

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

113974

**T.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**NİSİN ÜRETEN *Lactococcus lactis* İZOLASYONU
VE
NİSİN ÜRETİMİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER**

Duygu KIŞLA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.01.00

Sunuş Tarihi: 13.04.2001

113974

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adnan ÜNLÜTÜRK

Bornova-İZMİR

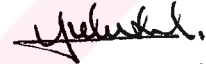
III

Sayın Duygu KIŞLA tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan 'Nisin Üreten *Lactococcus lactis* İzolasyonu ve Nisin Üretimine Etki Eden Faktörler' adlı bu çalışma, 'Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği' nin 24 üncü madde (c) ve (d) bentleri ve Enstitü yönergesinin ilgili hükümleri dikkate alınarak tarafımızdan değerlendirilmiş olup yapılan sözlü savunma sınavında aday oy birliği ile başarılı bulunmuştur. Bu nedenle Duygu KIŞLA'nın sunduğu metnin doktora tezi olarak kabulüne oy birliği ile karar verilmiştir.

13 Nisan 2001

Jüri Başkanı; Prof. Dr. Adnan ÜNLÜTÜRK

imza



Raportör ; Prof. Dr. Adnan ÜNLÜTÜRK

imza



Üye ; Prof. Dr. Mehmet KARAPINAR

imza



Üye ; Yrd. Doç. Dr. Nural KARAGÖZLÜ

imza



Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/5.../2001... gün ve 21-40... sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Alaettin TAYSUN
Enstitü Müdürü

Dr. Süleyman BORUZANLI
Enstitü Sekreteri

ÖZET**NİSİN ÜRETEEN *L.lactis* İZOLASYONU VE NİSİN
ÜRETİMİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER****KIŞLA, Duygu****Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü****Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Adnan ÜNLÜTÜRK****Nisan 2001, 133 sayfa**

Bu çalışmada, agar kuyu difüzyon (agar well-diffusion method) ve nokta inokülasyon agar difüzyon (agar spot method) yöntemleri ile nisin üreten *L.lactis* izole edilmeye çalışılmıştır. Toplam 83 örneğin 67'sinden izole edilen 273 laktik asit bakterisi bakteriyosin üretimi açısından taranmış ve bakteriyosin üreten bir izolata rastlanmamıştır. Nisin üreten *L.lactis* 497 suşunun nisin aktivitesi hem regresyon eşitliği kullanılarak (IU/ml) hem de nisin titresi (AU) olarak saptanmaya çalışılmıştır. Her iki yöntemin de nisin aktivitesinin belirlenmesinde sağlıklı ve hassas yöntem olmadıkları bulunmuştur. Regresyon eşitliği kullanılarak saptanan nisin aktivite değerleri daha fazla değişken sonuçlar verdiği için, nisin üretimine etki eden faktörlerin (karbon kaynaklarının çeşidi ve konsantrasyonu, maya ekstraktı konsantrasyonu, mangan iyonu, magnezyum iyonu, kalsiyum iyonu konsantrasyonları) belirlenmesinde, nisin aktivitesi nisin titresi olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar sakkarozun diğer karbon kaynaklarına (glukoz, fruktoz, laktoz) kıyasla nisin aktivitesini artırdığı, sakkaroz ve maya ekstraktı konsantrasyonlarının artırılmasıyla

nisin aktivitesinde değişiklik olmadığı saptanmıştır. Aynı şekilde ortamda bulunan mangan, magnezyum ve kalsiyum iyonlarının nisin üretimine bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Nisin, *L.lactis*, nisin aktivite tayini

ABSTRACT

**ISOLATION OF NISIN PRODUCING *L.lactis* AND
FACTORS EFFECTING NISIN PRODUCTION****KIŞLA, Duygu****PhD in Food Eng.****Supervisor: Prof Dr. Adnan ÜNLÜTÜRK****April 2001, 133 pages**

Isolation of nisin producing *L.lactis* by using agar well-diffusion and agar spot methods has been studied. Totally 273 lactic acid bacteria isolated from milk, cheese and vegetable samples were screened for bacteriocin production by using indicator microorganism *M.luteus* 982 and no bacteriocin producer was detected. Determination of the nisin activity of *L.lactis* 497 by regression equation (IU/ml) and as a nisin titer has been studied. Both of the methods were found as not sensitive and reliable. Since nisin activity values determined by regression equation gave more unreliable results as compared to the nisin titer method, as the activity indicator of nisin, nisin titer has been used in the determination of the effect of various factors (type and concentration of carbon sources, yeast extract concentration, concentrations of manganese, magnesium and calcium ions) in nisin production of *L.lactis* 497. Sucrose, in comparison with other carbon sources (glucose, fructose, lactose), increased the nisin activity and increasing the sucrose and yeast extract concentrations did not cause any increase in nisin production. Similarly, ions such

VIII

as manganese, magnesium and calcium did not have any effect on nisin production.

