

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

LACTOCOCCUS LACTIS *fhuR* GENİNİN
ÇOKLU KOPYALARININ NİSİN
BİYOSENTEZİNE ETKİSİ

ZEYNEP GİRGİN ERSOY
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

GEBZE

2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

LACTOCOCCUS LACTIS *fhuR* GENİNİN
ÇOKLU KOPYALARININ NİSİN
BİYOSENTEZİNE ETKİSİ

ZEYNEP GİRGİN ERSOY
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

TEZ DANIŞMANI PROF. DR. İ. YAVUZ SEZEN
II. TEZ DANIŞMANI DOÇ. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE

2013



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04/01/2013 tarih ve 2013/1 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından **17/01/2013** tarihinde tez savunma sınavı yapılan **Zeynep GİRGİN ERSOY**'un tez çalışması **MOLEKÜLER BİYOLOJİ** Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : PROF. DR. İ. YAVUZ SEZEN

ÜYE

: DOÇ. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

ÜYE

: DOÇ. DR. MELEK ÖZKAN

ÜYE

: DOÇ. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE

: YRD. DOÇ. DR. F. İNCİ ÖZDEMİR

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: LACTOCOCCUS LACTIS *fhuR* GENİNİN ÇOKLU KOPYALARININ NİSİN BİYOSENTEZİNE ETKİSİ

YAZAR ADI: ZEYNEP GİRGİN ERSOY

Nisin, laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis*'in çeşitli suşları tarafından üretilen bir bakteriyosindir. Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) tarafından gıda katkı maddesi olarak onaylanmış tek bakteriyosin olan nisin kimyasal yolla üretimi mümkün olmadığından, bu bakteriyosini üreten suşların üretim veriminin artırılması önem taşımaktadır.

Bu çalışma kapsamında *L. lactis* ATCC 11454'in nisin üretiminin optimizasyonu için farklı karbon kaynakları, pH değerleri ve sıcaklıklar denenmiştir. En yüksek nisin üretimi, galaktoz varlığında, pH 5.5'te ve 25 °C'ta sağlanmıştır.

Literatürde, bilgimiz dahilinde, kükürt metabolizmasıyla nisin üretimini ilişkilendiren tek bir çalışma mevcuttur. Wu ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bu çalışmada, kükürt metabolizmasının düzenlenmesinde transkripsiyonel bir aktivatör olarak görev yapan FhuR'den yoksun *L. lactis* suşlarının nisin üretemedikleri gösterilmiştir. Bu çalışmadan yola çıkılarak, tez çalışmasında, *fhuR* genini yüksek seviyede ifade edebilen mutant bir suş oluşturulması amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle *fhuR* geni PCR ile çoğaltılmış ve bu çalışma kapsamında elde edilen mekik vektörü pMG36e-Kn'e klonlanmıştır. *fhuR* genini taşıyan rekombinant plazmidin *L. lactis* hücrelerine elektroporasyonla aktarılması için yapılan her deneme başarısızlıkla sonuçlanmıştır.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: THE EFFECT OF MULTIPLE COPIES OF *fhuR* GENE OF LACTOCOCCUS LACTIS ON NISIN BIOSYNTHESIS

AUTHOR: ZEYNEP GIRGIN ERSOY

Nisin, which is produced by certain strains of *L. lactis* (member of lactic acid bacteria), is a bacteriocin. It's the only bacteriocin which is approved by World Health Organization (WHO) as a food additive. To increase the production efficiency of nisin producing strains is important since this bacteriocin cannot be produced by chemical methods.

In this study, to optimise nisin production of *L. lactis* ATCC 11454, different carbon sources, pH values and temperatures are tried. Maximum nisin production is achieved in the presence of galactose, at pH 5.5 and at 25 °C.

To our knowledge, in the literature, there is only one study which associate sulphur metabolism with nisin production. In this study, Wu et al. (2009) showed that *L. lactis* strains which lack FhuR, a transcriptional activator regulating sulphur metabolism, cannot produce nisin. Based on this work, in the thesis study, it is aimed to obtain a mutant strain which can overexpress *fhuR* gene. In order to achieve this, PCR amplified *fhuR* gene is cloned to a shuttle vector pMG36e-Kn which is obtained in this study. Every trial to transfer recombinant plasmid, which carry *fhuR* gene, into *L. lactis* cells by electroporation was failed.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama başlamamda ve deney süreçlerinde maddi ve manevi desteklerinden dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN'e; bilgisini, anlayışını, gülümsemesini ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen yardımcı tez danışmanım Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her yönden destek veren değerli bölüm başkanımız Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya ve yakın zamanda kaybettiğimiz saygıdeğer bölüm başkanımız merhum Prof. Dr. Füsün GÜMÜŞEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardım istemekten hiçbir zaman çekinmediğim, beni teslim alıp her halimle kabul eden Arş. Gör. Tuğrul DORUK ve ilk göz ağrım olan Özlem ASKER'e; tez konumun şekillenmesinde bana fikir veren, elinden gelen her türlü desteği sağlayan Murat Kemal AVCI'ya;

Laboratuvarda çalışmayı eğlenceli hale getiren arkadaşlarım; Aybike YEDEKÇİ, Ceyda KETENCİ, Güler TOPRAK, Şerif YILMAZ, Tuba KORKMAZ, Zeynep DEMİR ve Zişan ASAL KILIÇ'a;

Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarını esirgemeyen ve destekleri ile yanımda olan Arş. Gör. Mine GÜL ŞEKER, Uzm. Biyolog Pelin BALÇIK ERÇİN, Arş. Gör. Metin ÇETİN ve eşi İlknur ÇETİN, Uzm. İrem YALIM CAMCI, Esra KAYA, Elif SIRMA ve Veysel SÜZERER'e en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Son olarak, en zor zamanlarımda elimi sınıksız tutup hiç bırakmayan biricik eşim Tolga ERSOY'a; maddi ve manevi birçok zorluğa rağmen bugünlere ulaşabilmem için ellerinden geleni yapan, sevgi ve şefkatlerini hiçbir zaman esirgemeyen, canım ailem Gülgün GİRGİN, Necmettin GİRGİN ve Ayşe GİRGİN'e ve her türlü destekleri ile yanımda olan ERSOY ailesine bütün kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Nisin	1
1.1.1. Nisinin Yapısal Özellikleri	3
1.1.2. Nisinin Antimikrobiyal Etki Şekli ve Stabilitesi	6
1.1.3. Nisin Biyosentezinden Sorumlu Gen Kümesi	10
1.1.4. Nisin Biyosentezi	12
1.1.5. Nisin Üretiminin Arttırılması	14
1.2. <i>fhuR</i> geni	16
1.3. TEZ ÇALIŞMASININ AMACI	18
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
2.1. Gereçler	19
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	19
2.1.2. Kullanılan Enzimler	19
2.1.3. Kullanılan Kitler ve DNA Moleküler Belirteçleri	20
2.1.4. Kullanılan Bakteri Soyları ve Plazmitler	20
2.1.5. Kullanılan Çözeltiler	23
2.1.6. Kullanılan Besiyerleri	26
2.1.7. Kullanılan Antibiyotikler	29

2.1.8. Kullanılan Cihazlar	30
2.2. Yöntemler	31
2.2.1. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri	31
2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	31
2.2.3. İzole Edilen DNA'nın Agaroz Jelden Geri Kazanılması	31
2.2.4. Ligasyon	31
2.2.5. <i>E. coli</i> ' den Plazmit İzolasyonu	32
2.2.6. <i>E. coli</i> Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması	33
2.2.7. <i>L. lactis</i> 'in Büyüme Eğrisinin Çıkarılması	34
2.2.8. <i>L. lactis</i> 'ten Kromozomal DNA İzolasyonu	35
2.2.9. Ampisilin (<i>bla</i>) ve Kanamisin (<i>kan</i>) Direnç Genleri ile <i>fhuR</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması	35
2.2.10. PCR Ürünlerinin Klonlanması	39
2.2.10.1. <i>fhuR</i> geninin pMG36e Mekik Plazmidine Klonlanması	39
2.2.10.2. Ampisilin Direnç Geninin (<i>bla</i>) pMG36e Mekik Plazmidine Klonlanması	40
2.2.10.3. Kanamisin Direnç Geninin (<i>kan</i>) pMG36e Mekik Plazmidine Klonlanması	40
2.2.10.4. pMG36e-Kn Plazmidine <i>fhuR</i> Geninin Klonlanması	41
2.2.12. pMG36e-Kn- <i>fhuR</i> Plazmidinin <i>E. coli</i> ET12567 Suşuna Aktarılması	43
2.2.13. pMG36e-Kn- <i>fhuR</i> Plazmidinin <i>L. lactis</i> 'e Aktarılması	44
2.2.13.1. <i>L. lactis</i> Elektrokompetanlarının Hazırlanması	44
2.2.13.2. Elektroporasyon	46
2.2.14. <i>L. lactis</i> 'in Nisin Üretimi	47
2.2.14.1. Nisin Üretiminin Belirlenmesi	47
2.2.14.2. <i>L. lactis</i> 'in Nisin Üretimine Besiyerindeki Kükürt Konsantrasyonunun Etkisi	48

2.2.14.3. <i>L. lactis</i> 'in Nisin Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi	49
2.2.14.4. <i>L. lactis</i> 'in Nisin Üretimine pH'nın Etkisi	51
2.2.14.5. <i>L. lactis</i> 'in Nisin Üretimine Sıcaklığın Etkisi	52
2.2.14.6. <i>L. lactis</i> 'in Nisin Üretimine <i>B. thuringiensis</i> ve <i>S. coelicolor</i> Kültürlerinin Etkisi	52
3. BULGULAR	54
3.1. <i>Lactococcus lactis</i> 'in Nisin Üretimi	54
3.1.1. Nisin Üretimine Besiyerindeki Kükürt Konsantrasyonunun Etkisi	56
3.1.2. Nisin Üretimine <i>B. thuringiensis</i> ve <i>S. coelicolor</i> Kültürlerinin Etkisi	56
3.1.3. Nisin Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi	58
3.1.4. Nisin Üretimine pH'nın Etkisi	60
3.1.5. Nisin Üretimine Sıcaklığın Etkisi	61
3.2. <i>fhuR</i> Geninin Çoklu Kopyalarının <i>L. lactis</i> 'in Nisin Üretimine Etkisi	63
3.2.1. <i>fhuR</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması	63
3.2.2. Ampisilin Direnç Geninin (<i>bla</i>) PCR ile Çoğaltılması	65
3.2.3. Kanamisin Direnç Geninin (<i>kan</i>) PCR ile Çoğaltılması	66
3.2.4. Kanamisin (<i>kan</i>) Geninin pMG36e Plazmidine Klonlanması	67
3.2.5. <i>fhuR</i> Geninin pMG36e-Kn Plazmidine Klonlanması	69
3.2.6. pMG36e-Kn- <i>fhuR</i> Plazmidinin <i>L. lactis</i> 'e Aktarılması	72
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	73
5. KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
Amp	Ampisilin
bç	Baz çifti
CaCl₂	Kalsiyum klorür
Chl	Kloramfenikol
CTAB	Setil trimetilamonyum bromide
Da	Dalton
dk	Dakika
DTT	Dithiothreitol
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz I
EDTA	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
Ert	Eritromisin
EtBr	Etidyum bromid
HCl	Hidroklorik asit
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd endonükleaz III
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Potasyum fosfat monobazik
K₂HPO₄	Potasyum fosfat dibazik
Kn	Kanamisin
KoAC	Potasyum asetat
koü	Koloni oluşturan ünite
L	Litre
LB	Luria Bertani broth
LiAc	Lityum asetat
M	Molar
MgCl₂.6H₂O	Magnezyum klorür heksahidrat
MgSO₄.7H₂O	Magnezyum sülfat heptahidrat
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MnCl₂.4H₂O	Mangan klorür tetrahidrat
MOPS	3-morfolinopropan-1-sulfonik asit

NaCl	Sodyum klorür
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethanesülfonik asit)
<i>Pst</i>I	<i>Providencia stuartii</i> endonükleaz I
Rpm	Dakika başına dönüş
<i>Sac</i>I	<i>Streptomyces achromogenes</i> endonükleaz I
<i>Sal</i>I	<i>Streptomyces albus</i> endonükleaz I
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
TSB	Triptik Soy Broth
<i>Xba</i>I	<i>Xanthomonas badrii</i> endonükleaz I
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

1.1. Doğada nadir bulunan dehidroalanin, dehidrobütirin, lantiyonin ve β -metil lantiyonin aminoasitlerinin sentez mekanizması.	4
1.2. Nisin öncülünün ve olgun nisinin yapılarının şematik gösterimleri.	5
1.3. Nisin molekülü tarafından por oluşumu için önerilen Wedge modeli.	7
1.4. Nisin molekülü tarafından por oluşumu için önerilen Lipid II modeli.	8
1.5. Nisin biyosentezinden sorumlu olan gen kümesinin organizasyonu.	10
1.6. Nisin direncinin mekanizması.	12
1.7. <i>L. lactis</i> 'te nisin biyosentezinin ve bu biyosentezin düzenlenmesinin şematik gösterimi.	14
1.8. <i>L. lactis</i> 'te sistein ve metiyonin biyosentez yolağı ve bu yolağın FhuR tarafından düzenlenmesi.	17
2.1. Kullanılan Moleküler DNA Belirteçleri.	20
2.2. pMG36e vektörünün çoklu klonlama bölgesi ve genel özelliklerini gösteren haritası.	23
2.3. Nisin Standart Grafiğı.	48
3.1. <i>L. lactis</i> büyüme eğrisi.	55
3.2. Zamana bağı nisin üretimi.	55
3.3. <i>L. lactis</i> 'in nisin üretimine glukoz, sükroz, galaktoz, fruktoz, mannoz, trehaloz, arabinoz, ksiloz, melas, nişasta, sellobiyoz ve PAS'ın etkisi.	59
3.4. <i>L. lactis</i> 'in nisin üretimine karbon kaynağının pH 7'de ve 30 °C'taki etkisi.	59
3.5. <i>L. lactis</i> 'in nisin üretimine pH 3, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8 ve 9'un etkisi.	60
3.6. <i>L. lactis</i> 'in nisin üretimine pH'nın 30 °C'taki etkisi.	61
3.7. <i>L. lactis</i> 'in nisin üretimine 25 °C, 30 °C, 37 °C ve 42 °C'ın etkisi.	62
3.8. <i>L. lactis</i> 'in nisin üretimine sıcaklığın pH 7'deki etkisi.	62
3.9: <i>L. lactis</i> MG1363, <i>L. lactis</i> IL1403 ve <i>L. lactis</i> KF147'nin genom dizilerinin MegAlign programında birbirleriyle eşleştirilmesi.	64
3.10. <i>fhuR</i> genine ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	64
3.11. PCR ile elde edilen amplikonun DNA dizisi (<i>fhuR</i> geni).	65

- 3.12.** Ampisilin direnç genine ait olduğu düşünülen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünümleri. 66
- 3.13.** Kanamisin direnç genine ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. 67
- 3.14.** pMG36e ve olası pMG36e-Kn plazmidlerinin restriksiyon enzim kesim sonuçları. 68
- 3.15.** pMG36e plazmidine Kanamisin direnç geninin (*kan*) klonlanması sonucu oluşan pMG36e-Kn rekombinant plazmidinin şematik görünümü. 69
- 3.16.** pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidinin restriksiyon enzim kesim sonuçları. 70
- 3.17.** pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidindeki *fhuR* geninin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen PCR reaksiyonları. 71
- 3.18.** Rekombinant pMG36e-Kn plazmidine *fhuR* geninin klonlanması sonucu oluşan pMG36e-Kn-*fhuR* rekombinant plazmidinin şematik görünümü. 72

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bu çalışmada kullanılan bakteri soylarının karakteristik özellikleri ve kaynakları.	21
2.2. Bu çalışmada kullanılan plazmidlerin karakteristik özellikleri ve kaynakları.	22
2.3. Bu çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları.	30
2.4. Ampisilin (<i>bla</i>) ve Kanamisin (<i>kan</i>) direnç genleri ile <i>fhuR</i> geni için tasarlanmış ileri ve geri primerler.	37
2.5. Ampisilin (<i>bla</i>) ve Kanamisin (<i>kan</i>) direnç genleri ile <i>fhuR</i> geninin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan enzimler, reaksiyon tamponları ve reaksiyon koşulları.	38
2.6. <i>fhuR</i> geninin dizi analizi için kullanılan ileri ve geri primerler.	43
2.7. Elektroporasyonda denenen plazmit miktarları (μ l), Volt, ohm(Ω) ve μ Farad değerleri.	47
2.8. Bu çalışmada kullanılan karbon kaynaklarının gruplandırılması.	50
3.1. Besiyerindeki farklı kükürt konsantrasyonlarının <i>L. lactis</i> 'in nisin üretimi üzerine etkisi.	56
3.2. Besiyerindeki <i>B. thuringiensis</i> süpernatantı ya da canlı/ölü hücrelerinin <i>L. lactis</i> 'in nisin üretimi üzerine etkisi.	57
3.3. Besiyerindeki <i>S. coelicolor</i> süpernatantı ya da canlı/ölü hücrelerinin <i>L. lactis</i> 'in nisin üretimi üzerine etkisi.	58

1. GİRİŞ

1.1. Nisin

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen doğal antimikrobiyal maddelerdir. Protein yapısında olup, genellikle kısa zincirli, küçük molekül ağırlığına sahiptirler. Genellikle üretici suşa yakın akraba türlere karşı antimikrobiyal etki gösterirler. Bu polipeptitler, gıda bozulması ve gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimini engellemekte ve bu özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadırlar. Farklı özelliklere sahip birçok çeşitlerinin olmasına rağmen, gıdalarda güvenli bir şekilde ve yaygın olarak daha çok laktik asit bakterilerinden elde edilen nisin kullanılmaktadır (Chen ve Hoover, 2003).

Klaenhammer (1988), laktik asit bakterilerinin ürettikleri bakteriyosinleri; moleküler ağırlıkları, ısı duyarlılıkları, enzimatik duyarlılıkları, translasyon sonrası modifiye edilen aminoasitlerinin olup olmayışı ve etki mekanizmalarını esas alarak 4 sınıfa ayırmıştır:

Sınıf I bakteriyosinler (lantibiyotikler), ender bulunan aminoasitleri (lantiyonin ve türevleri) içeren peptidler;

Sınıf II bakteriyosinler, düşük molekül ağırlığına sahip (<10 kDa), ısıya dayanıklı, lantiyonin içermeyen membran aktif peptidler;

Sınıf III bakteriyosinler, yüksek molekül ağırlığına sahip (>30 kDa), ısıya hassas proteinler;

Sınıf IV bakteriyosinler, proteine ilaveten zorunlu (essential) lipid veya karbonhidrat grupları içeren kompleks bakteriyosinler.

L. lactis'in çeşitli suşları tarafından üretilen ve lantibiyotikler olarak adlandırılan Sınıf I bakteriyosinler grubuna ait olan nisin, gıdaların korunması amacıyla ticari olarak kullanılmaktadır (Nes ve ark., 1996). Nisin ile yapılan ilk araştırmalar, nisinin veterinerlik ve klinik alanlarda tedavi amacıyla kullanılması ile ilgilidir. Ancak, antibakteriyel spektrumunun dar olması, vücut sıvılarındaki çözünürlüğünün düşük olması, sindirim proteazları tarafından inaktive edilmesi ve fizyolojik pH'da (pH 7.0-7.5) stabil olmaması gibi nedenlerle tedavi amacıyla kullanılmasının uygun olmadığı düşünülmüştür (Delves-Broughton, 1990b).

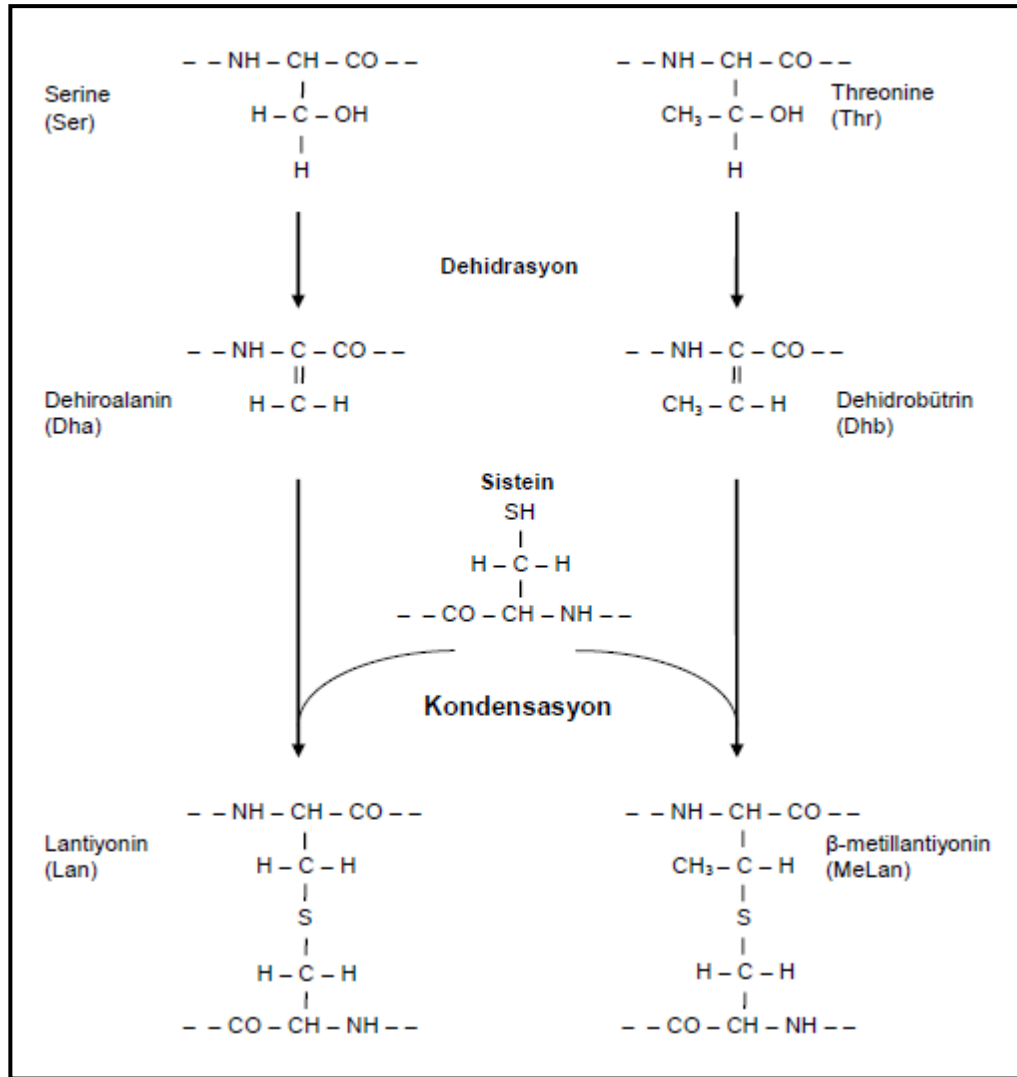
Nisin çok geniş bir yelpazede gram pozitif bakterilere, özellikle de çok önemli bir gıda patojeni olan *Listeria monocytogenes* ve *Listeria*'nın diğer bazı türlerine karşı oldukça etkilidir. Ayrıca, *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinin sporlarına karşı antimikrobiyal etkiye sahiptir (Koponen, 2004). Bu karakteristikleri nedeniyle nisin, yüksek sıcaklıktan etkilenen ya da ısıtılma işlemi uygulanmayan asidik gıdalarda, patojen ya da gıda bozulması etmeni birçok bakterinin vejetatif (*Listeria* ve laktik asit bakterilerinin kontamine üyeleri gibi) ve spor formlarının (*Clostridium* ve *Bacillus* sporları gibi) inhibisyonu amacı ile kullanılmaktadır (Hurst, 1981).

İlk olarak 1933 yılında Yeni Zelanda'da protein yapısında yeni bir madde tanımlanmış ve 1947 yılında bu madde nisin olarak isimlendirilmiştir. 1953 yılında ticari olarak İngiltere'de satışa sunulmuş olan bu lantibiyotik günümüzde Avrupa ülkeleri, Çin ve Amerika başta olmak üzere 50'den fazla ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır. 1969 yılında, Gıda ve Tarım Organizasyonu/Dünya Sağlık Organizasyonu (FAO/WHO) gıda katkıları uzman kurulu tarafından, nisinin gıdalarda kullanımının güvenli olduğu onaylanmıştır. Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) tarafından gıda katkı maddesi olarak onaylanmış tek bakteriyosindir (Jack ve ark., 1995; Hampikyan ve Çolak, 2007). Yapılan çalışmalarda nisinin toksik etkisinin sofra tuzu ile eşdeğer düzeyde (LD_{50} 7 g kg^{-1} vücut ağırlığı) olduğu bildirilmiştir (Hurst 1981). 1983 yılında Avrupa gıda katkı maddeleri listesinde E234 olarak numaralandırılmıştır (EEC, 1983). 1988'de Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından "GRAS" (Generally Recognized As Safe - Genel Olarak Güvenli Kabul Edilebilir Ürün) statüsünde kabul edilen nisinin peynir üretiminde kullanımına izin verilmiştir (Cotter ve ark., 2005). Sonraki yıllarda nisin, peynir üretimi ile sınırlı kalmayıp süt ve diğer süt ürünleri, konserve gıdalar, sıvı yumurta, pastane mamülleri,

sebze, et, kanatlı ve deniz ürünleri gibi çeşitli gıdalarda, ayrıca şarap ve bira sanayinde koruyucu olarak kullanılmaya başlanmıştır (Hampikyan ve Çolak, 2007; Koca, 2009; Wessels ve ark., 1998).

1.1.1. Nisinin Yapısal Özellikleri

Olgun nisin molekülü, nisin öncül peptidindeki sıradan aminoasitlerin (serin, treonin ve sistein) post-translasyonel modifikasyonu ile oluşmaktadır. Post-translasyonel modifikasyonda; nisin öncül peptidindeki 57 aminoasit rezidüsünden, N-terminal lider peptidi oluşturan 23 tanesi NisP tarafından çıkartılır. Ayrıca, serin ve treonin rezidüleri NisB tarafından dehidrasyona uğratılarak, sırasıyla dehidroalanin ve dehidrobütirine dönüştürülürler. Daha sonra, dehidrasyona uğramış bu rezidüler, NisC vasıtasıyla üst taraflarında bulunan sisteinlerle eşleşirler ve bu yolla karakteristik lantionin ve β -metil lantionin halkalarını meydana getiren tiyoeter bağlarını oluştururlar (Kleerebezem ve Quadri, 2001) (Şekil 1.1).

