) tüm peptitlerin translokasyonu

Stres koşullarında nisin üretimi, hücrenin stres koşullarına yanıt oluşturmasına paralel olarak korunabilmektedir. Gelişme fazında stres koşullarına karşı yüksek hassasiyet, genellikle nisin üretiminin transkripsiyonel düzeyde baskılanması ile sonuçlanmaktadır. Starter kültür suşu olarak kullanılan *L. lactis* üyelerinde bu nedenle, hızlı stres yanıt mekanizması özelliği tercih edilmektedir. Bazı araştırmalarda, nisin üretiminin stres koşulları altında kısmen teşvik edildiğinin belirlenmesi, doğrudan strese bağlı hücre parçalanması ile ilgili bir durumdur. Üssel fazdaki hücrelerde daima nisin üretiminde baskılanma meydana gelmektedir (Delves and Broughton 1990).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar ve gelişme ortamları

Çalışma kapsamında kullanılan nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşu ile nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* S102 kontrol suşu Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan, indikatör bakteri olarak kullanılan *Micrococcus luteus* suşu Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden sağlandı. *L. lactis* suşları 5 g/L olacak şekilde glukoz ilave edilmiş M17 sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat, *M. luteus* suşu ise Luria Bertani (LB) sıvı besiyerinde 37ºC'de çalkalamalı olarak 18 saat süre ile geliştirildi.

3.2 Yöntem

3.2.1 Farklı stres koşullarında letal ve subletal dozların belirlenmesi

Stres koşulu tayini çalışmalarında, ozmotik stres uygulaması için; % 1.0 ile % 7.5 arasında değişen konsantrasyonlarda NaCl içeren GM17 sıvı besiyeri hazırlandı. Safra tuzu stresi için; GM17 sıvı besiyerine % 0.025 ile % 0.250 arasında değişen konsantrasyonlarda safra tuzu (stok çözelti %20 w/v) ilave edildi. pH stresi çalışmasında gelişme ortamı olarak pH 3.0 ile pH 12.0 arasında belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan Elliker sıvı besiyeri kullanıldı. GM17 sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat süreyle geliştirilen *L. lactis* kültürleri, hazırlanan bu ortamlara % 1 oranında inoküle edildi ve 30°C'de 3 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Sıcaklık stresi denemelerinde, GM17 sıvı besiyerine % 1 inoküle edilen *L. lactis* kültürleri 3 saat boyunca 5ºC ile 45ºC arasında belirlenen inkübasyon sıcaklıklarına tabi tutuldu. Üç

saatlik inkübasyonun ardından *L. lactis* kültürlerinden fizyolojik tuzlu su (FTS, % 0.85 NaCl) içerisinde ardışık sekiz seyreltme yapıldı. Her bir seyreltme tüpünden, GM17 agar besiyerine 5 µl damlatma ekim yapılan petriler 30°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün koloni gelişimi gözlenmeyen stres koşulu değerleri letal doz olarak belirlendi. Gelişme gözlenen stres koşullarında seyreltme değerlerindeki koloni miktarlarına (cfu/mL) bakılarak uygun seyreltme oranı belirlendi. 30°C'de 18 saat geliştirilen *L. lactis* kültürleri damlatma ekim sonuçlarına göre belirlenen stres koşullarına göre hazırlanmış 5 mL GM17 sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilerek 30°C'de 3 saat süre ile inkübe edildi. 3 saatlik inkübasyonun ardından, damlatma ekim sonuçlarına göre belirlenen seyreltme değerine kadar ardışık seyreltmeler yapıldı ve GM17 agar besiyerine yayma ekim (100 µL) yapıldı. Bu ortamlar 30°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 35 ile 300 arasında koloni sayımı yapılabilen petrilerin seyreltme miktarları değerlendirmeye alınarak, stres koşulu için subletal dozlar belirlendi (Kim *et al*. 1999).

Elliker Broth

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

pH 6.8 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

M17 Broth ve Agar

Polipepton	5	g
Fitopepton	5	g
Maya ekstraktı	2.5	g
Et ekstraktı	5	g
β-disodyum gliserofosfat	19	g
Laktoz (%10)	50	g
$MgSO_4.7H_2O$ (1 M)	1	mL
Askorbik asit	0.5	g
Glukoz	5	g
Agar	15	g
Destile su	1000	mL

pH 7.15 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

3.2.2 Üssel fazda nisin üretim düzeyinin belirlenmesi

1 mL GM17 sıvı besiyeri içeren steril mikrosantrifüj tüplerine, GM17 sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat geliştirilmiş kültürden % 1 oranında inokülasyon yapılıp, 30°C'de 6 saat inkübasyona tabi tutuldu. Süre bitiminde bu ortamlar 12000 devir/dk hızda 30 saniye santrifüj işlemine tabi tutulup, üst sıvılar tamamen uzaklaştırıldı. Çökeltinin üzerine belirlenen subletal stres koşulları esas alınarak hazırlanmış GM17 sıvı besiyerinden (pH stresi uygulaması için Elliker sıvı besi yeri kullanıldı) 1 mL ilave edildi ve çökeltiler manyetik karıştırıcıda çözüldü. 30°C'de (sıcaklık stresi uygulaması için belirlenen subletal sıcaklık stresi koşullarında) 3 saat geliştirilen hücreler, 12000 devir/dk hızda 30 saniye santrifüj işlemine tabi tutulup çöktürüldü. Üst sıvılar steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 80°C su banyosunda 15 dakika ısıl muameleye tabi tutulup -20°C'de saklandı (Kim *et al*. 2002).

3.2.3 Üremenin durma fazında nisin üretim düzeyinin belirlenmesi

1 mL GM17 sıvı besiyeri içeren steril mikrosantrifüj tüplerine, GM17 sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat geliştirilmiş kültürden % 1 oranında inokülasyon yapılıp, 30°C'de 8 saat inkübasyona tabi tutuldu. Süre bitiminde mikrosantrifüj tüpleri 12000 devir/dk hızda 30 saniye santrifüj işlemine tabi tutulup üst sıvılar tamamen uzaklaştırıldı. Çökeltilerin üzerine belirlenen subletal tuz konsantrasyonunda hazırlanmış GM17 sıvı besiyerinden (pH stresi uygulaması için Elliker sıvı besi yeri kullanıldı) 1 mL ilave edilerek hücre çökeltileri çözüldü. 30°C'de (sıcaklık stresi uygulaması için belirlenen subletal sıcaklık stresi koşullarında) 3 saat geliştirilen hücreler 12000 devir/dk hızda 30 saniye santrifüj işlemine tabi tutulup çöktürüldü. Üst sıvılar steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 80°C sıcak su banyosunda 15 dakika ısıl muameleye tabi tutulup -20°C'de saklandı (Kim *et al*. 2002).

3.2.4 Nisin aktivitesinin belirlenmesi

Nisin aktivitesinin belirlenmesi amacı ile nisaplinin (Sigma Chem. Co., USA) farklı konsantrasyonlarda şahit çözeltileri (20 IU/mL, 40 IU/mL, 80 IU/mL, 160 IU/mL, 320 IU/mL, 640 IU/mL) hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin *M. luteus*'a karşı oluşturduğu inhibisyon zonu çapları agar difüzyon testi sonunda ölçüldü. Agar difüzyon testinde LB sıvı besiyerinde 37°C çalkalamalı inkübatörde 18 saat süre ile geliştirilen *M. luteus* kültüründen, 5 mL LB yumuşak agar (% 0.45) ortamına % 1 oranında inokülasyon yapılıp karıştırıldıktan sonra LB agar üzerine düzgünce yayıldı ve katılaşması beklendi. Şahit çözeltiler, hazırlanan petri plakalarına 10 µl damlatılarak, 30ºC'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek bir standart doğru oluşturuldu. Logaritmik faz ve üremenin durma fazında, farklı stres koşulları için belirlenen sublethal ortamlarda geliştirilen hücrelerden hazırlanan üst sıvılarda nisin aktivitesi, *M. luteus*'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu çapları, agar difüzyon testi sonucunda ölçülerek şahit çözeltilerle oluşturulmuş standart doğru formülünde yerine koyularak IU/mL cinsinden hesaplandı (Cheng *et al*. 2002).

LB Broth ve Agar

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

pH 7.0 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

3.2.5 Bakterilerin plazmid içeriklerinin tanımlanması

3.2.5.1 Plazmid izolasyonu

GM17 sıvı besiyeri içerisinde 30°C'de 18 saat geliştirilen hücreler, uygun olarak hazırlanmış 10 mL'lik GM17 sıvı besiyerlerine (pH stresi için subletal pH konsantrasyonuna ayarlanmış Ellikler sıvı besiyerine) % 10 oranında inokülasyonlar yapılarak 30°C'de 3 saat inkübasyona tabi tutuldu. Sıcaklık stresi uygulaması için 5°C'de ve 45°C'de 3 saat inkübasyon yapıldı. İnkübasyon süresi bitiminde santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri 6000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre çökeltisi kurutulduktan sonra, 379 µL sakkaroz tamponunda çözüldü. 37°C'de 5 dakika bekletilen bu ortama 96.5 µL lizozim ilave edilerek 37°C su banyosunda 5 dakika bekletildi. 48.5 µL Tris-EDTA-1 (pH 8.0) uygulamasının ardından, tüplere 28 µL % 20 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden aktarılarak karıştırıldı. Bu aşamada ortamda viskozitenin artışı lizizin başladığının göstergesidir. Lizizin tamamlanması için santrifüj tüpleri 37°C su banyosunda 10 dakika tutuldu. Süre sonunda tüp içerikleri yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA'nın kırılması sağlandı. Ortama yeni hazırlanmış 3 N NaOH çözeltisinden 28 µL ilave edilerek tüpler yatay bir zemin üzerinde 10 dakika boyunca yavaşça karıştırıldı. Denatürasyon aşamasının sonunda santrifüj tüplerine 50 µL Tris-HCl (pH 7.0) çözeltisi aktarılarak 3 dakika süre ile yine düz bir zemin üzerinde yavaşça karıştırıldı. Ardından tüplere +4°C'de saklanan 5 M NaCl çözeltisinden 72 µL ve Fenol çözeltisinden 700 µL eklenip, +4°C'de 15000 devirde 20 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Elde edilen üst faz, mikropipet yardımıyla

yeni steril tüplere aktarıldı ve deproteinasyonun sağlanması için 700 µL kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi ilave edilip +4°C'de 15000 devirde 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Oluşan üst faz yeni tüplere alındı ve üzerine 500 µL etilalkol aktarıldı. Etilalkol ilave edilen tüpler -20°C'de bir gece bekletildikten sonra 12500 devirde 20 dakika santrifüj uygulanarak plazmid DNA çöktürüldü ve sıvı faz uzaklaştırılarak çökeltiler kurutuldu. Kuruyan çökeltiler 20 µL Tris-EDTA-2 (pH 7,5) içerisinde çözüldü ve RNaz A stok çözeltisinden 2 µL ilave edilerek 37°C su banyosunda 45-50 dakika inkübe edildi (Anderson and McKay 1983).

Sakkaroz Çözeltisi

Tris	0.655	g
EDTA	0.0372	g
Sakkaroz	6.7	g
Destile su	100	mL

pH 8.0 ± 0.02

Lizozim Çözeltisi

Tris	0.3	g
Lizozim	0.1	g
Destile su	10	mL

pH 8.0 ± 0.02

Tris-EDTA-1

Tris	0.6	g
EDTA	9.31	g
Destile su	100	mL

pH 8.0 ± 0.02

SDS Çözeltisi

Tris	0.6	g
EDTA	0.74	g
SDS	20	g
Destile su	100	mL

pH 8.0 ± 0.02

Tris-HCl

Tris-HCl	31.52	g
Destile su	100	mL

pH 7.0 ± 0.02

Tris-EDTA-2

Tris	0.121	g
EDTA	0.037	g
Destile su	100	mL

pH 7.0 ± 0.02

% 3 NaCl ile Doyurulmuş Fenol Çözeltisinin Hazırlanışı: 100 g fenol üzerine 20 mL destile su ve 3 g NaCl aktarılarak 45°C'deki su banyosunda çözüldü. Ortalama 0.1 g hidroksiguinolin ilave edilip karıştırılarak oda sıcaklığında tutuldu.

RNaz A Çözeltisi: 5 mL steril destile su içerisinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat çözeltisinin pH'sı asetik asit ile 5.0'a ayarlandı ve üzerine 5 mg RNaz A (Sigma, Chem, Co., USA) ilave edildi. Ortam kaynar su içerisinde 5 dakika tutulduktan sonra, -20°C'de saklandı.

3.2.5.2 Elektroforez

Plazmid DNA örneklerinin elektroforezi % 0.7 agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapıldı (Mayers *et al.* 1976). Yatay jel sistemleri için agaroz, kullanılan jel plaka sisteminin büyüklüğüne göre 30-35 ya da 150-200 mL tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözüldü. 45°C'ye kadar soğutulan ortam, elektroforez plakalarına döküldü ve jel tarakları yerleştirilerek 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin üzerini kapatacak miktarda tampon çözelti ilave edildi ve jel zedelenmeden taraklar ortamdan alındı. 37°C su banyosunda 45 dakika RNaz uygulanan DNA örnekleri alınarak 2 µL marker boya çözeltisi ile karıştırıldı ve mikro pipet yardımıyla jel kuyucuklarına aktarıldı (20 µL). Elektroforez işlemi, 100 voltta 3-3.5 saat süre ile yapıldı. Marker boyanın jel sistemini terk etmesinden sonra elektrik akımı kesilip ortamdan alınan jeller, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren çözeltisinde bir saat boyandı. Boyama işleminin sonunda jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışık altında incelendi (Macrina *et al.* 1982). Fotoğrafların çekiminde Kodak Gel Logic 200 jel dökümantasyon sistemi (Eastman Kodak Co., USA) kullanıldı.

Tris-Asetat Tamponu

Tris	4.84	g
Sodyum asetat	4.08	mL
EDTA (0.5 M)	0.37	mL
Destile su	1000	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Marker Boya

Brom fenol blue	0.25	g
Sakkaroz	40	g
Destile su	100	mL

3.2.5.3 Plazmid büyüklüklerinin saptanması

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

Eğrinin eğimi (I) = $\dfrac{E-(G.C)}{B-(G.A)}$

Korelasyon Katsayısı (J) = $\dfrac{E-(G.C)}{\sqrt{\left[D-(H.C)\right].\left[B-(G.A)\right]}}$

Moleküler Büyüklük (W) = Antilog_{10} [I . (α – G) + H]

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

Y : Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

$A = X_1 + X_2 + X_3 + ... + X_n$

$B = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + ... + X_n^2$

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

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

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

G = Ortalama X = $\dfrac{A}{N}$

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

α : Moleküler büyüklüğü bilinmeyen plazmidin jel üzerindeki göçü (mm)

3.2.6 Hücre duvarı proteinlerinin izolasyonu

GM17 sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat geliştirilen hücre kültürleri GM17 sıvı besiyerine % 10 oranında inoküle edilip 30°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. Sıcaklık stresi uygulamasında 5°C ve 45°C inkübasyon sıcaklığı olarak kullanıldı. Diğer stres koşulları bölüm 3.2.1 de belirtildiği gibi uygulandı. Geliştirilen bakteri kültürleri 6000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra hücre çökeltisinin üzerine 10 mL destile su aktarıldı. Destile suda süspanse edilen hücreler 6000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Üst faz uzaklaştırıldı ve hücre çökeltisinin üzerine 250 µl ekstraksiyon çözeltisi ilave edilerek çözüldü. Daha sonra bu ortamlar 100°C kaynar suda 5 dakika ısıl muamelye tabi tutuldu. Oda sıcaklığına kadar soğutulan örnekler 12000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve üst fazlar sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sisteminde analiz edildi (Gatti *et al*. 2002).

Ekstraksiyon Çözeltisi (10xSDS Yükleme Tamponu)

Tris	0.5	M
Gliserol	10	mL
Bromfenol mavisi	50	mg
Sodyum dodesil sülfat	2	g
2-merkaptoetanol	2.5	mL
Destile su	250	mL

pH 6.8

3.2.6.1 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Hücre duvarı protein örneklerinin analizi, Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile yapıldı. (Laemmli 1970). Ayırıcı jel, tarak yerleştirme bölgesini 0.5 cm altına gelinceye kadar dökülüp üzerine yığma jelin geleceği seviyeye kadar destile su ilave edildi. Ayırıcı jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklendi ve destile su kurutma kağıdı aracılığıyla ortamdan alındı. Plakanın geri kalan kısmı yığma jel dökülerek tamamlandı ve tarak yerleştirildi. Yığma jelin polimerizasyonu için 20 dakika daha beklendikten sonra cam plakalar elektroforez tankına kondu. Tris-Glisin tamponu tanka doldurulup tarak çıkarıldı ve protein örneklerinden 15 µL, protein marker 20 µL alınarak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi 100 voltta 2.5 saat süre ile yapıldı. Protein örneklerinin yürütülme işleminin tamamlanmasının ardından jel, commasie brillant blue boya çözeltisine alınarak burada 25-30 dakika bekletildikten sonra 30-45 dakika da protein bantları netlik kazanıncaya kadar boya geri alma çözeltisinde tutuldu ve destile su içerisinde bir gece bekletildi.