Key words: Nisin, *L.lactis*, nisin activity determination



TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam boyunca sürekli desteğini gördüğüm başta sevgili eşim ve ailem olmak üzere, çalışmamın her aşamasında görüşlerinden yararlandığım ve ilgisini esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Adnan ÜNLÜTÜRK'e, sabırla beni destekleyen Su Ürünleri İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı adına Doç. Dr. Şükran ÇAKLI'ya, çalışmam sırasında yardımlarından yararlandığım Ar. Gör. Handan DİNÇER'e ve her konuda bana yardımcı olan Ar. Gör. Ömre SIKILI, Ar. Gör. Nükhet DEMİREL, Ar. Gör. İlkin YÜCEL ŞENGÜN, Ar. Gör. Gülten TIRYAKI, Teknisyen Figen BECERİK, Teknisyen Tülay ÜZEL ve Fatma DAYAN'a, tezi yazmamda yardımcı olan Aysun KÖSE'ye ve bu araştırmanın gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan E.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XX
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 <i>Lactococcus lactis</i> Tarafından Üretilen Bakteriyosinler	3
2.1.1 Diplococcin	6
2.1.2 Lactococcinler	7
2.1.3 Lantibiyotik tip bakteriyosinler.....	8
2.1.3.1 Nisin.....	9
2.1.3.1.1 Nisinin yapısı	9
2.1.3.1.2 Nisin etki mekanizması.....	19

İÇİNDEKİLER (devam)

2.1.3.1.3 Nisin üretimi ve nisin üretimine etki eden faktörler.....	23
2.1.3.1.4 Nisin üreten <i>L.lactis</i> izolasyonu ve nisin aktivitesi tayini	27
2.1.3.1.5 Nisinin antimikrobiyal özellikleri	32
2.1.3.1.6 Nisinin gıdalarda kullanım alanları	41
3.MATERYAL VE YÖNTEM	48
3.1 Materyal	48
3.1.1 Kültürler	48
3.1.2 Besiyerleri.....	48
3.2 Yöntem	51
3.2.1 <i>Lactococcus</i> izolasyonu	51
3.2.2 Kültürlerin hazırlanması	52
3.2.3 İzolatların tanımlanması.....	53
3.2.3.1 Katalaz testi.....	55
3.2.3.2 Glukozdan gaz üretimi	55

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2.3.3 Farklı sıcaklıklarda üreme	55
3.2.3.4 pH 9,2'de sıvı besiyerinde üreme	56
3.2.3.5 %4 NaCl içeren sıvı besiyerinde üreme	56
3.2.3.6 Arginin hidrolizi.....	56
3.2.3.7 Karbonhidrat fermantasyon testleri	57
3.2.4 Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi	57
3.2.4.1 Agar kuyu difüzyon yöntemi.....	57
3.2.4.1.1 Kültür süpernatantlarının hazırlanması	57
3.2.4.1.2 Antagonistik etkinin saptanması.....	58
3.2.4.1.3 Kontrol örneklerinin inhibitör etkisinin incelenmesi	59
3.2.4.2 Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi.....	59
3.2.5 Standart eğrinin çizilmesi ve nisin aktivitesinin saptanması.....	62
3.2.5.1 Standart eğrinin çizilmesi	62
3.2.5.2 Nisin aktivitesinin saptanması.....	63

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2.6 Nisin üretimine etki eden faktörlerin belirlenmesi.....	65
3.2.6.1 Karbon kaynaklarının nisin üretimine etkisinin saptanması.....	65
3.2.6.2 Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının nisin üretimine etkisinin saptanması.....	65
3.2.6.3 %0,5 maya ekstraktı ve farklı oranlarda sakkaroz konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması.....	66
3.2.6.4 %4 maya ekstraktı ve farklı oranlarda sakkaroz konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması.....	66
3.2.6.5 Farklı mangan iyonu konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması.....	67
3.2.6.6 Farklı magnezyum iyonu konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması.....	67
3.2.6.7 Farklı kalsiyum iyonu konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması.....	68
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	69
4.1 <i>Lactococcus</i> İzolasyonu.....	69
4.2 Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi	70

İÇİNDEKİLER (devam)

4.2.1 Agar kuyu difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi.....	72
4.2.2 Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi.....	78
4.3 <i>L.lactis</i> 497 Kültürünün Nisin Aktivitesi.....	85
4.4 Nisin Üretimine Etki Eden Faktörler.....	97
4.4.1 Karbon kaynaklarının nisin üretimine etkisi	99
4.4.2 Maya ekstraktı konsantrasyonunun nisin üretimine etkisi.....	106
4.4.3 %0,5 ve %4 maya ekstraktı ile farklı oranlarda sakkaroz konsantrasyonunun nisin üretimine etkisi	109
4.4.4 Katyonların nisin üretimine etkisi	113
5. SONUÇ.....	117
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	119
ÖZGEÇMİŞ	133

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1 Nisinin yapısı	12
2.2 Nisinde bulunan ender amino asitlerin sentezlenmesi	13
2.3 Öncü nisin molekülünün yapısı	14
4.1 Agar kuyu difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi	75
4.2 Agar kuyu difüzyon yöntemiyle bakteriyosin üreten ve üretmeyen laktik asit bakterilerinin <i>M.luteus</i> 982 içeren YGA petrisinde görüntüsü	77
4.3 Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi	83
4.4 <i>L.lactis</i> 497 suşunun nisin aktivitesinin saptanması.....	90
4.5 Standart nisin eğrisi (0,5-10 IU/ml).....	94
4.6 %2 sakkaroz içeren MRS Broth'da gelişen <i>L.lactis</i> 497 kültürüne ait süpernatantların <i>M.luteus</i> 982 içeren NAM'da oluşturdukları inhibisyon zonları	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