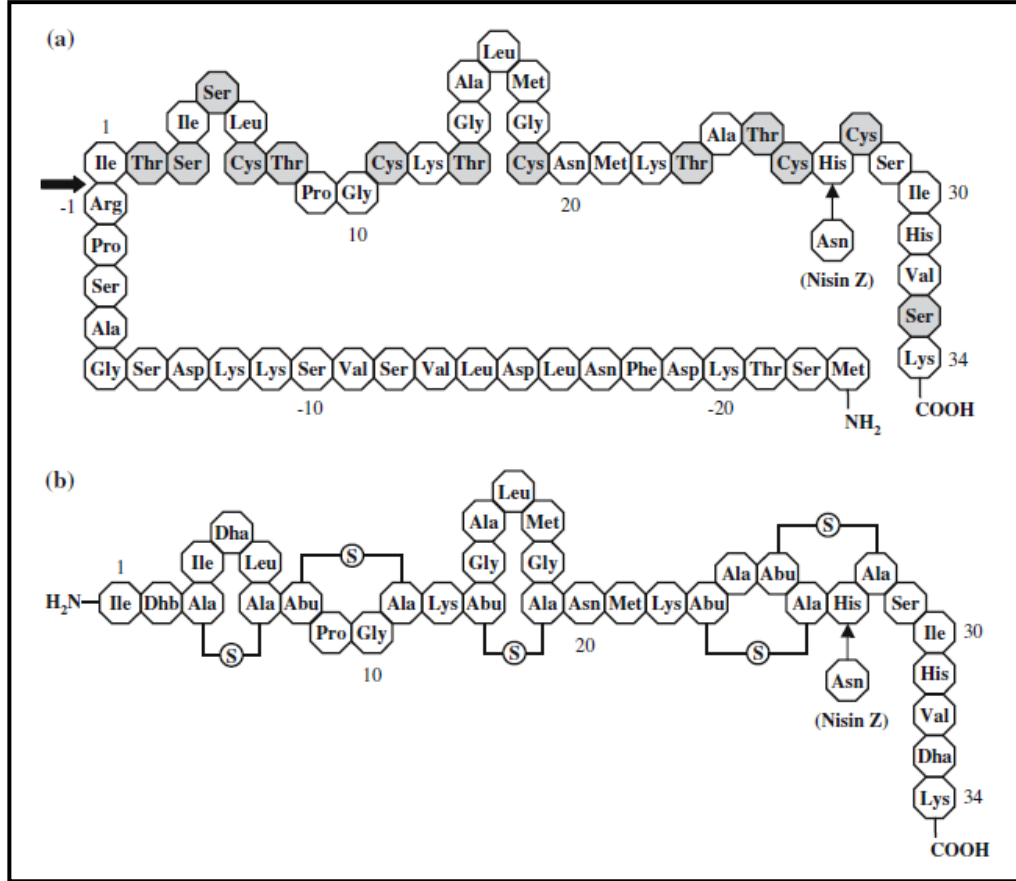


Şekil 1.1. Doğada nadir bulunan dehidroalanin, dehidrobütirin, lantiyonin ve β -metil lantiyonin aminoasitlerinin sentez mekanizması (Şimşek, 2009).

Molekül formülü $\text{C}_{143}\text{H}_{230}\text{N}_{42}\text{O}_{37}\text{S}_7$ ve molekül ağırlığı 3354.25 Da olan olgun nisin molekülü, bir lantiyonin ve dört β -metil lantiyonin halkası ve ayrıca dehidroalanin, dehidrobütirin gibi ender bulunan aminoasitleri içeren 34 aminoasitten meydana gelmiştir (Şekil 1.2). Lantibiyotik terimi içerdiği bu aminoasitlerden dolayı türetilmiştir (Cheigh ve Pyun, 2005).

Nisinin, Nisin A ve Nisin Z olmak üzere iki doğal varyantı tanımlanmıştır (Mulders ve ark., 1991). Bu iki varyant benzer yapıya ve antimikrobiyal spektruma sahiptir ancak 27. pozisyonundaki tek bir aminoasit rezidüleri farklıdır. Nisin A'da bu aminoasit histidin iken, Nisin Z'de ise asparajindir (Şekil 1.2). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda nisin molekülünün Nisin Q (Zendo ve ark., 2003), Nisin U

(Wirawan ve ark., 2006) ve Nisin F (Kwaadsteniet ve ark., 2008) gibi farklı varyantları tanımlanmış olmakla beraber, Nisin A ve Nisin Z varyantları doğada en fazla bulunan nisin türevleridir.



Şekil 1.2. Nisin öncülünün (a) ve olgun nisinin (b) yapılarının şematik gösterimleri. NisB ve NisC tarafından modifiye edilecek rezidüler gri olarak gösterilmiştir. Siyah ok, NisP tarafından lider peptidin çıkartılmasını işaret etmektedir. Şekilde görülen yapı Nisin A'ya aittir, ancak, 27. pozisyondaki histidin rezidüsünün yerinde asparajin olduğunda Nisin Z oluşmaktadır. Dha dehidroalanini, Dhb dehidrobütirini, Ala-S-Ala lantionini ve Abu-S-Ala β-metil-lantionini ifade etmektedir (Jack ve ark., 1995; Nes ve ark., 1996; Cheigh ve Pyun, 2005).

1.1.2. Nisinin Antimikrobiyal Etki Şekli ve Stabilitesi

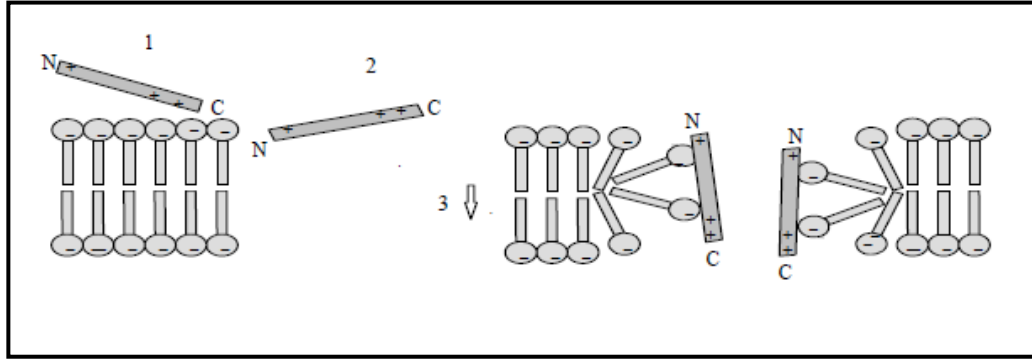
Nisin, duyarlı mikroorganizmaların vejetatif hücreleri üzerinde iki önemli etkiye sahiptir. Bunlardan birincisi, bakterilerin sitoplazmik membranı ile etkileşime girip membran yüzeyinde porlar oluşturarak hücre içerisindeki iyonların ve küçük moleküllerin hücre dışına sızmasına neden olmak; ikincisi ise, sitoplazmik membranlarda yer alan lipid II molekülünün peptidoglikan zinciriyle birleşmesini önleyerek hücre duvarı sentezini durdurmaktadır.

Nisin, bakterisidal etkisini, duyarlı hücrelerin membranlarını etkileyerek gösterir. Nisin molekülünün pozitif yüklü N- ve C-terminal uçları ile hücre membranında bulunan negatif yüklü fosfolipidlerin reaksiyona girmesiyle membranda porlar oluşarak membran fonksiyonları bozulur. Hücre içinde bulunan aminoasitler, ATP ve monovalent katyonlar oluşan bu porlardan hızlı bir şekilde dışarı çıkar, hücrelerin membran potansiyeli hızlı bir şekilde azalır ve hücre lipozomlarında pH değeri düşerek sonunda duyarlı hücredeki tüm biyokimyasal reaksiyonlar durur (Breukink ve ark., 1998).

Nisinin por oluşturma mekanizmasını açıklayabilmek için çeşitli modeller öne sürülmüştür. Bunlardan biri olan **barrel-stave model**e göre, başlangıçta nisin molekülleri lipid yüzeye bağlanırlar, sonrasında moleküller uygun membran potansiyeli varlığında membranın içerisine doğru hamle yaparlar. Membran içerisinde yerini alan nisin molekülleri merkezi bir por çevresinde küme oluştururlar, bu şekilde por oluşumu tamamlanmış olur. Olayların oluş sırası öncelikle nisin moleküllerinin membrana girişi, daha sonrasında diğer nisin moleküllerinin por çevresinde birikmesi şeklindedir (Benz ve ark., 1991; Sahl, 1991).

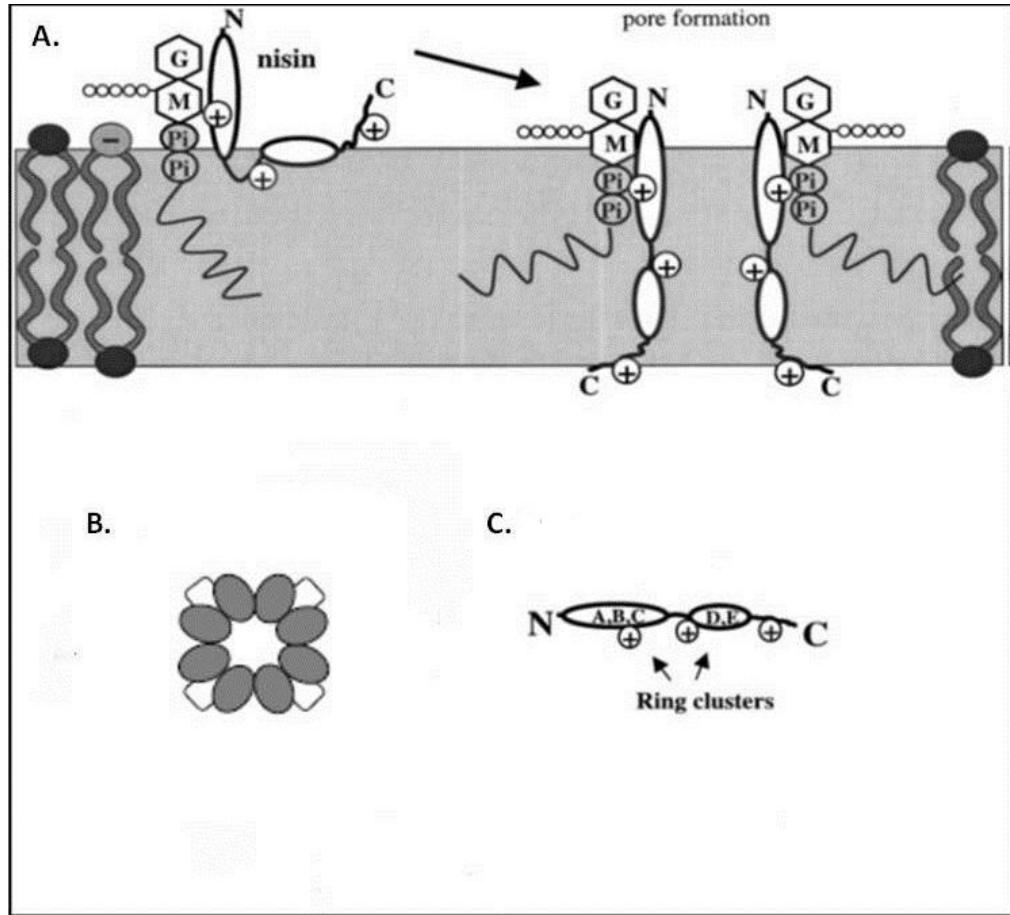
Wedge model olarak adlandırılan diğer bir modele göre ise nisin molekülleri bölgesel yüksek konsantrasyonları sayesinde membranın anyonik yüzeylerine sıkı bir şekilde bağlanırlar ve membranın lipid dinamiğini bozarlar. Uygun membran potansiyeli varlığında nisin molekülleri membrana girerler, bu giriş ile beraber lipid yüzeylerin anyonik fosfolipidleri nisin molekülüne doğru eğilerek kama (wedge) biçiminde spesifik olmayan bir por oluştururlar. Bu modelin önemli bir yönü, nisin

moleküllerinin, bakteri hücre membranındaki lipid katmanlarının konformasyonunu termodinamik olarak geçici şekilde bozması ve bu şekilde por oluşumunun sağlanmasıdır. Bu şekilde oluşan porlar doğaları gereği kararsızlardır çünkü lipidler katman yapılarını oluşturabilmek için tekrar düzenlenmeye çalışacaklardır (Driessen ve ark., 1995) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Nisin molekülü tarafından por oluşumu için önerilen Wedge modeli. **1.** Nisin molekülünün membrana bağlanması. Nisinin C-terminal ucundaki pozitif yükler, membranda yer alan fosfolipidlerin negatif yükleri ile elektrostatik olarak etkileşime girer. **2.** Nisinin membrana girişi. Nisin membran yüzeyine paralel bir duruma geçer, N-terminal ucu C-terminale göre biraz daha derine girmiştir. **3.** Nisinin anyonik fosfolipidlerle etkileşime girmesi sonucu lipid yüzeylerin eğilmesi ile kama (wedge) benzeri, spesifik olmayan por oluşur. Oluşan porun ömrü milisaniyelerle ifade edilecek kadar kısadır. Nisin hızlı bir şekilde membran yüzeyine paralel duruma geri döner (Driessen ve ark., 1995).

Nisinin bir diğer por oluşturma mekanizması ise lipozomal membranların fosfolipid kompozisyonuna bağlıdır. Son çalışmalar ışığında nisinin, fosfolipid komponentlerinden, hücre duvarı sentezinde öncül bir molekül olan lipid II molekülüne bağlanarak etkisini gösterdiği belirlenmiştir. İlk olarak nisin molekülünün N-terminal ucu, Şekil 1.4.'te de görüldüğü gibi lipid II molekülünün membranın hücre dışına yakın kısmında yer alan karbonhidrat içerikli kısmına bağlanır. Daha sonra nisinin C-terminal ucu membranın karşı tarafına ulaşmaya kadar ilerler. Böylece nisin-lipid II kompleksi poru oluşturur (Wiedemann ve ark., 2001).



Şekil 1.4. Nisin molekülü tarafından por oluşumu için önerilen Lipid II modeli. **A.** Nisin N-terminal ucu aracılığıyla lipid II molekülünün membranın hücre dışına yakın kısmında yer alan karbonhidrat içerikli kısmına bağlanmaktadır. Daha sonra nisin C-terminal ucu membranın karşı tarafına ulaşmaya kadar ilerler; böylece nisin-lipid II kompleksi poru oluşturur. Porun kararlılığı milisaniyelerden birkaç dakikaya kadar değişebilir. **B.** Nisin-lipit II kompleksinin üstten görünümü. **C.** Nisinin fonksiyonel açıdan önemli kısımları: N- uç köprüleri ABC, C- uç köprüleri DE ve aralarında bulunan esnek menteşe bölgesi. G: N-asetilglukozamin, M: N-asetilmuramik asit (Wiedemann ve ark., 2001).

Nisin, diğer gıda koruyucularından farklı olarak, sporların çimlenmesi aşamasında etkili olmaktadır. Sözü geçen etki bakterisidal etkiden çok bakteriyostatiktir. Nisin molekülünün yapısında bulunan dehidroalanin ve dehidrobütirin aminoasitleri, çimlenen sporların membranlarındaki proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanmakta ve bu şekilde sporların çimlenmesi engellenmektedir (Delves-Broughton ve Gasson, 1994).

Lantiyonin ve β -metil lantiyonin gibi ender rastlanan aminoasitlerin nisin molekülündeki fonksiyonları henüz açıklık kazanmamakla birlikte, bu aminoasitlerin nisinin bir takım yapısal özelliklerinde, örneğin düşük pH'da otoklavlandıktan sonra

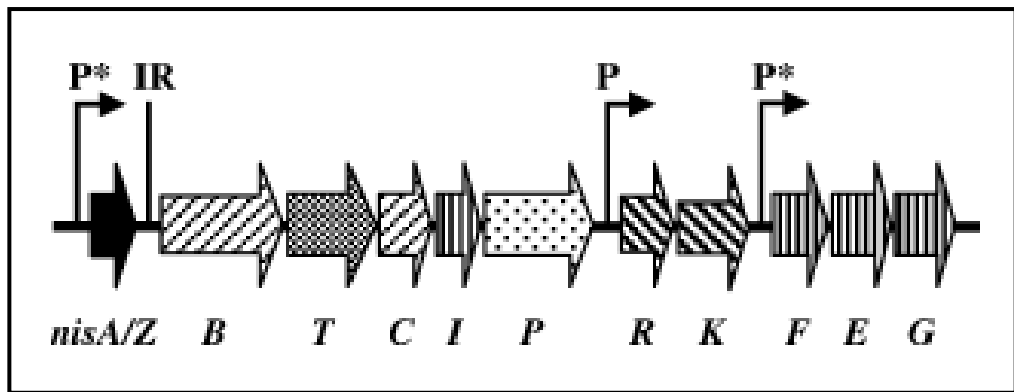
stabilitesini kaybetmemesinde etkili olabilecekleri öngörülmektedir (Hansen, 1994). Nisinin farklı pH'lardaki tampon çözeltilerde otoklavlanması sonrasındaki aktivitesini belirlemek için yapılan bir çalışmada, nisinin pH değeri 3 olan tampon çözeltide 121 °C'ta 15 dakika otoklavlanması sonucu aktivitesinin tamamını, pH değeri 5 olan tampon çözeltide aktivitesinin % 35'ini, pH değeri 7 olan tampon çözeltide ise aktivitesinin % 5'ini koruduğu tespit edilmiştir (Delves-Broughton, 1990a). Yapılan başka bir çalışmada, nisinin pH değeri 2 olan tampon çözeltide 115 °C'ta 20 dakika otoklavlanmasının, aktivitesinde herhangi bir kayba sebep olmadığı saptanmıştır (Piard ve ark., 1990). Bu konuda yapılan diğer çalışmalar, gıdalara ısıtıl işlem uygulanması sonucu yaşanabilecek nisin aktivesi kaybının, nisinin tampon çözeltilerde ısıtıl işlem görmesi sonucu yaşanan kayba göre daha az olduğunu göstermiştir (Delves-Broughton, 1990b). Bu sonuçlar nisinin gıdalarda kullanımının uygunluğunu destekleyici niteliktedir.

Nisin molekülünün asidik karakterde olması, düşük pH'da stabilitesinin ve çözünürlüğünün yüksek olmasına sebep olmaktadır. Yapılan bir çalışmada (Liu ve Hansen, 1990), nisinin düşük pH'da çözünürlüğünün oldukça yüksek olmasına rağmen (25 °C'ta pH 2'deki çözünürlük: 57 mg/ml), pH yükseldikçe molekülün çözünürlüğünün hızlı bir şekilde azaldığı (25 °C'ta pH 8–12'deki çözünürlük: 0.25 mg/ml) gösterilmiştir.

Nisin aktivitesi üzerine pH'nın yanı sıra değişik proteolitik enzimlerin etkisi de farklı çalışmalarda incelenmiştir. Bu çalışmalara göre nisin molekülünün aktivitesini etkilemeyen enzimler arasında pepsin, tripsin, proteinaz K enzimleri sayılabilir. Nisin molekülünün α -kimotripsin uygulamasına ise duyarlı olduğu gösterilmiştir (Klaenhammer, 1988; Piard ve ark., 1990; Kojic ve ark., 1991; Uhlman ve ark., 1992; Zezza ve ark., 1993).

1.1.3. Nisin Biyosentezinden Sorumlu Gen Kümesi

L. lactis'in belirli suşları tarafından gerçekleştirilen nisin biyosentezinden, 11 genden oluşan bir gen kümesi sorumludur (Şekil 1.5). Bu regülon *nisA(Z)BTCIPRK* ve *nisFEG* olmak üzere, nisin tarafından uyarılabilen iki operon içermektedir. Ayrıca regülonda *nisRK* genleri önünde sürekli çalışan bir promotor yer almaktadır (Şekil 1.5). Bu gen kümesinde yer alan genler, konjugatif nisin–sükroz transpozonunda yer alırlar (Kuipers ve ark., 1993).



Şekil 1.5. Nisin biyosentezinden sorumlu olan gen kümesinin organizasyonu. Şekilde verilen genlerin kodladığı ürünlerin fonksiyonları şöyle sıralanabilir: *nisA/Z*, nisin öncül peptidi; *nisB* and *nisC*, post-translasyonel modifikasyon; *nisT*, translokasyon; *nisP*, proteaz; *nisR* and *nisK*, nisin biyosentezinin düzenlenmesi; *nisI* ve *nisFEG*, bağışıklık. Düzenlenebilen promotorlar P* ile, konstitütif promotorlar ise P ile gösterilmiştir. IR ise geniş bir ters tekrar dizisini ifade etmektedir (Cheigh ve Pyun, 2005).

1.1.3.1. Biyosentez genleri

Nisin biyosentezinden sorumlu genler arasında yer alan *nisA(Z)* geni, 57 aminoasit rezidüsünden oluşan *nisA(Z)* öncül peptidini kodlar. Bu aminoasitlerden 23 tanesi, nisin öncülünün modifikasyonunda rol oynayan N-terminal lider peptidi oluştururlar (Kleerebezem ve Quadri, 2001).

nisB ve *nisC* genleri ise hücre içi post-translasyonel modifikasyonda görev alan membran ile ilişkili proteinleri kodlarlar. Post-translasyonel modifikasyonda serin ve treonin rezidüleri dehidroalanin ve dehidrobütirin oluşturmak üzere dehidrasyona uğrarlar. Daha sonra, dehidrasyona uğramış rezidüler üst taraflarında

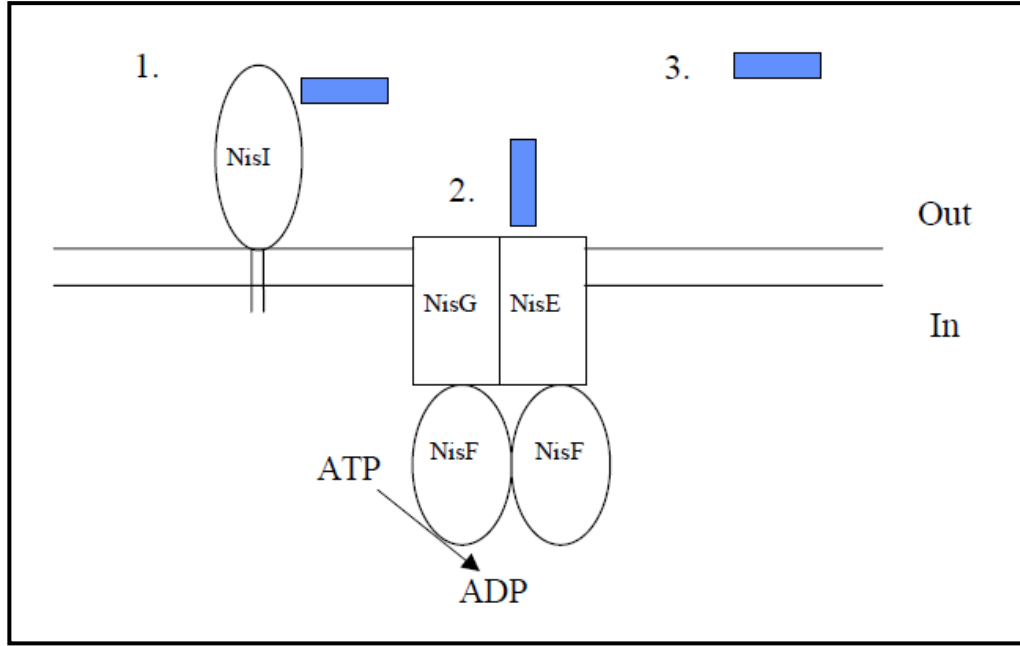
bulunan sisteinlerle eşleşirler ve bu yolla karakteristik (β -metil) lantionin halkalarını meydana getiren tiyoeter bağlarını oluştururlar (Kuipers ve ark., 1993).

nisT geni, ABC taşıyıcı ailesine ait olduğu düşünülen pütatif bir taşıyıcı protein kodlamaktadır. Bu protein, modifiye olmuş nisin öncülünün sitoplazmik membran boyunca taşınmasında görev alır (Qiao ve Saris, 1996).

nisP geni, hücre dışı proteolitik aktivasyondan sorumlu olan bir proteaz kodlar. Nisin öncülünün membran boyunca taşınması esnasında veya taşınmanın hemen sonrasında lider peptid, hücre dışı olgun nisin peptidini oluşturmak için NisP proteaz tarafından çıkartılır (van der Meer ve ark., 1993).

1.1.3.2. Dirençlilik genleri

Nisin üretici hücrelerin nisine karşı bağışıklığının sağlanmasında *nisI* ve *nisFEG* genleri birlikte rol oynarlar. *nisI* geni nisin üretici bakterinin nisine karşı kendisini korumasında görev alan bir lipoprotein kodlarken (Kuipers ve ark., 1993), *nisFEG* genleri ise üretilen nisinin hücre dışına atılmasından sorumlu olan pütatif bir ABC taşıyıcı protein kodlarlar (Siegers ve Entian, 1995) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Nisin direncinin mekanizması. **1.** Hücre dışında bulunan nisin molekülü, lipoprotein NisI'ya bağlanır. **2-3.** Bu bağlanma, sonraki nisin moleküllerinin ABC taşıyıcı kompleksi nisFEG tarafından hücreden dışarı atılmalarını uyarır (Koponen, 2004).

1.1.3.3. Regülasyon genleri

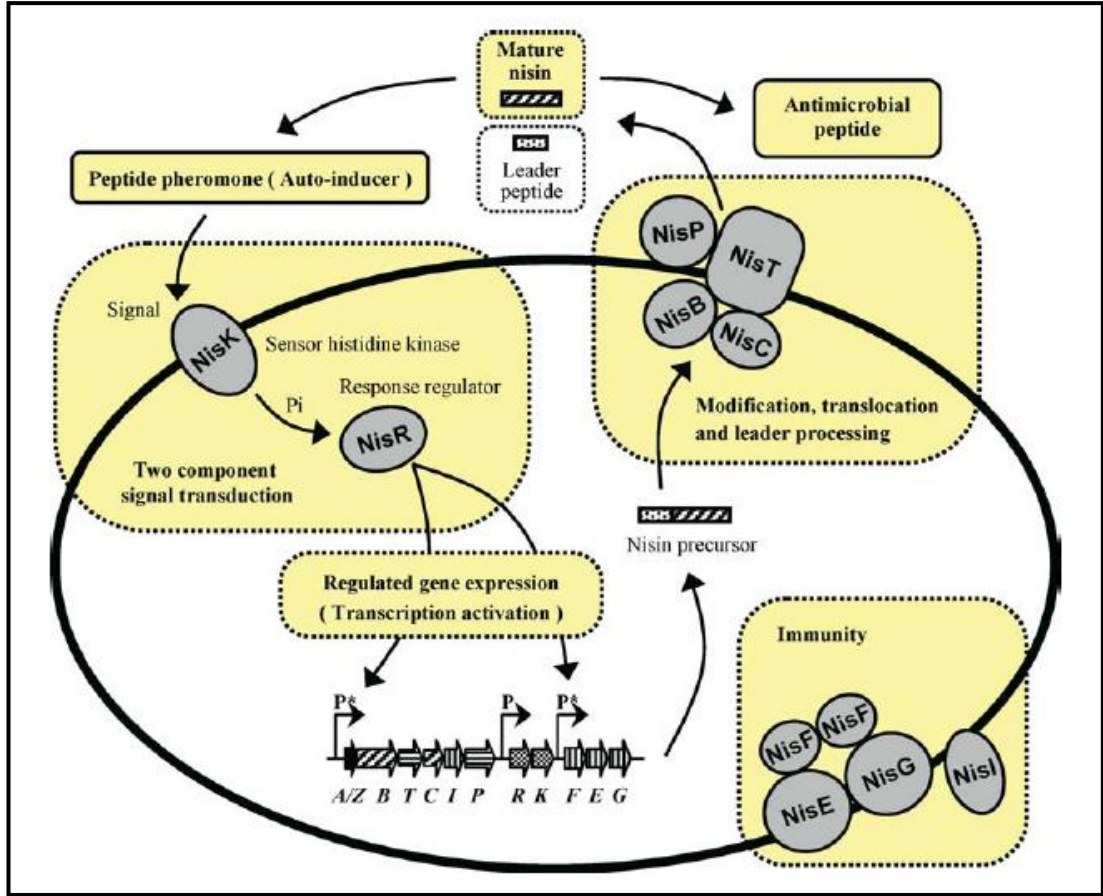
nisR ve *nisK* genleri, iki bileşenli düzenleyici sistemler sınıfına ait olan sırasıyla bir cevap düzenleyici (van der Meer ve ark., 1993) ve bir sensör kinaz (Siegers ve Entian, 1995) kodlarlar.