4 x Tris-Cl / SDS (pH 8.8)

Tris	91	g
Sodyum dodesil sülfat	2	g
Destile su	500	mL

4 x Tris-Cl / SDS (pH 6.8)

Tris (trisma base)	6.05	g
Sodyum dodesil sülfat	0.4	g
Destile su	100	mL

Amonyum Persülfat (%10)

Amonyum persülfat	0.1	g
Destile su	1	mL

Akrilamid / Bisakrilamid Çözeltisi

Akrilamit	29,2	g
Bisakrilamit	0,8	g
Destile su	1000	mL'tamamlanır

Whatman No.1 ile filtre edilir. +4ºC'de saklanır

Commasie Brilliant Blue Boya Çözeltisi

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

Tris-Glisin Tamponu (Elektrot Tamponu) (x1)

Tris	1.65	g
Glisin	8	g
Sodyum dodesil sülfat	1.4	g
Destile su	1100	mL

Boya Geri Alma Çözeltisi

Metanol	400	mL
Glasiyel Asetik Asit	100	mL
Destile su	500	mL

Jel Fiksasyon Çözeltisi

Glasiyel Asetik Asit	70	mL
Destile su	930	mL

Ayırıcı Jel % 12 lik

Akrilamit (% 30) / bisakrilamit (% 8)	6	mL
4 x Tris –Cl /SDS pH 8.8	3.75	mL
Steril distile su	5.25	mL
% 10 amonyum persülfat	50	µL
TEMED	10	µL

Yığma Jel

Akrilamit (% 30) / bisakrilamit (% 8)	0.65	mL
4 x Tris –Cl /SDS pH 6.8	1.25	mL
Steril distile su	3.05	mL
% 10 amonyum persülfat	25	µL
TEMED	5	µL

3.2.7 Protein büyüklüklerinin saptanması

SDS-PAGE sistemlerinde görüntülenen proteinlerin büyüklükleri; her bir marker proteininin moleküler ağırlığının logaritmasının, hesaplanan R_f değerine karşılık grafiğe geçilmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi temel alınarak hesaplandı. Büyüklükleri bilinen marker moleküllerinin logaritması y eksenini ve R_f değeri x eksenini teşkil edecek şekilde Excell programında grafiğe geçilerek, program aracılığı ile grafiğe ait eğrinin matematiksel ifadesi elde edildi. Araştırılan proteinin R_f değeri, jel fotoğrafı üzerinden ölçüldü ve formülde yerine konularak, Excell programında moleküler büyüklüğü hesaplandı.

R_f Değeri

R_f : Proteinin kat ettiği mesefe / boyanın kat ettiği mesafe.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

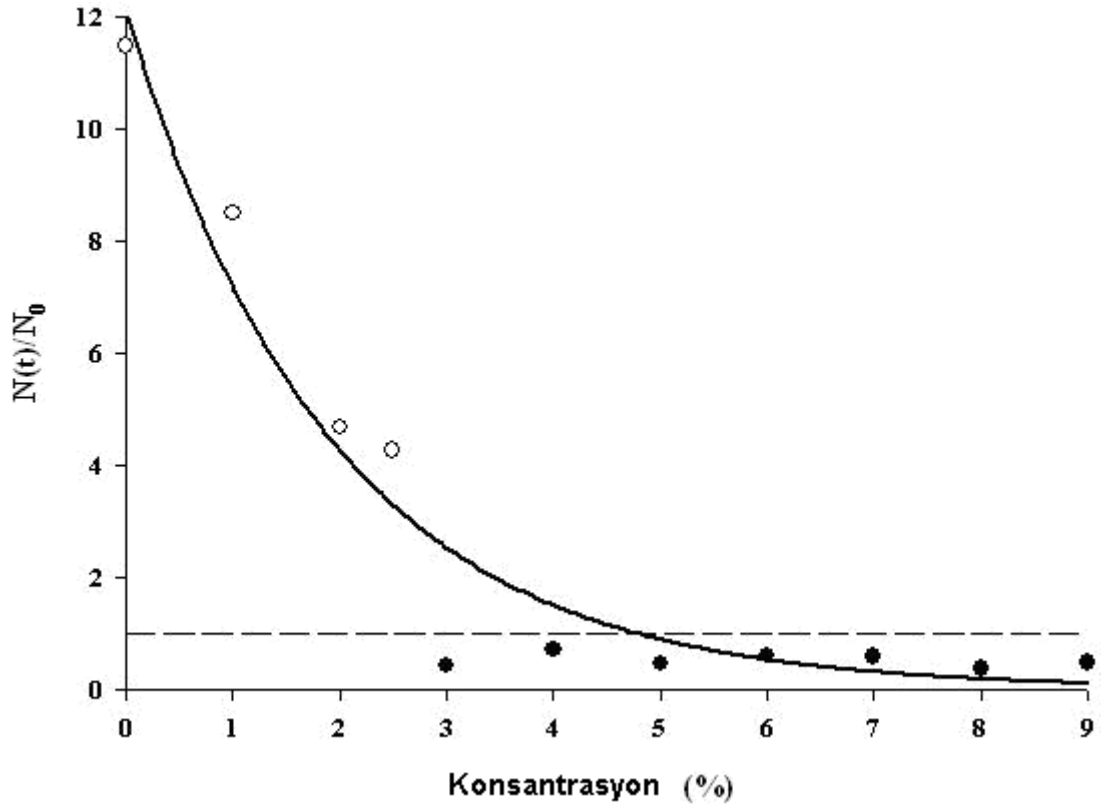
4.1 Stres Koşullarının Belirlenmesi

Çalışmada, 18 saat geliştirilen kültürlerden dört farklı stres koşulunda denemeye alınan iki *L. lactis* suşunda, canlı hücre sayısındaki farklanmalar saptanmıştır. İlk aşamada, *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunun değişik tuz konsantrasyonlarında (NaCl), zamana karşı yaşamda kalma oranı [$S(t)$] tanımlanmıştır. Bakteriyel gelişme, tuz konsantrasyonunun % 0.0-2.5 aralığında olduğu durumda meydana gelirken, % 3 - 9 arasında inaktivasyon gözlenmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda subletal NaCl konsantrasyonu % 3.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Tuz konsatrasyonuna ve onun yarattığı ozmotik şoka karşı sağlanan bu gelişme yanıtı, üstel azalan bir fonksiyon ile modellenmiştir;

$$S(t) = \frac{N(t)}{N_0} = I.\exp(-k.C) \qquad \text{(Eşitlik 4.1)}$$

Burada I kesişme noktası ve k hız sabitidir.

Model parametreleri aşağıdaki gibi saptanmıştır;
$I = 12.1 \pm 0.9^a$ ve $k = 0.5 \pm 0.07^a$, burada üstsimge a standart hatadır.
R^2 ve R^2_{adj} uygunluk değerlerinin ikisi de 0.94'tür.



Şekil 4.1 *L. lactis* subsp *lactis* S102 suşunda tuz konsantrasyonunun bakteriyel gelişme üzerine etkisi.

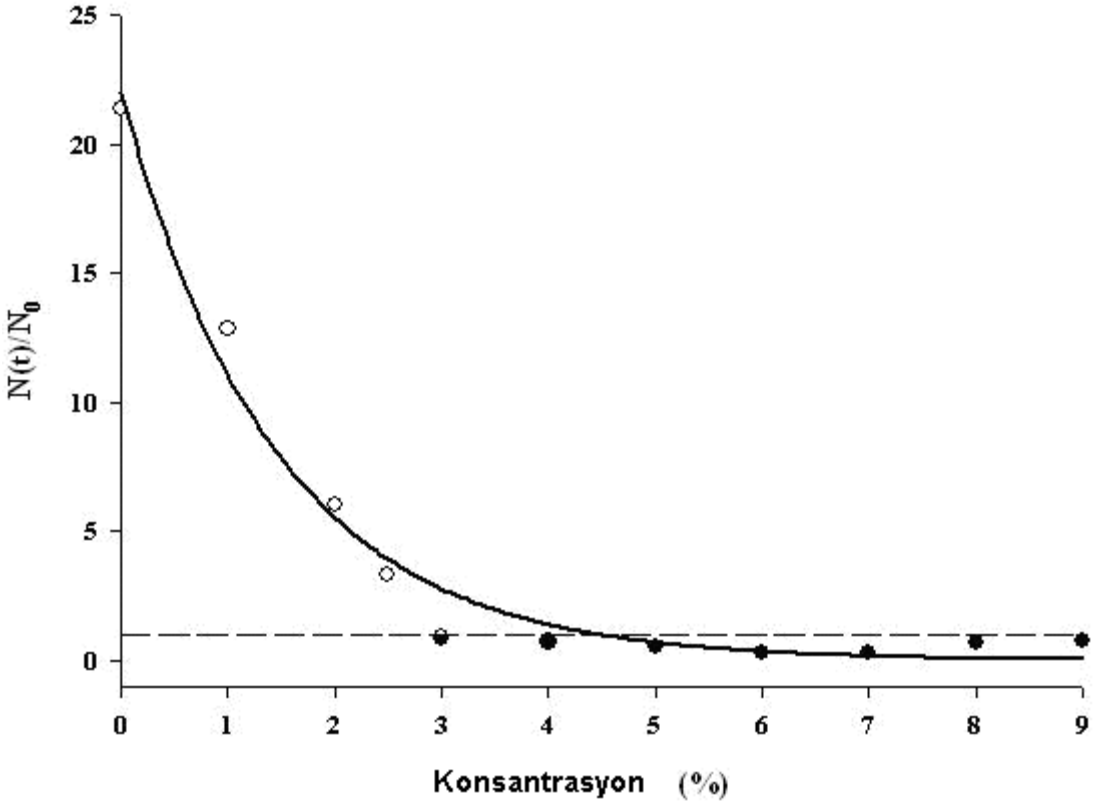
Her bir konsantrasyon değeri için inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresi 3 saattir. Kesikli çizgi, inaktivasyon ile gelişmeyi birbirinden ayıran hattı yani $S(t) = 1$'i göstermektedir. Bu çizginin altında kalan veriler, içi siyah çemberler ile gösterilmekte ve inaktivasyonu tanımlamaktadır. Çizginin üstündeki veriler, içi beyaz çemberler ile gösterilmekte ve gelişmeyi ifade etmektedir. Sürekli çizgi verinin Eşitlik 4.1'e uyumlanması ile elde edilen eğriyi göstermektedir

İkinci aşamada, *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunun değişik tuz konsantrasyonlarında, ve bu koşulların yarattığı ozmotik şokta zamana karşı yaşamda kalma oranı [$S(t)$] tanımlanmıştır. Elde edilen veriler, bakteriyel gelişmenin % 3.0 tuz konsantrasyonuna kadar gerçekleştiğine, bu konsantrasyonun üzerindeki tuz varlığında ise, konsantrasyonun artışına bağlı olarak bakteriyel gelişmenin de inaktive olduğuna işaret etmektedir. İnaktivasyon tuz konsantrasyonunun % 4.0-9.0 arasında olduğu bölgede belirlenmiştir. Söz konusu bakteride subletal NaCl konsantrasyonu % 2.5 olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.2).

Model parametreleri aşağıdaki gibi saptanmıştır;

$I = 22.0 \pm 1.0^a$ ve $k = 0.7 \pm 0.05^a$, burada üstsimge *a* standart hatadır.

R^2 ve R^2_{adj} uygunluk değerlerinin ikisi de 0.98'dir.



Şekil 4.2 *L. lactis* subsp *lactis* BLL27 suşunda tuz konsantrasyonunun bakteriyel gelişme üzerine etkisi.

Her bir konsantrasyon değeri için inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresi 3 saattir. Kesikli çizgi, inaktivasyon ile gelişmeyi birbirinden ayıran hattı, yani $S(t) = 1$'i göstermektedir. Bu çizginin altında kalan veriler, içi siyah çemberler ile gösterilmekte ve inaktivasyonu tanımlamaktadır. Çizginin üstündeki veriler, içi beyaz çemberler ile gösterilmekte ve gelişmeyi ifade etmektedir. Sürekli çizgi, verinin Eşitlik 4.1'e uyumlanması ile elde edilen eğriyi göstermektedir

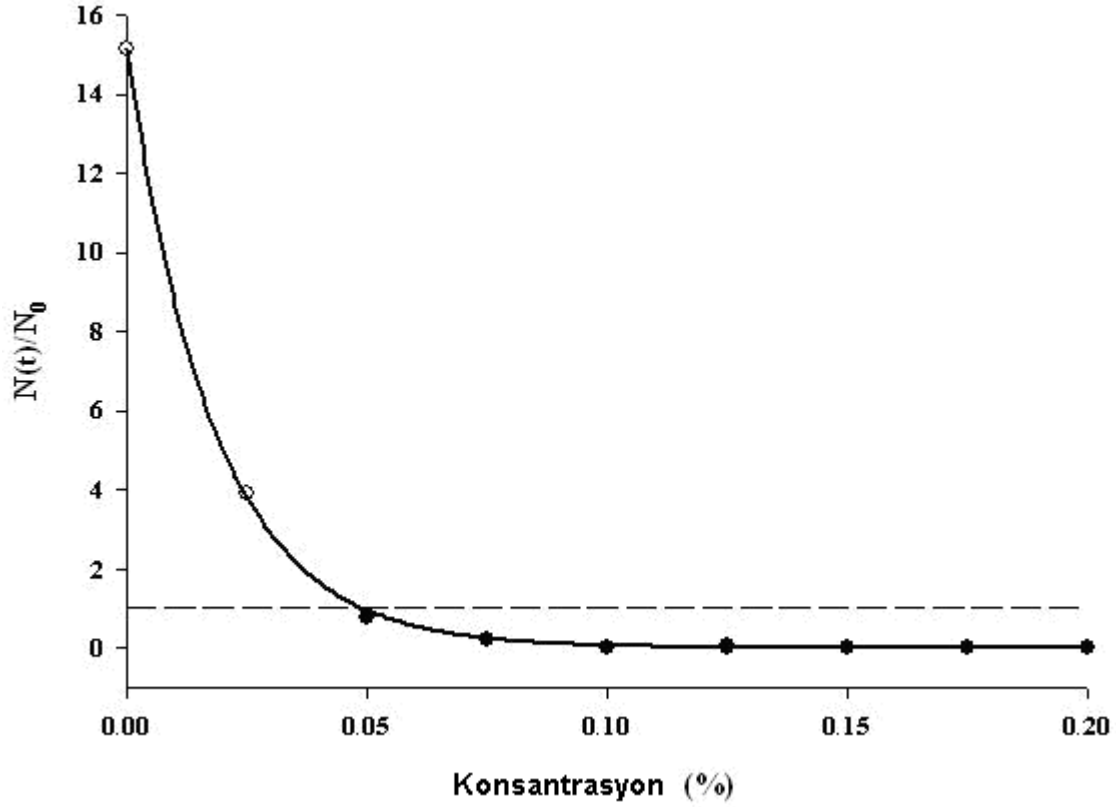
Bakteriler için ikinci aşamada stres koşulu olarak, safra tuzu denemeye alınmıştır. S102 suşunda bakteriyel gelişme, % 0.05 safra tuzu konsantrasyonuna kadar gözlenirken, bu konsantrasyonun üzerindeki değerlerde yüksek düzeyde inaktivasyon meydana gelmiştir. Safta tuzu konsantrasyonunun % 0.175–0.200 arasına ulaştığı değerlerde bakteriyel popülasyonun gelişimi tamamen inaktive olmuştur ($S(t) = 0$). S102 suşu için

% 0.150 safra tuzu konsantrasyonu subletal doz olarak saptanmıştır (Şekil 4.3). Safra tuzu stresine karşı oluşturulan yanıtı modellemek için, Eşitlik 4.2 geliştirilmiştir;

$$S(t) = \frac{N(t)}{N_0} = A.\exp\left[-0.5\left(\frac{B - B_{opt}}{b} \right)^2 \right] \qquad \text{(Eşitlik 4.2)}$$

Eşitlik 4.2'de; A, $S(t)$'nin maksimum değerini, B_{opt} optimum gelişmenin olduğu safra tuzu konsantrasyonunu ve b sağ fonksiyon yarısının genişliğini tanımlayan parametredir.

Model parametreleri aşağıdaki gibi saptanmıştır;
$I = 15.2 \pm 0.08^a$ ve $k = 55.3 \pm 0.7^a$, burada üstsimge a standart hatadır.
R^2 ve R^2_{adj} uygunluk değerlerinin ikiside 0.99'dur.



Şekil 4.3 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda safra tuzu konsantrasyonun bakteriyel gelişme üzerindeki etkisi.