2.1 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen lantiyonin içeren bakteriyosinler.....	3
2.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip lantiyonin içermeyen bakteriyosinler.....	4
2.3 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen yüksek molekül ağırlığına sahip bakteriyosinler.....	5
2.4 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen kompleks bakteriyosinler	5
2.5 Bazı ülkelerde nisin kullanımına izin verilen gıdalar ve maksimum nisin miktarları	43
3.1 İzolatların <i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> olarak tanımlanmasında kullanılan testler	54
4.1 <i>L.lactis</i> 497 kültürünün 3 farklı yöntem kullanılarak elde edilen süpernatant dilüsyonlarının YGA ve NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm)	91
4.2 B yolu kullanılarak hazırlanan farklı nisin konsantrasyonlarının <i>M.luteus</i> 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm)	96

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

ÇizelgeSayfa

4.3 %2 şeker içeren MRS Broth'da gelişen <i>L.lactis</i> 497 kültürüne ait süpernatantların <i>M.luteus</i> 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm)	100
4.4 %2 sakkaroz ve farklı oranlarda maya ekstraktı içeren MRS Broth'da gelişen <i>L.lactis</i> 497 kültürüne ait süpernatantların <i>M.luteus</i> 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm).....	107
4.5 %0,5 ve %4 maya ekstraktı ve farklı oranlarda sakkaroz içeren MRS Broth'da gelişen <i>L.lactis</i> 497 kültürüne ait süpernatantların <i>M.luteus</i> 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm).....	111
4.6 %2 sakkaroz, %0,5 maya ekstraktı ve farklı oranlarda Mn^{+2} iyonu içeren MRS Broth'da gelişen <i>L.lactis</i> 497 kültürüne ait süpernatantların <i>M.luteus</i> 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm).....	114
4.7 %2 sakkaroz, %0,5 maya ekstraktı ve farklı oranlarda Mg^{+2} iyonu içeren MRS Broth'da gelişen <i>L.lactis</i> 497 kültürüne ait süpernatantların <i>M.luteus</i> 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm).....	115

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

4.8 %2 sakkaroz, %0,5 maya ekstraktı ve farklı oranlarda Ca^{+2} iyonu içeren MRS Broth'da gelişen <i>L.lactis</i> 497 kültürüne ait süpernatantların <i>M.luteus</i> 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm).....	116
---	-----

KISALTMALAR

Met	Metiyonin
Ser	Serin
Thr	Treonin
Lys	Lisin
Asp	Aspartik asit
Phe	Fenilalanin
Asn	Asparagin
Leu	Lösin
Val	Valin
Gly	Glisin
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Ile	İzolösin
Pro	Prolin
Cys	Sistin
His	Histidin
ABA	Amino Bütirik Asit
DHA	Dehidroalanin
Ala-S-Ala	Lantiyonin
DHB	Dehidrobütirin
	(β -Metildehidroalanin)
ABA-S-Ala	β -Metillantiyonin

1.GİRİŞ

Birçok laktik asit bakterisi, sınırlı alanda özellikle üretici bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal etki gösteren ve bakteriyosin olarak adlandırılan peptidler üretirler. Bu bakteriyosinler arasında en iyi bilineni *L.lactis* subsp. *lactis*'in bazı suşları tarafından üretilen "nisin" dir. Nisin, ender amino asitlerden olan "lantiyonin" içerdiğinden "lantibiyotikler" sınıfının bir üyesi olup etki mekanizması sınırlıdır. Gram-negatif bakteri, maya ve küfleri inhibe etmediği halde, gram-pozitif bakterilere özellikle spor oluşturanlara karşı etkilidir (Delves-Broughton, 1990a; Hansen, 1994).

Nisin üretimi biomass oluşumu ile paralellik taşımaktadır. Öncü nisin molekülü, hücrelerin aktif büyüme fazının başında sentezlenmekte olup maksimum nisin üretim hızına ise logaritmik üreme fazının sonunda ulaşılmaktadır (De Vuyst and Vandamme, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1993). Bu nedenle biomass verimini dolayısıyla nisin üretimini etkileyen faktörler üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

1969 yılında FAO/WHO ortak komitesi tarafından nisinin gıda katkısı olarak kullanılmasına izin verilmiş olup dünyada 50'nin üzerinde ülkede güvenli ve etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Roller, 1991; Gorris, 1994; Roller and Lusengo, 1997). Ülkemizde de halen Avrupa Birliği ülkelerinde geçerli olan gıdalarda (irmik ve tapioka pudingler ve benzer ürünler,

olgunlaştırılmış ve işlem görmüş peynirler, ekşitilmiş krema) kullanılmaktadır (TGKY, 1997).