1.1.4. Nisin Biyosentezi

Nisin biyosentezinde ribozomlarda sentezlenen inaktif öncü peptid, iki ana yapıyı içermektedir. Bunlardan birincisi sentezlenen molekülü inaktif halde tutan lider peptid (23 aminoasit) ve ikincisi de biyolojik aktif nisin öncüsü olan propeptiddir (34 aminoasit). Translasyon sonrasında lider peptid, üretilen molekülün sitoplazmik membranda bulunan modifikasyon mekanizmasına yönlendirilmesini sağlamaktadır. Öncelikle NisB proteini, serin ve treonini; sırasıyla dehidroalanin (Dha) ve dehidrobütirin (Dhb) aminoasitlerine dönüştürmek için dehidre eder. Sonrasında, NisC vasıtasıyla komşu sistein kalıntılarının tiyol grupları ve dehidro-aminoasitlerin çift bağları reaksiyona girerek tiyoeter köprülerini oluştururlar. Nisin

molekölü ABC taşıma proteini NisT vasıtasıyla hücre dışına taşınır. Nisin molekülünden lider peptidin proteolitik ayrılması serin proteaz NisP tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.8) (Cheigh ve Pyun, 2005; Kleerebezem and Quadri 2001).

Nisin üretimi, yeterli sayı algılama (quorum sensing) sistemi ile düzenlenmektedir. Sistemde bir indükleyici peptid feromon (nisin) ve iki elemanlı (NisRK) regülatörler görev almaktadır. Bu sistemin işleyişinde öncelikle hücre dışındaki olgun nisin, NisK'ya (histidin kinaz) bağlanır. Nisin ve NisK'nın etkileşimi sonucunda oluşan hücre dışı sinyale yanıt olarak, NisK hücre içinde bulunan bir histidin kalıntısını otofosforilize eder. Sonrasında bu fosforil grup, transkripsiyonel aktivatör olan hücre içi NisR'nin bir aspartik asit kalıntısına aktarılır. Bu durum yanıt regülatöründe (NisR) konformasyonel bir değişikliği uyarır. Aktive edilen yanıt regülatörü NisR, nisA(Z) ve nisF indüklenebilen promotorlarının alt akış yönünde bulunan genlerin transkripsiyonunu yönetir (Şekil 1.7) (Cheigh ve Pyun, 2005; Kleerebezem ve Quadri 2001).



Şekil 1.7. *L. lactis*'te nisin biyosentezinin ve bu biyosentezin düzenlenmesinin şematik gösterimi (Cheigh ve Pyun, 2005).

1.1.5. Nisin Üretiminin Arttırılması

Nisin üretim seviyesi ve miktarı; besin kompozisyonu, pH, sıcaklık gibi faktörlere bağlı olduğu kadar, üretici hücrenin doğası ile de ilişkilidir. Nitekim farklı üretici suşlarda, farklı sınır üretim oranları tespit edilmiştir (Kim ve ark., 1998). Bu nedenle yüksek nisin üretme yeteneğine sahip suş taramaları uzun süreden beri uygulanmakta ve günümüzde de devam etmektedir. Çevresel faktörlerin optimizasyonu ve çeşitli model sistemlerin geliştirilmesi suretiyle arttırılmaya çalışılan nisin üretimi, aynı zamanda moleküler boyutta yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir. Nisin biyosentezinden sorumlu genlerin belirlenmesi ve genetik davranışlarının aydınlatılması, bu yöndeki çalışmalara hız kazandırmıştır.

Endüstriyel nisin üretimine yönelik suş geliştirme çalışmaları, moleküler düzeyde ilk kez konjugasyon uygulamaları ile yürütülmüştür. Konjugasyon çalışmalarında alıcı ve verici suşlar karşılaştırılmış ve nisin üretim yeteneği kazanmış transkonjugantlar elde edilmiştir. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda, transkonjugantlar için verici suşta elde edilen nisin üretim düzeyi geçilememiştir. Ayrıca transkonjugantlarda nisin fenotipinin stabil olmadığı da tespit edilmiştir (Şimşek ve ark., 2007).

Nisin üretiminde kullanılan hücrelerin, doğal nisin dirençlilik genlerinin (*nisI*, *nisF*, *nisE* ve *nisG*) yüksek düzeyde ifadesinin sağlanması, bu bakteriyosinin üretimi üzerine olumlu etki yapmaktadır. Çünkü, üretici hücrelerin dirençlilik gösterebildiği bir sınır nisin değeri bulunmaktadır. Nitekim *nisI* genlerinin vektör bir plazmid aracılığı ile üretici doğal suşa aktarılması ve bu genlerin ifadesinin sağlanması sonucunda, nisin üretim miktarında % 20'lik bir artışın söz konusu olduğu belirlenmiştir (Kim ve ark., 1998).

L. lactis subsp. *lactis* A164 suşunda nisin Z üretimi; *nisZ*, *nisR*, *nisK* ve *nisF*, *nisE*, *nisG* genlerinin çoklu kopyaları klonlanarak arttırılmaya çalışılmıştır. *nisZ* geninin klonlandığı hücrelerde gelişim sorunları meydana gelmiş ve bu durum nisin Z ön peptidinin ana suş üzerinde toksik etki oluşturduğu şeklinde yorumlanmıştır. Buna karşın kontrol suşta 16.000 AU/ml olan nisin aktivitesi; *nisR* ve *nisK* ve *nisF*, *nisE*, *nisG* genlerinin klonmasıyla 25.000 AU/ml değerine ulaşmıştır. Ayrıca Northern blot analizleri, *nisR* ve *nisK* genlerinin yüksek düzeyde ifadelerinin *nisZ* geninin transkripsiyonunu teşvik ettiğini göstermiştir (Cheigh ve ark., 2005).

2009 yılında Wu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, nisin üreticisi olan *L. lactis* N8 suşunda rastgele mutasyonlar gerçekleştirebilmek için Mu transpozisyon kompleksleri kullanılmıştır. Bu kompleksler kullanılarak yaklaşık 2000 ekleme (insertion) mutantından oluşan bir kütüphane oluşturulmuş ve bu mutantlar nisin üretimindeki farklılıklar açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucu, elde edilen mutantlardan 3 tanesinde nisin üretiminde azalış gözlenmiştir. Bu mutantlarda nisin üretimini etkileyen genlerin *nisB*, *fhuR* ve *rpiA* genleri olduğu tespit edilmiştir.

FhuR, *L. lactis*'te kükürt metabolizmasının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır (Sperandio ve ark., 2005). Bu protein, *L. lactis*'te kükürt alımı ile ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyonel düzenleyici olarak görev yapar. Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2009), *fhuR* geninin inaktivasyonunun, yapısında kükürt molekülü bulunan sistein aminoasidinin hücresel seviyesinin düşmesine neden olduğu, bu durumun da öncül metaboliti sistein aminoasidi olan nisin biyosentezini sekteye uğrattığı öngörülmektedir.

RpiA (Ribose Phosphate Isomerase A – Riboz Fosfat İzomeraz A) ise pentoz fosfat yolağında görev alan anahtar enzimlerden bir tanesidir (Jensen ve Maigaard, 1993). Fonksiyonel RpiA'dan yoksun mutantlarda yavaş gelişme gözlenmektedir (Wu ve ark., 2009). Gelişme ve nisin üretimi eş zamanlı gerçekleştiğinden, mutant suşların düşük metabolik etkinliklerinin nisin üretim seviyelerinde düşmeye neden olduğu düşünülmektedir.

1.2. *fhuR* geni

Kükürt (S); sistein, metiyonin, tiamin, biyotin, lipoik asit, koenzim A gibi hücre için vazgeçilmez olan bir çok bileşiğin yapı taşlarından biridir. Bu bileşikler arasında sistein aminoasidi merkezi bir role sahiptir çünkü mikroorganizmalarda sisteinin *de novo* sentezi, kükürt alımı için ana yolak durumundadır. Bu sebepten ötürü sistein, kükürt içeren bileşiklerin yapımı için gereken başlıca metabolittir. Sistein ayrıca sitokromlar gibi demir-kükürt kümeleri içeren evrensel proteinlerin katalitik bölümlerinin esansiyel aminoasididir. Bunun dışında sistein; proteinlerin katlanmalarında, düzenlenmelerinde ve disülfid bağlarının oluşumu yoluyla karalılıklarının sağlanmasında merkezi bir rol oynamaktadır. Ek olarak sisteinden türeyen glutatyon gibi enzimler, oksidatif strese korunmada yine büyük role sahip enzimlerdendir. Kükürt içeren aminoasitlerden ikincisi olan metiyonin ise translasyon başlangıcının kontrolünde ve çeşitli metiltransferaz reaksiyonlarında anahtar molekül konumundadır (Sperandio ve ark., 2005).

gösterilmesi, bu molekülün FhuR'nin aktivitesini arttırabileceğini vurgulamaktadır. SAM: S-adenozilmetiyonin; SAH: S-adenozilhomosistein; SRH: S-ribozilhomosistein; AI-2: otoindükleyici 2 (Sperandio ve ark., 2005).

1.3. TEZ ÇALIŞMASININ AMACI

Gıdaların korunmasında, bakteriyosinlerin kullanımını kısıtlayan temel sorun bu bileşiklerin üretici suşlar tarafından düşük verimde üretiliyor olmasıdır. Bu nedenle koruyucu olarak kullanılacak bakteriyosinlerin üretim ve saflaştırma maliyetleri oldukça yüksek olmaktadır. Nisinin yüksek ticari potansiyeli, üretimin arttırılması yönündeki çalışmalara hız kazandırmıştır. Bu çalışmalar; üretici suşun (*L. lactis*) farklı fermentasyon koşullarındaki davranışı ve nisin üretiminden sorumlu genetik özellikleri esas alınarak verimli fermentasyon sistemlerinin tasarlanmasını ve bu sayede yüksek verimli üretici suşların geliştirilmesini hedeflemektedir.

Bu tez çalışmasında, *L. lactis*'in nisin üretimini etkileyebilecek faktörlerin araştırılması ve nisin üretim verimini arttırmak amacıyla optimizasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Bunun yanında, yokluğunda nisin üretiminin tamamen durduğu FhuR transkripsiyonel aktivatörünü kodlayan genin (*fhuR*) çoklu kopyalarının nisin biyosentezine etkisinin belirlenmesi de hedefler arasındadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

CaCl₂ (Merck), Tris (Merck), SDS (Merck), Triton X-100 (Sigma Aldrich), EDTA (Merck), Pepton (Merck), MgCl₂.6H₂O (Merck), Agaroz (Sigma Aldrich), Etidyum bromid (Sigma Aldrich), Agar (Merck), NaOH (Merck), Sükröz (Merck), % 87 Gliserol (Riedel de Haen), D-(+)-Glukoz (Merck), PIPES (Fluka), NaCl (Sigma-Aldrich), MgSO₄.7H₂O (Fluka), Fenol (Riedel de Haen), Kloroform (Riedel de Haen), İzöamil alkol (Merck), 2-propanol (Merck), Asetik asit (Riedel de Haen), % 99.5 Etanol (Riedel de Haen), HCl (Riedel de Haen), CTAB (Merck), KOAc (Merck), MnCl₂.4H₂O (Merck), KCl (Riedel de Haen), MOPS (Sigma-Aldrich), Maya Özü (Alfa Aesar), Et Özü (Merck), Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich), Tween 20 (Merck), M17 (Merck), Nutrient Broth (Merck), TSB (Merck), Jelatin (Merck), Glisin (Merck), Nisaplin (Sigma-Aldrich), D(-)-Fruktoz (Riedel de Haen), D(-)-Arabinoz (Fluka), D-(+)-Galaktoz (Fluka), D(+)-Ksiloz (Fluka), D(+)-Mannoz (Fluka), D-(+)-Sellobiyoz (Fluka), Nişasta (Fluka), Melas, PAS, K₂HPO₄ (Merck), KH₂PO₄ (Riedel de Haen), LiAc (Sigma-Aldrich), DTT (Fischer), D(+)-Trehaloz (Fluka), L-Treonin (Sigma-Aldrich).

2.1.2. Kullanılan Enzimler

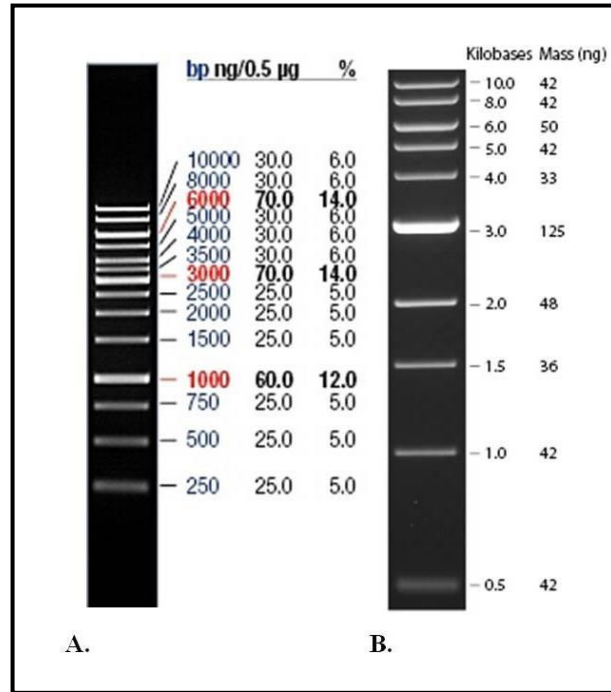
Phusion DNA Polimeraz (Fynnzymes), *EcoRI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *PstI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *XbaI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *HindIII* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *SacI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *SalI* Restriksiyon Endonükleaz (Jena Bioscience), T4 DNA ligaz (Jena Bioscience), Klenow Fragment (Calbiochem), Ribonükleaz A (Fermantas), Lizozim (Sigma).

Enzim reaksiyonları üretici firmaların önerdiği tamponlarla gerçekleştirilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Kitler ve DNA Moleküler Belirteçleri

Hem kimyasal yöntemle izole edilen plazmitlerin temizlenmesinde hem de DNA'nın jelden saflaştırılması işlemlerinde Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Health Care) kullanılmıştır.

Bu çalışmada Şekil 2.1'de gösterilen moleküler belirteçler kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Kullanılan Moleküler DNA Belirteçleri. **A.** 1 kb Moleküler DNA Belirteci (Fermentas, SM1334); **B.** 1 kb Moleküler DNA Belirteci (Biolabs, Quick-Load).

2.1.4. Kullanılan Bakteri Soyları ve Plazmitler

Bu çalışmada kullanılan bakteri soyları ve plazmitler sırasıyla Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

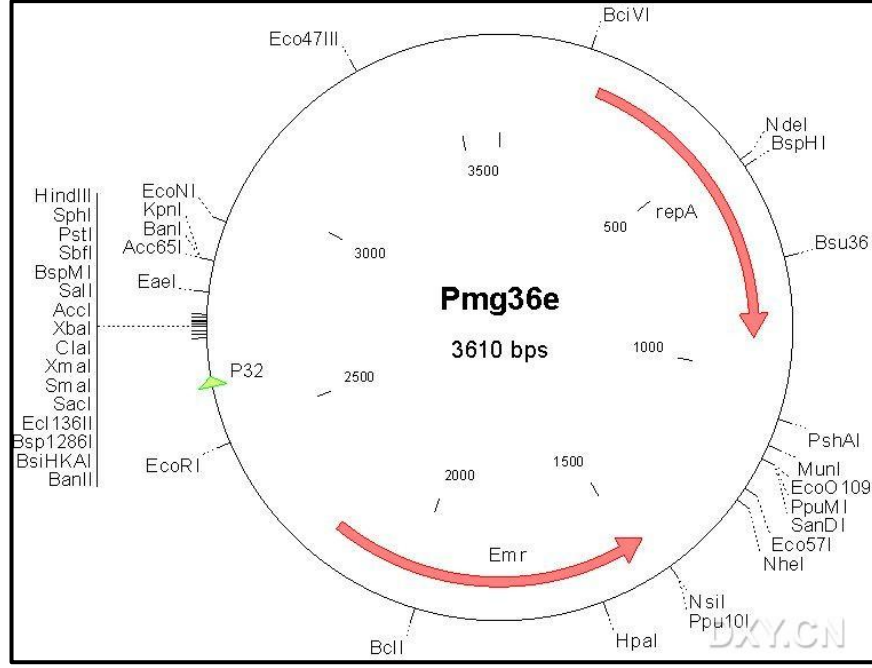
Tablo 2.1. Bu çalışmada kullanılan bakteri soylarının karakteristik özellikleri ve kaynakları.

Bakteri Soyları	Genotip	Kaynak
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>sup44</i> , <i>relA1</i> λ ⁻ , (σ 80dLacZAM15), D(<i>lacZYA</i> - <i>argF</i>)U169	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i>	MacNeil ve ark., 1992
<i>Lactococcus lactis</i> 11454	Yaban tip	ATCC
<i>Micrococcus luteus</i> 1123	Yaban tip	RSKK
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>var. israelensis</i> 35646	Yaban tip	ATCC
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Yaban tip	Hopwood ve ark., 1985
<i>E. coli</i> DH5 α /pMG36e	pMG36e plazmidini içermektedir.	Bu çalışma
<i>E. coli</i> DH5 α /pMG36e- Kn	pMG36e-Kn plazmidini içermektedir.	Bu çalışma
<i>E. coli</i> DH5 α /pMG36e- Kn- <i>fhuR</i>	pMG36e-Kn- <i>fhuR</i> plazmidini içermektedir.	Bu çalışma
<i>E. coli</i> ET12567/ pMG36e-Kn- <i>fhuR</i>	pMG36e-Kn- <i>fhuR</i> plazmidini içermektedir.	Bu çalışma

Tablo 2.2. Bu çalışmada kullanılan plazmidlerin karakteristik özellikleri ve kaynakları.

Plazmidler	Dirençlilik geni	Dirençlilik	Büyükölük	Kaynaklar
pMG36e	<i>emr</i>	Eritromisin	3610 bç	van de Guchte ve ark., 1989
pMG36e-Kn	<i>emr/kan</i>	Eritromisin/ Kanamisin	5107 bç	Bu çalışma
pMG36e-Kn- <i>fhuR</i>	<i>emr/kan</i>	Eritromisin/ Kanamisin	6084 bç	Bu çalışma
pSKdesAKn	<i>bla/kan</i>	Ampisilin/ Kanamisin	8700 bç	Tunca ve ark., 2007
pK18mob2	<i>kan</i>	Kanamisin	3035 bç	Tauch ve ark., 1998

pMG36e plazmiti (Şekil 2.2) üzerinde, eritromisin direnç geni (*emr*), P32 promotörü ve repA gen bölgesi bulunmaktadır.



Şekil 2.2. pMG36e vektörünün çoklu klonlama bölgesi ve genel özelliklerini gösteren haritası.

2.1.5. Kullanılan Çözeltiler

Tüm sterilizasyon işlemleri yüksek basınç altında 121 °C'ta 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

Tris–Asetat–EDTA (TAE) (50x)

- ✓ 242 g Tris Baz
- ✓ 57.1 ml Glasiyal Asetik Asit
- ✓ 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Tris–EDTA (TE) Tamponu

- ✓ 10 mM Tris–HCl (pH 8.0)
- ✓ 1mM EDTA (pH 8.0)

Solüsyon I

- ✓ 25 mM Tris (pH 8.0)
- ✓ 10 mM EDTA (pH 8.0)
- ✓ 50 mM Glukoz

Solüsyon II

- ✓ 0.2 N NaOH
- ✓ % 1 SDS

Solüsyon III

- ✓ % 60 5 M KOAc
- ✓ % 11.5 Glasiyal asetik asit

TfbI

- ✓ 30 mM KOAc
- ✓ 50 mM MnCl₂
- ✓ 100 mM KCl
- ✓ 10 mM CaCl₂
- ✓ % 15 gliserol

Tfb II

- ✓ 10 mM Na-MOPS (pH 7.0)
- ✓ 75 mM CaCl₂
- ✓ 10 mM KCl
- ✓ % 15 gliserol

STET Tamponu

- ✓ % 8 Sükroz
- ✓ % 5 Triton X-100
- ✓ 50 mM Tris-HCl pH 8.0
- ✓ 50 mM EDTA pH 8.0

24:1 Kloroform/İzoamilalkol Karışımı (1 L, v/v)

- ✓ 960 ml Kloroform
- ✓ 40 ml İzoamilalkol

25:24:1 Fenol/Kloroform/İzoamilalkol Karışımı (1 L, v/v/v)

- ✓ 500 ml Fenol
- ✓ 480 ml Kloroform
- ✓ 20 ml İzoamilalkol

CTAB/NaCl Solüsyonu

- ✓ % 10 CTAB
- ✓ 0.7 M NaCl

CaCl₂ Çözeltisi

- ✓ 60 mM CaCl₂
- ✓ % 15 Gliserol
- ✓ 10 mM PIPES

EDTA içeren elektroporasyon tamponu (pH 7.0)

- ✓ 0.5 M sükroz
- ✓ % 10 gliserol
- ✓ 0.05 M EDTA

EDTA içermeyen elektroporasyon tamponu (pH 7.0)

- ✓ 0.5 M süktroz
- ✓ % 10 gliserol

EPB (Elektroporasyon Tamponu)

- ✓ 0.5 M süktroz
- ✓ 1 mM MgCl₂
- ✓ 7 mM K₂HPO₄
- ✓ 7 mM KH₂PO₄

LiAc/DTT Çözeltisi (pH 7.5)

- ✓ 100 mM LiAc
- ✓ 10 mM DTT
- ✓ 0.6 M süktroz
- ✓ 10 mM Tris-HCl

2.1.6. Kullanılan Besiyerleri**Luria Bertani (LB) Besiyeri**

- ✓ 10 g NaCl
- ✓ 10 g tripton
- ✓ 5 g maya özütü

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

BLB Agar Besiyeri (pH 7.2)

- ✓ 10 g pepton
- ✓ 1 g maya özütü
- ✓ 5 g et özütü (beef powder=meat extract)
- ✓ 5 g NaCl
- ✓ 15 g agar

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

S1 Agar Besiyeri

- ✓ 8 g tripton
- ✓ 5 g maya özütü
- ✓ 5 g glukoz
- ✓ 5 g NaCl
- ✓ 2 g Na₂HPO₄
- ✓ % 1.5 Tween 20
- ✓ 16 g agar

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

M17 Besiyeri

- ✓ 42.5 g M17

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

SGM17 Besiyeri

- ✓ 42.5 g M17

dH₂O ile 980 ml'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

- ✓ 10 ml % 50 glukoz
- ✓ 10 ml % 50 sükroz

otoklav sonrası besiyerine eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.

SM17MC Besiyeri

- ✓ 42.5 g M17
- ✓ 0.5 M sükroz

otoklav sonrası eklenecek maddeler için gerekli hacim ayrılarak dH₂O ile çözülür ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

- ✓ 10 mM MgCl₂
- ✓ 10 mM CaCl₂

otoklav sonrası besiyerine eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.

Nutrient Broth Besiyeri

- ✓ 8 g Nutrient Broth

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

TSB (Tryptic Soy Broth) Besiyeri

- ✓ 30 g Tryptic Soy Broth

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

SR Agar Besiyeri (pH 6.8)

- ✓ 10 g tripton
- ✓ 5 g maya özütü
- ✓ 200 g sükroz
- ✓ 10 g glukoz
- ✓ 25 g jelatin
- ✓ 15 g agar

otoklav sonrası eklenecek maddeler için gerekli hacim ayrılarak dH₂O ile çözülür ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

- ✓ 2.5 mM MgCl₂
- ✓ 2.5 mM CaCl₂

otoklav sonrası besiyerine eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.

2.1.7. Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Bu çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları.

Antibiyotik	Stok konsantrasyon (mg/ml)	<i>E. coli</i>'de kullanılan konsantrasyonu (µg/ml)	<i>L. lactis</i>'te kullanılan konsantrasyonu (µg/ml)
Ampisilin (Amp)	100	100	-
Eritromisin* (Ert)	25	400	5
Kanamisin (Kn)	50	25	-
Kloramfenikol* (Chl)	50	50	-

* Çözücü: % 100 Etanol

2.1.8. Kullanılan Cihazlar

+4 °C Buzdolabı (Ariston), -20 °C Derin Dondurucu (Ariston), -80 °C Derin Dondurucu (Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Yatay Elektroforez Sistemi (BIO-RAD, Mini-Sab Cell CT), Güç Kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (Beckman Coulter, Microfuge 22R), Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Etüv (Binder, 9010-0078), İnkübatör (Heraeus, D-63450 Herau), Çalkalamalı İnkübatör (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Lourmart), Mikrodalga Fırın (Kumtel), Spektrofotometre (BIO-RAD), PCR (Applied Biosystems).

2.2. Yöntemler

2.2.1. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri

İzole edilen plazmit ve kromozomal DNA'ların restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonları, enzimlerin üretici firmalarının belirttiği konsantrasyonlar ve koşullarda, önerilen tamponlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazmit DNA'lar yaklaşık 2–5 saat süre ile kesilirken, kromozomal DNA'ların kesimleri gece boyunca devam etmiştir.

2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez yöntemi ile, nükleik asitlerin agaroz jelde büyüklüklerine bağlı olarak ayrılmaları sağlanmıştır. % 0.8 veya % 1' lik agaroz jeli, 1x TAE tamponu kullanılarak hazırlanmış ve son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr ilave edilmiştir. DNA yükleme tamponu ilave edilen örnekler agaroz jele yüklenerek, içinde yürütme tamponu olarak 1x TAE bulunan elektroforez tankında 80–120 Volt' ta yürütülmüşlerdir.

2.2.3. İzole Edilen DNA'nın Agaroz Jelden Geri Kazanılması

DNA fragmentlerinin agaroz jelden geri elde edilmesi protokolü, Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapılmıştır.

2.2.4. Ligasyon

Ligasyon reaksiyonlarında bulunması gereken vektör ve insört DNA konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{ng (insört)} = \frac{\text{ng (vektör)} \times \text{kb (insört)}}{\text{kb (vektör)}}$$

Genel olarak reaksiyonlarda vektör:insört oranı, 1:3, 1:5 ve 1:10 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ligasyon reaksiyonlarında 1U T4 Ligaz, 1x T4 Ligaz tamponu kullanılmıştır. Ligasyon için hazırlanan karışım, 16 °C'ta 1 gece boyunca inkübe edilmiştir.