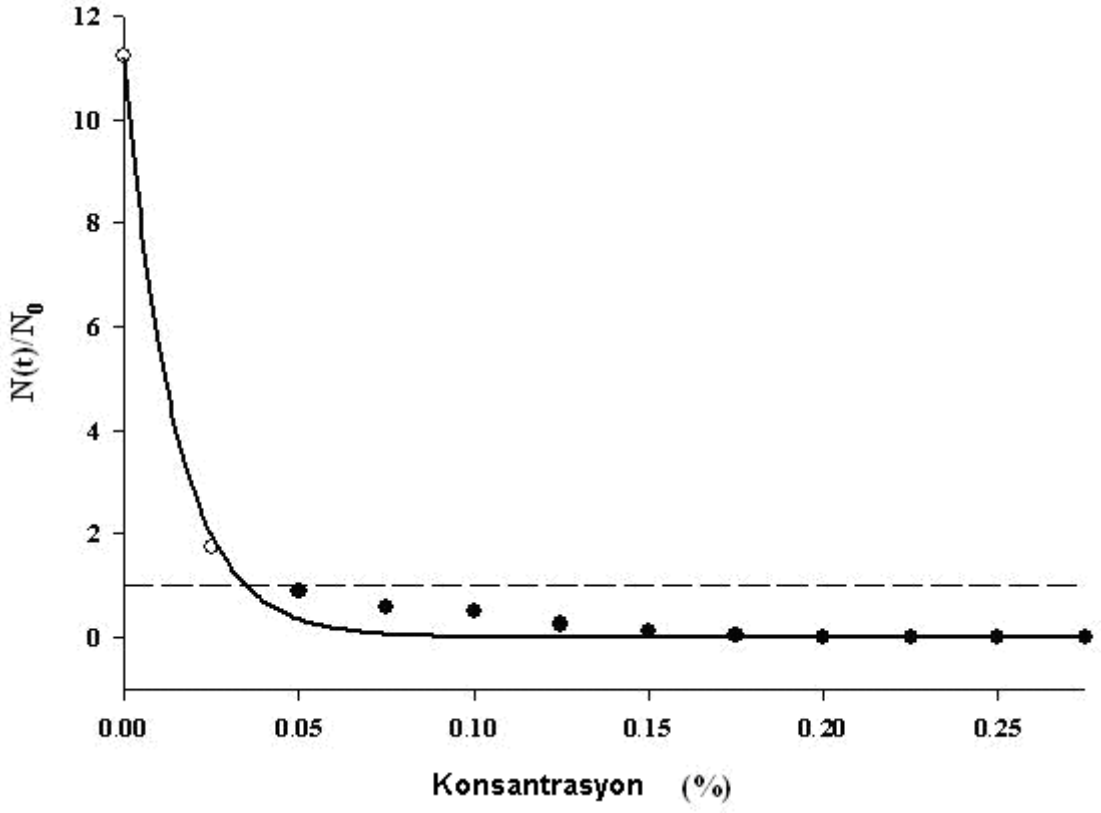
Her bir konsantrasyon değeri için inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresi 3 saattir. Kesikli çizgi, inaktivasyon ile gelişmeyi birbirinden ayıran hattı, yani $S(t) = 1$'i göstermektedir. Bu çizginin altında kalan veriler, içi siyah çemberler ile gösterilmekte ve inaktivasyonu işaret etmektedir. Çizginin üstündeki veriler ise, içi beyaz çemberler ile gösterilmekte ve gelişmeyi ifade etmektedir. Sürekli çizgi verinin Eşitlik 4.2'ye uyumlanması ile elde edilen eğriyi göstermektedir

BLL27 suşunda populasyonun tamamen inaktivasyonu ($S(t) = 0$) % 0.275 safra tuzu konsantrasyonunda meydana gelmiştir. Bu suşta subletal safra tuzu konsantrasyonu % 0.2 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).

Model parametreleri aşağıdaki gibi saptanmıştır;

$I = 11.2 \pm 0.3^a$ ve $k = 69.1 \pm 5.9^a$, burada üstsimge *a* standart hatadır.

R^2 ve R^2_{adj} uygunluk değerlerinin ikisi de 0.99'dur.



Şekil 4.4 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda safra tuzu konsantrasyonun bakteriyel gelişme üzerindeki etkisi.

Her bir konsantrasyon değeri için inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresi 3 saattir. Kesikli çizgi, inaktivasyon ile gelişmeyi birbirinden ayıran hattı, yani S(*t*)=1 'i göstermektedir. Bu çizginin altında kalan veriler, içi siyah çemberler ile gösterilmekte ve inaktivasyonu işaret etmektedir. Çizginin üstündeki veriler, içi beyaz çemberler ile gösterilmekte ve gelişmeyi ifade etmektedir. Sürekli çizgi verinin Eşitlik 4.2'ye uyumlanması ile elde edilen eğriyi göstermektedir

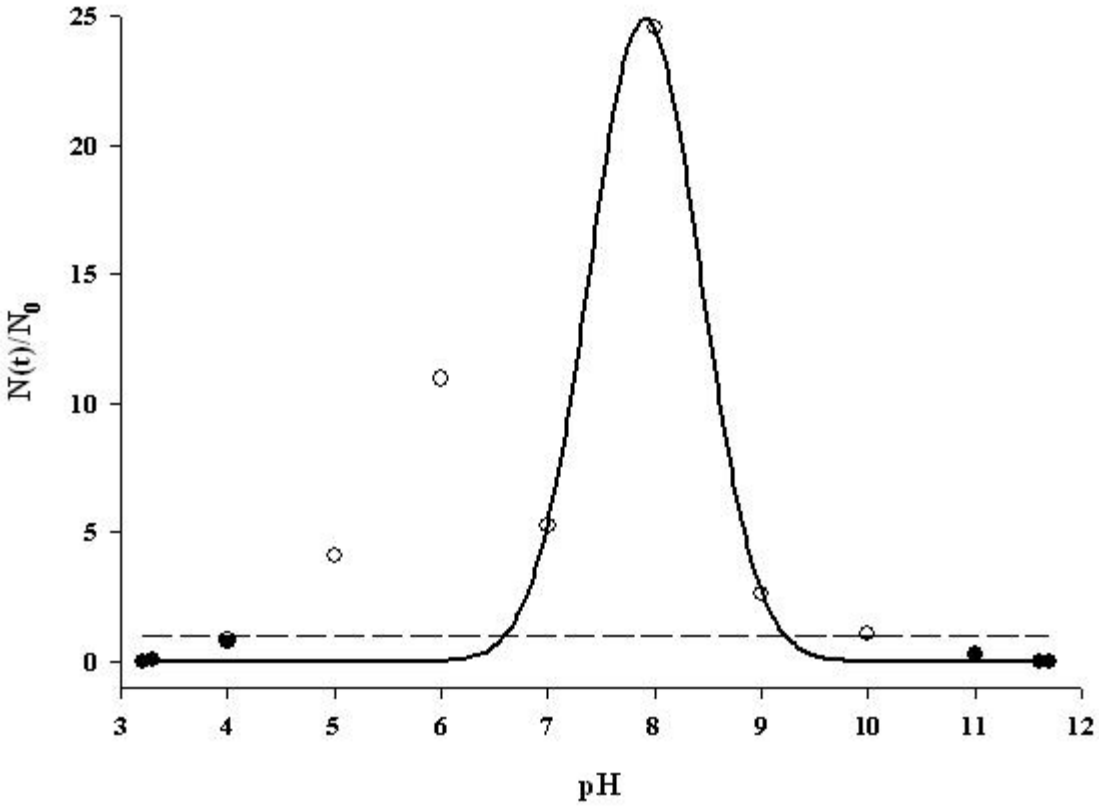
L. lactis subsp. *lactis* S102 suşunda pH'nın 3.0-4.5 aralığında olduğu yüksek asitlik koşullarında inaktivasyon meydana gelmiştir. pH 5.0-6.0 aralığındaki düşük asit koşullarında ise bakteriyel gelişme başlamaktadır. pH'nın 9.0'dan büyük ve buna bağlı olarak bazik koşulların hakim olduğu durumlarda ise tekrar inaktivasyon meydana gelmektedir. Bu bakteride asit stresi için subletal pH 3.2 ve baz stresi için ise pH 11.7 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). Asit stresine karşı oluşturulan gelişme yanıtı, Gauss modeli ile ifade edilmiştir;

$$S(t) = \frac{N(t)}{N_0} = A.\exp\left[-0.5\left(\frac{pH - PH_{opt}}{b}\right)^2\right] \qquad \text{(Eşitlik 4.3)}$$

Model parametreleri aşağıdaki gibi saptanmıştır;

$A = 24.9 \pm 4.3^a$, $pH_{opt} = 7.9 \pm 0.2^a$ ve $b = 0.5 \pm 0.1^a$, burada üstsimge *a* standart hatadır.

R^2 ve R^2_{adj} uygunluk değerleri sırası ile 0.76 ve 0.70'tir.



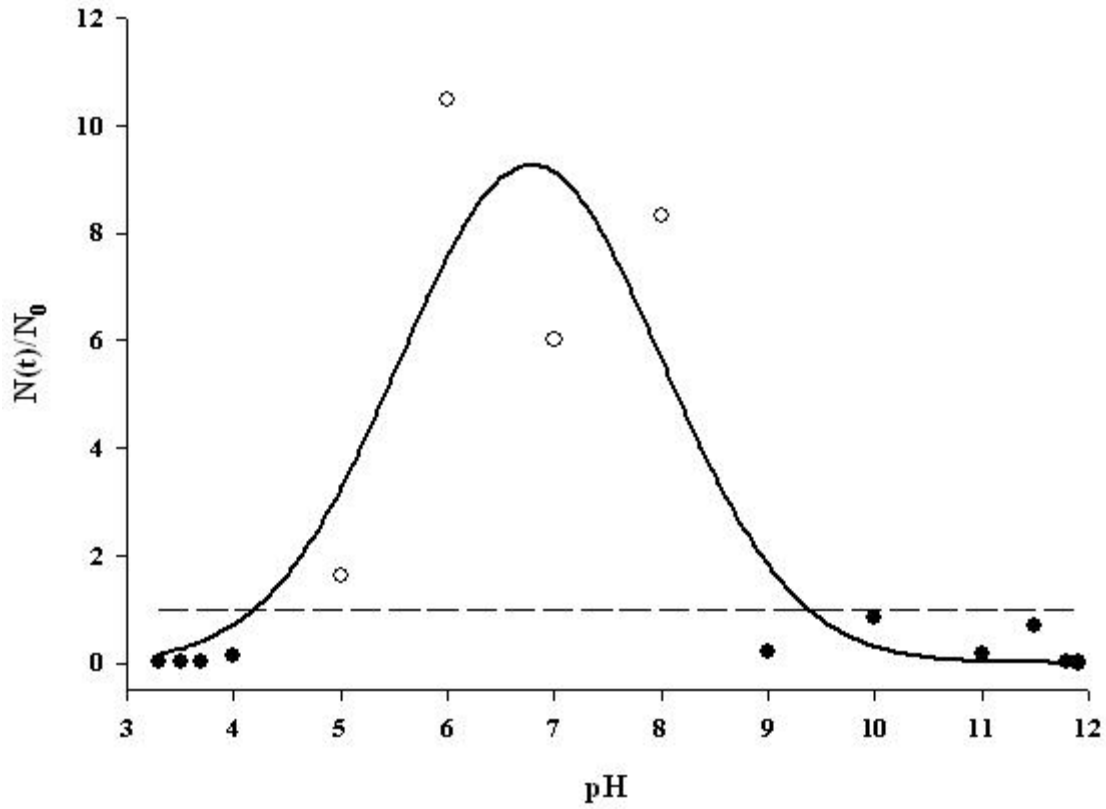
Şekil 4.5 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda, pH'nın bakteriyel gelişim üzerine etkisi.

Her bir pH değeri için inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresi 3 saattir. Kesikli çizgi, inaktivasyon ile gelişmeyi birbirinden ayıran hattı yani $S(t) = 1$'i göstermektedir. Bu çizginin altında kalan veriler, içi siyah çemberler ile gösterilmekte ve inaktivasyona işaret etmektedir. Çizginin üstündeki veriler ise, içi beyaz çemberler ile gösterilmekte ve gelişmeyi ifade etmektedir. Sürekli çizgi verinin Eşitlik 4.3'e uyumlanması ile elde edilen eğriyi göstermektedir

L. lactis subsp. *lactis* BLL27 suşunda yüksek asidik pH değerlerinde (pH 3.0-4.0), S102 suşuna oranla daha yüksek düzeyde bakteriyel gelişme inaktivasyonu meydana gelmiştir. pH 8.0 yukarısındaki bütün bazik koşullarda, bakteriyel gelişme tamamen inaktive olmaktadır. BLL27 suşunda asit stresi için subletal pH 3.5 ve baz stresi için ise pH 11.7 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Model parametreleri aşağıdaki gibi saptanmıştır;

$A = 9.3 \pm 1.4^a$, $pH_{opt} = 6.8 \pm 0.2^a$ ve $b = 1.2 \pm 0.2^a$, burada üstsimge *a* standart hatadır.

R^2 ve R^2_{adj} uygunluk değerleri sırası ile 0.8076 ve 0.77'dir.



Şekil 4.6 *L. lactis* subsp *lactis* BLL27 suşunda, pH'nın bakteriyel gelişim üzerine etkisi.

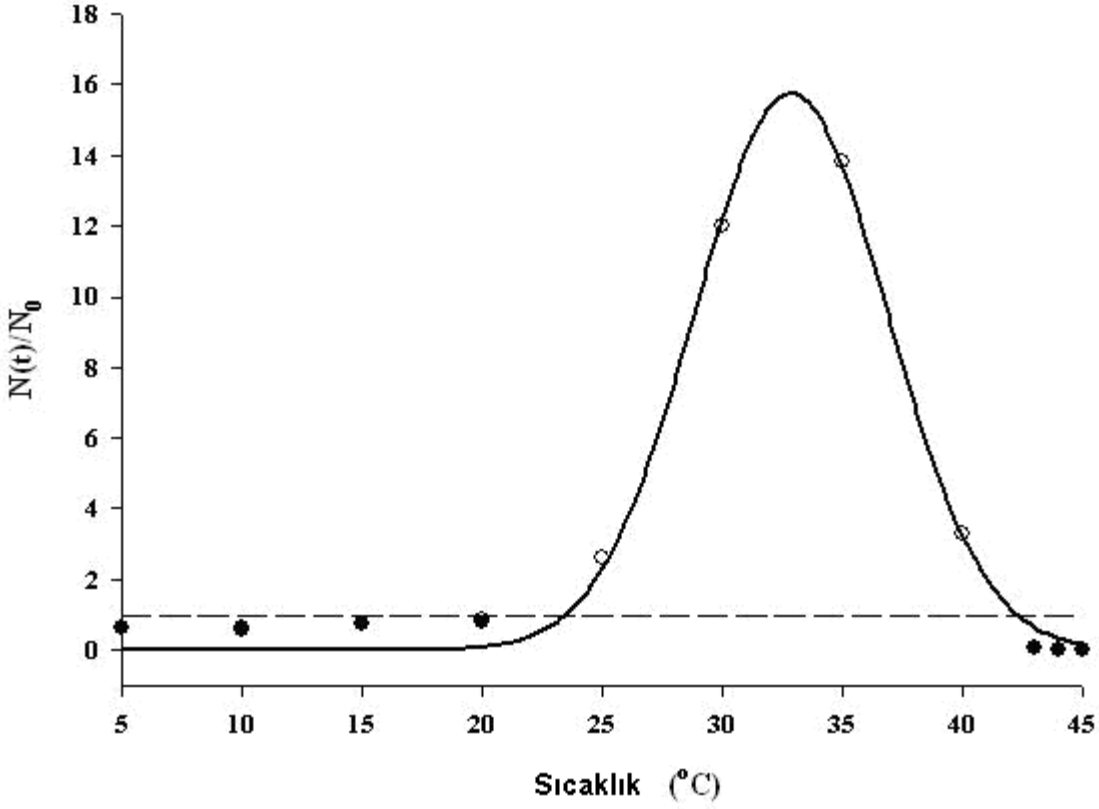
Her bir pH değeri için inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresi 3 saattir. Kesikli çizgi, inaktivasyon ile gelişmeyi birbirinden ayıran hattı yani $S(t) = 1$'i göstermektedir. Bu çizginin altında kalan veriler, içi siyah çemberler ile gösterilmekte ve inaktivasyona işaret etmektedir. Çizginin üstündeki veriler ise, içi beyaz çemberler ile gösterilmekte ve gelişmeyi ifade etmektedir. Sürekli çizgi verinin Eşitlik 4.3'e uyumlanması ile elde edilen eğriyi göstermektedir

L. lactis subsp. *lactis* S102 suşunun inkübasyon sıcaklığına bağlı gelişme eğrisinde, 5°C-20°C arasında çok az inaktivasyonun olduğu ($S(t)$ 1'e çok yakın) ve 25°C ile 40°C arasında gelişmenin meydana geldiği saptanmıştır. Gelişme miktarı, sıcaklık yaklaşık 35°C'ye ulaşıncaya kadar ivmelenerek artarken, 35°C - 40°C arasında ise aynı şekilde azalmaktadır. Subletal inkübasyon sıcaklıkları 5°C ve 45°C derece olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Sıcaklık stresi altında elde edilen veriler, Eşitlik 4.4'te verilen Gauss Modeli ile tanımlanmıştır;

$$S(t) = \frac{N(t)}{N_0} = A.\exp\left[-0.5\left(\frac{T - T_{opt}}{b} \right)^2 \right] \qquad \text{(Eşitlik 4.4)}$$

Eşitlik 4.4'te; A $S(t)$'nin maksimum değerini, T_{opt} optimum gelişmenin olduğu sıcaklık değerini ve b sağ fonksiyon yarısının genişliğini belirleyen parametredir. Model parametreleri aşağıdaki gibi saptanmıştır;

$A = 15.8 \pm 0.6^a$, $T_{opt} = 32.9 \pm 0.2^a$ ve $b = 4.0 \pm 0.2^a$, burada üstsimge *a* standart hatadır. R^2 ve R^2_{adj} uygunluk değerlerinin ikisi de 0.99'dur.