Bu çalışmada, agar difüzyon yöntemlerinden agar kuyu difüzyon ve nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemleri ile nisin üreten *L.lactis* izole edilmeye çalışılmıştır. Nisin üreticisi *L.lactis* 497 suşunun nisin aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemi ile tayin edilerek, yöntem doğruluk ve hassasiyet açısından değerlendirilmiş ve nisin üretimini etkileyen çeşitli faktörler (karbon ve azot kaynakları, katyonlar) incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Lactococcus lactis* Tarafından Üretilen Bakteriyosinler

Bakteriyosinler, genellikle üretici bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal etki gösteren protein veya protein kompleksleridir (Klaenhammer, 1988). Laktik asit bakterileri diğer gram-pozitif bakterilere karşı etkili çeşitli bakteriyosinler üretirler. Klaenhammer'a göre laktik asit bakterilerinin ürettikleri bakteriyosinler 4 sınıfa ayrılmaktadır (Jack et al., 1995); Sınıf 1: bu gruba ait bakteriyosinler ender rastlanan amino asitleri (lantiyonin ve türevleri) içeren ve 'lantibiyotik' olarak adlandırılan küçük peptidlerdir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen lantiyonin içeren bakteriyosinler (Ouweland, 1998)

Lantibiyotik	Üretici suş
Carnocin U149	<i>Carnobacterium piscicola</i> U149
Cytolysin L1	<i>Enterococcus faecalis</i>
Cytolysin L2	<i>E. faecalis</i>
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> 481
Lactococcin	<i>L.lactis</i> ADRI85L030
Nisin A	<i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Nisin Z	<i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NIZO 22186
Lactocin S	<i>Lactobacillus sake</i> 145
Mutacin	<i>Streptococcus mutans</i>
Salivaricin A	<i>Str.salivarius</i> 20P3
Streptococcin A-FF22	<i>Str.pyogenes</i>

Sınıf 2: düşük molekül ağırlığına sahip (<10 kDa), ısıya dayanıklı, lantiyonin içermeyen membran aktif peptidler bu grupta yer alır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip lantiyonin içermeyen bakteriyosinler (Ouwehand,1998)

Bakteriyosin	Üretici Suş
Acidocin 8912	<i>Lb.acidophilus</i>
Brevicin 37	<i>Lb.brevis</i>
Carnobacteriocin A	<i>Cb.piscicola</i> LV17A
Carnobacteriocin BM1	<i>Cb.piscicola</i> LV17B
Carnobacteriocin B2	<i>Cb.piscicola</i> LV17B
Curvacin A	<i>Lb.curvatus</i> LTH 1174
Gassericin A	<i>Lb.gasseri</i>
Hiraecin S	<i>E.hirae</i> C311
Lactacin B	<i>Lb.acidophilus</i>
Lactacin F	<i>Lb.johnsonii</i> 11088
Lacticin 3147	<i>L.lactis</i> DPC3147
Lactococcin A	<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Lactococcin B	<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Lactococcin G	<i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2081
Lactococcin M	<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Leucocin A	<i>Leuconostos gelidum</i>
Mesentericin Y105	<i>Leu.mesenteroides</i> Y105
Pediocin AcH (Pediocin PA-1)	<i>Pediococcus acidilactici</i> H
Pediocin JD	<i>P. acidilactici</i>
Piscicolin 126	<i>Cb.piscicola</i>
Plantaricin A	<i>Lb.plantarum</i>
Plantaricin C	<i>Lb.plantarum</i> 11441
Plantaricin S	<i>Lb.plantarum</i>
Plantaricin T	<i>Lb.plantarum</i>
Reuterin 6	<i>Lb.reuteri</i>
Sakacin A	<i>Lb.sake</i> LB 706
Sakacin P	<i>Lb.sake</i> 673

Sınıf 3: bu gruba ait bakteriyosinler yüksek molekül ağırlığına sahip (>30 kDa), ısıya hassas proteinler içermektedirler (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen yüksek molekül ağırlığına sahip bakteriyosinler (Ouweland,1998)

Bakteriyosin	Üretici Suş
Acidophilucin A	<i>Lb.acidophilus</i>
Caseicin 80	<i>Lb.casei</i> B80
Helveticin J	<i>Lb.helveticus</i>
Helveticin V-1829	<i>Lb.helveticus</i>
Lacticin A	<i>Lb.delbrueckii</i>
Lacticin B	<i>Lb.delbrueckii</i>

Sınıf 4: proteine ilaveten zorunlu (essential) lipid veya karbonhidrat grupları içeren kompleks bakteriyosinler bu grubu oluşturmaktadır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen kompleks bakteriyosinler (Ouweland, 1998)

Bakteriyosin	Üretici Suş
Bacteriocin	<i>Lb.fermenti</i>
Lactocin 27	<i>Lb.helveticus</i>
Leuconocin S	<i>Leu.paramesenteroides</i>
Pediocin SJ-1	<i>P.acidilactici</i>

McKay'in yaptığı bir araştırmada *Lactococcus* suşlarının çoğunda veya bazılarında görülen plazmid bağlantılı fenotip özellikler belirtilmiştir (von Wright and Sibakov, 1998). Bakteriyosin üretimi bu özelliklerden birisidir. *L.lactis*

tarafından üretilen plazmid kodlu bakteriyosinler diplococcin, lactococcinler ve lantibiyotik tip bakteriyosinler olarak 3 gruba ayrılmaktadır. Lantibiyotik tip bakteriyosinlerden olan nisin üretiminin önceleri plazmid bağlantılı olduğu tahmin edilmesine rağmen 1990 yılında yapılan çalışmalardan sonra nisin üretim genlerinin plazmid kodlu olmayıp nisin üretim ve bağışıklığının yer değiştirebilir (transmissible) kromozomal gen blokları tarafından kodlandığı bulunmuştur (Delves-Broughton and Gasson, 1994; Hansen, 1994; von Wright and Sibakov, 1998).