2.2.5. *E. coli*' den Plazmit İzolasyonu

E. coli' den plazmit izolasyonu Sambrook ve arkadaşlarının (1989) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Uygun antibiyotik içeren 100 ml LB' de 37 °C' ta 220 rpm'de 12–16 saat büyütülmüş kültür, oda sıcaklığında 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra pelet üzerine her 5 ml kültür için 200 µl Solüsyon I eklenmiş, vortekslenmiş ve bu karışım 200'er µl olacak şekilde ependorf tüplerine paylaştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra üzerlerine 400'er µl Solüsyon II eklenerek karıştırılmış ve her 2 dakikada bir karıştırılarak 5 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. 5 dakika buzda bekletildikten sonra her birine 300'er µl Solüsyon III eklenip, her 2 dakikada bir karıştırılarak 10 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra 14000 rpm'de +4 °C' ta 20 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda süpernatantlar temiz birer ependorf tüpüne alınarak, üzerlerine 0.6 hacim izopropanol eklenip karıştırılmıştır. En az 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, karışımlar oda sıcaklığında 11000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar atılıp, her bir ependorf tüpündeki pelet 25 µl dH₂O'da çözülmüştür. Üzerlerine her 100 µl örnek için 10 µl RNaz (10 mg/ml) eklendikten sonra 30 dakika 37 °C' ta inkübe edilmiştir. Bu şekilde izole edilen plazmit, Jel Bant Pürifikasyon Kitinden (GE Healthcare) geçirilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan plazmit DNA, -20 °C'ta saklanmıştır.

E. coli hücrelerinin plazmitlerle transformasyonu sonucu elde edilen tek kolonilerden doğrulama amacı ile plazmit izolasyonu yapmak için ise aşağıda anlatılan yöntem kullanılmıştır. Koloniler steril kürdan ile uygun antibiyotik içeren 1'er ml LB besiyerine ekildikten sonra, 37 °C'ta 12–16 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası hücreler, oda sıcaklığında 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvılar uzaklaştırılmıştır. Peletler, 2 mg/ml lizozim içeren 250'şer µl STET tamponunda vortekslenerek çözülmüşler ve hemen kaynayan su içine alınarak 45 saniye bekletilmişlerdir. Daha sonra örnekler, oda sıcaklığında 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmişlerdir. Tüplerin dibinde oluşan peletler steril kürdan ile uzaklaştırılmış ve üst sıvılar üzerlerine 250'şer µl izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Ardından örnekler oda sıcaklığında 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmişlerdir. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra peletler vakum ile kurutulmuşlar ve yoğunluklarına göre 20–30 µl dH₂O'da çözülmüşlerdir. Elde edilen DNA örnekleri hemen % 1'lik agaroz jelde yürütülerek analiz edilmişlerdir.

2.2.6. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli DH5α ve *E. coli* ET12567 kompetan hücreleri CaCl₂ yöntemiyle hazırlanmışlardır (Sambrook ve ark., 1989). Hücreler, kloramfenikol içeren (*E. coli* ET12567 için) ve içermeyen (*E. coli* DH5α için) 10'ar ml LB besiyerlerine ekilerek 37 °C'ta 225 rpm'de gece boyunca üretilmişlerdir. Kloramfenikol içeren (*E. coli* ET12567 için) ve içermeyen (*E. coli* DH5α için) 100'er ml LB besiyerlerine bu ön kültürlerden 1/100 oranında ekimler yapılmıştır. Hücreler, 600 nm dalga boyunda absorbans değeri 0.4–0.6'ya ulaşana kadar 37 °C'ta 225 rpm'de inkübe edilmişlerdir. 2 adet 50 ml'lik santrifüj tüpüne eşit bir şekilde bölünen kültür, 5 dk buzda bekletildikten sonra +4 °C'ta 3000 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Peletler 10'ar ml soğuk 60 mM CaCl₂ solüsyonunda çözülmüşler ve ardından +4 °C'ta 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmişlerdir. Bu basamak 2 defa tekrar edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra peletler 1 ml soğuk 60 mM CaCl₂ solüsyonunda çözülmüşler ve 100'er µl olacak şekilde soğuk ependorf tüplerine dağıtılmışlardır. Hücreler, sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C'a kaldırılmışlardır.

Yapılan denemelerde üstte anlatılan yöntemin verimliliği düşük bulunduğundan, *E. coli* DH5 α ve *E. coli* ET12567 hücrelerinden aşağıda tarif edilen yönteme göre (Sanders, 2011) kompetan hücreler hazırlanmıştır. Hücreler gece boyunca katı besiyerinde üretilmişlerdir. *E. coli* DH5 α antibiyotiksiz LB besiyerinde üretilirken, *E. coli* ET12567 hücreleri 25 μ g/ml kloramfenikol içeren LB besiyerinde üretilmişlerdir. Ertesi sabah, üreyen hücrelerden bir koloni seçilip 5 ml antibiyotiksiz/antibiyotikli sıvı LB besiyerine ekim yapılmıştır. Hücreler 300 rpm'de 37 °C'ta 2 saat inkübe edilmişlerdir. 2 saat sonrasında hücreler 100 ml antibiyotiksiz/antibiyotikli LB besiyerine aktarılmış, 200 rpm'de 37 °C'ta OD₅₅₀ 0.4 olana kadar çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmışlardır. Üreyen hücreler 50 ml'lik falkona aktarılıp 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmişlerdir. Üst faz atılarak hücre peleti 40 ml soğuk TfbI solüsyonunda çözülmüş ve 10 dk buzda bekletilmiştir. Karışım 3000 rpm'de 8 dk +4 °C'ta santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılıp hücre peleti soğuk TfbII solüsyonunda çözülerek soğuk ependorf tüplerine 100'er μ l olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücreler sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C'a kaldırılmışlardır.

2.2.7. *L. lactis*'in Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

L. lactis hücresinin büyüme eğrisinin çıkarılması, canlı hücre sayımı ve nisin üretiminin belirlenmesi eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle 1 gecelik *L. lactis* kültüründen 2 ml alınarak 100 ml SGM17 besiyerine ekilmiştir. Ekim yapıldıktan hemen sonra alınan 1 ml'lik ilk örnek t_0 olarak kabul edilmiştir. Daha sonra kültür 30 °C'ta çalkalamasız olarak üremeye bırakılmıştır. Bundan sonraki örnekler 2., 4., 6., 8., 10., 12., 16. ve 24. saatlerde alınmıştır. Belirtilen saatlerde alınan 1'er ml'lik örneklerin öncelikle 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra örneklerin 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} oranlarında seyreltmeleri yapılmıştır. Bu seyreltmelerin 10^{-2} dışında kalanların hepsinden SGM17 agara 100'er μ l ekim yapılmıştır. Son olarak örnekler, 13000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek süpernatantları ayrılmıştır. Ayrılan bu süpernatantlar, nisin üretiminin belirlenmesi için kullanılmışlardır. Bu denemelerin hepsi 3'er kez tekrarlanmıştır.

2.2.8. *L. lactis*'ten Kromozomal DNA İzolasyonu

L. lactis'in genomik DNA'sı, Ausubel ve arkadaşlarının (2003) yöntemine göre izole edilmiştir. 100 ml LB'de 1 gece boyunca inkübe edilen hücreler 2 adet 50 ml'lik santrifüj tüpünde +4 °C'ta 4500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve peletler 1.7 ml TE tamponunda çözülerek karışıma 3.4 mg lizozim eklenmiştir. 1.7 ml karışımın üzerine 50 µl % 20 SDS ve 50 µl RNaz (10 mg/ml) eklendikten sonra, 37 °C'ta 15 dk inkübe edilmiştir. Bu karışım 4 ependorf tüpüne bölündükten sonra her bir ependorf tüpüne 75 µl 5 M NaCl ve 60 µl CTAB/NaCl solüsyonu eklenerek 65 °C'ta 10 dakika inkübe edilmiştir.

Oda sıcaklığına soğutulan örnek üzerine eşit hacimde CIA (24 hacim Kloroform + 1 hacim İzomilalkol) eklendikten sonra oda sıcaklığında 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir ependorf tüpüne alınıp eşit hacimde Fenol/CIA (25 hacim Fenol + 24 hacim Kloroform + 1 hacim İzomilalkol) ile muamele edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra yeni bir ependorf tüpüne alınan üst faz üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenerek oda sıcaklığında 13000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Pelet % 70 etanol ile yıkandıktan sonra kurutulmuş ve dH₂O'da çözülerek saklanmak üzere -20 °C'a kaldırılmıştır.

2.2.9. Ampisilin (*bla*) ve Kanamisin (*kan*) Direnç Genleri ile *fhuR*

Geninin PCR ile Çoğaltılması

L. lactis ATCC 11454 suşunun genom dizisi bilinmediği için, genom dizisi bilinen *L. lactis* suşlarının *fhuR* gen bölgesinin karşılaştırılması sonucu belirlenmiş olan korunmuş bölgeler kullanılarak dejenere primerler hazırlanmıştır. Tasarlanan primerlerin 5' uçlarına pMG36e klonlama vektörünün çoklu klonlama bölgelerine uygun şekilde yerleşmesini sağlayacak restriksiyon enzim tanıma bölgeleri eklenmiştir. İlk olarak hazırlanan F ve R primerlerin 5' uçlarına *Pst*I enziminin kesim bölgesi eklenmiştir. Ancak klonlama çalışmalarında karşılaşılan sorunlar neticesinde aynı gen için farklı bir F primer tasarlanarak bu kez primerin 5' ucuna *Xba*I enzim

kesim bölgesi eklenmiştir (Tablo 2.4). *fhuR* genine ait DNA fragmanı, *L. lactis* genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır (Tablo 2.5).

Ampisilin direnç geninin çoğaltılması için gereken primerlerin hazırlanmasında pBluescript SK(-) plazmidinin DNA dizisinden yararlanılmıştır. Ampisilin direnç geni ve bu genin promotorunu içeren bölgenin ön kısmından yaklaşık 200 nükleotit, arka kısmından ise yaklaşık 350 nükleotitlik kısmı da içerecek şekilde F ve R primerler hazırlanmıştır. Hazırlanan primerlerin 5' uçlarına *EcoRI* enzim kesim bölgesi eklenmiştir (Tablo 2.4). PCR için kalıp olarak pBluescript SK(-) plazmidinin DNA'sı kullanılmıştır (Tablo 2.5).

Kanamisin direnç geninin çoğaltılması için gerekli primerler, pK18mob2 plazmidinin kanamisin direnç geni esas alınarak hazırlanmışlardır (Tablo 2.4). Kanamisin direnç genine ait DNA fragmanının çoğaltılmasında, pSKdesAKn plazmit DNA'sı PCR için kalıp olarak kullanılmıştır (Tablo 2.5).

Farklı DNA polimeraz enzimleri ve primer bağlanma sıcaklıkları ile yapılan PCR optimizasyon çalışmaları sonucunda en iyi PCR ürününün elde edildiği reaksiyon koşulları ve tamponları belirlenmiştir. Belirtilen genlerin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan enzimler, reaksiyon tamponları ve reaksiyon koşulları Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Ampisilin (*bla*) ve Kanamisin (*kan*) direnç genleri ile *fhuR* geni için tasarlanmış ileri ve geri primerler.

Gen	Primer		Restriksiyon Endonükleaz	PCR Ürünü (bp)
<i>fhuR</i> Geni	İleri (1)	5'AA <u>CTGCAGA</u> AACCAATGCAT TGATG'3	<i>Pst</i> I	977
	İleri (2)	5'CTAG <u>TCTAGA</u> CTAGATGAA TATTAAACAATTA'3	<i>Xba</i> I	
	Geri	5'AA <u>CTGCAGA</u> AACCAATGCAT TGTTAAAATTCATAGTTTTC'3	<i>Pst</i> I	
Ampisilin (<i>bla</i>) Direnç Geni	İleri	5' <u>GGAATTC</u> CCGGCGAACGTG GCGAGAA'3	<i>Eco</i> RI	1492
	Geri	5' <u>GGAATTC</u> CAGGCGGTGCTA CAGAGT'3	<i>Eco</i> RI	
Kanamisin (<i>kan</i>) Direnç Geni	İleri	5'GTGCTGACCCCGGATGAAT GT'3	-	1497
	Geri	5'AGCGGGGCAGGATAGGTGA AGTAG'3	-	

Tablo 2.5. Ampisilin (*bla*) ve Kanamisin (*kan*) direnç genleri ile *fhuR* geninin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan enzimler, reaksiyon tamponları ve reaksiyon koşulları.

Gen	Enzim	Reaksiyon Bileşenleri (Son Konsantrasyon)	Reaksiyon Koşulları (45 döngü)
<i>fhuR</i> Geni	Phusion DNA Polimeraz	1x Phusion HF Tamponu 200 µM dNTP 0.5 µM Primerler 250 ng Kalıp DNA 1 U Phusion DNA Polimeraz	98 °C'ta 3 dk. 98 °C'ta 10 sn. 50 °C'ta 30 sn. 72 °C'ta 45 sn. 72 °C'ta 10 dk.
Ampisilin Direnç Geni (<i>bla</i>)			98 °C'ta 3 dk. 98 °C'ta 10 sn. 70 °C'ta 30 sn. 72 °C'ta 1 dk. 72 °C'ta 10 dk.
Kanamisin Direnç Geni (<i>kan</i>)			98 °C'ta 3 dk. 98 °C'ta 10 sn. 55 °C'ta 30 sn. 72 °C'ta 1 dk. 72 °C'ta 10 dk.

2.2.10. PCR Ürünlerinin Klonlanması

2.2.10.1. *fhuR* geninin pMG36e Mekik Plazmidine Klonlanması

fhuR geninin pMG36e plazmidine klonlanması amacıyla, öncelikle *fhuR* geni İleri Primer (1) ve Geri Primer kullanılarak Tablo 2.5'te belirtilen koşullarda PCR ile çoğaltılmıştır. *fhuR* PCR ürünü ve pMG36e plazmidi *Pst*I restriksiyon enzimi ile 37 °C'ta 4 saat boyunca kesilmişlerdir. Kesim reaksiyonları 1x *Pst*I Tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Kesim reaksiyonları % 1'lik agaroz jele yüklenerek 1 saat süreyle yürütülmüş ve 1 kb Moleküler DNA belirteci ile büyüklükleri doğrulanmış ve agaroz jelden saflaştırılmışlardır. Tekrar agaroz jelde yürütülerek konsantrasyonları belirlenen *fhuR* *Pst*I fragmanı (40 ng/μl) ve pMG36e *Pst*I plazmidi (70 ng/μl) ile 3:1 (insört:vektör), 5:1 (insört:vektör) ve 10:1 (insört:vektör) oranlarında ligasyon reaksiyonları kurulmuştur. Ligasyon ürünleri *E. coli* DH5α suşunun transformasyonunda kullanılmış ve hücreler 300 μg/ml eritromisin içeren LB agar besiyerlerine yayılmışlardır.

Ancak transformasyon sonrası 300 μg/ml eritromisin içeren LB agar besiyerlerinde yaban tip *E. coli* hücreleri ürerken ayrıca transformasyon petrilerinde hücreler tüm besiyerini kaplayacak şekilde üremişlerdir. Bu durumda transformantlar ile yaban tip hücreler arasında seçim yapılamadığından besiyerindeki eritromisin konsantrasyonunun arttırılması denenmiştir. Ancak konsantrasyonun 400, 500, 600, 700 hatta 800 μg/ml'ye çıkarılmasına rağmen yaban tip *E. coli* hücreleri bu besiyerlerinde üremeye devam etmişlerdir.

Bu kez *fhuR* geninin çoğaltılması için başka bir enzim kesim bölgesine (*Xba*I) sahip olan İleri Primer (2) sipariş edilmiş ve yukarıda anlatılan işlemler bu kez de bu primer kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak sonuç değişmemiş ve yaban tip *E. coli* hücreleri besiyerinde çok yüksek seviyelere ulaşan eritromisin konsantrasyonlarında üremeye devam etmişlerdir.

Bu durum pMG36e plazmidinde yer alan eritromisin direnç geninin *E. coli* hücrelerinde etkin bir biçimde çalışmadığını göstermiştir. Bu sebeple bu plazmide *E. coli* hücrelerinde etkin bir biçimde çalışacak bir antibiyotik direnç geninin eklenmesine karar verilmiştir.

2.2.10.2. Ampisilin Direnç Geninin (*bla*) pMG36e Mekik Plazmidine Klonlanması

pMG36e plazmiti ve Tablo 2.5'te belirtilen koşullarda PCR ile çoğaltılmış Ampisilin direnç geni, klonlama çalışmaları için öncelikle *EcoRI* restriksiyon enzimi ile 37 °C'ta 4 saat süre ile kesilmişlerdir. Kesilen DNA fragmanları % 1'lik agaroz jelde gözlenerek, uygun fragmanlar jelden saflaştırılmışlardır.

Tekrar agaroz jelde yürütülerek konsantrasyonları belirlenen pMG36e *EcoRI* plazmidi (100 ng/μl) ve Ampisilin direnç geni *EcoRI* fragmanı (25 ng/μl) ile 3:1 (insört:vektör) ve 5:1 (insört:vektör) oranlarında ligasyon reaksiyonları kurulmuştur. Reaksiyonlar 16 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir.

Ligasyon ürünlerinin 5'er μl'si, 100'er μl *E. coli* DH5α kompetan hücreleri üzerine eklenerek buz içerisinde 30 dakika inkübe edilmişlerdir. Daha sonra 42 °C'ta 45 saniye ısı şoku uygulanarak 2 dakika daha buz içerisinde bekletilmişlerdir. Üzerlerine 900'er μl LB eklendikten sonra 1 saat 37 °C'ta çalkalanarak inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon sonrası hücrelerden 200'er μl, 100 μg/ml ampisilin içeren LB agar besiyerlerine yayılmıştır. Petriler 37 °C'ta gece boyu inkübe edilmişlerdir. Ancak inkübasyon sonrası petrilere hiçbir üreme gözlenmemiştir. Ligasyon ve transformasyon işlemlerinin tekrar edilmesi, sonucu değiştirmemiştir. Bu sonuç, PCR ile elde edilen DNA fragmanının ampisilin direnç geni (*bla*) olamayabileceğini düşündürmüştür.

2.2.10.3. Kanamisin Direnç Geninin (*kan*) pMG36e Mekik Plazmidine Klonlanması

pMG36e plazmidinin *HindIII* restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası oluşan yapışkan uçları küt uca çevirmek amacıyla Klenow enzimi kullanılmıştır. Kanamisin

direnç geni (*kan*) ise Phusion DNA Polimeraz enziminin özelliğinden dolayı küt uçlu PCR ürünü olduğundan, ligasyon öncesi herhangi bir restriksiyon enzim kesimi gerekmemiştir. Plazmit ve gen belirtilen işlemler sonrasında % 1'lik agaroz jelde gözlenmiş ve uygun DNA fragmanları jelden saflaştırılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlara göre Kanamisin direnç geni (*kan*) (120 ng/μl) ve pMG36e plazmiti (60 ng/μl) ile 3:1 (PCR ürünü:vektör), 5:1 (PCR ürünü:vektör) ve 10:1 (PCR ürünü:vektör) oranlarında ligasyon reaksiyonları kurulmuştur. Ligasyon reaksiyonlarında 1U T4 Ligaz, 1x T4 Ligaz tamponu kullanılmıştır. Örnekler 16 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir.

Transformasyon için, 10 μl ligasyon karışımı *E. coli* DH5α suşunun transformasyonunda kullanılmış ve hücreler 100 μg/ml kanamisin içeren LB agar besiyerlerine yayılmışlardır.

Elde edilen transformanların tek koloni halinde yeni besiyerine çizilmesiyle elde edilen saf kültürlerin her birinden kaynatma yöntemiyle plazmit izolasyonu yapılmış ve plazmitler uygun restriksiyon enzimleri (*SacI* ve *SalI*) ile kesilerek doğrulanmıştır. Bu çalışma sonucunda oluşturulan yeni plazmide pMG36e-Kn adı verilmiştir.

2.2.10.4. pMG36e-Kn Plazmidine *fhuR* Geninin Klonlanması

pMG36e-Kn plazmidine, *fhuR* genini klonlamak için, *fhuR* geni İleri Primer (2) ve Geri Primer kullanılarak Tablo 2.5'te belirtilen koşullarda PCR ile çoğaltılmıştır. *fhuR* PCR ürünü ve pMG36e-Kn plazmidi *XbaI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ile 37 °C'ta 4 saat süre ile kesilmişlerdir. Kesim reaksiyonları ortak tampon olarak belirlenen 1x B4 Tamponu (Biolabs) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her iki enzimin de ortak tamponda etkili bir şekilde çalışabilmeleri için reaksiyona 0.1 mg/ml BSA (Biolabs) eklenmiştir.

Kesim reaksiyonları % 1'lik agaroz jele yüklenerek 1 saat süreyle yürütülmüş ve 1 kb Moleküler DNA belirteci ile büyüklükleri doğrulanmış ve agaroz jelden saflaştırılmışlardır. Tekrar agaroz jelde yürütülerek konsantrasyonları belirlenen *fhuR* *XbaI*-*PstI* fragmanı (150 ng/μl) ve pMG36e-Kn *XbaI*-*PstI* plazmidi (200 ng/μl) ile

3:1 (insört:vektör), 5:1 (insört:vektör) ve 10:1 (insört:vektör) oranlarında ligasyon reaksiyonları kurulmuştur. Ligasyon reaksiyonlarında 1U T4 Ligaz, 1x T4 Ligaz tamponu kullanılmıştır. Reaksiyonlar 16 °C’ta gece boyu inkübe edilmiştir. Ligasyon ürünlerinin 10’ar µl’si *E. coli* DH5α suşunun transformasyonunda kullanılmış ve hücreler 100 µg/ml kanamisin içeren LB agar besiyerlerine yayılmıştır.

Elde edilen transformanların tek koloni halinde yeni besiyerine çizilmesiyle elde edilen saf kültürlerin her birinden kaynatma yöntemiyle plazmit izolasyonu yapılmış ve plazmitler enzim kesimi (*SacI*), PCR reaksiyonu ve dizi analizi ile doğrulanmışlardır. Enzim kesimi ve PCR reaksiyonu ile *fhuR* geninin plazmitteki varlığı ispat edilirken, plazmide doğru yönde yerleşip yerleşmediğinin belirlenmesi için dizi analizine ihtiyaç duyulmuştur. Doğrulama için gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda kalıp olarak 4 farklı DNA (*L. lactis* genomik DNA’sı, pMG36e plazmit DNA’sı, pMG36e-Kn plazmit DNA’sı ve pMG36e-Kn-*fhuR* plazmit DNA’sı) kullanılırken, primer olarak *fhuR* geni için tasarlanan ileri (2) ve geri primerler kullanılmıştır. Phusion DNA Polimeraz enziminin gerçekleştirdiği reaksiyonda primer bağlanma sıcaklığı 55 °C olarak seçilmiştir. Bu çalışma sonucunda oluşturulan yeni plazmide pMG36e-Kn-*fhuR* adı verilmiştir.

Elde edilen pMG36e-Kn-*fhuR* plazmiti ile *fhuR* geninin PCR ürünü, DNA dizilerinin belirlenmesi için jelden saflaştırıldıktan sonra uygun konsantrasyonlarda İontek Ltd.’ye (İstanbul, Türkiye) gönderilmişlerdir. *fhuR* geninin dizilenmesi için gene özgül ileri ve geri primerler kullanılırken, pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidindeki *fhuR* geninin varlığının ve yönünün belirlenmesi için ise genin orta kısmındaki dizilere uygun olarak tasarlanan primerler kullanılmıştır. Kullanılan primerler Tablo 2.6’da belirtilmiştir.

Tablo 2.6. *fhuR* geninin dizi analizi için kullanılan ileri ve geri primerler.

<i>fhuR</i> Geni (PCR Ürünü)	İleri Primer	5'AACTGCAGAACCAAT GCATTGATG'3
	Geri Primer	5'AACTGCAGAACCAAT GCATTGTTAAAATTCAT AGTTTTTC'3
<i>fhuR</i> Geni (pMG36e-Kn-<i>fhuR</i> plazmidi)	İleri Primer	5'TAAGAATGCTCAATA AACT'3
	Geri Primer	5'ACGTTGAGCTAGTGG ATGG'3

2.2.12. pMG36e-Kn-*fhuR* Plazmidinin *E. coli* ET12567 Suşuna

Aktarılması

E. coli K12 ya da *E. coli* DH5 α gibi suşlarda çoğaltılan plazmit DNA'larının, Dam (GA^{Me}TC), Dcm (C^{Me}CA/TGG) ya da Hsd (AA^{Me}CN₆GTGC ve GCA^{Me}CN₆GTT) enzimleri tarafından metillenmesi, *Lactococcus* suşlarının bu plazmidlerle transformasyonunu engellenmektedir. Bu nedenle, *E. coli* DH5 α suşunda bulunan pMG36e-Kn ve pMG36e-Kn-*fhuR* plazmitlerinin, *L. lactis*'e aktarılabilmesi için öncelikle Dam, Dcm ve HsdS enzimlerinden yoksun olan *E. coli* ET12567 suşuna aktarılıp bu bakteriden izole edilmeleri gerekir.

Bu amaçla, *E. coli* DH5 α suşundan izole edilen pMG36e-Kn ve pMG36e-Kn-*fhuR* plazmitlerinden 10'ar μ l, 100'er μ l kompetan *E. coli* ET12567 hücreleriyle karıştırılmıştır. Buz içinde 30 dakika bekletilen hücrelere 42 °C'ta 45 saniye ısı şoku uygulandıktan sonra 2 dakika daha buz içerisinde bekletilmişler ve daha sonra üzerlerine 900'er μ l LB eklenerek 37 °C'ta 1 saat çalkalamalı olarak inkübe

edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası örnekler, 100 µg/ml kanamisin ve 50 µg/ml kloramfenikol içeren LB agar besiyerine 100'er µl yayılarak 37 °C'ta gece boyu inkübe edilmişlerdir.

Elde edilen transformanlardan 3–4 tanesi alınarak kanamisin ve kloramfenikol içeren LB agar petrilere çizilerek büyütülmüş ve kolonilerin her birinden kaynatma yöntemiyle plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmitler restriksiyon enzim analizi ile doğrulanmışlardır.

2.2.13. pMG36e-Kn-*fhuR* Plazmidinin *L. lactis*'e Aktarılması

2.2.13.1. *L.lactis* Elektrokompentanlarının Hazırlanması

L. lactis elektrokompentan hücrelerinin hazırlanmasında Holo ve Nes (1995)'in yöntemi denenmiş ancak bu yöntemle başarı sağlanamamıştır. Bu yöntemle göre ilk gün *L. lactis* hücrelerinin -80 °C stoğundan 5 ml SGM17 besiyerine ekim yapılarak 30 °C'ta 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İkinci gün bu kültür 10 ml % 2.5 glisin içeren SGM17 besiyerine aktarılmış ve gece boyu 30 °C'ta inkübe edilmiştir. Bu kültürden % 2.5 glisin içeren SGM17 besiyerine 1/100 oranında ekim yapılarak, kültürün optik yoğunluğu OD₆₀₀ 0.2–0.3 olana dek hücreler 30 °C'ta inkübe edilmişlerdir. Bu aralığa ulaşan kültür, buz üzerine alınarak soğutulmuş ve hücreler 4500 rpm'de +4 °C'ta 20 dk santrifüj edilerek toplanmışlardır. Üst sıvı dökülerek uzaklaştırıldıktan sonra hücreler EDTA içermeyen elektroporasyon tamponunda (+4 °C) çözülmüşlerdir. Elde edilen süspansiyon, 4500 rpm'de +4 °C'ta 20 dk santrifüj edilerek tekrar hücre çökeltisi elde edilmiştir. Hücreler bu kez EDTA içeren elektroporasyon tamponunda çözülerek, buz üzerinde 15 dk inkübe edilmişlerdir. İnkübe edilen bu hücreler tekrar 4500 rpm'de +4 °C'ta 20 dk santrifüj edilerek hücre peleti son kez EDTA içermeyen elektroporasyon tamponuyla yıkanmıştır. Son olarak hücrelerin 4500 rpm'de +4 °C'ta 20 dk santrifüj edilmesiyle elde edilen hücre peleti, EDTA içermeyen elektroporasyon tamponunda çözülerek 100'er µl olacak şekilde buzda soğutulmuş ependorf tüplerine bölünerek, kullanılıncaya kadar -80 °C'ta muhafaza edilmişlerdir.