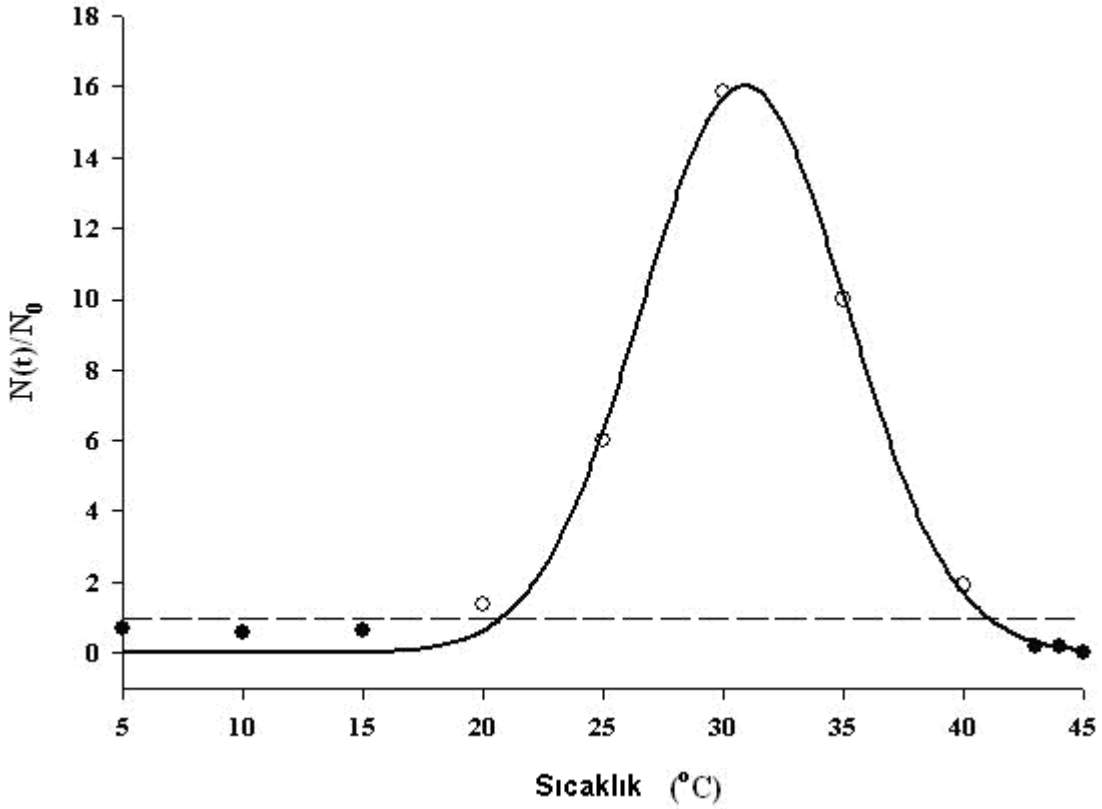
Şekil 4.7 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda, inkübasyon sıcaklığının bakteriyel gelişim üzerine etkisi.

Her bir sıcaklık değeri için inkübasyon süresi 3 saattir. Kesikli çizgi, inaktivasyon ile gelişmeyi birbirinden ayıran hattı yani S(*t*)=1'i göstermektedir. Bu çizginin altında kalan veriler, içi siyah çemberler ile gösterilmekte ve inaktivasyona işaret etmektedir. Çizginin üstündeki veriler, içi beyaz çemberler ile gösterilmekte ve gelişmeyi ifade etmektedir. Sürekli çizgi verinin Eşitlik 4.4'e uyumlanması ile elde edilen eğriyi göstermektedir

L. lactis subsp. *lactis* BLL27 suşunda sıcaklığa karşı bakteriyel gelişme davranışı, gelişmenin 20°C'de başlaması dışında, tamamen aynı bulunmuştur. Subletal inkübasyon

sıcaklıkları 5°C ve 44°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). Model parametreleri aşağıdaki gibi saptanmıştır;

$A = 16.0 \pm 0.5^a$, $T_{opt} = 30.9 \pm 0.2^a$ ve $b = 4.3 \pm 0.1^a$, burada üstsimge *a* standart hatadır. R^2 ve R^2_{adj} uygunluk değerlerinin ikisi de 0,99'dur.



Şekil 4.8 *L. lactis* subsp *lactis* BLL27 inkübasyon sıcaklığının bakteriyel gelişim üzerine etkisi.

Her bir sıcaklık değeri için inkübasyon süresi 3 saattir. Kesikli çizgi, inaktivasyon ile gelişmeyi birbirinden ayıran hattı yani $S(t) = 1$'i göstermektedir. Bu çizginin altında kalan veriler, içi siyah çemberler ile gösterilmekte ve inaktivasyona işaret etmektedir. Çizginin üstündeki veriler, içi beyaz çemberler ile gösterilmekte ve gelişmeyi ifade etmektedir. Sürekli çizgi verinin Eşitlik 4.4'e uyumlanması ile elde edilen eğriyi göstermektedir

L. lactis suşlarında stres koşullarına yanıt stabil bir karakter olmayıp, suşlar arasında önemli ölçüde değişiklikler göstermektedir. Bu bakteriler gerek doğal çevrelerinde ve gerekse endüstriyel üretim süreçlerinde değişik stres koşulları ile karşı karşıya kalmaktadır. Söz konusu stres koşullarının en tipik örnekleri; ısı şoku, düşük sıcaklık, ozmotik şok, oksidatif stresden kaynaklanan DNA hasarı, düşük pH ve besinsel kısıtlama olarak tanımlanabilir (Kim *et al*. 1999, Van de Guchte *et al*. 2002, Miyoshi *et*

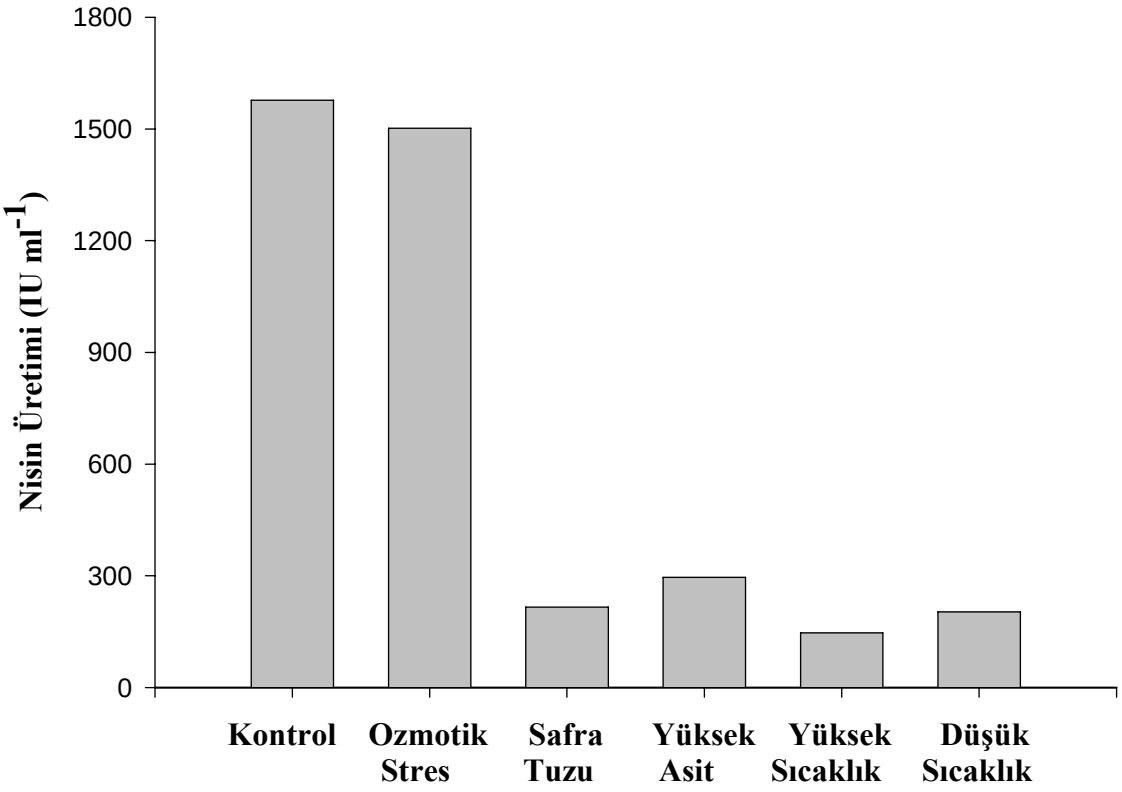
al. 2003, Madsen *et al*. 2005, Kilimann *et al*. 2007, Egervarn *et al*. 2007). Bu koşullara hızlı yanıt yeteneği içeren *L. lactis* suşları, doğal habitatları yanında, endüstriyel fermentasyonlarda da hakim florayı oluşturmaktadır. Özellikle endüstriyel süt fermentasyonlarında stres koşullarına dirençli suşların seçimi ve kullanımı, ürün kalitesi ve miktarı ile tanımlanan ürün ekonomisi açısından en önemli kriterlerden biri olarak kabul edimektedir (Centeno *et al*. 2002, Redon *et al.* 2005, O'Driscoll *et al*. 2006, Siezen *et al*. 2008). Araştırmada kullanılan farklı kökene sahip iki nisin üreticisi *L. lactis* suşu, denenen stres koşullarına karşı benzer üreme davranışları göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, benzer çalışmaları esas alan literatür verileri ile karşılaştırıldığında, denenen *L. lactis* suşlarının orta düzey direnç yanıt sistemlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Sanders *et al*. 1999, Duwat *et al*. 2000, Kim *et al*. 2001, Redon *et al*. 2005, Kilimann *et al*. 2007, Siezen *et al*. 2008).

Çalışmada, bakteriyel üreme ve nisin üretimi üzerine etkinliği saptanan stres koşullarından tuz (ozmotik stres), pH ve sıcaklık stresi, laktokokların hem doğal ve hem de endüstriyel üretim süreçlerinde karşılaştıkları başlıca kısıtlayıcı koşullardır. Safra tuzu stresi ise söz konusu bakterilerin bağırsak sisteminde kalıcılıklarını tanımlamak açısından kullanılan kriterlerden biridir. Bu koşullar altında suşların verdiği yanıtlar esas alınarak çıkarılan matematiksel modellerin birbiri ile aynı oluşu, söz konusu modellerin evrenselliğine işaret etmektedir. *L. lactis* suşlarının doğal ya da yapay besin ortamlarında gelişme kinetikleri tanımlanmış olsa da, stres koşullarına yanıtın matematiksel ifadesi yapılmamış ve model sistemler geliştirilmemiştir. Bu nedenle çalışmamızdan elde edilen veriler, gerek bilimsel ve gerekse endüstriyel suşların stres yanıt düzeylerinin tanımlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu modeller esas alınarak stres koşullarının bakteriyel üreme üzerine etkisi hızlı bir şekilde tanımlanabilir ve deneysel sonuçlar matematiksel olarak ifade edilebilir.

4.2 Üssel ve Durağan Faz Hücrelerinin Stres Koşulları Altında Nisin Üretim Davranışlarının Belirlenmesi

BLL27 ve S102 suşları GM17 sıvı besiyerinde 6 ve 8 saat boyunca geliştirilerek logaritmik ve durağan faza ulaştırılmıştır. Ardından bu hücreler 3 saat boyunca sırasıyla ozmotik (S102 suşu için % 3.0, BLL27 suşu için % 2.5 konsantrasyonlarında), safra tuzu (S102 suşu için ve % 0.15, BLL27 suşu için ve % 0.2 konsantrasyonlarında), pH (S102 suşu için pH 3.2, pH 11.7, BLL27 suşu için pH 3.5, pH 11.8 değerlerinde) ve sıcaklık stresleri (S102 ve BLL27 suşları için 5ºC, 45ºC de) ile muamele edilmiştir.

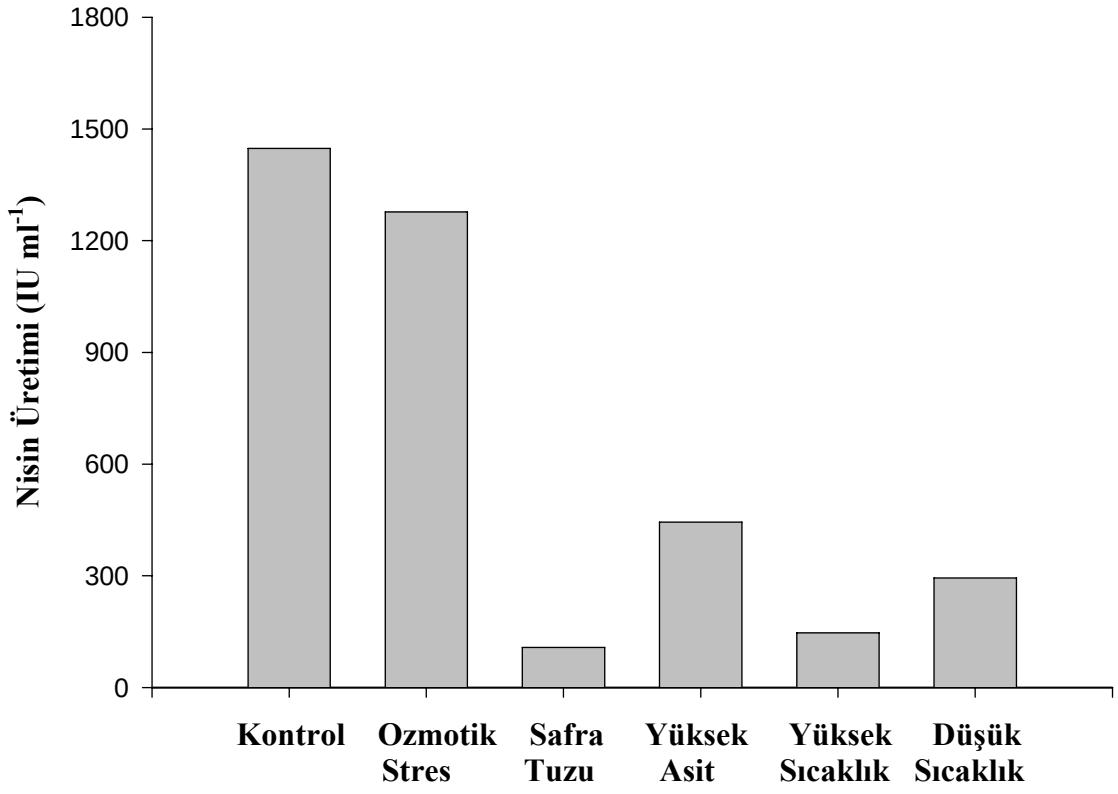
S102 suşunda üssel fazdaki hücreler üzerinde stres uygulamaları değişik düzeyde etki göstermiştir. pH 11.7 uygulamasına maruz bırakılan hücrelerde nisin üretimi belirlenemezken, asit, safra tuzu, düşük sıcaklık ve yüksek sıcaklık stresi uygulanan hücrelerde sırasıyla; 296, 216, 203 ve 147 IU/ml nisin üretimi tanımlanmıştır. Stres koşullarına bağlı olarak meydana gelen nisin verimindeki düşmeler arasında en belirgin farklılık, sıcaklık stresi uygulamasında saptanmıştır. Üssel fazdaki S102 hücrelelerine ozmotik şok uygulamasından sonra ise nisin üretim düzeyi 1502 IU/ml düzeyine çıkmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Üssel fazdaki *L. lactis* subsp. *lactis* S102 hücrelerinde subletal seviyelerde stres uygulaması sonucu belirlenen nisin üretim düzeyleri.

Hücreler 3 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. Osmotik stres için M17G ortamında % 3 NaCI, safra tuzu stresi için % 0.15 safra tuzu konsantrasyonları denenmiştir. Yüksek asit stresi için hücreler, pH'sı 3.2'ye ayarlanmış M17G ortamında inkübe edilmiştir. Yüksek ve düşük sıcaklık stresi için hücreler sırasıyla 5°C ve 45°C'de inkübe edilmiştir. Baz stresi uygulamasında nisin aktivitesi belirlenememiştir.