2.1.1 Diplococcin: İlk tanımlanan plazmid kodlu bakteriyosinlerden birisi olup *L.lactis* subsp. *cremoris* 346 tarafından üretilmektedir (Klaenhammer, 1988; Dufour et al., 1991; Thuault et al., 1991). Nisinden farklı olarak antimikrobiyal aktivitesi diğer *Lactococcus* türlerine karşı sınırlıdır ve spor oluşturan bakterilere karşı etkili değildir (Klaenhammer, 1988). Diplococcine duyarlı hücrelerde, lizis olmadan DNA ve RNA sentezinde inhibisyona bağlı olarak ölüm meydana gelir. Diplococcin, lantionin ve β -metillantiyonin gibi ender rastlanan amino asitleri içermez. Molekül ağırlığı 5300 Dalton'dur (Piard et al., 1990). Tripsin, pronaz ve α -kimotripsin enzimleri tarafından tamamen inaktif olur. Diplococcin üretiminin hangi plazmid tarafından kodlandığı bilinmektedir ancak bu sistem üzerinde fazla

genetik veya moleküler biyolojik analiz yapılmamıştır (von Wright and Sibakov, 1998).

2.1.2 Lactococcinler: Lactococcinler başlıca diğer laktokoklara karşı aktivite gösteren ısıya dayanıklı nonlantibiyotik peptidlerdir (von Wright and Sibakov, 1998). Çizelge 2.1’de *L.lactis* ADRI85L030 tarafından üretilen ve lantiyonin içeren ‘Lactococcin’ ile karıştırılmamalıdır. Çizelge 2.2’den görüldüğü gibi *L.lactis* subsp. *cremoris* 9B4 tarafından lactococcin A, B, M ve *L.lactis* subsp. *lactis* LMG 2081 tarafından lactococcin G bakteriyosinleri üretilmektedir. Bunların dışında *L.lactis* subsp. *cremoris* 346 suşu da lactococcin tipi bakteriyosin üretmektedir. *L.lactis* subsp. *cremoris* 9B4’te bakteriyosin üretiminden sorumlu plazmidde bakteriyosin üretim ve bağışıklık genleri iki ayrı bölgede organize olmuş durumda bulunmaktadır. Bu bölgelerden birisi (düşük antagonistik aktivite ile ilgili olanı) lactococcin M, yüksek antagonistik aktivite gösteren diğer bölge ise lactococcin A ve B olarak bilinmektedir.

Lactococcinler membran aktif peptidler olup gözenek oluşturarak sitoplazmik membranın bütünlüğünü bozarlar (Ouweland, 1998). Nisinden farklı olarak aktivite için spesifik protein reseptörüne ihtiyaç duyarlar. Membranda farklı büyüklükte oluşan gözeneklerin bakteriyosin konsantrasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu durum, küçük moleküllerin içeriye girmesine, UV absorbe eden amino asitler, K^+ , o-

nitrofenol gibi maddelerin dışarıya çıkmasına neden olarak membran geçirgenliğini artırır.

Lactococcinler dışında *L.lactis* DPC 3147 tarafından lacticin 3147 (plazmid kodlu ve lantibiyotik olmayan bakteriyosin) üretilmektedir (Çizelge 2.2). *L.lactis* DPC 3147, kefir tanesinden izole edilmiş olup geniş inhibisyon spektrumu olan bakteriyosin üretmektedir (Ryan et al., 1996). Lacticin 3147 yukarıda bahsedildiği gibi lactococcinler gibi membran aktif peptiddir. Etki mekanizması lactococcinlere benzemektedir (Ouwehand, 1998). Lacticin 3147'nin tripsin, α -kimotripsin, proteinaz K ve pronaz E enzimlerine karşı duyarlı, pepsin enzimine karşı ise duyarlı olmadığı bulunmuştur (Ryan et al., 1996).

2.1.3 Lantibiyotik tip bakteriyosinler: Çizelge 2.1'den görüldüğü gibi nisin A ve nisin Z dışında *L.lactis* 481 ve *L.lactis* ADRI85L030 suşları tarafından sırasıyla lacticin 481 ve lactococcin bakteriyosinleri üretilmektedir (Piard et al., 1990; Dufour et al., 1991; Pridmore et al., 1996). Lantibiyotiklerin genel özelliği thioether amino asitlerden lantiyonin ve β -metillantiyonin içermesidir. Bunun yanında lantibiyotikler α,β -didehidroalanin ve α,β -didehidrobütirin içerebilir (Bierbaum and Sahl, 1993). Lantibiyotik tip bakteriyosinlerin model tipi olan nisin, lantibiyotiklerin etki mekanizmasını açıklayan örnek olarak bölüm 2.1.3.1.2'de anlatılmıştır.