Elektroporasyon denemelerinin başarılı olmaması sonucu, besiyerindeki glisin miktarı % 0.5, 1, 1.5 ve 2 olacak şekilde değiştirilerek denenmiş ancak yine de bu yöntemde başarı sağlanamamıştır.

Elektrokompetan hücrelerin hazırlanmasında Powell ve ark. (1988) tarafından kullanılan yöntem de denenmiştir. Bu yöntemde ilk gün *L. lactis* hücrelerinin -80 °C stoğundan % 0.5 oranında glukoz içeren M17 besiyerine ekim yapılarak 30 °C'ta 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İkinci gün bu kültür, % 0.5 oranında glukoz içeren M17 besiyerine 1/100 oranında inoküle edilmiş ve 30 °C'ta 2 ila 4 saat OD₆₀₀ 0.3–0.7 olana dek inkübe edilmiştir. Bu aralığa ulaşan hücreler 4500 rpm'de +4 °C'ta 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldükten sonra, +4 °C'taki elektroporasyon tamponunda (EPB) yıkanmışlardır. Yıkama işleminden sonra hücreler toplam kültür hacminin 0.1'i hacminde EPB'de çözülmüşlerdir. Lizozim ile muamele edilebilmesi için öncelikle hücreler 37 °C'a ısıtılmışlar, sonrasında son konsantasyon 2 kU/ml olacak şekilde lizozim eklenerek 37 °C'ta 20 dk bekletilmişlerdir. Bekleme süresi sonunda hücreler santrifüjle (4500 rpm'de +4 °C'ta 15 dk) toplandıktan sonra, +4 °C'taki elektroporasyon tamponunda (EPB) yıkanmışlardır. Hücreler son olarak toplam kültür hacminin 0.05'i oranında EPB ile çözüldükten sonra 100'er µl olacak şekilde buzda soğutulmuş ependorf tüplerine bölünerek, kullanılıncaya kadar -80 °C'ta saklanmışlardır. Ancak bu hücreler kullanılarak yapılan elektroporasyon denemeleri de başarılı olmamıştır.

Son olarak *L. lactis* ATCC 11454 elektrokompetan hücreleri hazırlamak için, Papagianni ve ark.'nın 2007 yılında yayınladıkları yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde göre, ilk gün *L. lactis* hücrelerinin -80 °C stoğundan GM17 besiyerine ekilip 30 °C'ta 1 gece inkübe edilerek hücreler canlandırılmışlardır. Ertesi gün hücreler, 40 mmol/L treonin içeren GM17 besiyerine ekilerek aynı şartlarda inkübe edilmişlerdir. 1 gece inkübasyon sonrası üreyen hücreler, 1:12.5 oranında 100 ml GM17 besiyerine inoküle edilerek OD₆₆₀ değeri 0.26–0.38 olana dek 30 °C'ta inkübe edilmişlerdir. Kültür bu aralığa ulaştığında, 4500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek hücreler toplanmışlardır. Elde edilen peletler, 32 ml LiAc/DTT çözeltisinde çözülerek oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler tekrar santrifüjle toplanmışlar, bu kez de aynı çözeltinin 10 ml'sinde tekrar çözülerek tekrar santrifüj edilmişlerdir. Bu aşamadan sonra hücreler

buza alınarak bundan sonra eklenecek bütün solüsyonlar +4 °C'ta hazır olarak bekletilmişlerdir. Bu aşamadan sonra yapılacak tüm santrifüjler, +4 °C'ta 4500 rpm'de 15 dk olacak şekilde gerçekleştirilmişlerdir. Hücreler bundan sonra sırasıyla; 8 ml dH₂O, 4 ml dH₂O, 4 ml 50 mmol/L EDTA (pH 8), 4 ml dH₂O, 4 ml 0.3 mol/L süktroz'da çözülerek santrifüj edilmişlerdir. Son olarak hücreler 1.2 ml 0.3 mol/L süktroz'da çözülerek 200'er µl olacak şekilde buzda soğutulmuş ependorf tüplerine aktarılmışlardır. Hücreler elektroporasyonda kullanılıncaya kadar -80 °C'ta saklanmışlardır. Bu yöntem ile hazırlanan elektrokompentan hücrelerle yapılan elektroporasyon denemelerinde yine başarı sağlanamamıştır.

2.2.13.2. Elektroporasyon

100 µl *L. lactis* elektrokompentan hücresi üzerine *E. coli* ET12567 hücresinden izole edilen pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidi eklenerek karıştırılmıştır. Elde edilen bu karışım, 0.2 cm'lik elektroporasyon küvetine konularak elektroporasyon için hazır hale getirilmiştir. Elektroporasyon 2.5 kV'ta, 25 µF'ta, farklı plazmit miktarları ve farklı ohm(Ω)'lar denenerek gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon sonrasında hücrelere 900 µl SM17MC besiyeri eklenmiş ve 30 °C'ta 2 saat çalkalama olmadan inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında hücreler, 200'er µl olacak şekilde 5 adet Kn (25 µg/ml) içeren LB agara yayılarak ekim yapılmıştır. Ertesi gün hücreler taranarak klonlar seçilmiştir. Elektroporasyonda denenen plazmit miktarları (µl) ve ohm(Ω)'lar Tablo 2.7'de verilmiştir.

Tablo 2.7. Elektroporasyonda denenen plazmit miktarları (μ l), Volt, ohm(Ω) ve μ Farad değerleri.

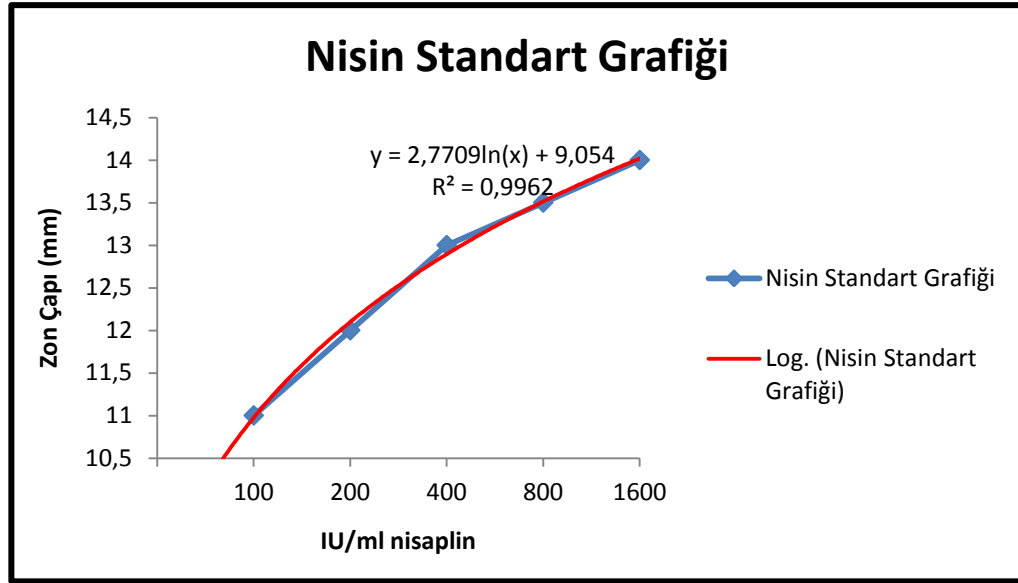
Plazmit (μ l)	Volt	Ohm (Ω)	μ Farad
5	2500	200	25
5	2500	300	25
7.5	2500	200	25
7.5	2500	300	25
10	2500	200	25
10	2500	300	25

2.2.14. *L. lactis*'in Nisin Üretimi

2.2.14.1. Nisin Üretiminin Belirlenmesi

Nisin ana stoğu, Cheigh ve arkadaşlarının (2002) yöntemine göre 10000 IU/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için 0.1 g nisaplin (Sigma) tartılıp son hacim 0.02 N HCl ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu solüsyon 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra, elde edilen süpernatant 0.2 μ m'lik filtreden geçirilerek +4 °C'ta muhafaza edilmiştir.

Nisin standart grafiğinin oluşturulması için ana stok (10000 IU/ml) 100 IU/ml, 200 IU/ml, 400 IU/ml, 800 IU/ml ve 1600 IU/ml olacak şekilde 0.02 N HCl ile seyreltilmiştir. Hazırlanan bu solüsyonlarla yapılan biyoassay deneyinin sonuçları grafiğe dökülerek nisin standart grafiği elde edilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Nisin Standart Grafiği.

Nisin üretiminin belirlenmesinde Wu ve arkadaşlarının (2009) çalışmaları esas alınmıştır. BLB agar besiyerinde 20 saat büyütülmüş olan *M. luteus* suşundan bir öze dolusu alınarak, 6 ml steril izotonik (% 0.9) NaCl içerisinde süspanse edilmiştir. 20 ml S1 agar (50 °C'ta) *M. luteus* süspansiyonu ile karıştırılmış, petriye yayılmış ve örneklerin eklenmesinin ardından 30 °C'ta 20–24 saat inkübe edilmiştir. Örneklerin eklenmesi, 16 saat büyütülmüş olan *L. lactis* suşlarının süpernatantlarından 80 µl alınıp S1 agardaki kuyucuklara eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. 20–24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, *M. luteus*'a karşı oluşan inhibisyon zonları ölçülerek, nisin standart grafiğinin yardımıyla *L. lactis* hücrelerinin IU/ml cinsinden nisin üretimleri belirlenmiştir.

2.2.14.2. *L. lactis*'in Nisin Üretimine Besiyerindeki Kükürt Konsantrasyonunun Etkisi

L. lactis hücrelerini üretmek için kullanılan SGM17 besiyeri kükürt kaynağı olarak 0.25g/L MgSO₄ içerdiğinden, besiyerindeki kükürt konsantrasyonunu arttırmak için yine bu bileşik kullanılmıştır. 0.5 g/L, 0.75 g/L ve 1 g/L MgSO₄·7H₂O içeren SGM17 besiyerleri hazırlanmıştır. 1 gecelik *L. lactis* önkültüründen bu besiyerlerine (20'şer ml) ve ayrıca kontrol olarak kullanılmak üzere 0.25g/L MgSO₄ içeren SGM17 besiyerine (20 ml) 200'er µl ekim yapılmıştır. 16 saatlik inkübasyon

süresinin sonunda nisin üretiminin belirlenmesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki gün zon çapları ölçülerek hücrelerin nisin üretimleri belirlenmiştir.

2.2.14.3. *L. lactis*'in Nisin Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi

L. lactis'in farklı karbon kaynaklarındaki nisin üretimini inceleyebilmek için karbon kaynağı olarak 12 farklı madde kullanılmıştır. Bu maddeler; sükroz, glukoz, fruktoz, arabinoz, galaktoz, ksiloz, mannoz, trehaloz, sellobiyoz, nişasta, melas ve peynir altı suyu (PAS)'dur (Tablo 2.8). Deneyi gerçekleştirmeden önce ekim yapılacak 50 ml'lik falkonlar tartılarak not edilmiştir. 50 ml'lik falkonların her birine farklı karbon kaynakları içeren 20'şer ml M17 besiyeri konulmuştur. Kullanılan karbon kaynakları M17 besiyerine % 0.5 g olacak şekilde eklenmişlerdir. Melas ise öncelikle 1/5 oranında sulandırılmış, besiyerine ise 1/4 oranında seyrececek şekilde eklenmiştir. PAS da besiyerine 1/4 seyrececek şekilde eklenmiştir.

Tablo 2.8. Bu çalışmada kullanılan karbon kaynaklarının gruplandırılması.

	Basit Şeker Ünitelerinin Sayısına Göre	Karbon Zincirinin Uzunluğuna Göre	Reaktif Gruplarına Göre
Glukoz	Monosakkarit	Hegzos (6 Karbonlu)	Aldoz
Fruktoz	Monosakkarit	Hegzos (6 Karbonlu)	Ketoz
Arabinoz	Monosakkarit	Pentoz (5 Karbonlu)	Aldoz
Galaktoz	Monosakkarit	Hegzos (6 Karbonlu)	Aldoz
Ksiloz	Monosakkarit	Pentoz (5 Karbonlu)	Aldoz
Mannoz	Monosakkarit	Hegzos (6 Karbonlu)	Aldoz
Sükroz	Disakkarit (glukoz+fruktoz)	–	–
Sellobiyoz	Disakkarit (glukoz+glukoz)	–	–
Trehaloz	Disakkarit (glukoz+glukoz)	–	–
Niştasta	Polisakkarit (glukoz)	–	–
Melas	Disakkarit (sükrozca zengin)	–	–
PAS	Disakkarit (laktozca zengin) laktoz=glukoz+galaktoz	–	–

1 gecelik *L. lactis* kültüründen 0.5'er ml, farklı karbon kaynakları içeren 20'er ml M17 besiyerlerine eklenerek 1 gece 30 °C'ta inkübe edilmiştir. Kontrol olarak ise herhangi bir karbon kaynağı içermeyen M17 besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonrası falkonlar 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatantlar nisin üretimi deneyinde kullanılmak üzere ayrılırlarken, hücre peletleri 1 saat boyunca hudda kurutulmuşlardır. Kurutulan falkonlar tekrar tartılarak hücre peletleri hesaplanmıştır. Bütün denemeler ikişer tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

L. lactis'in nisin üretimine karbon kaynağının etkisini grafik üzerinde gösterebilmek için öncelikle iki tekrarlı olarak gerçekleştirilen deneyler sonucu elde edilen IU/ml cinsinden nisin değerlerinin ortalamaları alınmıştır. Sonrasında elde edilen ortalama nisin değerleri, ortalama pelet ağırlıklarına bölünerek ortalama spesifik nisin aktiviteleri (IU/ml.g) hesaplanmıştır. Hesaplanan ortalama spesifik nisin aktiviteleri, grafikte sütunlar olarak gösterilmişlerdir. Standart sapmaların belirlenmesi için ise her bir deney tekrarı için ayrı spesifik nisin aktivitesi hesaplanarak, bu birim spesifik nisin aktivitesinin ortalama spesifik nisin aktivitesinden farkı alınmıştır. Elde edilen pozitif farklar pozitif sapma, elde edilen negatif farklar negatif sapma olarak gösterilmişlerdir. Nisin üretimine pH ve sıcaklığın etkisi de aynı şekilde hesaplanarak grafiğe dökülmüşlerdir.

2.2.14.4. *L. lactis*'in Nisin Üretimine pH'nın Etkisi

L. lactis'in nisin üretimine farklı pH'ların etkisini inceleyebilmek için M17 besiyerlerinin başlangıç pH'ları 3, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır. Deneyi gerçekleştirmeden önce ekim yapılacak 50 ml'lik falkonlar tartılarak not edilmiştir. 50 ml'lik falkonların her birine farklı farklı pH'larda 20'er ml M17 besiyeri konulmuştur.

1 gecelik *L. lactis* kültüründen 0.5'er ml, farklı başlangıç pH'larındaki 20'er ml M17 besiyerlerine eklenerek 1 gece 30 °C'ta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası falkonlar 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatantlar nisin üretimi deneyinde kullanılmak üzere ayrılırlarken, hücre peletleri 1 saat boyunca hudda kurutulmuşlardır. Kurutulan falkonlar tekrar tartılarak

hücre peletleri hesaplanmıştır. Bütün denemeler ikişer tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.14.5. *L. lactis*'in Nisin Üretimine Sıcaklığın Etkisi

L. lactis'in nisin üretimine farklı büyüme sıcaklıklarının etkisini inceleyebilmek için M17 besiyerlerine ekilen hücreler, 25 °C, 30 °C, 37 °C ve 42 °C'ta inkübe edilmişlerdir. Deneyi gerçekleştirmeden önce ekim yapılacak 50 ml'lik falkonlar tartılarak not edilmiştir.

1 gecelik *L. lactis* kültüründen 0.5'er ml, 20'şer ml M17 besiyerlerine eklenerek 1 gece farklı sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası falkonlar 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatantlar nisin üretimi deneyinde kullanılmak üzere ayrılırlarken, hücre peletleri 1 saat boyunca hudda kurutulmuşlardır. Kurutulan falkonlar tekrar tartılarak hücre peletleri hesaplanmıştır. Bütün denemeler ikişer tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.14.6. *L. lactis*'in Nisin Üretimine *B. thuringiensis* ve *S. coelicolor* Kültürlerinin Etkisi

B. thuringiensis hücrelerini deneye hazır hale getirmek için öncelikle 1 gecelik *B. thuringiensis* önkültüründen, 100 ml Nutrient Broth besiyerine 2 ml ekim yapılarak 4 saat boyunca 30 °C'ta inkübe edilmiştir. *B. thuringiensis* kültürü 4. saatine ulaştığında, 100 ml'lik kültür 50 ml'lik 2 adet falkona bölünmüş ve hücreler 4000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Elde edilen süpernatantlar deneyde kullanılmak üzere ayrıldıktan sonra, peletler 10'ar ml % 0.9 NaCl içerisinde çözülmüşlerdir. Çözülen peletler tekrar 4000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek hücrelerin yıkanması sağlanmıştır. Elde edilen peletlerin üzerlerine 50'şer ml % 0.9 NaCl eklenerek çözülmeleri sağlanmıştır. 50 ml % 0.9 NaCl'de çözülmüş peletlerden bir tanesi deneyde kullanılmak üzere kaldırılırken, diğeri ise vejetatif hücrelerin öldürülmesi amacıyla ısı ile inaktivasyon için 30 dk kaynayan suda bekletilmiştir. Böylece üç örnek (*B. thuringiensis* süpernatantı, 50 ml % 0.9 NaCl'de çözülmüş *B. thuringiensis* peleti ve 50 ml % 0.9 NaCl'de çözülmüş ve ısı ile inaktivasyon yapılmış *B. thuringiensis* peleti) deney için hazır hale getirilmiştir.

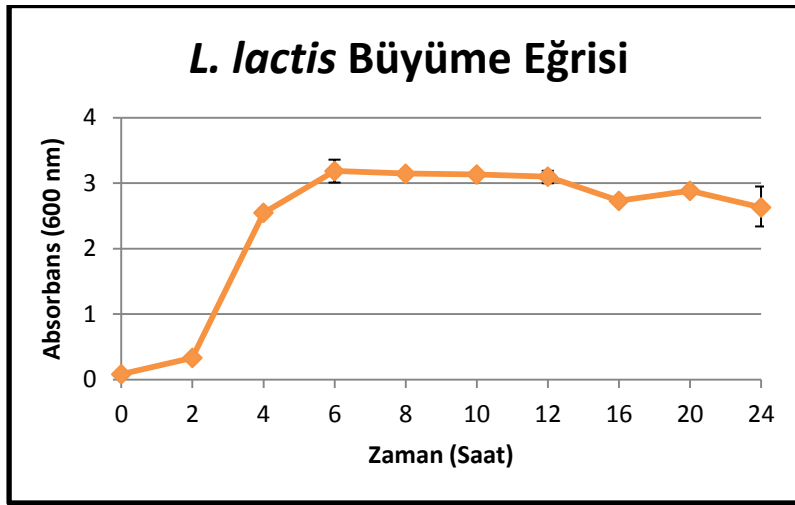
S. coelicolor hücrelerini deneye hazır hale getirmek için ise, *B. thuringiensis* hücrelerinden farklı olarak, *S. coelicolor* önkültüründen 100 ml TSB besiyerine ekim yapılmış ve 48 saat boyunca 30 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır. Diğer tüm aşamalar *B. thuringiensis* ile aynı olmakla beraber, yalnızca santrifüjler 4500 rpm'de 20 dk yapılmıştır.

1 gecelik *L. lactis* önkültüründen 4 adet 100'er ml SGM17 besiyerine 2'şer ml ekim yapılarak deneye başlanmıştır. Hücreler 30 °C'ta çalkalamasız olarak inkübe edilmişlerdir. *L. lactis* hücreleri 4. saatlerine ulaştıklarında 100 ml'lik kültürlerden bir tanesine 2.5 ml *B. thuringiensis* süpernatantı, bir tanesine 2.5 ml 50 ml % 0.9 NaCl'de çözülmüş *B. thuringiensis* peleti ve bir tanesine ise 2.5 ml 50 ml % 0,9 NaCl'de çözülmüş ve ısı ile inaktivasyon yapılmış *B. thuringiensis* peleti eklenmiştir. Sonuncu 100 ml'lik kültür ise kontrol olarak bırakılmış ve dolayısı ile içerisine hiçbir madde eklenmemiştir. *S. coelicolor* için aynı işlemler tekrarlanmıştır. Kültürler 16 saat boyunca 30 °C'ta çalkalamasız olarak inkübasyona bırakılmışlardır. 16. saatin sonunda nisin üretiminin belirlenmesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün ise zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

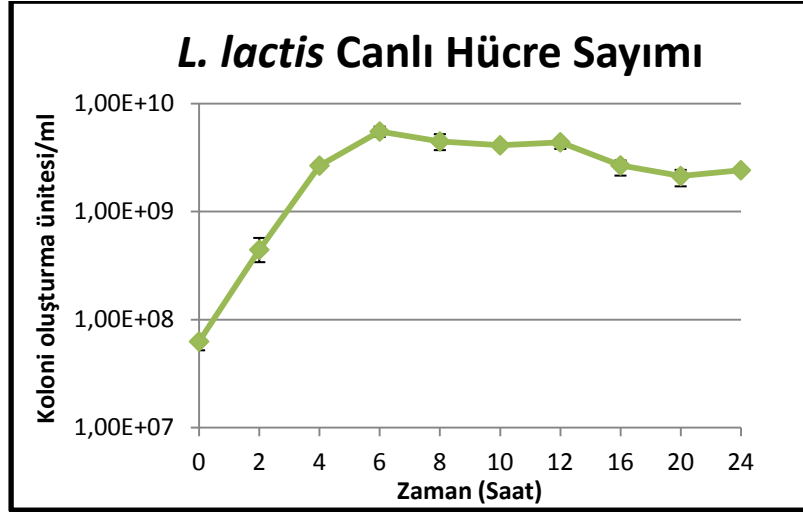
3. BULGULAR

3.1. *Lactococcus lactis*'in Nisin Üretimi

L. lactis'in büyüme eğrisi, hem spektrofotometrik olarak (Şekil 3.1.A) hem de canlı hücre sayısı belirlenerek oluşturulmuştur (Şekil 3.1.B). Her iki grafikte de *L. lactis* hücrelerinin 6. saatte durağan faza girdiği görülmektedir. *L. lactis*'in büyüme eğrisinin oluşturulması ve nisin üretiminin belirlenmesi eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Primer metabolit kinetiği gösteren nisin üretimi, bakterinin büyümesine paralel olarak gerçekleşmektedir (Şekil 3.2). Fermentasyonun ilk 8 saatinde artan nisin konsantrasyonu, 8. saatte 0.58 IU/ml'ye ulaşmıştır. Fermentasyonun 16. saatinde en yüksek nisin üretimine (4.98 IU/ml) ulaşılmıştır.

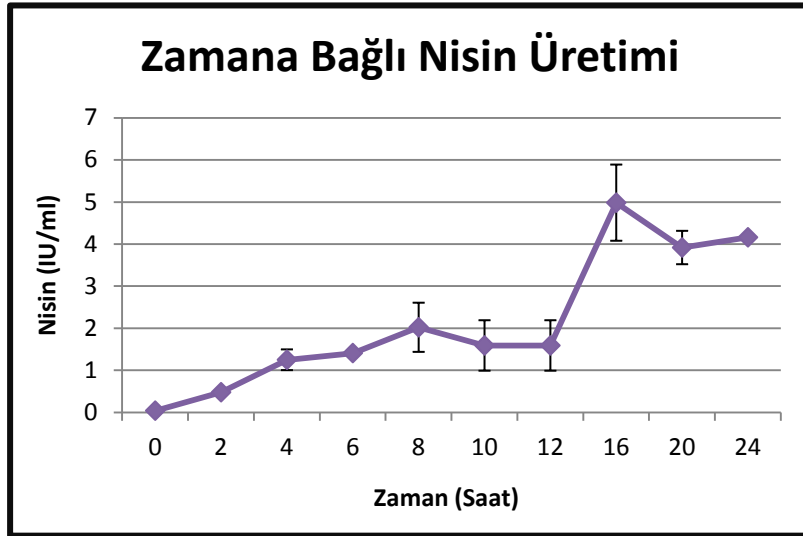


A.



B.

Şekil 3.1. *L. lactis* büyüme eğrisi hem spektrofotometrik olarak (A) hem de canlı hücre sayısı (B) belirlenerek oluşturulmuştur. Dikey çizgiler standart hataları göstermektedir. Veriler 3 kez tekrarlanan deneyler sonucu elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Zamana bağlı nisin üretimi. Dikey çizgiler standart hataları göstermektedir. Veriler 3 kez tekrarlanan deneyler sonucu elde edilmiştir.

3.1.1. Nisin Üretimine Besiyerindeki Kükürt Konsantrasyonunun Etkisi

Nisin molekülünün yapısında kükürt atomu içeren sistein aminoasitleri yer almaktadır. Bu sebeple besiyerine dışarıdan eklenen kükürtün, hücrelerin nisin üretimi üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Hücrelerin üretildikleri besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda kükürt eklenerek nisin üretimlerine bakılmıştır (Tablo 3.1). Sonuçlar incelendiğinde, kükürt konsantrasyonundaki artışın, *L. lactis*'in nisin üretimini etkilemediği görülmüştür.

Tablo 3.1. Besiyerindeki farklı kükürt konsantrasyonlarının *L. lactis*'in nisin üretimi üzerine etkisi.

Kükürt Konsantrasyonu	1. Deneme (Zon Çapı)	2. Deneme (Zon Çapı)
Kontrol (SGM17) 0.25 g/L MgSO₄	11 mm	11 mm
0.5 g/L MgSO₄ (SGM17 + 0.25 g/L MgSO₄.7H₂O)	11 mm	11 mm
0.75 g/L MgSO₄ (SGM17 + 0.5 g/L MgSO₄.7H₂O)	11 mm	11 mm
1 g/L MgSO₄ (SGM17 + 0.75 g/L MgSO₄.7H₂O)	11 mm	11 mm

3.1.2. Nisin Üretimine *B. thuringiensis* ve *S. coelicolor* Kültürlerinin Etkisi

Literatürde sekonder metabolitlerin üretim verimlerinin artırılmasında türler arası etkileşimin kullanılabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Luti ve

Mavituna, 2011). Bu sebeple bu çalışma kapsamında *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimleri üzerine *B. thuringiensis* ve *S. coelicolor* kültürlerinin etkisi incelenmiştir. *L. lactis* hücrelerinin; *B. thuringiensis* süpernatantını, *B. thuringiensis* canlı hücrelerini veya *B. thuringiensis* ölü hücrelerini içeren SGM17 besiyerlerine ekilmesinin ardından, 16 saatlik inkübasyon süresinin sonunda nisin üretimleri belirlenmiştir (Tablo 3.2). Sonuçlar, besiyerlerinde ölçülen zon çapları olarak verilmiştir. Tablo 3.2’de görüldüğü üzere elde edilen zon çapları (11.5 mm) aynı olduğundan, besiyerine eklenen *B. thuringiensis* canlı ya da ölü hücrelerinin ve kültür süpernatantının, *L. lactis* bakterisinin nisin üretimini etkilemediği görülmüştür.