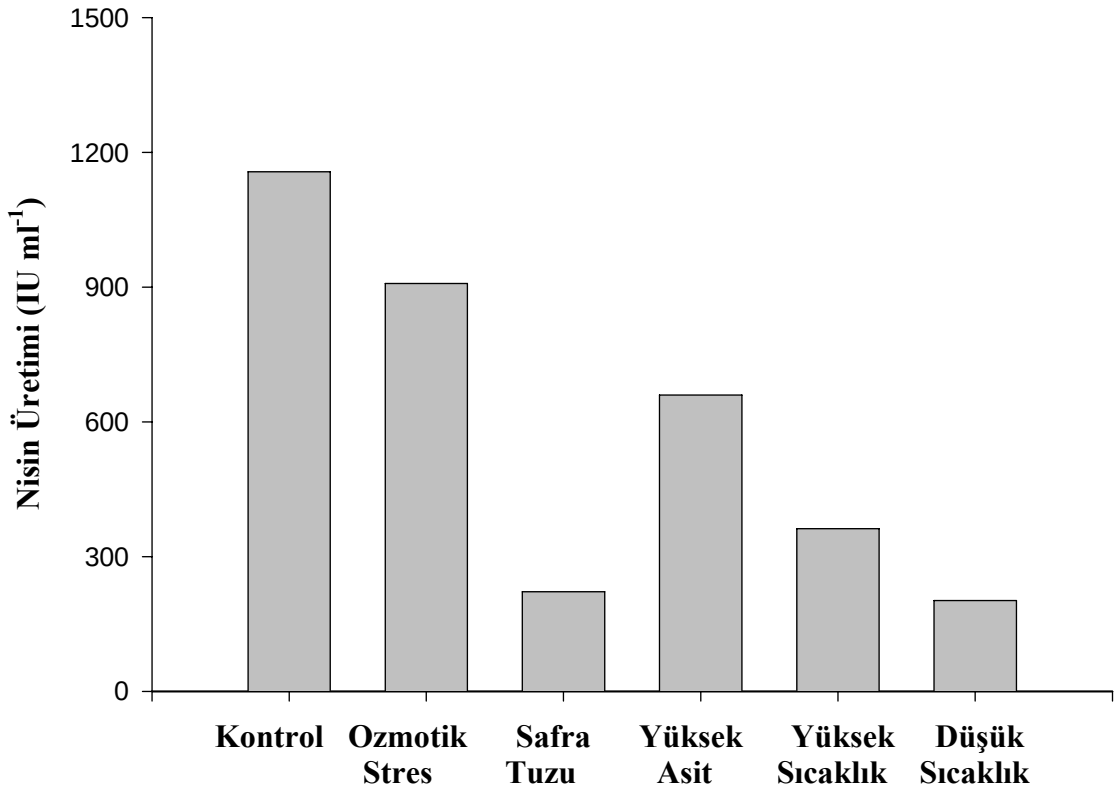
Bu bakterinin durağan faz kültürlerinde stres uygulamalarının nisin üretimi üzerine etkisi, üssel fazdaki eğilim ile benzerlik göstermiştir. Ozmotik şok uygulaması sonucu yine yüksek nisin verimi (1277 IU/ml) sağlanırken; asit stresinde 444 IU/ml, düşük sıcaklık stresinde 294 IU/ml, yüksek sıcaklık stresinde 147 IU/ml, safra tuzu stresinde 108 IU/ml nisin verimi sağlanmıştır. Baz stresinde ise nisin üretimi tanımlanamamıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Durağan fazdaki *L. lactis* subsp. *lactis* S102 hücrelerinde subletal seviyelerde stres uygulaması sonucu belirlenen nisin üretim düzeyleri.

Hücreler 3 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. Osmotik stres için M17G ortamında % 3 NaCI, safra tuzu stresi için % 0.15 safra tuzu konsantrasyonları denenmiştir. Yüksek asit stresi için hücreler, pH'sı 3.2'ye ayarlanmış M17G ortamında inkübe edilmiştir. Yüksek ve düşük sıcaklık stresi için hücreler sırasıyla 5°C ve 45°C'de inkübe edilmiştir. Baz stresi uygulamasında nisin aktivitesi belirlenememiştir.

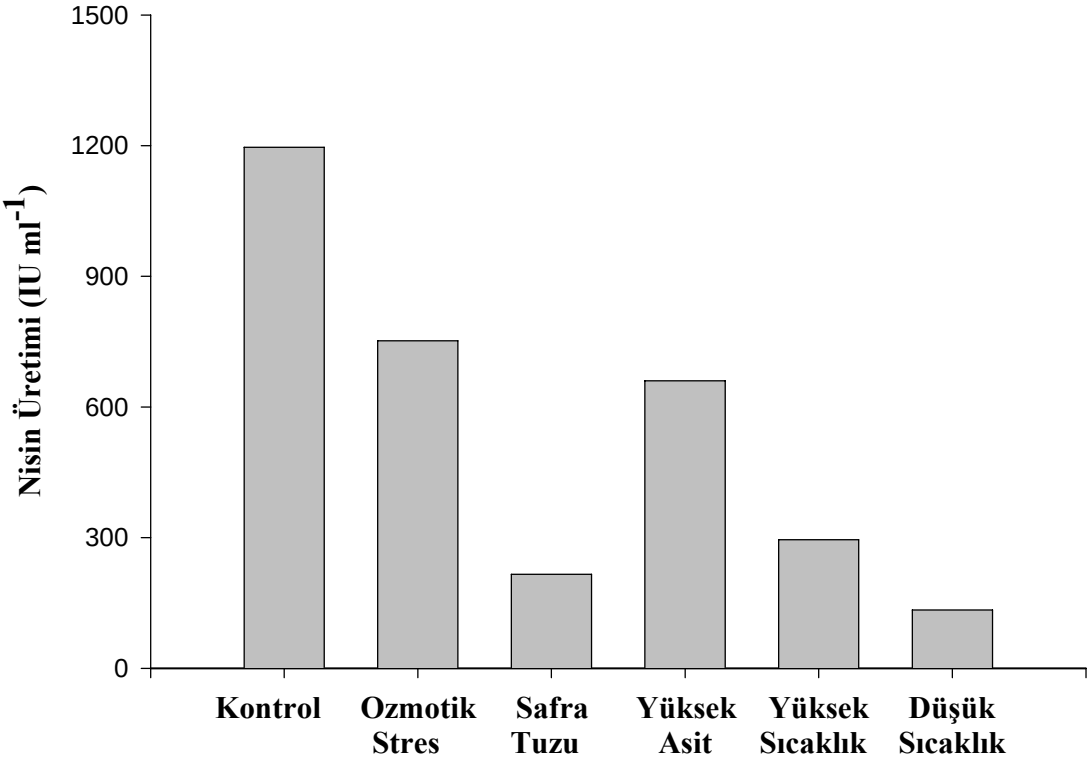
BLL27 suşunun logaritmik faz kültürlerinde de, S102 suşunda olduğu gibi, en yüksek nisin verimi (908 IU/ml) ozmotik stres koşullarının oluşturulduğu %2.5 NaCl konsantrasyonunda belirlenmiştir. Yine pH 11.7'de nisin aktivitesi tanımlanamamıştır. Diğer yandan BLL27 suşunun logaritmik faz kültürleri, nisin üretimi esas alındığında, en az düşük asit stresinden etkilenmiştir (660 IU/ml). Bunu yüksek sıcaklık (362 IU/ml), safra tuzu (222 IU/ml) ve düşük sıcaklık (202 IU/ml) izlemiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Üssel fazdaki *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 hücrelerinde subletal seviyelerde stres uygulaması sonucu belirlenen nisin üretim düzeyleri.

Hücreler 3 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. Osmotik stres için M17G ortamında % 2.5 NaCI, safra tuzu stresi için % 0.2 safra tuzu konsantrasyonları denenmiştir. Yüksek asit stresi için hücreler, pH'sı 3.5'e ayarlanmış M17G ortamında inkübe edilmiştir. Yüksek ve düşük sıcaklık stresi için hücreler sırasıyla 5°C ve 45°C'de inkübe edilmiştir. Baz stresi uygulamasında nisin aktivitesi belirlenememiştir.

Stres uygulamalarının logaritmik fazdaki BLL27 kültürlerinin nisin verimi üzerine etkisi, durağan fazdaki etkinlik ile büyük oranda benzerlik göstermiştir. Bu uygulamada ozmotik şok altında hücrelerde nisin verimi, logaritmik faza oranla 156 IU/ml azalmıştır. Diğer stres uygulamaları tamamen aynı (asit ve baz stresi) ya da yakın (safra tuzu, yüksek sıcaklık ve düşük sıcaklık) nisin üretimlerine yol açmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Durağan fazdaki *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 hücrelerinde subletal seviyelerde stres uygulaması sonucu belirlenen nisin üretim düzeyleri.

Hücreler 3 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. Osmotik stres için M17G ortamında % 2.5 NaCI, safra tuzu stresi için % 0.2 safra tuzu konsantrasyonları denenmiştir. Yüksek asit stresi için hücreler, pH'sı 3.5'e ayarlanmış M17G ortamında inkübe edilmiştir. Yüksek ve düşük sıcaklık stresi için hücreler sırasıyla 5°C ve 45°C'de inkübe edilmiştir. Baz stresi uygulamasında nisin aktivitesi belirlenememiştir.

4.3 Stres Uygulamalarının Bakterilerin İçerdiği Plazmidlerin Stabilitesi Üzerine Etkisi

L. lactis suşlarında laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite, bakteriyosin üretimi, ekzopolisakkarit üretimi, faj dirençlilik ve sitrattan dasetil oluşturma gibi endüstriyel süt fermentasyonları açısından büyük önem taşıyan metabolik özelliklerin plazmid kodlu oluşu, bu suşlarda plazmid stabilitesini çok önemli hale getirmektedir (Akçelik and Tunail 1992, Akçelik 1999, Sanchez *et al*. 2000, Siezen *et al*. 2005). *L. lactis* suşları genellikle diğer gram pozitif bakterilerden daha zengin bir plazmid içeriğine sahiptir.

Bu durum söz konusu bakterilere genetik açıdan yüksek bir elastikiyet kazandırmaktadır (Siezen *et al*. 2008).

Doğal suşlarda plazmid içerikleri, alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucu; *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunun, büyüklükleri 2.8 ile 18.9 kb arasında değişen 9 adet, *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunun ise büyüklükleri 1.4 ile 25.0 arasında değişen 9 adet plazmid içerdiği saptanmıştır (Şekil 4.13).

Safra tuzu (ox-bile) stresi altında geliştirilen *L. lactis* hücrelerinde plazmid stabilitesi incelendiğinde; BLL27 suşunda % 0.05 ox-bile konsantrasyonunun plazmid stabilitesi üzerinde bir etkisi olmadığı, % 0.2 ox-bile konsantrasyonunda ise 25.0, 19.9 ve 1.4 kb plazmidlerin kaybolduğu saptanmıştır. S102 suşunda da ilk denenen konsantrasyonda (%0.05) 14.3 ve 13.4; % 0.15 ox-bile konsantrasyonunda 18.9 , 17.4 ve 13.4 kb plazmidler stabilitelerini koruyamamıştır (Şekil 4.13).

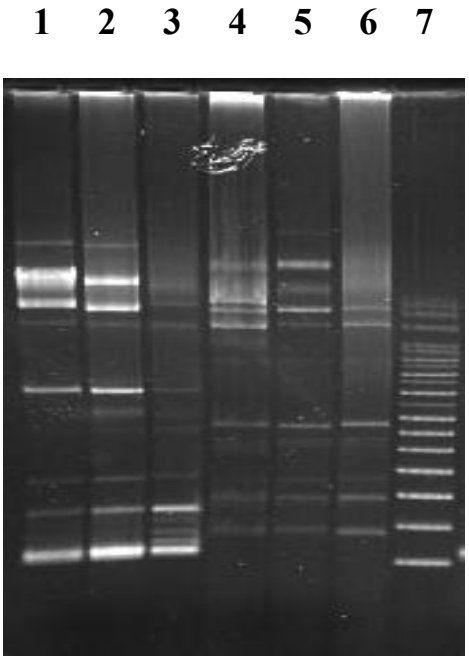
Nisin ve üyesi bulunduğu lantibiyotik grup bakteriyosinler, translasyon sonrası modifikasyonlar sonucu olgun formlarını kazanan bakteriyosinlerdir. Özellikle çoklu ilaç dirençlilik özelliklerine sahip gram pozitif bakterilere karşı geniş etki spektrumu içermesi, nisini sadece gıda korumada değil kemoterapide de öne çıkarmaktadır. Günümüzde gıda koruma amacı ile en yoğun kullanım olanağı bulan nisin, bu endüstriyel özelliğinden dolayı yoğun araştırmaların odağı haline gelmiştir. Bu nedenle, nisin üretim yeteneğindeki starter kültür suşlarında stres koşullarına yanıt, üreme karakteristiklerinin değişimi yanında, nisin stabilitesi ile de değerlendirilmektedir (Matsukaki *et al.* 1996, Chen and Hoover 2003, Kleerebezem 2004, Kim *et al*. 2006). Nisin üretimi ikili regülatör sistemlerinin kontrolü altında, üssel fazda gerçekleşmektedir. Bu nedenle söz konusu bakteriyosin birincil metabolit olarak tanımlanmaktadır. Üssel fazda üretilmesi, nisinin stres koşullarında stabilitesini sağlayan en önemli unsurdur. Değişik araştırmalarda nisin üretimi üzerine stres koşullarının etkisinin, üssel faz hücrelerinde, durağan faza oranla daha düşük olduğu

saptanmıştır (Duwat *et al*. 2000, Cheng *et al*. 2002, Kim *et al*. 2002, Kvint *et al.* 2003, Madsen *et al*. 2005, Corr *et al*. 2007). Stres koşulları nisin üretimi üzerinde genellikle negatif bir etkiye sahipken, düşük pH ve ozmotik stres koşulları altında bazı suşlarda nisin üretiminin, sırasıyla üssel ve durağan fazda teşvik edildiği ileri sürülmüştür. Düşük (asidik) pH koşullarında üssel fazda nisin üretiminin teşviki, nisin gen blokunda bulunan promotorların asit koşullarında indüklenmesi ile açıklanmıştır. Durağan fazda ozmotik stres altında geliştirilen hücrelerde nisin veriminin artması ise erken liziz ile karakterize edilmiştir (Redon *et al*. 2005, Diep *et al*. 2007, Aruz *et al*. 2008, Zhou *et al*. 2008).

Bu araştırmada denenen stres koşullarının nisin üretimi üzerine etkisi, düşük sıcaklık ve ozmotik stres için tanımlanan veriler dışında, literatür bulguları ile benzerlik göstermiştir. Hem kontrol suş *L. lactis* subsp. *lactis* S102 (ATCC11454) ve hem de *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 (Türkiye kökenli nisin üretici suş) için düşük pH ve ozmotik şok koşullarında nisin üretiminde ciddi bir indüksiyon meydana gelmemiştir (sadece S102 suşu üssel faz kültürleri, düşük pH stresine maruz kaldıktan sonra yaklaşık 100 IU/ml daha fazla nisin üretmiştir). Ancak suşların üssel ve logaritmik faz kültürlerinin nisin üretimi açısından en düşük düzeyde etkilendiği stres koşulları bu iki ortam olmuştur. Diğer stres koşullarında ise (NaCl, ox-bile, düşük/yüksek pH ve düşük/yüksek sıcaklık) üssel ve durağan fazların her ikisinde de nisin üretim düzeylerinde düşmeye yol açmıştır. Yüksek (alkali) pH değerlerinde nisin üretiminin tamamen durması, regülatör sistemlerin geri dönüşsüz bir şekilde bozulduğuna işaret etmektedir. Ancak bu öngörünün kesinlik kazanabilmesi için, ileri genetik ve biyokimyasal analizler ile desteklenmesi zorunludur.

Literatür verilerinin aksine, çalışmamızda kullanılan her iki suşta da, stres koşullarının üssel ve durağan fazlar arasında nisin verimi açısında önemli bir farklanma göstermemesi, özellikle regülatör sistemlerin bu suşlarda tek tip olmadığına işaret etmektedir. Bu nedenle her yeni suş için söz konusu koşulların tanımlanma zorunluluğu vardır. Regülatör sistemlerdeki bu farklılıkların moleküler genetik doğasının çalışılması,

değişik stres koşullarına karşı yüksek düzeyde direnç gösteren suşların geliştirilmesi olanağını doğuracaktır.