Piard et al. (1990) yaptığı bir çalışmada, lacticin 481'in birçok *Lactococcus* suşlarını, bazı *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Clostridium* türlerini inhibe ettiğini saptamışlardır. Lacticin 481, ender rastlanan amino asitlerden, lantiyonin ve β -metillantiyonin içermektedir (Pridmore et al., 1996). Molekül ağırlığı 5500 Dalton'dur. Fislin ve proteinaz-K enzimleri tarafından tamamen inaktif olduğu halde pronaz ve α -kimotripsin enzimleri tarafından kısmen inaktif olur. Tripsin enzimine ise dayanıklıdır.

Dufour et al.'un (1991) yaptığı bir çalışmada ise lactococcin saflaştırılarak molekül ağırlığı yaklaşık 2,3-2,4 kDa olarak bulunmuş ve lactococcin üretimi ve bağışıklığından sorumlu olan plazmidin ayrımı yapılmıştır.

2.1.3.1 Nisin

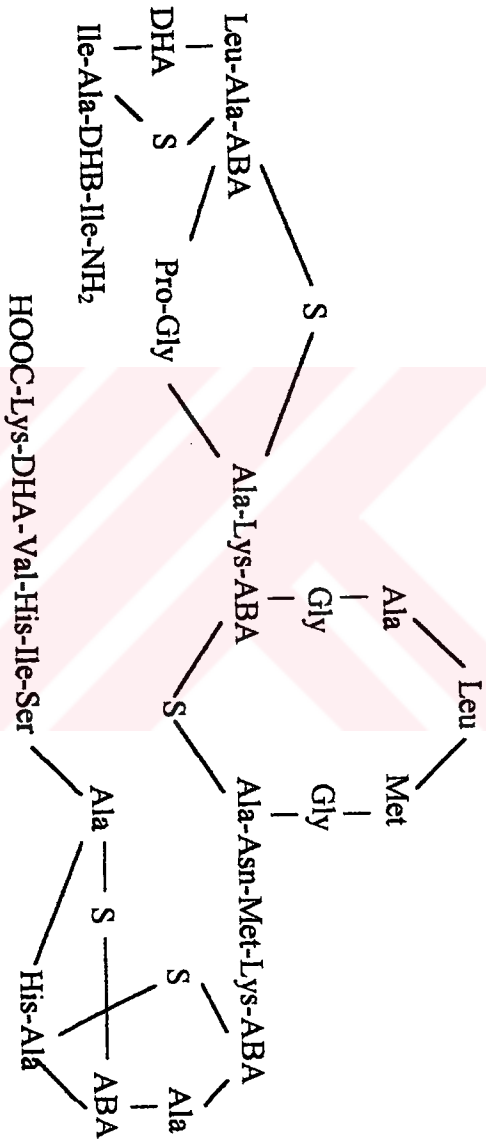
2.1.3.1.1 Nisinin yapısı

Nisin *L.lactis* subsp. *lactis*'in bazı suşları tarafından üretilen ve ribozomlarca kodlanan polipeptid yapısında bir bakteriyosindir. Nisin adı, N grubu streptokokların ürettiği inhibitör madde anlamına gelen 'group N (*Streptococci*) Inhibitory Substance' kelimelerinden türetilmiştir (Delves-Broughton, 1987; Harris et al., 1992a; Bierbaum and Sahl, 1993).