Tablo 3.2. Besiyerindeki *B. thuringiensis* süpernatantı ya da canlı/ölü hücrelerinin *L. lactis*’in nisin üretimi üzerine etkisi.

	1. Deneme (Zon Çapı)	2. Deneme (Zon Çapı)
<i>L. lactis</i> – Kontrol	11.5 mm	11.5 mm
<i>L. lactis</i> – <i>B. thuringiensis</i> süpernatantı	11.5 mm	11.5 mm
<i>L. lactis</i> – % 0.9 NaCl’de çözülmüş <i>B. thuringiensis</i> peleti	11.5 mm	11.5 mm
<i>L. lactis</i> – % 0.9 NaCl’de çözülmüş ve ısı ile inaktivasyon yapılmış <i>B. thuringiensis</i> peleti	11.5 mm	11.5 mm

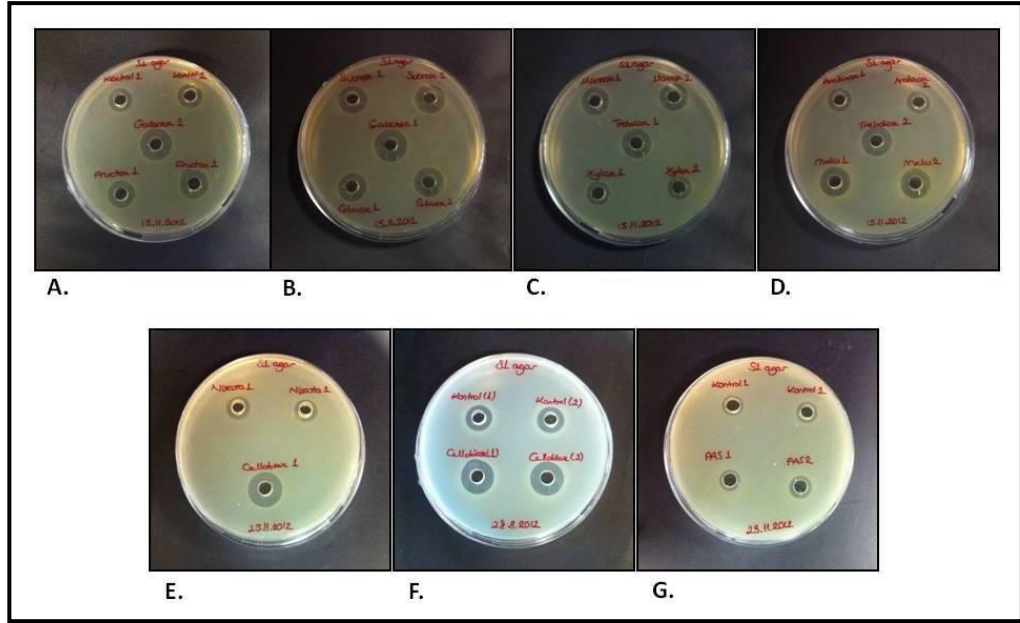
L. lactis hücrelerinin, *S. coelicolor* süpernatantını, *S. coelicolor* canlı veya ölü hücrelerini içeren SGM17 besiyerlerine ekilmesinin ardından, 16 saatlik inkübasyon süresinin sonunda nisin üretimi belirlenmiştir (Tablo 3.3). Elde edilen zon çapları (12 mm) eşit olduğundan, besiyerindeki *S. coelicolor* canlı veya ölü hücrelerinin, *L. lactis*’in nisin üretimi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Ancak SGM17 besiyerine eklenen *S. coelicolor* süpernatantı, *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimlerini olumsuz yönde etkilemiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Besiyerindeki *S. coelicolor* süpernatantı ya da canlı/ölü hücrelerinin *L. lactis*'in nisin üretimi üzerine etkisi.

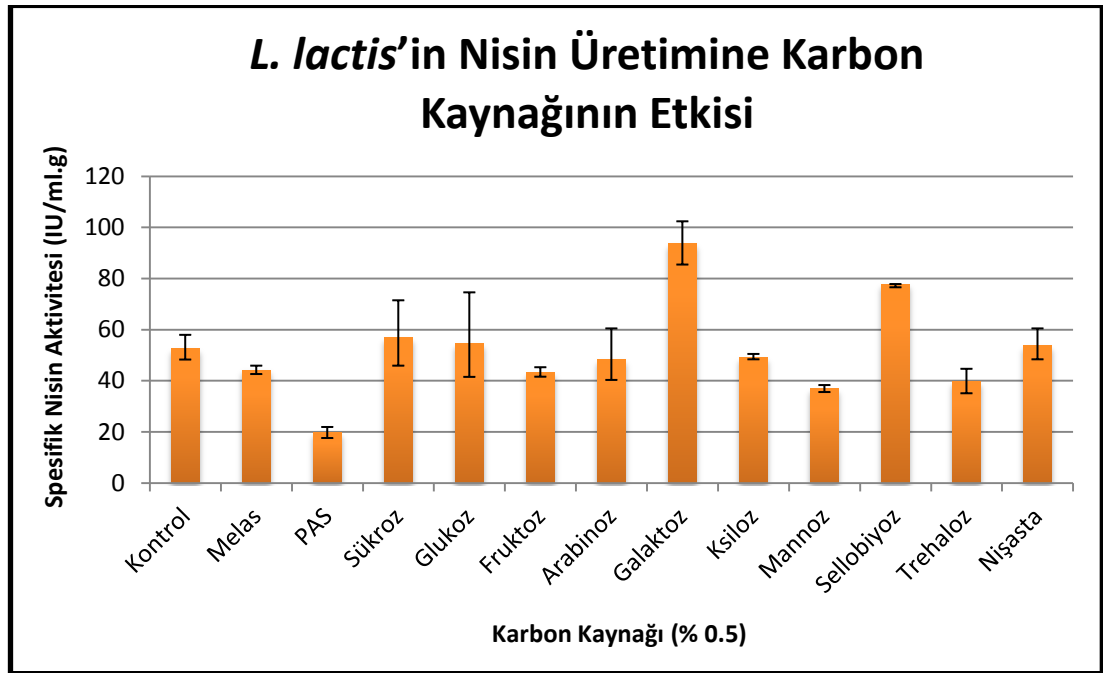
	1. Deneme (Zon Çapı)	2. Deneme (Zon Çapı)
<i>L. lactis</i> – Kontrol	12 mm	12 mm
<i>L. lactis</i> – <i>S. coelicolor</i> süpernatantı	10 mm	9.5 mm
<i>L. lactis</i> – % 0.9 NaCl'de çözülmüş <i>S. coelicolor</i> peleti	12 mm	12 mm
<i>L. lactis</i> – % 0.9 NaCl'de çözülmüş ve ısı ile inaktivasyon yapılmış <i>S. coelicolor</i> peleti	12 mm	12 mm

3.1.3. Nisin Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının, *L. lactis* ATCC 11454'ün nisin üretimini nasıl etkilediğini göstermek için; *L. lactis* hücreleri glukoz, sükroz, galaktoz, fruktoz, mannoz, trehaloz, arabinoz, ksiloz, melas, nişasta, sellobiyoz ve PAS'ın ayrı ayrı eklendiği 12 farklı besiyerinde büyütülmüştür. Daha sonra bu hücrelerin nisin üretimleri ölçülmüştür (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).



Şekil 3.3. *L. lactis*'in nisin üretimine **A-B.** glukoz, sükröz, galaktoz ve fruktozun; **C-D.** mannoz, trehaloz, arabinoz, ksiloz ve melasın; **E-F.** nişasta ve sellobiyozun; **G.** PAS'ın etkisi.



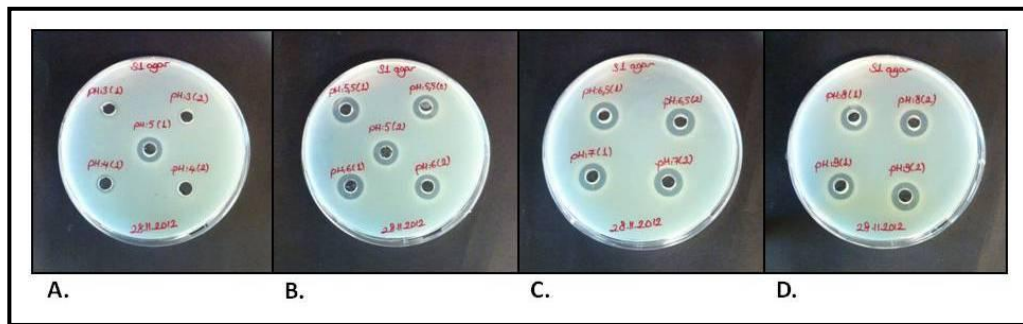
Şekil 3.4. *L. lactis*'in nisin üretimine karbon kaynağının pH 7'de ve 30 °C'teki etkisi. Dikey çizgiler standart hataları göstermektedir. Veriler 2 kez tekrarlanan deneyler sonucu elde edilmiştir.

Bu deneyde kontrol, dışarıdan herhangi bir karbon kaynağı eklenmemiş M17 besiyerinde büyütülen *L. lactis*'in ürettiği nisin miktarıdır. Elde edilen sonuçlara

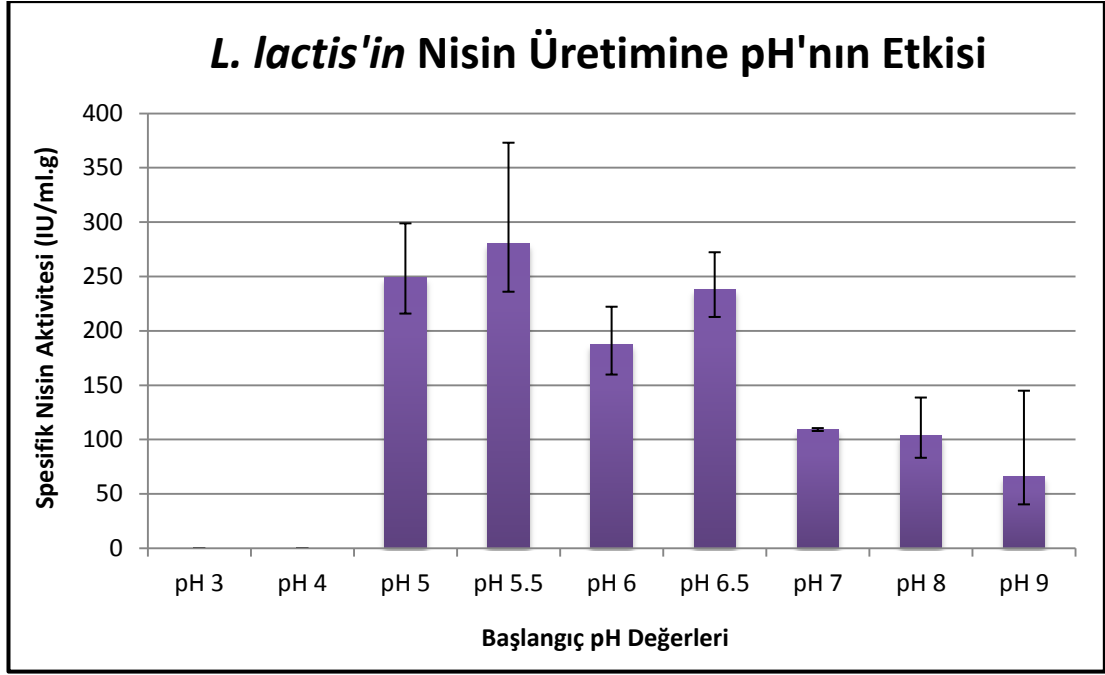
göre; kontroldeki nisin üretimi göz önüne alındığında, besiyerine karbon kaynağı olarak galaktoz ve sellobiyoz eklenmesi, *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimini arttırmaktadır. Sayılan karbon kaynaklarının dışında besiyerine karbon kaynağı olarak eklenen arabinoz, ksiloz, melas, PAS, fruktoz, mannoz ve trehaloz ise nisin üretiminde azalmaya sebep olmaktadır. Sükroz (56.78 IU/ml), glukoz (54.51 IU/ml) ve nişastanın (53.75 IU/ml) nisin üretimi üzerine etkilerinin kontrole (52.68 IU/ml) çok yakın olduğu bulunmuştur (Şekil 3.4). Farklı karbon kaynakları eklenen besiyerlerinde 1 g hücrenin ürettiği nisin miktarları karşılaştırıldığında; en yüksek nisin üretimi galaktoz (93.53 IU/ml) eklenen besiyerinin kullanılması ile gerçekleşirken, en düşük nisin üretimi ise besiyerine PAS (19.83 IU/ml) eklenmesi ile meydana gelmiştir.

3.1.4. Nisin Üretimine pH'nın Etkisi

L. lactis'in farklı başlangıç pH'ları olan M17 besiyerlerinde büyütülmesi sonrası yapılan nisin üretimi deneylerinin sonuçları, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da görülmektedir. *L. lactis* hücreleri tarafından üretilen en yüksek nisin konsantrasyonu pH 5.5'te (249.03 IU/ml), en düşük nisin konsantrasyonu ise pH 9'da (108.83 IU/ml) gözlenmiştir. *L. lactis* hücreleri, başlangıç pH'sı 3 ve 4 olan besiyerlerinde üreyememişlerdir.



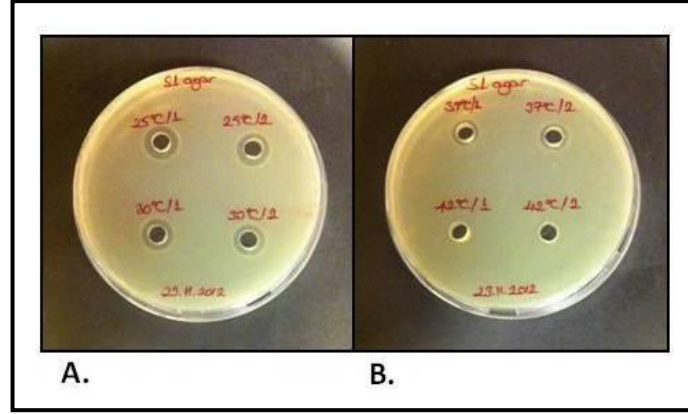
Şekil 3.5. *L. lactis*'in nisin üretimine **A-B.** pH 3, 4, 5, 5.5 ve 6'nın; **C-D.** pH 6.5, 7, 8 ve 9'un etkisi.



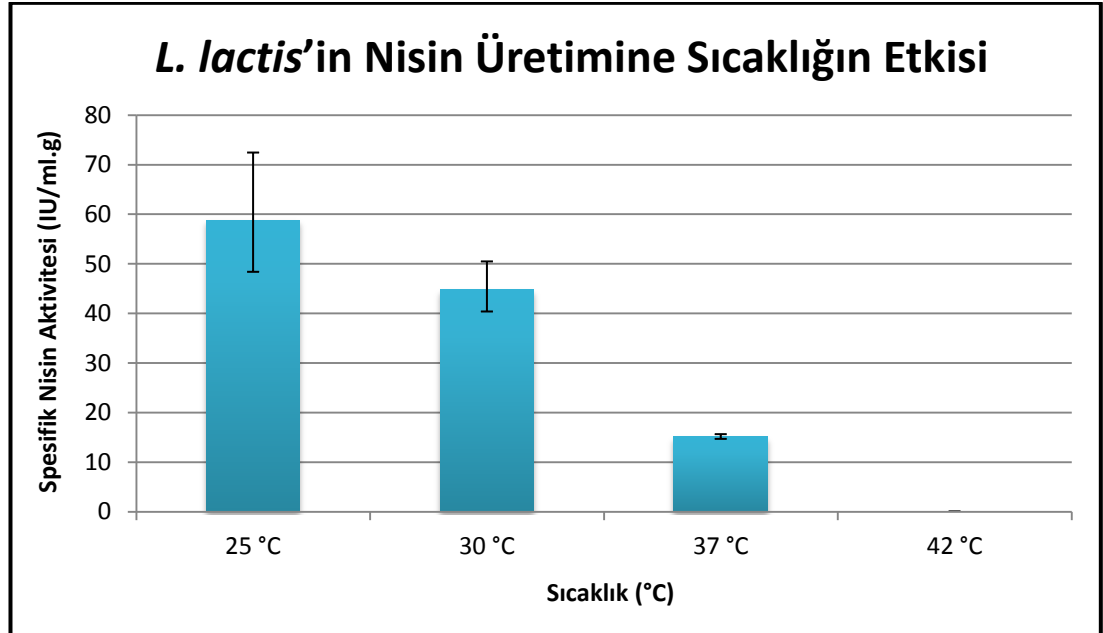
Şekil 3.6. *L. lactis*'in nisin üretimine pH'nın 30 °C'taki etkisi. Dikey çizgiler standart hataları göstermektedir. Veriler 2 kez tekrarlanan deneyler sonucu elde edilmiştir.

3.1.5. Nisin Üretimine Sıcaklığın Etkisi

L. lactis'in nisin üretimine sıcaklığın etkisini gözlemleyebilmek için, M17 besiyerlerine ekilen hücreler farklı sıcaklıklarda büyütülmüş, sonrasında nisin üretimleri ölçülmüştür (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). En fazla nisin, 25 °C'ta (72.44 IU/ml) üretildiği gözlenmiştir. *L. lactis* ATCC 11454 suşunun nisin üretimi, 25 °C'tan başlayarak sıcaklığın artışı ile birlikte azalmakta, 42 °C'ta ise tamamen durmaktadır. Hücreler 42 °C'ta üredikleri halde nisin üretmemişlerdir.



Şekil 3.7. *L. lactis*'in nisin üretimine A. 25 ve 30 °C'in, B. 37 ve 42 °C'in etkisi.



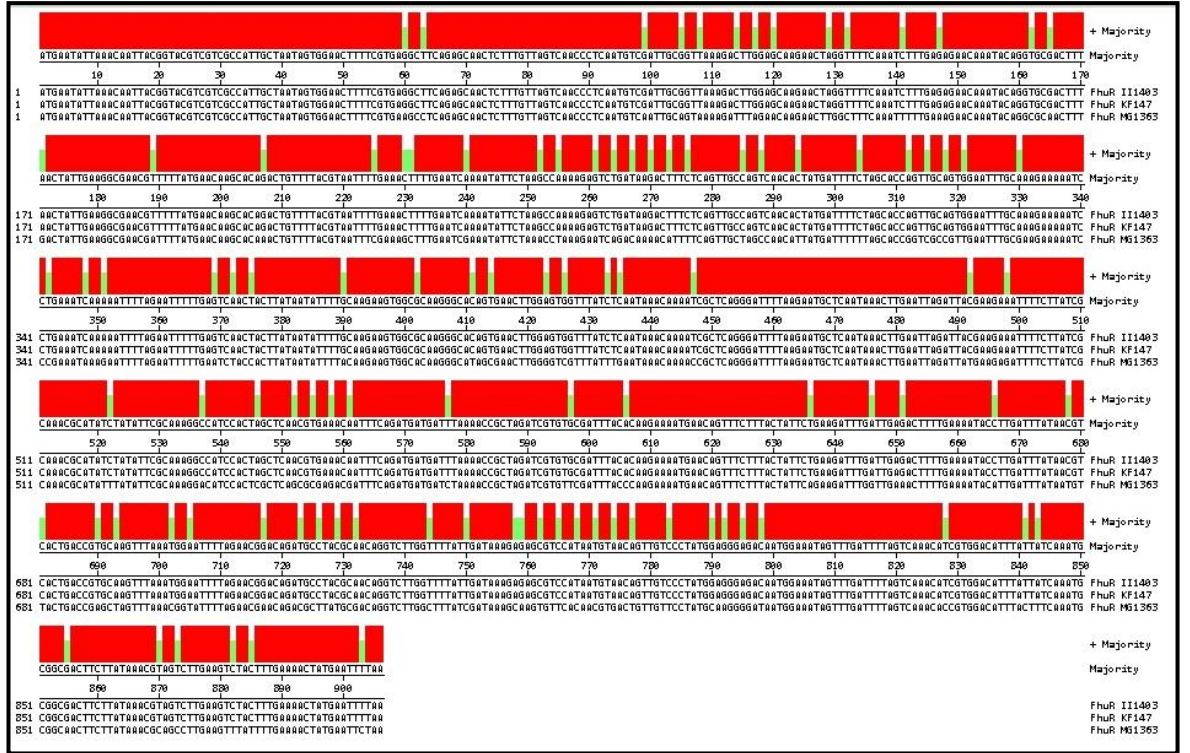
Şekil 3.8. *L. lactis*'in nisin üretimine sıcaklığın pH 7'deki etkisi. Dikey çizgiler standart hataları göstermektedir. Veriler 2 kez tekrarlanan deneyler sonucu elde edilmiştir.

3.2. *fhuR* Geninin Çoklu Kopyalarının *L. lactis*'in Nisin Üretimine Etkisi

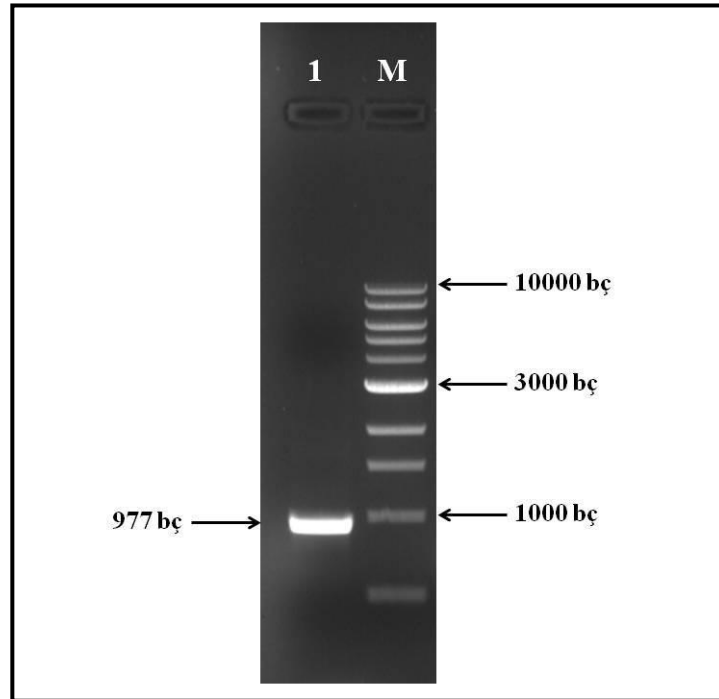
3.2.1. *fhuR* Geninin PCR ile Çoğaltılması

L. lactis ATCC 11454 suşunun genom dizisi bilinmediğinden, *fhuR* geninin PCR ile çoğaltılabilmesi için dejenere primerler tasarlanmıştır. Dejenere primerleri hazırlamak için *L. lactis* MG1363, *L. lactis* IL1403 ve *L. lactis* KF147'nin genom dizileri birbirleriyle eşleştirilerek *fhuR* geni için korunmuş bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 3.9). Tespit edilen bu korunmuş bölgeler kullanılarak genin başından ve sonundan olmak üzere F ve R primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin 5' uçlarına pMG36e vektörünün çoklu klonlama bölgesine uygun şekilde yerleşmesini sağlayacak restriksiyon enzim tanıma bölgeleri (*Pst*I) eklenmiştir. Ayrıca yönlü klonlama yapabilmek için, bir başka bir F primer daha tasarlanarak 5' ucuna *Xba*I kesim bölgesi eklenmiştir.

Bu primerlerin ve kalıp olarak *L. lactis* ATCC 11454 genomik DNA'sının kullanılması ile olası *fhuR* geninin çoğaltılması için PCR gerçekleştirilmiştir. Phusion DNA polimeraz enzimi ile 50 °C primer tutunma sıcaklığında, *fhuR* geni için özgül amplikon elde edilmiştir (Şekil 3.10). PCR ürününün dizi analizi yapılmış ve BLAST programı aracılığıyla, çoğaltılan amplikonun *L. lactis fhuR* geni olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.9: *L. lactis* MG1363, *L. lactis* IL1403 ve *L. lactis* KF147'nin genom dizilerinin MegAlign programında birbirleriyle eşleştirilmesi. % 100 korunmuş bölgeler kırmızı ile gösterilmiştir.



Şekil 3.10. *fhuR* genine ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. **M.** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1.** *fhuR* (977 bp).

```

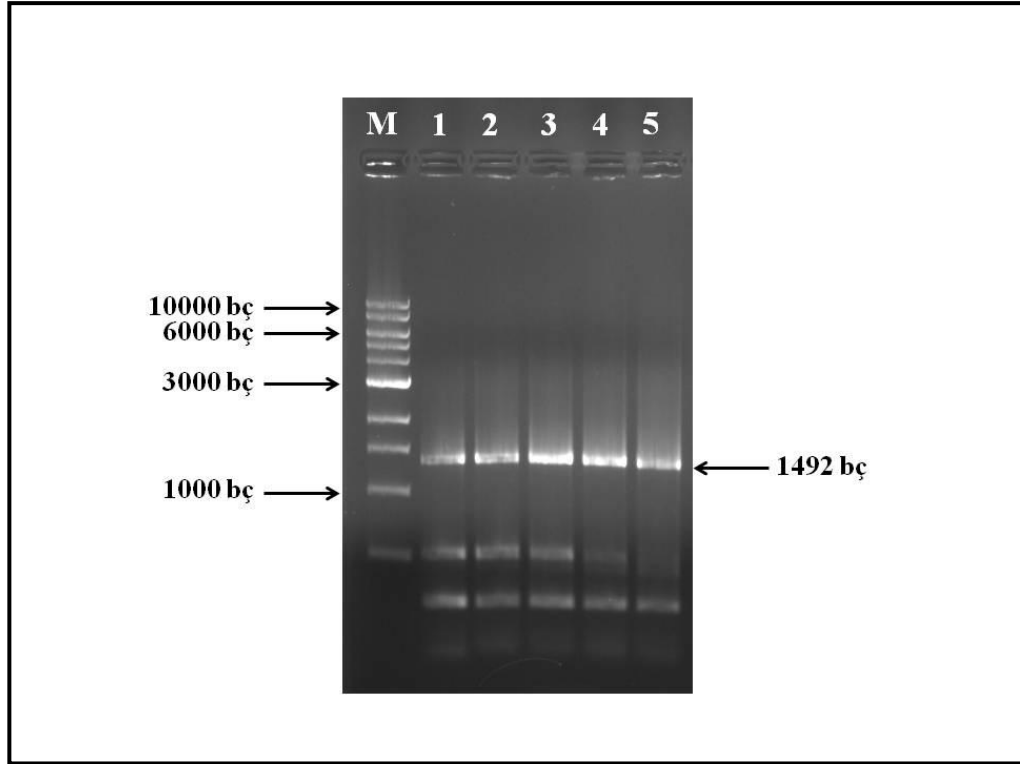
5' ATGAATATTAACAATTACGGTACGTCGTCGCCATTGCTAATAGTGGAACCTTTTCGTGAGGCTTCAGAGCAACT
CTTTGTTAGTCAACCCCTCAATGTCGATTGCGGTTAAAGACTTGAGCAAGAAGCTAGGTTTTCAAATCTTTGAGAGA
ACAAATACAGGTGCGACTTTAACTATTGAAGGCGAACGTTTTTATGAACAAGCACAGACTGTTTTACGTAATTTTG
AAACTTTTGAATCAAAATATTCTAAGCCAAAAGAGTCTGATAAGACTTTCTCAGTTGCCAGTCAACACTATGATTT
TCTAGCACCAGTTGCAGTGGAATTTGCAAAGAAAAATCCTGAAATCAAAAATTTTAGAATTTTGTAGTCAACTACT
TATAATATTTTGCAAGAAGTGGCGCAAGGGCACAGTGAAGTTGGAGTGGTTTATCTCAATAAACAAAATCGCTCAG
GGATTTTAAGAATGCTCAATAAACTTGAATTAGATTACGAAGAAATTTTCTTATCGCAAACGCATATCTATATTCG
CAAAGGCCATCCACTAGCTCAACGTGAAACAATTTTCTAGATGATGATTTAAACCGCTAGATCGTGTGCGATTTACA
CAAGAAAATGAACAGTTTCTTTACTATTCTGAAGATTTGATTGAGACTTTTGAAAATACCTTGATTTATAACGTCA
CTGACCGTGCAAGTTTAAATGGAATTTTAGAACGGACAGATGCCTACGCAACAGGTCTTGGTTTTATTGATAAAGA
GAGCGTCCATAATGTAACAGTTGTCCCTATGGAGGGAGACAATGGAATAAGTTTGTATTTAGTCAAACATCGTGGA
CATTATTTATCAAATGCGGCGACTTCTTATAAACGTAGTCTTGAA 3'

```

Şekil 3.11. PCR ile elde edilen amplikonun DNA dizisi (*fhuR* geni).