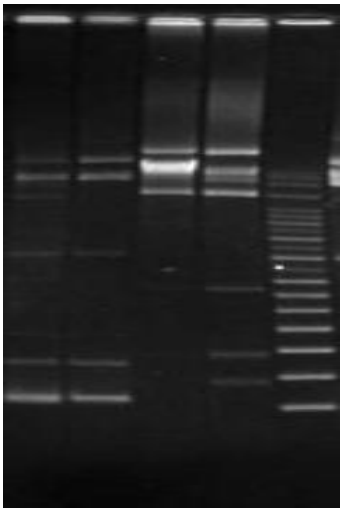


Şekil 4.13 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BLL27 ve S102 suşlarında safra tuzu stresinin plazmid stabilitesi üzerine etkisi

Bant	1 BLL27 (Kb)	2 BLL27 %0.05 ox-bile (Kb)	3 BLL27 %0.2 ox-bile (Kb)	4 S102 (Kb)	5 S102 %0.05 ox-bile (Kb)	6 S102 %0.15 ox-bile (Kb)	7 Marker (Kb)
1	25.0	25.0	18.2	18.9	18.9	16.2	16.2
2	19.9	19.9	16.2	17.4	17.4	15.6	14.4
3	18.2	18.2	14.0	16.2	16.2	7.9	12.1
4	16.2	16.2	8,7	15.6	15.6	3.8	10.1
5	14.0	14.0	3.7	14.3	7.9	2.8	8.0
6	8,7	8,7	2.6	13.4	3.8		7.0
7	3.7	3.7		7.9	2.8		6.0
8	2.6	2.6		3.8			5.0
9	1.4	1.4		2.8			4.0
10							3.0
11							2.0

L. lactis subsp. *lactis* BLL27 suşunda % 2.5 NaCl stresi altında 25.0, 19.9, 14.0, 8.7 ve 1.4 kb, *L. lactis* subsp.*lactis* S102 suşunda %3 NaCl stresi altında ise 16.2, 15.6, 13.4, 7.9, 3.8 ve 2.8 kb plazmidler kaybolmuştur (Şekil 4.14).

1 2 3 4 5



Şekil 4.14 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BLL27 ve S102 suşlarında tuz stresinin plazmid stabilitesi üzerine etkisi

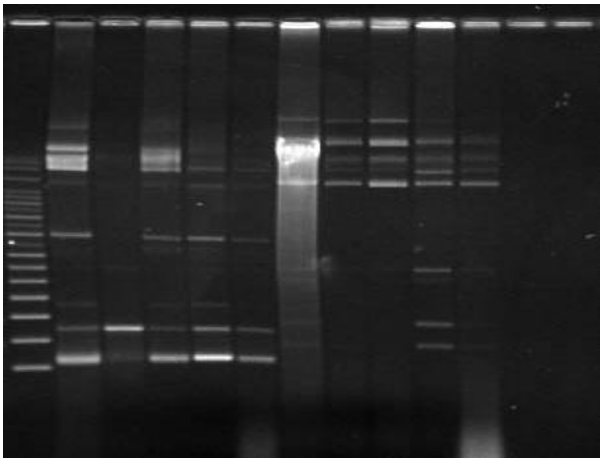
Bant	1 BLL27 %2.5 NaCl (Kb)	2 BLL27 %2.5 NaCl (Kb)	3 S102 %3.0 NaCl (Kb)	4 S102 (Kb)	5 Marker (Kb)
1	18.2	18.2	18.9	18.9	16.2
2	16.2	16.2	17.4	17.4	14.2
3	3.7	3.7	14.3	16.2	12.1
4	2.6	2.6		15.6	10.1
5				14.3	8.0
6				13.4	7.0
7				7.9	6.0
8				3.8	5.0
9				2.8	4.0
10					3.0
11					2,0

Değişik pH koşulları altında *L. lactis* suşlarının plazmid stabiliteleri incelendiğinde; pH 3.5'te BLL27 suşunun 2.6 ve 1.4 kb büyüklükteki plazmidler dışında kalan tüm plazmidlerini kaybettiği saptanmıştır. pH değeri 5.0'a yükseltildiğinde ise sadece en büyük iki plazmid (25.0 ve 19.9 kb) tespit edilememiştir. pH 10'da bu iki plazmide ilave olarak 18.2 kb büyüklükteki plazmid de kaybolmuştur. Denenen son pH değeri

olan 11.8 de plazmid stabilitesi yüksek oranda düşmüş ve 25.0, 19.9, 18.2, 16.2, 14.0 ve 3.7 kb büyüklükteki plazmidler, suş plazmid profillerinde belirlenememiştir (Şekil 4.15). S102 suşunda pH stresinin plazmid stabilitesi üzerine etkisi dört farklı pH değerinde tanımlanmıştır. pH 3.2 ve 4.0'da 14.3, 13.4, 7.9, 3.8 ve 2.8 kb , pH 10'da 18.9 kb ve pH 11.7'de ise 18.9, 13.4, 7.9, 3.8 ve 2.8 kb büyüklükteki plazmidler tanımlanamamıştır (Şekil 4.15).

L. lactis suşlarına denenen son stres koşulu olan düşük ve yüksek sıcaklık stresi altında, her iki suşun plazmid içeriklerinde de, diğer stres koşullarına oranla daha yüksek stabilite saptanmıştır. BLL27 suşunda, 5ºC uygulaması sonucu plazmid içeriklerinde herhangi bir değişme meydana gelmezken, 20ºC'de yalnız 25.0 kb, 45ºC'de 25.0, 19.9 ve 18.2 kb büyüklükteki plazmidler belirlenememiştir. S102 suşunda ise denenen sıcaklık değerlerinin (5ºC, 20ºC ve 45ºC) hiçbirinde plazmid kaybı gerçekleşmemiştir (Şekil 4.16).

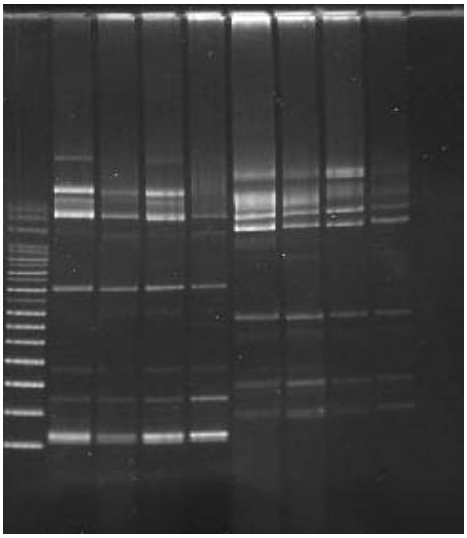
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Şekil 4.15 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BLL27 ve S102 suşlarında pH stresinin plazmid stabilitesi üzerine etkisi

Bant	1. Marker (Kb)	2 LL27 (Kb)	3 LL27 pH 3.5 (Kb)	4 LL27 pH 5.0 (Kb)	5 LL27 pH10.0 (Kb)	6 LL27 pH 11.8 (Kb)	7 S102 pH 3.2 (Kb)	8 S102 pH3.2 (Kb)	9 S102 pH 4.0 (Kb)	10 S102 pH 10.0 (Kb)	11 S102 pH 11.7 (Kb)
1	16,2	25.0	2.6	18.2	16.2	8.7	18.9	18.9	18.9	17.4	17.4
2	14,2	19.9	1.4	16.2	14.0	2.6	17.4	17.4	17.4	16.2	16.2
3	12,1	18.2		14.0	8,7	1.4	16.2	16.2	16.2	15.6	15.6
4	10,1	16.2		8,7	3.7		15.6	15.6	15.6	14.3	14.3
5	8,0	14.0		3.7	2.6					13.4	
6	7,0	8,7		2.6	1.4					7.9	
7	6,0	3.7		1.4						3.8	
8	5,0	2.6								2.8	
9	4,0	1.4									
10	3,0										
11	2,0										

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Şekil 4.16 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BLL27 ve S102 suşlarında sıcaklık stresinin plazmid stabilitesi üzerine etkisi

Bant	1 Marker	2 BLL27	3 BLL27 20ºC	4 BLL27 5ºC	5 BLL27 45ºC	6 S102	7 S102 20ºC	8 S102 5ºC	9 S102 45ºC
	(Kb)	(Kb)	(Kb)	(Kb)	(Kb)	(Kb)	(Kb)	(Kb)	(Kb)
1	16,2	25.0	19.9	25.0	16.2	18.9	18.9	18.9	18.9
2	14,2	19.9	18.2	19.9	14.0	17.4	17.4	17.4	17.4
3	12,1	18.2	16.2	18.2	8,7	16.2	16.2	16.2	16.2
4	10,1	16.2	14.0	16.2	3.7	15.6	15.6	15.6	15.6
5	8,0	14.0	8,7	14.0	2.6	14.3	14.3	14.3	14.3
6	7,0	8,7	3.7	8,7	1.4	13.4	13.4	13.4	13.4
7	6,0	3.7	2.6	3.7		7.9	7.9	7.9	7.9
8	5,0	2.6	1.4	2.6		3.8	3.8	3.8	3.8
9	4,0	1.4		1.4		2.8	2.8	2.8	2.8
10	3,0								
11	2,0								

Laktokoklarda laktoz plazmidi dışında kalan diğer plazmidler, metabolik bir fonksiyon kodlasa bile bu suşlar için yaşamsal önem taşımazlar. Yalnız laktoz plazmidi süt ortamında başlıca karbon kaynağının laktoz olması nedeni ile zorunludur. Bu plazmidin

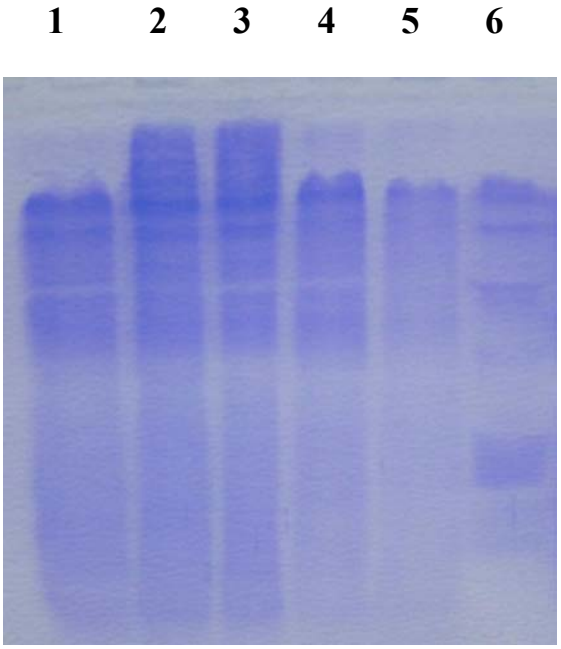
evrimsel süreçte kazanılması sayesinde söz konusu bakteriler bitkisel habitattan süt habitatına geçmiştir. Stres koşulları altında laktokokların genel metabolik davranışlarından biri, metabolizmayı sınırlandırmaktır. Bu doğrultuda, bulundukları organizmada çevresel koşullara uyumu güçlendiren ancak yaşamsal önem taşımayan kromozom dışı genetik yapıların (plazmidler) hücreden eliminasyonu başvurulan temel strateji olmaktadır. Bu koşullarda doğal olarak laktokok plazmidleri içerisinde, stabilitesi en yüksek plazmid sınıfı konjugatif özellikteki laktoz plazmidleridir (Feirtag *et al*. 1991, Cotter *et al*. 2006, van Belkum and Stiles 2006, Siezen *et al*. 2008).

Bu çalışmada da yukarıda özetlenen literatür verilerinde olduğu gibi, plazmid stabilitesi stres koşullarından olumsuz yönde etkilenmiştir. Laktokoklarda plazmid stabilitesi, sayısal olmaktan çok, nitelik bakımından önemlidir. Zira kriptik plazmidler starter kültür suşlarının endüstriyel özellikleri üzerinde önemli bir etki yapmazken, metabolik plazmidler endüstriyel karakteristikleri kökten değiştirebilmektedir. Bu açıdan bakıldığında, çalışmamızda tanımlanan plazmid stabilite oranlarının, söz konusu plazmidlerin *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda kodladığı özellikler belirlendikten sonra tam anlamı ile değerlendirilebileceği ortaya çıkmaktadır.

4.4 Stres Koşullarının Hücre Duvarı Protein İçerikleri Üzerine Etkisi

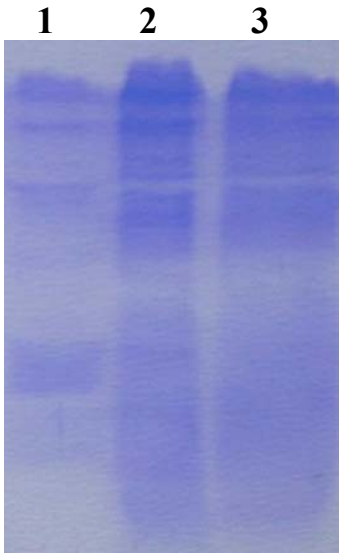
L. lactis subsp. *lactis* BLL27 suşunda, pH stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi, dört farklı pH düzeyinde (pH 3.5, 5.0, 10.0 ve 11.7) araştırılmıştır. Başlangıç pH değeri 6.8 (laktokoklar için optimum pH) olan M17 broth ortamında geliştirilen BLL27 suşunda moleküler büyüklükleri 39.8, 28.7, 21.5, 16.4, 3.1 ve 1.7 kDa olan 6 adet major hücre duvarı proteini belirlenmiştir. Aynı suşun pH 3.5 ve 5.0 stresine maruz bırakılması durumunda, 28.7 kDa büyüklükteki protein belirlenemezken, 64.6 ve 53.8 kDa büyüklüklerinde iki yeni protein tanımlanmıştır. pH 10.0 stresinde küçük iki (3.1 ve 1.7 kDa) protein içeriklerinde saptanamamıştır. pH değeri 11.7 düzeyine çıkarıldığında ise, bu suşun hücre duvarı protein içeriğinde yalnız 39.8 kDa büyüklüğündeki major protein stabilitesini koruyabilmiştir (Şekil 4.17).

Bu bakteride tanımlanan tuz (%2.5 NaCl) stres koşulunda 18.1 kDa büyüklükte ilave bir proteinin varlığı tespit edilmiştir. Diğer proteinler, tuz muamelesi yapılmayan kontrol BLL27 suşu hücre duvarı proteinleri ile tamamen aynı bulunmuştur (Şekil 4.18). BLL27 suşu sıcaklık stresine yanıtta, 5ºC ve 20ºC'de hücre duvarı protein içerikleri bakımından tamamen aynı davranışı göstermiştir. Bu koşullarda, kontrol örnekle kıyaslandığında, hücre duvarı protein içeriklerine sadece 7.6 kDa büyüklükte bir proteinin ilave olduğu saptanmıştır. 45ºC'de ise, kontrol örnekte bulunan 28.7 kDa protein dışındaki tüm proteinler elimine olmuş ve 20.7 kDa büyüklükte yeni bir protein üretilmiştir (Şekil 4.19). İki farklı ox-bile konsantrasyonunda (% 0.05 ve % 0.2) strese maruz bırakılan BLL27 hücrelerinde farklı hücre duvarı protein içerikleri saptanmıştır. % 0.05 ox-bile konsantrasyonunda, kontrol suşun içerdiği tüm hücre duvarı proteinleri yanında, 17.8 ve 14.4 kDa büyüklükte iki ilave protein belirlenmiştir. Ox-bile konsantrasyonu % 0.2 düzeyine çıkarıldığında ise, 45ºC stres koşulunda tanımlanan hücre duvarı protein içeriğinin (28.7 ve 20.7 kDa) tamamen aynısı tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



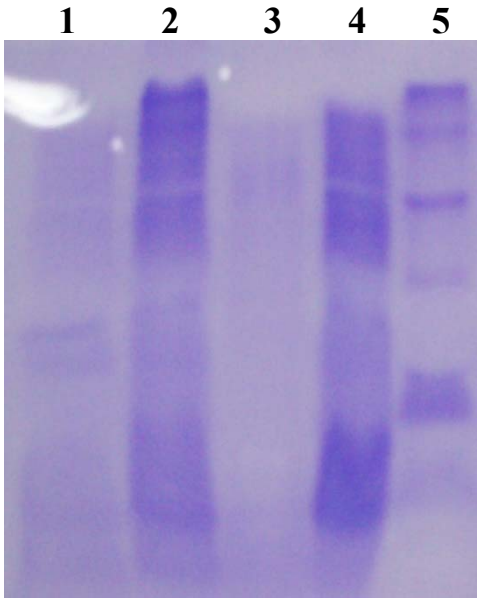
Şekil 4.17 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda pH stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi

Bant	1 BLL27 (kDa)	2 BLL27 pH 3.5 (kDa)	3 BLL27 pH 5.0 (kDa)	4 BLL27 pH 10 (kDa)	5 BLL27 pH 11 (kDa)	6 Protein Marker (kDa)
1	39.8	64.6	64.6	39.8	39.8	43.0
2	28.7	53.8	53.8	28.7		29.0
3	21.5	39.8	39.8	21.5		18.4
4	16.4	21.5	21.5	16.4		6.2
5	3.1	16.4	16.4			3.0
6	1.7	3.1	3.1			
7		1.7	1.7			