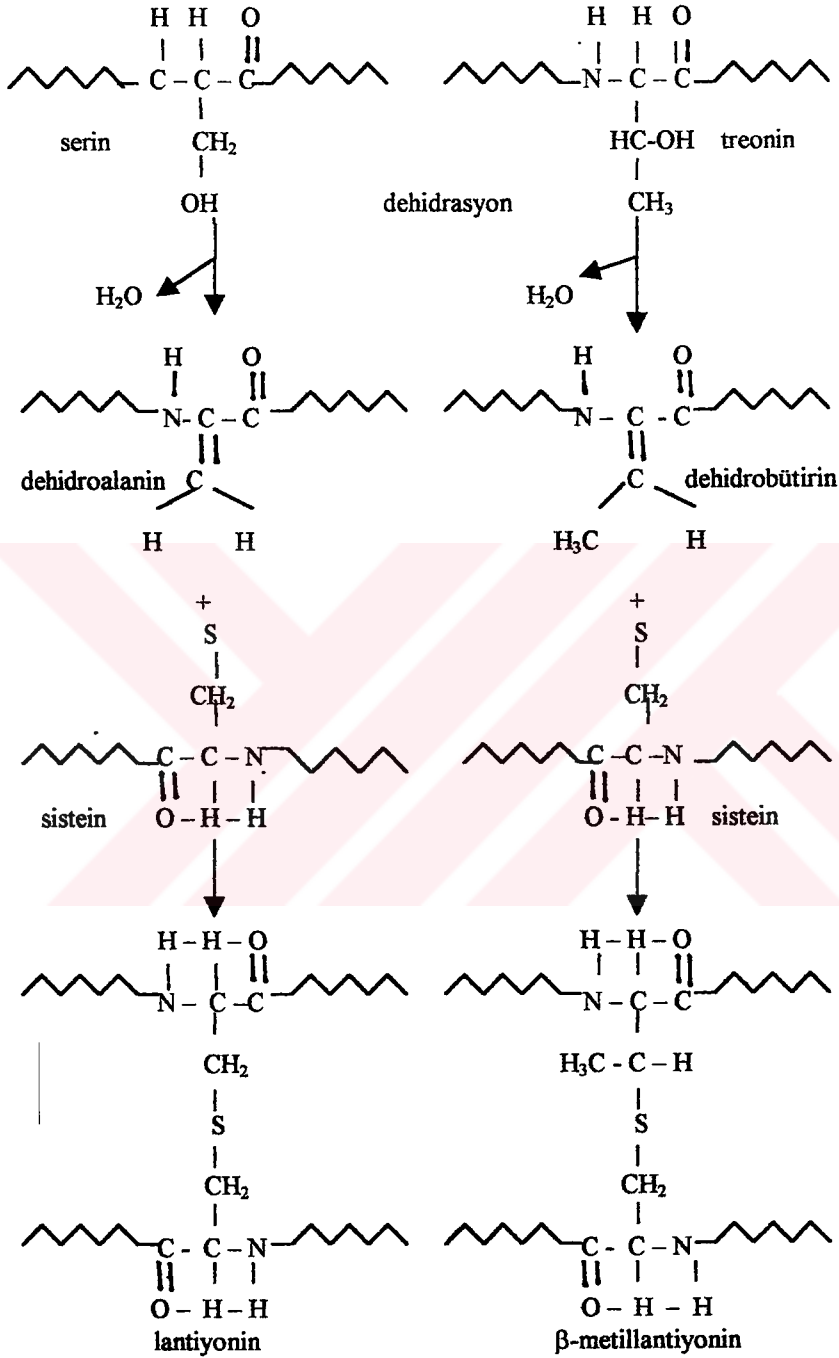
İlk olarak 1928 yılında *Lactobacillus bulgaricus*'un gelişmesini inhibe eden bir inhibitör madde tanımlanmıştır (Hurst, 1972; Harris et al., 1992a; Gudmundsdottir, 1993). Rogers tarafından belirlenen bu inhibitör madde daha sonra Mattich and Hirsch tarafından çalışılmış ve bu maddeye 'Nisin' adı verilmiştir (Harris et al., 1992a; Gudmundsdottir, 1993). Nisin ile ilgili ilk araştırmalar, nisinin veterinerlik ve klinik alanlarda terapötik amaç için kullanılmasıyla ilgilidir. Ancak, dar antibakteriyal spektrum göstermesi, vücut sıvılarında düşük çözünürlüğe sahip olması, sindirim proteazları tarafından inaktive edilmesi ve fizyolojik pH'da (pH: 7,0-7,5) stabil olmaması gibi nedenlerle terapötik amaç için uygun olmadığı saptanmıştır (Delves-Broughton, 1990b; Vandenbergh, 1993). Hirsch tarafından peynir yapımında nisin üreten starter kültürler kullanılmış ve peynirlerde 'clostridial' gaz oluşumu önlenmiştir. Böylece ilk olarak nisinin gıda koruyucusu olarak kullanılması önerilmiştir (Gudmundsdottir, 1993). Daha sonraları peynirin olgunlaştırma aşamasında nisinin starter kültürün gelişmesini inhibe ettiği gözlenmiş ve peynir yapımında nisin üreten kültürlerin kullanımı üzerine ilgi azalmıştır. Yinede 1950'lilerin ortasında, pastörize peynirlerde 'clostridial' bozulmanın önlenmesinde nisinin en etkili yöntem olduğu bulunmuştur (Delves-Broughton, 1990a). 1966'dan sonra moleküler biyolojinin gelişmesiyle birlikte nisinin yapısı ile ilgili araştırmalar artmış ve Gross and Morell tarafından

nisinin yapısı ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır (Şekil 2.1; Hurst, 1972; Hansen, 1994).

Nisin, ender rastlanan amino asitleri (DHA, DHB, lantiyonin, β -metillantiyonin) içerdiğinden lantibiyotikler sınıfının bir üyesidir (Harris et al., 1992a; Hansen, 1994). Ingram adlı bir araştırmacı öncü (precursor) nisin polipeptid zincirindeki sıradan amino asitlerin posttranslasyonel mekanizma tarafından ender olmayan amino asitlere dönüşümünü gösteren bir hipotez öne sürmüştür (Şekil 2.2; Harris et al., 1992a). Buna göre, serin ve treonin amino asitlerinin dehidre olmasıyla sırasıyla DHA ve DHB oluşmaktadır. DHA ve DHB'ye sistein sülfidril gruplarının eklenmesiyle de thioether bağları ve sırasıyla lantiyonin ve β -metillantiyonin amino asitleri oluşmaktadır (Harris et al., 1992a; Hansen, 1994). Bu durumda nisin molekülü 2 basamakta sentezlenmektedir (Gudmundsdottir, 1993): öncü molekülün protein sentez mekanizma tarafından sentezi ve aktif nisin molekülüne dönüşümü sağlayan enzimlerin yardımıyla posttranslasyonel modifikasyonlar. Öncü nisin molekülü 57 amino asit uzunluğunda olup 23 amino asit lider bölgeyi, 34 amino asit yapısal bölgeyi oluşturmaktadır (Şekil 2.3; Delves-Broughton and Gasson, 1994). 23 amino asitlik kısım nisinin salgılanmasında lider olarak görev yapar ve aktif nisin molekülü oluşumu aşamasında peptidaz enzimi yardımıyla zincirden ayrılır (Bierbaum and Sahl, 1993; Gudmundsdottir, 1993).