3.2.2. Ampisilin Direnç Geninin (*bla*) PCR ile Çoğaltılması

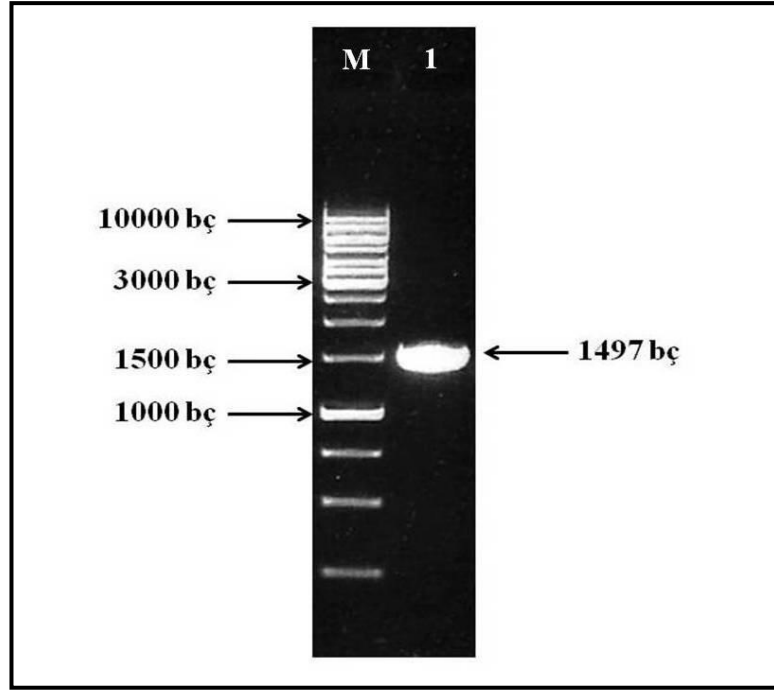
Yaban tip *E. coli* DH5α hücrelerinin oldukça yüksek konsantrasyonlarda eritromisin içeren besiyerlerinde üreyor olmaları, üzerinde eritromisin direnç geni bulunan pMG36e plazmidini taşıyan hücrelerin yaban tip hücreler arasından seçilememesine sebep olmuştur. Bu yüzden pMG36e plazmidine ampisilin direnç geninin (*bla*) klonlanmasına karar verilmiştir. 5' uçlarında *EcoRI* enzim kesim bölgesi bulunan primerler ve pBluescript SK(-) plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı PCR ile olası *bla* geni çoğaltılmıştır (Şekil 3.12). PCR ürünü, *EcoRI* ile kesildikten sonra, aynı enzim ile kesilmiş pMG36e plazmidile ligasyon ile birleştirilmiştir. Yapılan hiçbir denemede, ampisilinli besiyerinde üreyen transformant/transformantlar elde edilmemiştir. PCR ile elde edilen DNA fragmanının, *bla* genine ait olmayabileceği sonucuna varılarak (DNA dizi analizi yapılmamıştır) başka bir direnç geninin pMG36e plazmidine klonlanmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.12. Ampisilin direnç genine ait olduğu düşünülen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünüşleri. **M.** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1.** Olası ampisilin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); **2.** Olası ampisilin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); **3.** Olası ampisilin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C); **4.** Olası ampisilin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 67.5 °C); **5.** Olası ampisilin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 70 °C).

3.2.3. Kanamisin Direnç Geninin (*kan*) PCR ile Çoğaltılması

E. coli'de seçicilik sağlamayan eritromisin direnç geni dışında, ikinci bir direnç geninin pMG36e plazmidinde bulunması gerekmektedir. Ampisilin direnç geniyle yapılan denemeler başarısızlıkla sonuçlandığından, kanamisin direnç geninin PCR ile çoğaltılıp pMG36e plazmidine klonlanmasına karar verilmiştir. Kanamisin direnç geni, pSKdesAKn plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 3.13). PCR ürününün büyüklüğü moleküler DNA belirteci ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır.



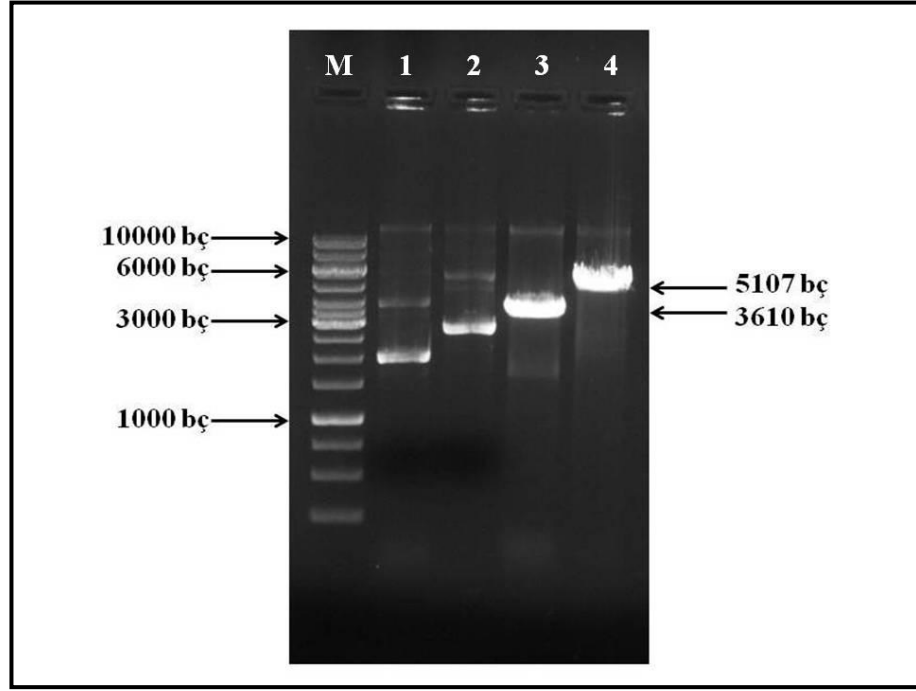
Şekil 3.13. Kanamisin direnç genine ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. **M.** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1.** Kanamisin direnç geni (1497 bp).

3.2.4. Kanamisin (*kan*) Geninin pMG36e Plazmidine Klonlanması

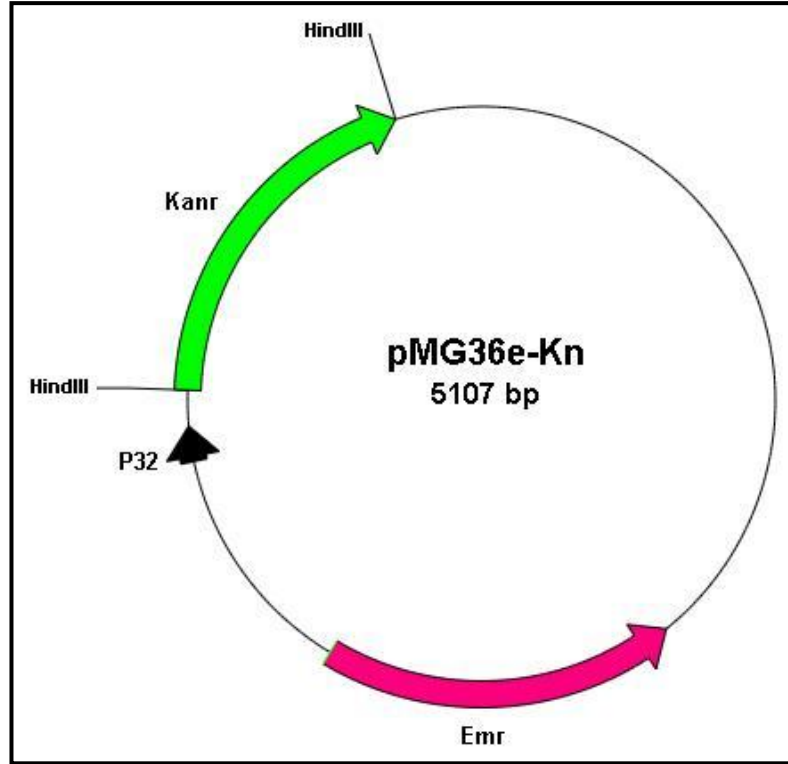
Kanamisin direnç geni (*kan*) Phusion DNA Polimeraz enziminin özelliğinden dolayı küt uçlu PCR ürünü olduğundan, ligasyon öncesi herhangi bir restriksiyon enzim kesimi gerektirmezken; pMG36e plazmidi *Hind*III restriksiyon enzimi ile kesilmiş, sonrasında ise oluşan yapışkan uçları küt uca çevirmek amacıyla Klenow enzimi kullanılmıştır. Jelden saflaştırılan DNA fragmanları ligaz enzimi ile birleştirilmiş ve ligasyon ürünleri *E. coli* DH5 α 'ya aktarılmıştır. Kanamisin içeren besiyerinde üreyen transformantlardan izole edilen plazmitler, uygun restriksiyon enzimleri (*Sac*I ve *Sal*I) ile kesilerek rekombinant plazmitler taranmıştır (Şekil 3.14). Bu çalışmada, oluşturulan yeni plazmide pMG36e-Kn adı verilmiştir (Şekil 3.15)

Plazmidlerin doğrulanması amacıyla seçilen *Sac*I ve *Sal*I restriksiyon enzimleri, hem pMG36e hem de oluşturulması amaçlanan pMG36e-Kn plazmidini tek bir noktadan keserek jelde plazmidin büyüklüğünde tek bir bant gözlenmesine sebep olmaktadır. Kesim sonucu elde edilmesi beklenen bant büyüklükleri; pMG36e plazmidinin kesimi sonucu 3610 bp, pMG36e-Kn plazmidinin kesimi

sonucu ise 5107 bç'dir. Şekil 3.14'te pMG36e ve olası pMG36e-Kn plazmidlerinin *SacI* restriksiyon enzimi ile kesimleri sonucunda elde edilen sırasıyla 3610 ve 5107 bç olan bantlar gözlenmektedir. pMG36e ve olası pMG36e-Kn plazmitlerinin *SalI* enzimi ile kesimleri sonucu elde edilen bantlar da (sırasıyla 3610 ve 5107 bç) Şekil 3.14'te verildiği gibi gözlenmektedir.



Şekil 3.14. pMG36e ve olası pMG36e-Kn plazmidlerinin restriksiyon enzim kesim sonuçları. **M.** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1.** pMG36e plazmidi (kesilmemiş) **2.** pMG36e-Kn plazmidi (kesilmemiş) **3.** pMG36e plazmidinin *SacI* ile kesimi (3610 bç); **4.** pMG36e-Kn plazmidinin *SacI* ile kesimi (5107 bç).



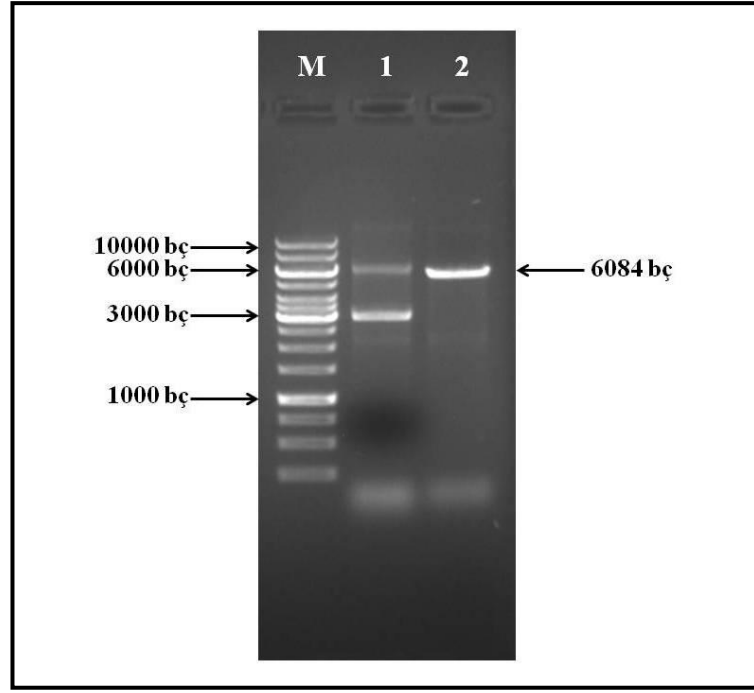
Şekil 3.15. pMG36e plazmidine Kanamisin direnç geninin (*kan*) klonlanması sonucu oluşan pMG36e-Kn rekombinant plazmidinin şematik görünümü.

3.2.5. *fhuR* Geninin pMG36e-Kn Plazmidine Klonlanması

fhuR PCR ürünü ve pMG36e-Kn plazmidi *XbaI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jelden saflaştırılmışlardır. Tekrar agaroz jelde yürütülerek konsantrasyonları belirlenen *fhuR XbaI-PstI* fragmanı ve pMG36e-Kn *XbaI-PstI* plazmidi ile ligasyon reaksiyonları kurulmuştur. Ligasyon ürünleri, *E. coli* DH5α suşunun transformasyonunda kullanılmıştır.

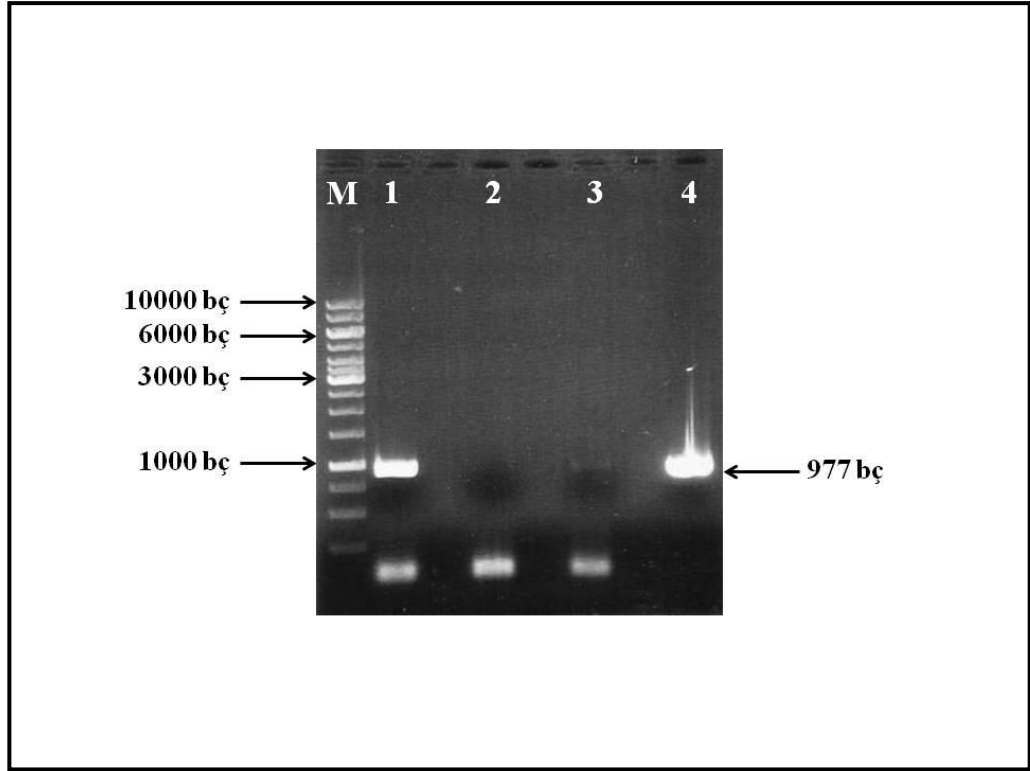
Elde edilen transformantlardan plazmit izolasyonu yapılmış ve rekombinant plazmitler restriksiyon enzim kesimi (*SacI*) (Şekil 3.16), PCR reaksiyonu (Şekil 3.17) ve dizi analizi ile doğrulanmışlardır. Bu çalışma sonucunda oluşturulan yeni plazmid pMG36e-Kn-*fhuR* adı verilmiştir (Şekil 3.18).

pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidinin *SacI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu elde edilmesi beklenen tek bandın büyüklüğü 6084 bp'dir. Şekil 3.16'da görüldüğü gibi 2. kuyudaki plazmid pMG36e-Kn-*fhuR*'dir.



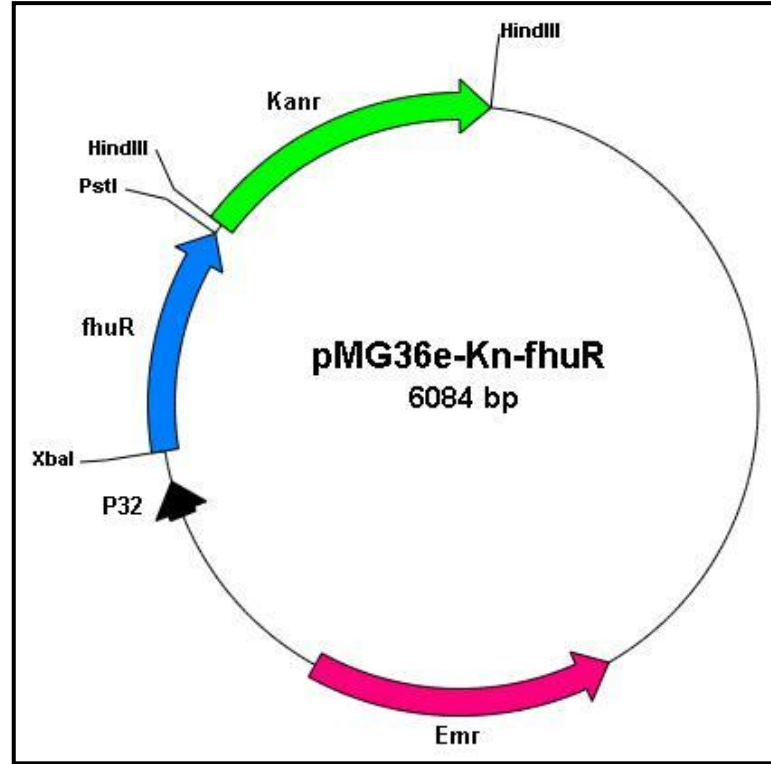
Şekil 3.16. pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidinin restriksiyon enzim kesim sonuçları. **M.** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1.** pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidi (kesilmemiş); **2.** pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidinin *SacI* ile kesimi (6084 bp).

pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidinin PCR ile doğrulanması için kalıp olarak 4 farklı DNA (*L. lactis* genomik DNA'sı, pMG36e plazmit DNA'sı, pMG36e-Kn plazmit DNA'sı ve pMG36e-Kn-*fhuR* plazmit DNA'sı) kullanılırken, primer olarak *fhuR* geni için tasarlanan ileri (2) ve geri primerler kullanılmıştır. *L. lactis* yaban suşu genomik DNA'sı ve pMG36e-Kn-*fhuR* plazmit DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucunda jelde *fhuR* genine ait bant gözlenirken, pMG36e plazmit DNA'sı ve pMG36e-Kn plazmit DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonları sonucu jelde bant gözlenmemiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidindeki *fhuR* geninin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen PCR reaksiyonları. **M.** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1.** *L. lactis* genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu; **2.** pMG36e plazmit DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu; **3.** pMG36e-Kn plazmit DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu; **4.** pMG36e-Kn-*fhuR* plazmit DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu.

Enzim kesimi ve PCR reaksiyonu ile *fhuR* geninin plazmitteki varlığı ispat edilmiş, ancak *fhuR*'nin, pMG36e üzerinde bulunan P32 promotorunun altına doğru yönde yerleşip yerleşmediği belirlenememiştir. Bunun için rekombinant plazmidin DNA'sının dizilenmesine ihtiyaç duyulmuştur. Dizi analizi sonuçlarına göre *fhuR* geninin pMG36e-Kn plazmidine P32 promotoruyla aynı yönde yerleştiği belirlenmiştir.



Şekil 3.18. Rekombinant pMG36e-Kn plazmidine *fhuR* geninin klonlanması sonucu oluşan pMG36e-Kn-*fhuR* rekombinant plazmidinin şematik görünümü.

3.2.6. pMG36e-Kn-*fhuR* Plazmidinin *L. lactis*'e Aktarılması

E. coli DH5 α suşunda hazırlanan, sonrasında metilasyon yoksunu *E. coli* ET12567 suşuna aktarılan ve bu suştan izole edilen pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidinin *L. lactis* hücrelerine aktarılması için elektroporasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Elektrokompentan hücreler ilk olarak Holo ve Nes (1995)'in yöntemi ile hazırlanmış, ancak bu yöntemle hazırlanan hücrelerin kullanıldığı elektroporasyon denemelerinde başarı sağlanamamıştır. *L. lactis* elektrokompentan hücrelerin hazırlanmasında denenen bir diğer yöntem, Powell ve ark. (1988) tarafından geliştirilmiştir. Ancak bu hücreler kullanılarak yapılan elektroporasyon denemeleri de başarılı olmamıştır. Son olarak *L. lactis* elektrokompentan hücreleri hazırlamak için, Papagianni ve ark.'nın 2007 yılında yayınladıkları yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem ile hazırlanan elektrokompentan hücrelerle yapılan elektroporasyon denemelerinde yine başarı sağlanamamıştır. Farklı yöntemlerle hazırlanan elektrokompentan hücrelerle yapılan bütün denemelerde farklı gerilim ve direnç değerleri de kullanılmıştır (Tablo 2.7).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nisin, 1969 yılında Gıda ve Tarım Organizasyonu/Dünya Sağlık Organizasyonu (FAO/WHO) tarafından güvenli olduğu onaylandığından beri gıdaların korunması amacıyla kullanılmaktadır. Bu tarihten günümüze kadar geçen süre içerisinde nisin, gıda sektöründe güvenle kullanılan gıda katkı maddeleri arasında yerini almıştır. Bunun en önemli nedeni, insanlar için tamamen güvenli olmasıdır. Bu denli önemli bir molekülün üretim veriminin artırılması bu çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır.

Çalışmamız kapsamında öncelikle *L. lactis* ATCC 11454 hücrelerinin büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Büyüme eğrisinin oluşturulmasında hem spektrofotometrik ölçüm yapılarak hem de canlı hücre sayısı belirlenerek iki farklı grafik hazırlanmıştır. *L. lactis*'in büyüme eğrisinin oluşturulması ve nisin üretiminin belirlenmesi eş zamanlı olarak gerçekleştirilerek büyüme eğrisi ile nisin üretimi ilişkilendirilmiştir. Beklendiği üzere primer metabolit kinetiği gösteren nisin üretimi, bakterinin büyümesine paralel olarak gerçekleşmiştir.

Nisin üretim veriminin artırılması için öncelikle besiyerinin içeriğinin değiştirilmesi yoluna gidilmiştir. Nisin molekülünün yapısında kükürt atomu içeren sistein aminoasitleri yer aldığından besiyerinde bulunan kükürt konsantrasyonunun, hücrelerin nisin üretimi üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu yüzden ilk olarak besiyerinin kükürt konsantrasyonları değiştirilmiş ve bu değişimin *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren besiyerlerinde geliştirilen *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimlerinde herhangi bir değişime rastlanmamıştır.

Luti ve Mavituna, 2011 yılında yaptıkları çalışmada, *S. coelicolor* A3 (2) suşunun ürettiği antimikrobiyal, immünsupresif ve antikanser özellikler gösteren bir molekül olan undesilprodigiosin üretimi üzerinde *B. subtilis* hücrelerinin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *B. subtilis* canlı ya da ölü hücreleri *S. coelicolor* hücrelerinin undesilprodigiosin üretimini yaban tipe göre % 256 oranında arttırmıştır. Araştırmacılar bu sonuçlar ışığında, sekonder

metabolitlerin üretim verimlerinin artırılmasında türler arası etkileşimin kullanılabileceğini gözler önüne sermişlerdir. Tez çalışmasında, nisin üretim veriminin artırılması amacıyla besiyerlerine, *B. thuringiensis* ve *S. coelicolor* kültürlerinin süpernatantları, canlı hücreleri veya ölü hücreleri eklenmiş ve *L. lactis* hücreleri bu besiyerlerinde inkübe edilmişlerdir.

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, *B. thuringiensis* süpernatantı, canlı hücreleri veya ölü hücrelerinin, *L. lactis* bakterisinin nisin üretimi üzerine olumlu ya da olumsuz yönde herhangi bir etkisinin bulunmadığını göstermiştir.

L. lactis hücrelerinin, *S. coelicolor* süpernatantı, canlı hücreleri veya ölü hücrelerini içeren farklı besiyerlerinde büyümelerini takiben yapılan nisin ölçüm sonuçlarına göre; besiyerindeki *S. coelicolor* canlı ya da ölü hücrelerinin, *L. lactis* bakterisinin nisin üretimi üzerine olumlu ya da olumsuz yönde herhangi bir etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Ancak besiyerine eklenen *S. coelicolor* süpernatantının, *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimini olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. Bu durumun, *S. coelicolor* kültürlerinin süpernatantında bulunan antibiyotiklerin *L. lactis* hücrelerini inhibe etmesinden veya öldürmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında, nisin üretiminin en yüksek olduğu karbon kaynağı, pH ve sıcaklık da tespit edilmiştir. Besiyerindeki karbon kaynağının, *L. lactis* hücrelerinin nisin üretiminde önemli olduğu bilinmektedir. Hücreler farklı karbon kaynakları içeren besiyerlerinde üretildiğinde hem hücre gelişimi hem de nisin biyosentezi etkilenmektedir.

Nisin üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisinin belirlenmesi amacıyla denenen karbon kaynakları arasında mono-, di- ve polisakkaritler bulunmaktadır. Kullanılan monosakkaritler; glukoz, fruktoz, arabinoz, galaktoz, ksiloz ve mannozdur. Disakkarit olarak sükroz, sellobiyoz ve trehaloz denenmiştir. Sükroz disakkaritini içeren melas ve laktoz disakkaritini içeren PAS da denenen karbon kaynakları arasındadır. Ayrıca polisakkarit olarak glukoz monosakkaritlerinin bir araya gelmesi sonucu oluşan nişasta da denenmiştir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre; besiyerine karbon kaynağı olarak % 0.5 oranında galaktoz ve sellobiyoz eklenmesi *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimini arttırırken; % 0.5 oranında arabinoz, ksiloz, fruktoz, mannoz ve trehaloz eklenmesi ise nisin üretiminde azalmaya sebep olmaktadır. Besiyerindeki son konsantrasyonu 1/20 oranında olan melas ve son konsantrasyonu 1/4 oranında olan PAS da nisin üretiminde azalmaya sebep olan diğer iki karbon kaynağıdır. Karbon kaynağı olarak sükroz, glukoz ve nişastanın besiyerine eklenmelerinin, nisin üretimini değiştirmedikleri saptanmıştır.