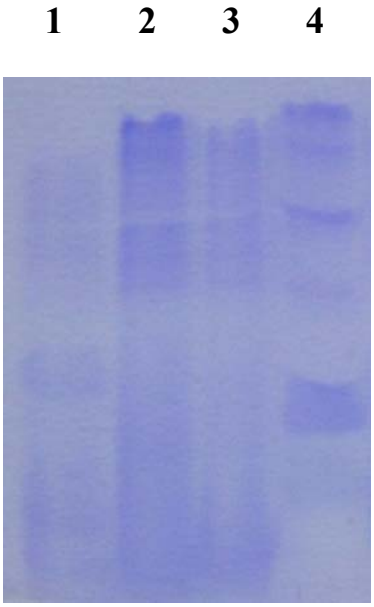
Şekil 4.18 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda tuz stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi

Bant	1 Protein Marker (kDa)	2 BLL27 %2.5 NaCl (kDa)	3 BLL27 (kDa)
1	43.0	39.8	39.8
2	29.0	28.7	28.7
3	18.4	21.5	21.5
4	6.2	18.1	16.4
5	3.0	16.4	3.1
6		3.1	1.7
7		1.7	



Şekil 4.19 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda sıcaklık stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi

Bant	1 BLL27 (kDa)	2 BLL27 5ºC (kDa)	3 BLL27 45ºC (kDa)	4 BLL27 20ºC (kDa)	5 Protein Marker (kDa)
1	39.8	39.8	28.7	39.8	43.0
2	28.7	28.7	20.7	28.7	29.0
3	21.5	21.5		20.7	18.4
4	16.4	16.4		16.4	6.2
5	3.1	7.6		7.6	3.0
6	1.7	3.1		3.1	
7		1.7		1.7	



Şekil 4.20 *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 suşunda safra tuzu stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi

Bant	1 BLL27 (kDa)	2 BLL27 % 0.05 Ox-bile (kDa)	3 BLL27 % 0.2 Ox-bile (kDa)	4 Protein Marker (kDa)
1	39.8	39.8	28.7	43.0
2	28.7	28.7	20.7	29.0
3	21.5	21.5		18.4
4	16.4	17.8		6.2
5	3.1	16.4		3.0
6	1.7	14.4		
7		3.1		
8		1.7		

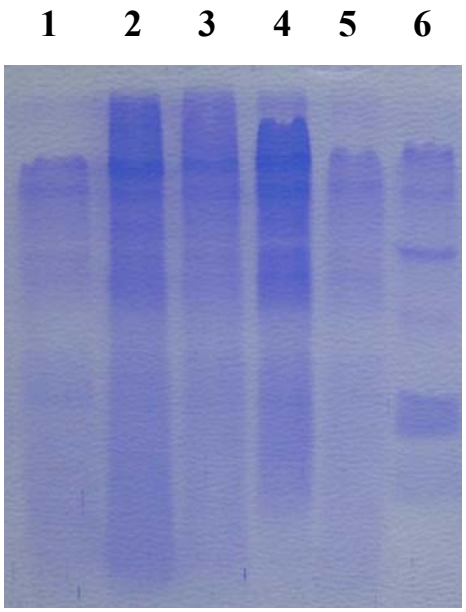
L. lactis subsp. *lactis* S102 suşunda pH stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi dört farklı pH değeri (pH 3.5, 4.0, 10.0 ve 11.7) kullanılarak araştırılmıştır. pH 3.5 stresine maruz bırakılan S102 hücrelerinde, hücre duvarı protein içerikleri 51.7 ve 22.7 kDa büyüklükte iki proteinin ilavesi ve 8.1 ve 4.1 kDa büyüklükteki proteinlerin kaybı bakımından, kontrol örnekten farklı bulunmuştur. pH 4.0'da, pH 3.5 uygulamasından sonra tanımlanan protein içerikleri bakımından tek farklılık, 51.7 kDa proteinin

bulunmayışı olarak belirlenmiştir. pH 10.0'da da, pH 4.0'da tanımlanan hücre duvarı protein içeriklerinin tümü saptanmış ve ayrıca 16.7 kDa büyüklükte yeni bir protein üretilmiştir. pH 11.0 stresinde ise, kontrol örnekte tespit edilen 28.4 ve 39.8 kDa büyüklükteki proteinler dışında kalan tüm proteinlerin üretimi durmuştur (Şekil 4.21).

S102 hücrelerinde tuz stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi % 3 NaCl ilave edilen GM17 broth ortamında araştırılmıştır. Bu koşullarda, kontrol örnek hücre duvarı protein içeriklerinden farklı olarak, sadece ilave 20.7 kDa büyüklükte bir protein tanımlanmıştır (Şekil 4.22).

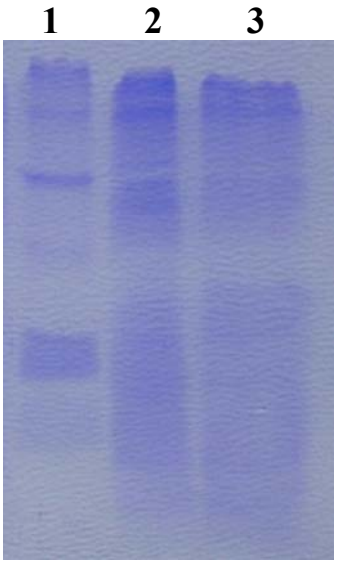
S102 hücreleri denemeye alınan üç sıcaklık stresine (5ºC, 20ºC ve 4 ºC) farklı hücre duvarı protein içerikleri geliştirerek yanıt vermiştir. 5ºC'de 20.7, 14.1 ve 10.1 kDa büyüklükteki proteinler hücre duvarı protein içeriğine ilave olurken, kontrol örnekte bulunan 17.6 ve 8.1 kDa büyüklükteki proteinler elimine olmuştur. 20ºC uygulamasında, kontrol örnek hücre duvarı protein içeriklerine 22.7, 20.7 ve 14.1 kDa büyüklükte üç yeni proteinin katıldığı belirlenmiştir. 45ºC stres koşulunda ise kontrol örnekte bulunan 29.0 kDa büyüklükteki protein dışında kalan tüm proteinler kaybolmuştur (Şekil 4.23).

Denemede kullanılan iki farklı safra tuzu (% 0.05 ve % 0.21 ox-bile) konsantrasyonunda S102 hücreleri, hücre duvarı protein içeriklerindeki değişim bakımından tamamen aynı davranışı göstermiştir. Her iki konsantrasyonda da kontrol örneklerin hücre duvarı protein içeriğine 16.8 kDa büyüklükte bir proteinin ilave olduğu saptanmıştır (Şekil 4.24).



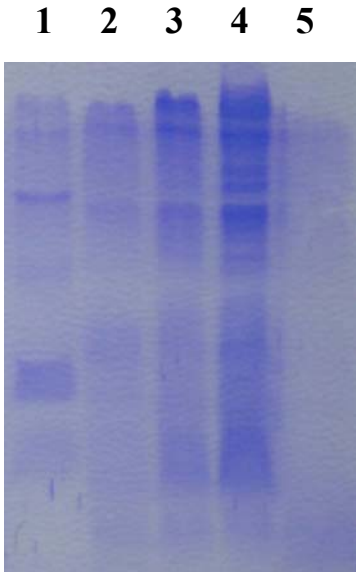
Şekil 4.21 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda pH stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi

Bant	1 S102 (kDa)	2 S102 pH 3.5 (kDa)	3 S102 pH 4.0 (kDa)	4 S102 pH 10 (kDa)	5 S102 pH 11.7 (kDa)	6 Protein Marker (kDa)
1	39.0	51.7	39.0	39.8	39.8	43.0
2	28.4	39.0	28.4	28.4	28.4	29.0
3	17.6	28.4	22.7	22.7		18.4
4	8.1	22.7	17.6	17.6		6.2
5	4.1	17.6		16.7		3.0



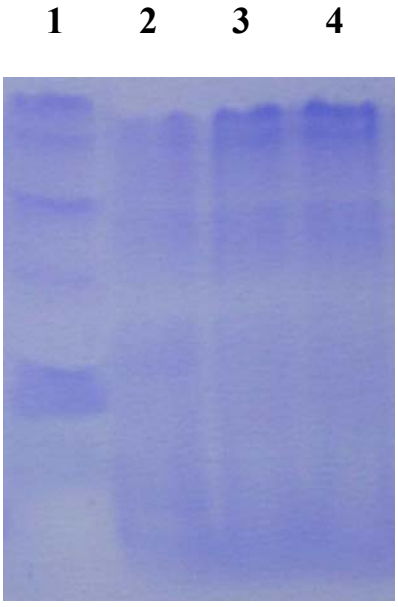
Şekil 4.22 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda tuz stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi

Bant	1 Protein Marker (kDa)	2 S102 % 3 NaCl (kDa)	3 S102 (kDa)
1	43.0	39.0	39.0
2	29.0	28.4	28.4
3	18.4	20.7	17.6
4	6.2	17.6	8.1
5	3.0	8.1	4.1
		4.1	



Şekil 4.23 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda sıcaklık stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi

Bant	1 Protein Marker (kDa)	2 S102 (kDa)	3 S102 5ºC (kDa)	4 S102 20ºC (kDa)	5 S102 45ºC (kDa)
1	43.0	39.0	39.0	39.0	29.0
2	29.0	28.4	28.4	28.4	
3	18.4	17.6	20.7	22.7	
4	6.2	8.1	14.1	20.7	
5	3.0	4.1	10.1	17.6	
6			4.1	14.1	
7				8.1	
8				4.1	



Şekil 4.24 *L. lactis* subsp. *lactis* S102 suşunda safra tuzu stresinin hücre duvarı proteinleri üzerine etkisi

Bant	1 Protein Marker (kDa)	1 S102 (kDa)	3 S102 % 0.05 Ox-bile (kDa)	4 S102 % 0.215 Ox-bile (kDa)
1	43.0	39.0	39.0	39.0
2	29.0	28.4	28.4	28.4
3	18.4	17.6	17.6	17.6
4	6.2	8.1	16.8	16.8
5	3.0	4.1	8.1	8.1
6			4.1	4.1

Laktokoklarda aktif madde transportuna ve protein olgunlaştırılmasına katılan birçok enzimin hücre duvarında lokalize oluşu, stres koşullarına yanıtta bu moleküllerin çok önemli bir rol aldığına işaret etmektedir. Bu nedenle *L. lactis*'te stres yanıtını esas alan çalışmalarda gerek hücre duvarı ve gerekse sitoplazmik proteinlerin tanısı tamamlayıcı bir unsur olarak kullanılmaktadır (Sanders *et al*. 1998, Wood *et al*. 2001, Fukuda *et al*. 2002, Zhang *et al*. 2008). Değişik araştırıcılar bakterilerde stres yanıtından sorumlu en önemli protein grubunun şaperonlar olduğunu ileri sürmüş ve *L. lactis*'te pH, sıcaklık ve ozmotik stres koşullarında üretilen özgül şaperon proteinler tanımlanmıştır. Bunun

yanında aynı araştırmalarda, bazı sitosolik ve hücre duvarına özgül farklı proteinlerin kaybolduğu da saptanmıştır (Lale *et al*. 2007, Zhang *et al*. 2008, Zhou *et al*. 2008).

Bu çalışmada da, literatür verileri ile paralel bir şekilde, stres koşuluna bağlı olarak, bazı proteinlerin üretimi engellenirken bazı yeni proteinlerin üretimi teşvik edilmiştir. NaCl stresi dışındaki tüm stres koşullarında suşlarda yeni proteinlerin üretimi tanımlanmış olmasına rağmen, bu proteinler ortak molekül büyüklüğü göstermemiştir. Bu durum da söz konusu proteinlerin stres koşullarına yanıtta etkin bir rol oynama olasılığını düşürmektedir. Çalışmamızda iki yönlü jel elektroforezi tekniğinin kullanılmamış oluşu, sonuçların sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesini engelleyen temel eksikliktir. Bu aşamadan sonra özellikle her iki suşta da aynı stres koşulu altında üretimi teşvik edilen proteinlerin iki yönlü jel elektroforezi tekniği kullanılarak tekrar değerlendirilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca bu çalışmalara sitoplazmik proteinler de ilave edilerek stres yanıtının biyokimyasal esası detaylı bir şekilde incelenecektir.

5. SONUÇ

Daha önceki çalışmalarda (Özkalp *et al*. 2007); laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite, bakteriyosin üretimi ve faj dirençlilik özellikleri dikkate alınarak, güçlü bir starter kültür suşu karakteristiği gösteren *L. lactis* subsp. *lactis* BLL27 bakterisinin, stres koşullarına karşı gerek gelişme ve gerekse nisin üretimi açısından geliştirdiği yanıtlar belirlenerek, endüstryel süreçlerde kullanım için önerilebileceği belirlenmiştir. Bu suşta çevresel stres koşullarına uyum ve endüstriyel üretim süreçlerinde karşılaşılabilecek stres koşulları dikkate alındığında, ürün kayıplarını engelleyecek niteliktedir. Yüksek alkali pH değerleri dışındaki tüm stres koşullarında üssel ve durma fazlarında üretilen nisin miktarı, gıda bozulması ve gıda kökenli hastalık etmeni gram pozitif bakterilerin gelişiminin engellenmesi için yeterli düzeydedir.

Bu çalışmada elde edilen bir diğer önemli sonuç, stres koşulları altında *L. lactis* suşlarının gelişme kinetiklerinin modellenmesidir. Bu sayede bilimsel ve endüstriyel açıdan büyük önem taşıyan bu çalışmalar standardize edilebilecektir.

Stres koşullarının bakterilerin içerdiği plazmidlerin stabilitesi üzerine etkisi nicel olarak tanımlanmasına rağmen, metabolik plazmidler üzerine etki sınıflandırması yapılmamıştır. Söz konusu sınıflandırma, metabolik plazmidlerin genetik tanısı gerçekleştirildikten sonra tekrar ele alınacaktır.

Özellikle stres yanıtının geliştirilmesinde kritik önem taşıyan protein tanısı, bu araştırmada bir ön çalışma niteliği taşımaktadır. Tanımlanan proteinler detaylı biyokimyasal analizler ile doğrulandıktan sonra genetik regülasyon çalışmalarına geçilecektir. Araştırma sonucunda özetle, *L. lactis* suşlarında stres yanıtının plazmid ve proteinlerle ilişkisinin detaylı bir şekilde araştırılabileceği bilgi birikimi ve biyomateryal sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

Adamowicz, M., Kelly, P. M. and Nickerson, K. W. 1991. Detergent (sodium dodecyl sulfate) shock proteins in *Echerichia coli.* J. Bacteriol., 173; 229-233.

Akçelik, M. and Tunail, N. 1992. A 30 Kd Cell Wall Protein Produced by Plasmid DNA Which Encodes Inhibition of Phage Adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P25. Milchwissenschaft, 47 (4); 215-217.

Akçelik, M. 1999. Plasmid Mediated Industrial Traits in *Lactococcus lactis* subsp*. lactis* LL140. Milchwissenschaft, 54 (11); 603-606.

Anderson, D. G. and Mc Kay, L. L. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Applied and Environmental Microbiololgy, 40; 549-552.

Arnau, J., Sorensen, K. I., Appel, K. F., Vogensen, F. K. and Hammer, K. 1996. Analysis of heat shock gene expression in *Lactococcus lactis* MG1363. Microbiology, 142; 1685-1691.

Aruz, L. J., Jozala, A. F., Pinhero, G. S., Mazzola, P. G. and Pena, V. 2008. Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83; 325-328.

Blank, L. M., Koebmann, B. J., Michelsen, O., Nielsen, L. K. and Jensen, P. R. 2001. Hemin reconstitutes proton extrusion in an H(+)-ATPase-negative mutant of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol., 183; 6707-6709.

Breukink, E. and de Kruijff, B. 1999. The lantibiotic nisin, a special case or not?. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, Vol.1462; 223-234.

Campbell, R. C. 1974. Stastics for biologists. Cambridge University Pres, Second Edition, 385 p.

Centeno, J. A., Tomillo, F. J., Fernández-García, E., Gaya, P. and Nuñez, .M. 2002. Effect of Wild Strains of Lactococcus lactis on the Volatile Profile and the Sensory Characteristics of Ewes' Raw Milk Cheese. Journal of Dairy Science, 85; 3164-3172.

Cheigh, C. I. and Pyun, Y. R. 2005. Nisin Biosynthesis and its Properties. Biotechnol. Lett., 27; 1641–1648.

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

Cheng, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S., Kook, M., Kim, T., Hwang, J. and Pyun, Y. 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. J. Biotechnol., 95; 225-235.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriosins: Safa, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol., 71; 1-20.

Cook, G. M. and Russel, J. B. 1994. The effect of extracellular ph and lactik acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis.* Curr. Microbiol., 28; 165-168.

Corr, S., Li, Y., Riedel, C., O'Toole, P., Hill, C. and Gahan, G. M. 2007. Bacteriocin production mechanism fort he antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. PNAS. 104; 7617-7621.

Cortes-Perez, N. G., Pouget, I., Gratadaux, J. J., Madsen, S. M., Miyoshi, A., Forthier, G., Azevedo, V., Langella, P. and Bermudez-Humarin, L.G. 2006. Construction and characterization of a *Lactococcus lactis* strain deficient in intracellular ClpC and extracellular HtrA proteases.. Microbiology, 152; 2611-2618.

Cotter, P. D., Draper, L. A., Lawton, E.M., McAulife, O., Hill, C. and Ross, R.P. 2006. Overproduction of wild-type bioengineered derivatives of the lantibiotic lacticin 3147. Applied Environmental Microbiology, 72; 4492-4496.

Csonka, L. N. and Epstein, W. 1996. Osmoregulation, p. 1210-1223. In F. C. Neidhardt *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium:* cellular and molecular biology. ASM Press, Washington DC.

Cutler, R. G. and Evans, J. E. 1966. Synchronization of bacteria by a stationary-phase method. J. Bacteriol., 91; 469-476.

Delves, J. and Broughton, D. J. 1990. Nisin as a food preservative. Food Australia, 57; 525-527.

de Smet, I., van Hoorde, L., Vande Woestyne, M., Christiaens, H. and Verstraete, W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. 1995. Journal of Applied Bacteriology, Vol. 79;292–301

de Vos, W. M., Kuipers, O. P., van der Meer, J. R. and Siezen, R. J. 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. Mol. Microbiol., 17; 427-437.

de Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications, pp. 539, Chapman & Hall. New York.

Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. and Nes, I.F. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. PNAS. 104; 2384-2389.

Dimov, S. G., Ivanova, P. M. and Harizanova, N.T. 2005 Biotechnol. Biotechnol. Eq., 19(3), General and applied genetics, Supplement, 4-10.

Drews, O., Reil, G., Parlar, H. and Görg, A. 2004. Setting up standards and a reference map for the alkaline proteome of the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. Proteomics, Vol.4; 1293-304.

Duwat, P., Ehrlich, S. D. and Gruss, A. 1995, The recA gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. Mol. Microbiol., 17; 1121-1131.

Duwat, P., Ehrlic, S. D. and Gruss, A. 1999. Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis.* Mol. Microbiol., 31; 845-858.

Duwat, P., Casselin, B., Sourcie, S. and Gruss, A. 2000. *Lactococcus lactis*: a bacterial model for stres responses and survival. International Journal of Food Microbiology, 55; 83-86.

Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubiere, P. and Gruss, A. 2001. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. J. Bacteriol., 183; 4509-4516.

Earnshaw, R. G., Appleyard, J. and Hurst, R., M. 1995. Understanding physical inactivation processes: combined and pressure. Int. J. Food Microbiol., 28; 197-219.

Egervarn, M., Lindmark, H., Ross, S., Huys, G. and Lindgren, S. 2007. Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility testing of lactic acid bacteria. Antimicrobial agents and chemotherapy, 51;394-396.

Elder, J. K., Amos, A., Southern, E. M. and Shippey, G. A. 1983. measurement of DNA lenght by gel electrophoresis (I). Analytical Biochemistry, 128; 223-226.

Elder, J. K. and Southern, E. M. 1983 measurement of DNA lenght by gel electrophoresis (II): comparison of methods for plating mobility of ragment length. Analytical Biochemistry, 170; 38-44.

Engelke, G., Gutoeski-Eckel, Z., Hammelmann, M. and Entian, K. D. 1992. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the *nisB* protein. App. Environ. Microbiol., 8(11); 3730-3743

Even, S., Lindley, N.D., Loubiere, P. and Cocaign-Bousquet, M. 2003. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. Mol Microbiol., 45; 1143–1152.

Feirtag, J. M., Petzel, J. P., Pasalodos, E., Baldwin, K. A. and Mc Kay, L. L. 1991. Thermosensitive plasmid replication, temperature sensitive host growth, and chromosomal plasmid integration conferred by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* lactose plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl Environ Microbiol., 57; 539-548

Folgering, J. H. A., Moe, P. C., Schuurman-Wolters, Gea, K., Blount, P. and Poolman, B. 2005. Lactococcus lactis Uses MscL as Its Principal Mechanosensitive Channel. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 280, No. 10, Issue of March 11, pp. 8784–8792.

Foster, J. W. and Spector, M. P. 1995. How *Salmonella* survives against the odds. Annu. Rev. Microbiol., 49; 145-174.

Foucaud-Scheunemann, C. and. Poquet, I. 2003. HtrA is a key factor in the response to specific stress conditions in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol. Lett. 224:53–59

Frees, D., Vogensen, F. K. and Ingmer, H. 2003. Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. Int. J. Food Microbiol., 87; 293-300.

Fukuda, D., Watanabe, M., Sonezaki, S., Sugimoto, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2002. Molecular characterization and regulatory analysis of *dnaK* operon of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophila.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 93, 388-394.

Gatti, S., Colombo, G., Buffa, R., Turcatti, F., Garofalo, L., Carboni, N., Ferla, L., Fassati, L.R., Lipton, JM. and Catania, A. 2002. Melanocyte-stimulating hormone protects the allograft in experimental heart transplantation. Transplantation (Baltim) 74; 1678–1684.

Graumann, P., Wendrich, T. M., Weber, M. H., Schroder, K. and Marahiel, M. A. 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatres. Mol. Microbiol., 25; 741-756.

Gregus, Z. and Nemeti, B. 2005. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase works as an arsenate reductase in human red blood cells and rat liver cytosol. Toxicological Sciences, Vol. 85, no. 2, pp. 859–869.

Gunn, J. S. 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. Microbes Infect., 2; 907-913.

Hammes, W. P. and Hertel, C. 2003. The genera Lactobacillus and Carnobacterium. In The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, release 3.15. Edited by M. Dworkin and others.

Hansen, M. C., Nielsen, A. K., Molin, S., Hammer, K., Kilstrup, M., Palmer Jr, R. J., Udsen, C. and White, D. C. 2001. Changes in mRNA blotting: flourescence insitu rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. J. Bacteriol., 183; 4747-4751.

Hartke, A., Bouché, S., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P. and Auffray, Y. 1996. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Curr. Microbiol., 33; 194-199.

Herman, C., Thévent, D., D'Ari, R. and Bouloc, P. 1995. Degradation of σ^{32}, the heat shock regulator in *Escherichia coli,* is governed by HflB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92; 3516-3520.

Janowiak, B. E. and Griffith, O. W. 2005. Glutathione Synthesis in *Streptococcus agalactiae* One Protein Accounts for γ-Glutamylcysteine Synthetase and Glutathione Synthetase Activities. J. Biol. Chem., Vol. 280; 11829-11839.

Kets, E. P. W., de Bont, J. A. M. and Heipieper, H. J. 1996. Physiological response of Pseudomonas putida S12 subjected to reduced water activity. FEMS Microbiology Letters, Vol.139; 133-137.

Kilimann, K. V., Doster, W., Vogel, R. F., Hartmann, C. and Ganzle, M.G. 2007. Protection by sucrose against heat-induced and sublethal injury of *Lactococcus lactis*: an FT-IFR study. Biochimica et Biophcica Acta., 1764; 1188-1197.

Kilstrup, M., Jacopsen, S., Hammer, K. and Vogensen, F. K. 1997. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis.* Appl. Environ. Microbiol., 63; 1826-1837.

Kim, W. S. and Dunn, N. W. 1997. Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock cryotolerance. Curr. Microbiol., 25; 59-63.

Kim, W. S., Ren, J. and Dunn, N. W. 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and subsp. *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. FEMS Microbiol. Lett., 171; 57-65.

Kim, W. S., Perl, L., Park, J. H., Tandianus, J. E. and Dunn, N. W. 2001. Assesment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus.* Curr. Microbiol., 43; 346-350.

Kim, W. S., Park, H. J., Tandianus, J. E., Ren, J., Su, P. and Dunn, N. W. 2002. Adistinct physiological state of *Lactococcus lactis* cell that confers survival against a direct and prolonged exposure to severe stresses. FEMS Microbiol. Lett., 212; 203-208.

Kim, M-H., Kong, Y., Baek, H. and Hyun, H. 2006. Optimization of culture conditions and medium composition fort he production of micrococcin GO5. Journal of Biotechnology, 121; 54-61.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12; 39-85.

Kleerebezem, M. 2004. Quorrum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. Peptides, 25; 1405-1414.

Kuipers, O. P., Beerthhuyzen, M. M., de Vos, W. M. and Siezen, R. J. 1993. Biosynthesis and secretion of a precursor of nisin Z by *Lactococcus lactis* directed by the leader peptide of the homologus lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis*. FEMS Lett., 330 (1); 23-27.

Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G. G. A., Luesink, E. J. and de Vos, W. M., 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. J. Biol. Chem., 270; 27299-27304.

Kvint, K., Nachin, L. and Diez, A. 2003. The bacterial universal stres proteins. Current Opinion in Microbiology, 6; 140-145.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227; 680-685.

Lale, R., Tükel, Ç. and Akçelik, M. 2007. Protein Profiles and Plasmid Contents of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL52 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC79 Strains Under Several Stress Conditions. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 31(4); 247-252.

Li, H., Xiong, H., Kong, H. J., Chen, Y., Zhao, J., Xiong, S., Huang, B., Gu, H., Mayer, L., Ozato, K. and Unkeless, J. C. 2005. Ubiquitin-dependent degradation of interferon regulatory factor-8 mediated by Cbl downregulates interleukin-12 expression. J Biol Chem.,. 280-(25); 23531-23539.

Lomovskaya, O. and Lewis, K. 1992. Emr, an *Escherichia coli* locus for multi during resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89; 8938-9842.

Madsen, S., Hindre, T., Pennec, J. and Dufour, A. 2005. Two acid inducible promoters from *Lactococcus lactis* require the cis acting ACID-box and the transcription regulator RcfB. Molecular Microbiology, 56; 735-746.

Marcina, F. L., Kopecko, D. J., Jones, K. R., Ayers, D. S. and Mc Coven ,S. M. 1978. A multiple plasmid containing *Escherichia coli* strain: Coveinent 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 clonning vector ble to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sangius*. Gene, 19; 345-353.

Matsukaki, H., Endo, N., Sonomoto, K. and Izhibaki, A. 1996. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 45; 36-40.

Mayers, J. A., Sanches, D., Elwell, L. P. and Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method fort he identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., 137(3); 1529-1537.

Miyoshi, A., Rochat, T., Grat, J., Loir, Y., Olivera, G., Langella, P. and Azavedo, V. 2003. Oxidative stres in *Lactococcus lactis*. Genetics and Molecular Research, 2; 348-359.

Molenaar, D., Hagting, A., Alkema, H., Driessen, A. J. M. and Konings, W. N. 1993. Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systemes for proline and betaine in *Lactococcus lactis.* J. Bacteriol., 175; 5438-5444.

Moser, S. A. and Savage, D. C. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol., 67; 3476-3480.

Nannen, N. L. and Hutkins, R. W. 1991. Proton translocating adenosine triphosphatese activity in lactic acid bacteria. J. Dairy Sci., 74; 747-751.

Nes, I. F., Dilp, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek., 70; 113-128.

Nilsson, D., Lauridsen, A. A., Tomoyasu, T. and Ogura, T. 1994. A *Lactococcus lactis* gene encodes membrane protein with putative ATPase activity that is homologus to the essential *Escherichia coli ftsH* gene product. Microbiology, 140; 2601-2610.

Nishino, K. and Yamaguchi, A. 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 183; 5803-5812.

O'Driscoll, J., Glynn, F., Fitzgerald, G.F. and van Sinderen, D. 2006. Sequence analoysis of the lactococcal plasmid pNP40: a mobile replicon for coping with the environmental hazard. Journal of Bacteriology. 188; 6629-6639.

O'Sullivan, E. and Condon, S. 1999. Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H^+-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 65; 2287-2293.

Özkalp, B., Özden, B., Tuncer, Y., Şanlıbaba, P. and Akçelik, M. 2007. Technological Characterization of Wild Type *Lactococcus lactis* Strains Isolated From Raw Milk And Fermented Milk Products In Turkiye. Lait., 87; 521-534.

Panoff, J. M., Legrand, S., Thammavongs, B. and Boutibonnes, P. 1994. The cold-shock response in *Lactococcus* subsp. *lactis.* Curr. Microbiol., 29; 213-216.

Patton, G. C. and van der Donk, W. A. 2005. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. Current Opinion in Microbiology, Vol. 8; 543-551.

Phadtare, S., Yamanata, K. and Inouye, M. 2000. The cold-shock response. *In*: Stortz, G., and Hengge-Aronis, R. (Eds.). Bacterial Stress Response. (pp. 33-34). ASM Press, Washington, DC.

Poolman, B. and E. Glaasker. 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. Mol. Microbiol., 29; 397–407.

Presser, K. A., Ratkowsky, D. A. and Ross, T. 1997. Modelling the groth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. Appl. Environ. Microbiol., 63; 2355-2360.

Ra, S. R., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I. and Saris, E. J. 1996. Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity from a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. Microbiology, 142 (5); 1281-1288.

Rallu, F., Gruss, A. and Maguin, E. 1996. *Lactococcus lactis* and stress. Antonie van Leeuwenhoek, 70; 243-251.

Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. 2000. Acid-and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. Mol. Microbiol. 35; 517-528.

Redon, E., Loubrie, P. and Bousqet, M.C. 2005. Role of mRNA stability during genome-wide adaptadion of Lactococcus lactis to carbon starvation. The Journal of Biological Chemistry, 280; 3680-3685.

Russel, D. W. and Setchell, K. D. 1992. Bile acid biosynthesis. Biochemistry, 31; 4737-4749.

Sanchez, M. M., Delgado, T., Alonso, L. and Mayo, B. 2000. Phenotypic and genetic characterization of a selected set of *Lactococcus lactis* strains isolated from a starter-free farmhouse cheese. Food Microbiology, 17; 449-460.

Sanders, J. W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J. R., Venema, G., and Kok, J. 1998. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. Mol. Microbiol., 27; 299-310.

Sanders, J.W., Venema, G. and Kok, J. 1999. Environmental stres responses in *Lactococcus lactis.* FEMS Microbiology Reviews, 23; 483-501.

Schaffer, H. E. and Sederoff, R. R. 1981. ımprovement estimation of DNA fragment lenghts from agorose gels. Analytical Biochemistry, 115; 122-133.

Siegers, K. and Entian, K. D. 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. Appl. Environ. Microbiol. 61; 1082-1089.

Siezen, R. J., Renckens, B., Swam, I., Peters, S., van Kranenburg, R. and Kleerebezem, M., 2005. Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. Applied and Environmental Microbiology, 71; 8371 - 8382.

Siezen, R. J., Starrenburg, M.J.C., Boekhorst, J., Renckens, B., Molenear, D. and Vlieg, H. 2008. Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation of the plant niche. Applied Environmental Microbiology, 74; 424-436.

Somero, G. N. 1995. Proteins and temperature. Annu. Rev. Physiol., 57; 43-68.

Southern, E. M. 1979. measurement of DNA length by gel electrophoresis. Anal. Biochem., 100; 319-323.

Teixera, P., Castro, H., Mohacsi-Farkas, C. and Kirby, R. 1997. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. J. Appl. Microbiol., 83; 219-226.

Thanassi, D. G., Cheng, L. W. and Nikaido, H. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli.* J. Bacteriol., 179; 2512-2518.

Van Asseldonk, M., Simons, A., Visser, H., de Vos, W. M. and Simons, G. 1993. Cloning, nucleotide sequence and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis* dnaJ gene. J. Bacteriol., 175; 1637-1644.

Van Belkum, M.J and Stiles, M.E .2006. Characterization of theta-type plasmid pCD3.4 from *Carnobacterium divergens*, and modulation of its host range by RepA mutation. Microbiol., 152; 171-178

Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Erlich, S.D. and Maguin, E. 2002. Stres responses in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 82; 187-216.

Viang, W., Hou, Y. and Inouye, M. 1997. CspA, the mojor cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. J. Biol. Chem., 272; 196-202.

Whitaker, R. D. and Batt, C. A. 1991. Characterizetion of heat shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Appl. Environ. Microbiol., 57; 1408-1412.

Whitehead, H. R. and Riddet, W. 1933. Slow development of acidity in cheese manufacture. Investigation of a typical case of "non-acid" milk. N. Z. J. Agric., 46; 225-229.

Wood, J. M., Bremer, E., Csonka, L. N., Kraemer, R., Poolman, B., Van Der Heide, T. and Smith, L. T. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. Comparitive Biochemistry and Physiology Part A., 130; 437-460.

Wouters, J. A., Jeynov, B., Rombouts, F. M., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. 1999. Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. Microbiology, 145; 3185-3194.

Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Somoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem., 67; 1616-1619.

Zhang, J., Fu, R-Y., Hugenholtz, J., Li, Y. and Chen, J. 2008. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stres. Applied Environmental Microbiology, 73; 5268-5275.

Zhou, X., Wang, Y. and Pan, Y. 2008. Nisin-controlled extracellular production of apidaecin. Biotechnology Product and Process Engineering, 78; 947-953.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu Çağla YILMAZ

Doğum Yeri : Kocaeli

Doğum Tarihi: 1981

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kocaeli 19 Mayıs Lisesi (1995-1998)

Lisans : Ankara Üniversitesi (1999-2004)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Eylül2005-Temmuz2008)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Servier İlaç ve Araştırma A. Ş. (2008 - -)