Farklı karbon kaynakları eklenen besiyerlerinde 1 g hücrenin ürettiği nisin miktarları karşılaştırıldığında; en yüksek nisin üretimi galaktoz eklenen besiyerinin kullanılması ile gerçekleşirken, en düşük nisin üretimi ise besiyerine PAS eklenmesi ile meydana gelmiştir.

Chandrapati ve O'Sullivan 1998 yılında yaptıkları çalışmada, *L. lactis* ATCC 11454 suşunun nisin üretimini etkileyen çeşitli karbon kaynaklarını incelemişlerdir. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara göre, glukozun tek başına nisin üretimi için, ortalama 975 IU nisin/10⁶ koü ile optimal karbon kaynağı olduğu bulunmuştur. Besiyerlerine karbon kaynağı olarak sükroz ya da fruktozun eklenmesi, nisin üretiminde glukozu göre yaklaşık 2 kat düşüşe sebep olmuştur. Glukoz ve sükrozun birlikte kullanıldıkları besiyerinde ise *L. lactis* hücreleri oldukça düşük seviyede nisin üretmişlerdir. Araştırmacılar, bu durumun sükrozun nisin üretimi üzerine baskılayıcı bir etkisinin bulunabileceği şeklinde açıklanabileceğini, ancak aynı transpozonda bulunan sükroz ve nisin genleri için elde edilen bu sonuçların merak uyandırıcı olduğunu belirtmişlerdir. Glukozun nisin üretimine etkileri ile ilgili bu çalışmada yayınlanan sonuçlar, bizim bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar ile uyum göstermemektedir. Bizim çalışmamıza göre besiyerine eklenen glukoz, nisin üretim verimini etkilememektedir. Elde ettiğimiz diğer sonuçlara göre, sükroz da nisin üretim verimini etkilemezken, fruktoz nisin üretiminde bir miktar düşüşe sebep olmaktadır.

Çalışmamız kapsamında, *L. lactis* hücrelerinin farklı başlangıç pH'larındaki besiyerlerinde büyütülerek, *L. lactis*'in nisin üretimine pH'nın etkisi gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, *L. lactis* hücreleri en çok nisini pH 5.5'te üretmişlerdir. En düşük nisin üretimi ise pH 9'da gözlenmiştir.

Literatürde son yıllarda *L. lactis* ATCC 11454 suşunun nisin üretimi üzerine pH'nın etkisini araştıran çalışmalardan biri, 2010 yılında Liu ve arkadaşları tarafından yayımlanmıştır. Bu çalışmada, pH'sı 5.25, 5.5, 5.75, 6, 6.25 ve 6.5 ± 0.05 'e ayarlanarak sabit tutulan 6 farklı fermentasyon koşulunda *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimleri incelenmiştir. 3790 ± 130 IU/ml nisin ile en yüksek seviyede nisini, pH'sı 5.75'te sabit tutulan besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücreleri üretmişlerdir. Diğer pH değerlerinde, pH 5.75'e göre daha az nisin üretimi gerçekleşmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak, tez çalışmasında da en fazla nisin üretiminin görüldüğü besiyerinin pH'sı 5.5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamız kapsamında yapılan pH deneylerinde besiyerlerinin pH'ları sabit tutulmayıp sadece başlangıç pH'ları verilen değerlere ayarlanmasına rağmen elde edilen sonuçlar, Liu ve arkadaşlarının (2010) sonuçlarıyla oldukça uyumludur.

L. lactis'in nisin üretimine sıcaklığın etkisi de bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır. Besiyerlerine ekilen *L. lactis*'in farklı sıcaklıklarda büyütülmesi sonrası yapılan nisin üretimi deneylerinin sonuçlarına göre, en fazla nisin 25 °C'ta üretilmektedir. Nisin üretimi, sıcaklığın artışı ile birlikte azalmakta, 42 °C'ta ise tamamen durmaktadır.

L. lactis hücrelerinin nisin üretim verimlerini arttırmak için yapılan bu optimizasyon çalışmalarının ardından, moleküler seviyede nisin biyosentezini arttırabilmek için ilgili genler araştırılmıştır. Wu ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada, Mu transpozisyon kompleksleri kullanılarak, *L. lactis* hücreleri rastgele mutasyona uğratılmışlardır. Araştırmacılar, elde ettikleri yaklaşık 2000 ekleme mutantını tarayarak nisin üretimlerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, 3 mutantta nisin üretimlerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Bu mutantların genetik yapıları incelendiğinde *nisB*, *rpiA* ve *fhuR* genlerinde mutasyonların olduğu saptanmıştır.

fhuR geninin kodladığı FhuR proteini, *L. lactis*'te kükürt metabolizmasının düzenlenmesinde transkripsiyonel bir aktivatör olarak görev alır. Bu protein,

düzenlediği yedi farklı operonla kükürt metabolizmasında görevli anahtar bir moleküldür. Araştırmacılar (Wu ve ark., 2009), hücrede *fhuR* geninin yokluğunun nisin üretimini sekteye uğrattığını tespit etmişlerdir. Bu durumu nisin yapı taşlarından biri olan sistein aminoasidinin dolayısı ile kükürt atomunun hücredeki eksiliği ile açıklamışlardır.

Tez çalışması kapsamında, nisin üretimini arttırabileceği düşünülerek, *fhuR* geninin çoklu kopyalarının nisin üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle *fhuR* geni PCR ile çoğaltılıp pMG36e plazmidine klonlanmaya çalışılmıştır.

fhuR genini çoğaltmak için yapılan PCR'da, *L. lactis* ATCC 11454 suşunun genom dizisi bilinmediğinden dejenere primerler hazırlanmış (5' uçlarında aynı enzim kesim bölgesi mevcut) ve kalıp olarak *L. lactis* ATCC 11454 genomik DNA'sı kullanılmıştır. Elde edilen ampikonun *fhuR* geni olduğu dizi analizi ile ispatlanmıştır.

Ancak klonlama çalışmalarında yaşanan sorunlar sebebiyle hazırlanan dejenere primerlerden F primer, 5' ucunda farklı bir enzim kesim bölgesi olacak şekilde tekrar tasarlanmıştır. Bu şekilde *fhuR* fragmanının vektöre yönlü bir şekilde klonlanması düşünülmüştür. Bu şekilde de *fhuR* geni pMG36e'ye klonlanamamıştır.

Klonlama çalışmalarında yaşanan sorunun ana sebeplerinden biri pMG36e plazmidinin *E. coli* DH5α hücrelerinden istenilen yoğunlukta elde edilememesidir. Konvansiyonel yöntemlerle ya da kitle yapılan plazmit izolasyonu denemelerinde çok düşük yoğunluklarda plazmit izole edilebilmiştir. Düşük yoğunlukta elde edilen plazmit DNA, restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası jelden saflaştırıldığında daha da azalmış, dolayısıyla çok düşük yoğunlukta plazmit ile yapılan ligasyon denemeleri başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu durum bize, pMG36e plazmitinin *E. coli* hücrelerindeki kararlılığının düşük olduğunu ve bu sebeple izolasyon sonucu elde edilen plazmitin istenilen yoğunlukta olmadığını düşündürmüştür. Ancak, Wang ve arkadaşlarının 2005 yılında yayımladıkları çalışmada, pMG36e plazmidinin hem *E. coli*'de hem de *L. lactis*'de oldukça kararlı olduğu gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada, araştırmacılar, *E. coli* JM109 suşunu 120 jenerasyon boyunca devamlı

olarak ürettiklerinde pMG36e plazmidinin genetik kararlılığının eritromisin varlığında % 100, eritromisin yokluğunda % 98 olduğunu tespit etmişlerdir. *L. lactis* MG1363/36e suşunun 100 jenerasyon boyunca devamlı olarak üretilmesi sonucu, pMG36e plazmidinin genetik kararlılık oranı ise eritromisin varlığında ve yokluğunda % 98'dir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, pMG36e plazmidinin her iki konakçıda oldukça yüksek genetik kararlılığa sahip olduğuna ve eritromisinin bu kararlılığa kaydadeğer bir etki yapmadığına dikkat çekmişlerdir.

Uzunca bir süre yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, pMG36e plazmidinin yoğun bir şekilde izole edilebilmesi için, öncelikle bir gece boyunca katı besiyerinde büyütülmesi, ardından bu taze kültürden sıvı besiyerine ekim yapılarak bir gece inkübe edilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

Klonlama çalışmalarında yaşanan diğer ana sorunlardan bir tanesi ise yaban tip *E. coli* DH5 α hücrelerinde görülen eritromisin direncidir. pMG36e plazmidi mekik bir vektör olup hem *E. coli* hem de *L. lactis* hücrelerinde replike olabilmektedir. Bu plazmitin antibiyotik direnç geni olarak taşıdığı eritromisin direnç geni (*emr*) bu iki hücre için de işlevseldir. Dolayısıyla pMG36e plazmidi kullanılarak gerçekleştirilen pek çok çalışmada eritromisin direnci hem *E. coli* hem de *L. lactis* hücrelerinde plazmiti alan hücrelerin tespitinde kullanılabilmektedir. Ancak bu çalışmada, besiyerindeki eritromisin konsantrasyonu 800 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar çıkarıldığı halde, yaban tip *E. coli* hücreleri bu besiyerlerinde üremeye devam etmişlerdir. Bu yüzden, *fhuR* geninin klonlandığı rekombinant plazmidi taşıyan suşlar saptanamamıştır. Bu sorunu çözebilmek için öncelikle yeni bir eritromisin antibiyotiği sipariş edilmiş ve hücreler üzerinde denenmiştir ancak durum değişmemiştir. Daha sonra, *E. coli* DH5 α 'da bir problem olabileceği düşünülerek, Ankara Üniversitesi'nden yaban tip *E. coli* DH5 α sağlanmış, fakat bu hücrelerin de eritromisine dirençli oldukları görülmüştür. Bunun üzerine, pMG36e vektörüne ikinci bir direnç geninin klonlanması kararlaştırılmıştır.

pMG36e plazmidine ampicilin direnç geninin (*bla*) klonlanması için, pBluescript SK(-)'nin kalıp olarak kullanıldığı PCR gerçekleştirilmiştir. PCR sonucu spesifik olmayan bantlarla beraber ampicilin direnç geninin büyüklüğüne uygun DNA fragmanı da elde edilmiştir. Jelden saflaştırılan bu fragman ile pMG36e

plazmidi ligasyon reaksiyonu ile birleştirilmiştir. Ancak transformasyon sonucunda ampisiline dirençli hiç bir *E. coli* hücresi elde edilememiştir. Bu durum, PCR’da elde edilen amplikonun ampisilin direnç geni olmayabileceğini ya da küçük olasılıkla PCR esnasında yanlış nükleotidlerin eklenerek gen dizisinin bozulduğunu düşündürmüştür. Ampisilin direnç geniyle yapılan denemeler başarısızlıkla sonuçlandığından, pMG36e plazmidine kanamisin direnç geninin klonlanmasına karar verilmiştir.

Kanamisin direnç geni (*kan*), uygun primerler ile pSKdesAKn plazmit DNA’sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu ile çoğaltılmış ve pMG36e plazmitine klonlanmıştır. Yeni plazmide, bu çalışmada, pMG36e-Kn adı verilmiştir. Ardından bu plazmide (pMG36e-Kn), *fhuR* geni klonlanarak pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidi elde edilmiştir. *fhuR* geninin üzerinde bulunduğu bu rekombinant plazmidin doğruluğu hem restriksiyon enzim kesimleriyle, hem PCR ile hem de dizi analiziyle gösterilmiştir.

pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidi, farklı elektrokompentan hücre hazırlama yöntemleriyle, *L. lactis*’e elektroporasyonla aktarılmaya çalışılmıştır. Literatürde pek çok çalışmada (Wu ve ark., 2009 ve Gerber ve Solioz, 2007) Holo ve Nes’in 1995 yılında yayımladıkları çalışma esas alınarak elektroporasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, *L. lactis* hücreleri farklı konsantrasyonlarda glisin içeren besiyerlerinde üretilmişlerdir. Besiyerine eklenen glisinin, peptidoglikan sentezinde D-alanin ile yer değiştirdiği ve biriken D-alanin içeren değiştirilmiş peptidoglikan öncüllerinin, transpeptidasyon reaksiyonunda aksaklıklara sebep olarak hücre duvarını zayıflattığı öne sürülmüştür.

Bu yöntemle ilgili esas sorun, *L. lactis* hücrelerinin glisin içeren besiyerlerinde üremelerinde yaşanan zorluklardır. Holo ve Nes (1995) bu durumu aşabilmek için, besiyerlerine ozmotik dengenin sabit tutulmasını sağlayan 0.5 M süktroz eklemişlerdir. Besiyerlerine süktrozun eklenmesi, hücrelerin % 3’e kadar glisin içeren besiyerlerinde üreyebilmelerini mümkün kılmıştır. Araştırmacılar besiyerine eklenen glisin miktarı arttıkça hücrelerin transformasyon etkinliklerinin arttığını savunmuşlardır. Ancak glisin, hücrelerin üremesini engellediğinden, besiyerinde

sükroz yokluğunda en fazla % 2, sükroz varlığında ise en fazla % 3 glisin konsantrasyonuna ulaşılabilmiştir.

Bizim çalışmamızda, besiyerlerine % 0.5, 1, 1.5 ve 2 olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda glisin eklenmiş ancak ozmotik sabitleyici sükrozun besiyerlerindeki varlığına rağmen *L. lactis* ATCC 11454 hücreleri bu besiyerlerinde ya hiç ürememiş ya da çok geç üremişlerdir. Dolayısıyla bu yöntemle elektrokompentan hücreler elde edilememiştir. Bilgimiz dahilinde, bu yöntemle elektroporasyonu gerçekleştiren çalışmaların hiç birinde, bu çalışmada kullanılan *L. lactis* ATCC 11454 kullanılmamıştır. Nitekim Holo ve Nes (1995) çalışmalarında, bazı laktokokkal suşların glisine daha da hassas olabileceklerinden söz etmişlerdir. Bu sebeple, bizim suşumuzun da glisine fazla hassas olabileceği düşünülerek bu yöntem terk edilmiştir.

Elektrokompentan hücrelerin eldesi için kullanılan bir diğer yöntem ise Powell ve arkadaşları (1988) tarafından uygulanmıştır. Bu yöntemde, *L. lactis* hücrelerinin hücre duvarlarının zayıflatılması amacıyla lizozim enzimi kullanılmıştır. Tez çalışmasında, gece boyunca üretilen hücreler, belli konsantrasyonlarda lizozim enzimi ile 37 °C'ta 20 dk inkübe edilmiş, daha sonra ise belirli yıkama aşamalarından geçirilerek elektrokompentan hücreler elde edilmiştir. Ancak bu yöntemle hazırlanan hücrelerle yapılan elektroporasyon sonucu da başarısız olmuştur. Bu sonucun, lizozim enziminin hücreleri öldürmüş olabileceğinden ya da duvar yapısı oldukça zayıf kalan hücrelerin antibiyotikli besiyerlerinde üreyemeyecek kadar güçsüz olmalarından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Elektrokompentan hücre hazırlamak için denenen son yöntem Papagianni ve arkadaşlarının (2007) yöntemidir. Bu çalışmada kullanılan hücreler, tez çalışmasında da kullanılan *L. lactis* ATCC 11454 suşudur. Araştırmacılar, bu suşun transformasyon etkinliğinin oldukça düşük olduğunun ancak kullanılan bu yöntemle oldukça etkili bir transformasyonun gerçekleştirildiğinin altını çizmişlerdir. Bu yöntemle elektrokompentan hücrelerin eldesi için, gece boyunca treonin içeren besiyerinde üretilen hücreler, LiAc ve DTT içeren çözeltide oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmişler ve akabinde çeşitli yıkama aşamalarından geçirilerek elektrokompentan hücreler haline almışlardır. Araştırmacılar, besiyerine eklenen treoninin önceki

Çalışmalarda kullanılan glisin gibi hücre duvarını zayıflattığını, ancak LiAc ve DTT'nin mekanizmasının tam olarak bilinmediğini belirtmişlerdir. Bu yönteme göre hazırlanan elektrokompetan hücrelerle yapılan elektroporasyon denemesinde de başarı sağlanamamıştır.

Çalışmamız kapsamında farklı yöntemlerle hazırlanan elektrokompetan hücrelerle yapılan bütün elektroporasyon denemelerinde, kullanılan plazmit miktarları ve direnç değerleri değiştirilerek de bir çok farklı deney gerçekleştirilmiştir. Ancak farklı yöntemlerle hazırlanan elektrokompetan hücrelerle gerçekleştirilen bir çok deneme sonucunda rekombinant plazmidi taşıyan *L. lactis* hücreleri elde edilememiştir. Dolayısıyla pMG36e-Kn-*fhuR* plazmidi *L. lactis* ATCC 11454 hücrelerine aktarılmadığından, *fhuR* geninin nisin üretimi üzerine etkisi gösterilememiştir.

zet olarak, bu çalışmada, *L. lactis* ATCC 11454 hücrelerinin nisin üretimini etkileyebilecek faktörler (kükürt konsantrasyonu, *B. thuringiensis* ve *S. coelicolor* kültürleri) araştırılmış ve nisin üretimi için optimum karbon kaynağı (galaktoz), sıcaklık (25 C) ve pH (5.5) tespit edilmiştir. Aynı zamanda, çalışma, nisin üretim veriminin arttırılması amacıyla, *L. lactis*'in kükürt metabolizmasında görevli olan *fhuR* geninin çoklu kopyalarının bakteriosin üretimine etkisini göstermek için yapılan çalışmaları da içermektedir. Rekombinant plazmit, bütün denemelere rağmen *L. lactis* ATCC 11454 hücrelerine aktarılamadığından, *fhuR* geninin nisin üretimi üzerine etkisi gösterilememiştir. *fhuR* genini içeren plazmitin *L. lactis* hücresine aktarılabilmesi için farklı yöntemlerin kullanılacağı deneyler (konjugasyon ve protoplast transformasyonu vb.), bu konuyla ilgili ileride yapılacak çalışmalar arasında öncelikli sıradadır. Bu tez alışması, *L. lactis* ATCC 11454 suşunun nisin üretimi ile ilgili yapılacak olan daha ayrıntılı araştırmalara öncülük etmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. ve Struhl, K.** 2003. Current protocols in molecular biology. *John Wiley & Sons*, New York.
2. **Benz, R., Jung, G. ve Sahl, H-G.** 1991. Mechanism of channel-formation by lantibiotics in black lipid membranes. Nisin and novel lantibiotics. 359-372. *ESCOM Science Publishers*, Leiden, Hollanda.
3. **Breukink, E., van Kraaij, C., van Dalen, A., Demel, R. A., Siezen, R. J.** 1998. The Orientation of nisin in membranes. *Biochemistry*, 37(22), 8153-8162.
4. **Chandrapati, S., O’Sullivan D. J.** 1998. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Biotechnology*, 63, 229–233.
5. **Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S. B., Kook, M. C., Kim, T. S., Hwang, J. K. ve Pyun, Y. R.** 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 225-235.
6. **Cheigh, C. I., Lee, S. J., Pyun, Y. R., Chung, Y. J., Hwang, Y. S., An, D. J., Park, H.** 2005. The effect of carbon sources on nisin Z biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 15(5), 1152–1157.
7. **Cheigh, C. I., Pyun, Y. R.** 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnology Letters*, 27, 1641–1648.
8. **Chen, H., Hoover, D. G.** 2003. Bacteriosins and their food applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, Vol. 2, 82-100.
9. **Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-88.
10. **de Kwaadsteniet, M., ten Doeschate, K. ve Dicks, L. M. T.** 2008. Characterization of the Structural Gene Encoding Nisin F, a New Lantibiotic Produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolate from Freshwater Catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(2), 547-549.

11. **Delves-Broughton, J.** 1990a. Nisin and its application as a food preservative. *Journal of the Society of Dairy Technology*. 43(3), 73-76.
12. **Delves-Broughton, J.** 1990b. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, 44, 100, 102, 104, 106, 108, 111-112, 117.
13. **Delves-Broughton, J. ve Gasson, M. J.** 1994. Nisin. Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation. *CAB International*, Wallingford, İngiltere. 99-131.
14. **Driessen, A. J. M., van den Hooven, H. W., Kuiper, W., van de Kamp, M., Sahl, H-G., Konings, R. N. H. ve Konings, W. N.** 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 34, 1606-1614.
15. **Gerber, S. D., Solioz, M.** 2007. Efficient transformation of *Lactococcus lactis* IL1403 and generation of knock-out mutants by homologous recombination. *Journal of Basic Microbiology*, 47(3), 281-286.
16. **Hampikyan, H., Çolak, H.,** 2007. Nisin ve gıdalardaki antimikrobiyal etkisi, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6(2), 142–147.
17. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580.
18. **Hansen, J. N.** 1994. Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(1), 69-93.
19. **Holo, H., ve Nes I. F.** 1995. Transformation of *Lactococcus* by electroporation. *Methods in Molecular Biology*, 47, 195-199.
20. **Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P, Ward, J. M. Schrempf, H.** 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. *John Innes Foundation*, Norwich, İngiltere.
21. **Hurst, A.** 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27; 85-123.
22. **Jack, R.W., Tagg, J.R. ve Ray, B.** 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, June: 171-200.
23. **Jensen, B. H., Maigaard, M.** 1993. *Escherichia coli rpiA* gene encoding ribose phosphate isomerase A. *Journal of Bacteriology*, 175(17), 5628–5635.

24. **Kim, W. S., Hall, R. J., Dunn, N. W.** 1998. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 429–433.
25. **Klaenhammer, T.R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337-349.
26. **Kleerebezem, M., Quadri, L.E.** 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides*, 22, 1579–1596.
27. **Koca, E.** 2009. Nisin Dirençlilik Genlerinin Laktisin 481 Üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 Suşunda İfadesi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
28. **Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. Topisirovic, L.** 1991. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacitilactis* S50. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1835-1837.
29. **Koponen, O.** 2004. Studies of producer self-protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*. *Institute of Biotechnology and Department of Applied Chemistry and Microbiology*, Helsinki.
30. **Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., de Vos, W. M.** 1993. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis* Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.*, 216, 281–291.
31. **Liu, W. ve Hansen, J. N.** 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2551-2558.
32. **Liu, W., Zheng, H., Wu, Z., Wang Y.** 2010. Effects of pH profiles on nisin fermentation coupling with foam separation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85(5):1401-1407.
33. **Luti, K. J. ve Mavituna, F.** *Streptomyces coelicolor* increases the production of undecylprodigiosin when interacted with *Bacillus subtilis*. 2011. *Biotechnology Letters*, 33(1),113-118.
34. **MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H. , MacNeil, T.** 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for

- avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111(1), 61–68.
35. **Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J., de Vos, W. M.** 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201, 581–584.
 36. **Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., Holo, H.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 113–128.
 37. **Papagianni, M., Avramidis, N. ve Filioussis, G.** 2007. High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *Lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BMC Biotechnology*, 7:15.
 38. **Piard, J. C., Delorme, F., Giraffa, G., Commisaire, J. ve Desmazeaud, M. J.** 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *L. lactis* CNRZ 481. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 44, 143-158.
 39. **Powell, I. B., Achen, M. G., Hillier, A. J. ve Davidson, B. E.** 1988. A Simple and Rapid Method for Genetic Transformation of Lactic Streptococci by Electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(3), 655-660.
 40. **Qiao, M., Saris, P. E. J.** 1996. Evidence for a role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8. *FEMS Microbiol. Lett.*, 144(1), 89–93.
 41. **Sahl, H-G.** 1991. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics. Nisin and novel lantibiotics. 359-372. *ESCOM Science Publishers*, Leiden, Hollanda.
 42. **Sambrook, J., Russell, D. W.** 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 16.7–16.8.
 43. **Sanders, C. R.** 2011. Sanders Lab Protocols, *Vanderbilt University*.
 44. **Siegers, K., Entian, K. D.** 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(3), 1082–1089.

45. Sperandio, B., Polard, P., Ehrlich, D. S., Renault, P., Guedon, E. 2005. Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3762–3778.
46. Şimşek, Ö. 2009. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'te Nisin Üretim Yeteneğinin Geliştirilmesi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
47. Şimşek, Ö., Çon, A. H., Akçelik, M. 2007. Endüstriyel nisin üretiminde etkili faktörler ve model sistemler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 13(1), 57–67.
48. Tauch, A., Zheng, Z., Pühler, A. ve Kalinowski J. 1998. *Corynebacterium striatum* Chloramphenicol Resistance Transposon Tn5564: Genetic Organization and Transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 40(2), 126–139.
49. Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque1, J. J. R. ve Martin, J. F. 2007. Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the *desA* gene. *FEBS Journal*, 274(4), 1110–1122.
50. Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J. R. and Holzapfel, W. H. 1992. Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *L. lactis* isolated from vegetables. *Int. J. Food Microbiology*, 16(2), 141-151.
51. van de Guchte, M., van der Vossen, J. M. B. M., Kok, J., Venema, G. 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 224–228.
52. van der Meer, J. R., Polman, J., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., de Vos, W. M. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 175(9), 2578–2588.
53. Wang, C., Zhang, C. W., Du, J., Lü, X. Y. 2005. Study of genetic stability of expression plasmid vector pMG36e in host bacteria. *Wei Sheng Yan Jiu*, 34(2), 214-216.

54. **Wessels, S., Jelle, B., Ingolf, F.** 1998. Bacteriocins of the Lactic acid Bacteria: An Overlooked Benefit for Food: Science, Application, Legislation. *Danish Toxicology Center*.
55. **Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. ve Sahl, H-G.** 2001. Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 1772-1779.
56. **Wirawan, R. E., Klesse, N. A., Jack, R. W. ve Tagg, J. R.** 2006. Molecular and genetic characterisation of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2), 1148-1156.
57. **Wu, Z., Xuanyuan, Z., Li, R., Jiang, D., Li, C., Xu, H., Bai, Y., Zhang, X., Turakainen, H., Saris, P. E. J., Savilahti, H., Qiao, M.** 2009. Mu transposition complex mutagenesis in *Lactococcus lactis*-identification of genes affecting nisin production. *J. Appl. Microbiol.*, 106, 41-48.
58. **Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. ve Sonomoto, K.** 2003. Identification of the lantibiotic nisinQ, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67; 1616-1619.
59. **Zezza, N., Pasini, G., Lombardi, A., Mercenier, A., Spettoli, P., Zamorani, A. ve Nuti, M. P.** 1993. Production of a bacteriocin active on lactate-fermenting Clostridia by *L. lactis* subsp. *lactis* immobilized in coated alginate beads. *Journal of Dairy Research*, 60, 581-591.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep GİRGİN ERSOY, 16 Mart 1986'da Ankara'da doğdu. 2004 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2008 yılında tamamladıktan sonra 2010 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam eden Zeynep GİRGİN ERSOY, 2010 yılından beri Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.