Şekil 2.1 Nisinin yapısı (Hansen, 1994)



Şekil 2.2 Nisinde bulunan ender amino asitlerin sentezlenmesi (Harris et al., 1992a)

-23

Met - Ser - Thr - Lys - Asp - Phe - Asn - Leu - Asp

Leu

Val

-10

Ala - Gly - Ser - Asp - Lys - Lys - Ser - Val - Ser

Ser

-1 Arg

Ile - Thr - Ala

Ile / Ser \ Leu

Ala - Thr

Pro - Gly

10

Cys - Lys - Thr

Gly / Ala - Leu

Met

Cys

Gly

Asn 20

Met

His - Ala

Thr - Lys

34 Lys - Ser - Val - His - Ile - Ser - Cys

30

Thr - Ala

Şekil 2.3 Öncü misin molekülünün yapısı (Delves-Broughton and Gasson, 1994)

Öncü nisin molekülünün yapısal bölgesinde bir takım mutasyonlar oluşturarak nisine göre bazı avantajları olan nisin analogları oluşturmak mümkündür (Liu and Hansen, 1990; Hansen, 1994). Ancak bunu gerçekleştirmek için posttraslasyonel modifikasyon mekanizmasının iyi bilinmesi gerekir.

Hirsch tarafından yapılan çalışmalarda nisinin farklı polipeptid yapılarda bulunduğu belirtilmiştir. Berridge et al. tarafından A, B, C, D ve E olmak üzere 5 adet polipeptid nisin molekülü tanımlanmıştır (Harris et al., 1992a; Gudmundsdottir, 1993). Kağıt kromatografisi yöntemi kullanılarak yapılan amino asit analizlerinde nisin A, B ve C arasında belirgin bir benzerlik olmasına rağmen nisin D'nin biraz daha farklı yapıda olduğu bulunmuştur. Diğer üçünde mevcut olan valin ve metiyonin amino asitlerinin nisin D'de bulunmadığı görülmüştür. Aynı zamanda bazı kükürt içeren amino asitlerin okside haldeki formları nisin D'nin yapısında bulunmaktadır. Gross and Morell tarafından saptanan nisinin yapısı nisin A'ya ait olup, bu durum NMR ve FAB-MS (fast atom bombardment mass spectroscopy) çalışmalarıyla doğrulanmıştır. Nisin B, C, D ve E'nin nisin A'nın parçalanma ürünleri olduğu düşünülmektedir (Harris et al, 1992a). Chan et al. yaptıkları bir çalışmada son kullanma tarihinden 3 yıl sonraya ait ticari nisin örneklerinde nisin ile birlikte iki tane nisinin doğal parçalanma ürünlerini izole etmişlerdir (Harris et al., 1992a; Gudmundsdottir, 1993). Bunlar, nisin molekülünün 32. amino asidinden bölünmüş nisin 1-32, nisin molekülündeki hem 5. hem de

32. amino asidinden bölünmüş [(desDala 5) nisin 1-32] bileşikleridir. Nisin 1-32'nin bazı gram-pozitif bakterilere karşı nisin kadar aktif olduğu, diğerinin [(desDala 5) nisin 1-32] ise nisine göre 500 kat daha az aktif olduğu bulunmuştur. Gross and Morell, nisinin kuvvetli asidik ortamda 50°C'de muamele edilmesinden sonra ortaya çıkan en önemli ürünün [(desDala 5) nisin 1-32] olduğunu bulmuşlardır (Harris et al., 1992a; Gudmundsdottir, 1993). Chan et al., Berridge et al.'un çalışmalarında belirtilen nisin A ve nisin B'nin sırasıyla nisin 1-34 ve nisin 1-32 olabileceklerini bildirmişlerdir (Gudmundsdottir, 1993).

Nisin A'nın kimyasal olarak türetilen modifikasyonlarına ilaveten DNA dizisinde değişikliklere bağlı olarak nisin varyasyonları ortaya çıkabilir. Örnek olarak *L.lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186'nın ürettiği peptid (Nisin Z), 27. amino asit olan histidin yerine asparagin'in yer değiştirmesi haricinde nisin A'nın benzeridir (Harris et al., 1992a; Bierbaum and Sahl, 1993). Nisin Z'nin Nisin A'ya göre agarda daha hızlı difüzyon göstermesi amino asit kompozisyonundaki değişiklikten ileri gelmektedir (Delves-Broughton and Gasson, 1994).

Nisin molekülü asidik karakterde olup düşük pH'da stabilitesi ve çözünürlüğü yüksektir (Delves-Broughton, 1987; Delves-Broughton, 1990a). Liu and Hansen (1990) yaptıkları bir çalışmada nisinin çözünürlüğü ve stabilitesi üzerine pH'nın (pH 2-12) etkisini incelemişlerdir. Buna göre nisinin farklı

pH'larda tamponlanmış sudaki çözeltileri hazırlanmıştır. Düşük pH'da nisin'in çözünürlüğünün oldukça yüksek olduğu (57 mg/ml, pH:2, 25°C), yüksek pH'da ise çözünürlüğün hızlı bir şekilde azaldığı (0,25 mg/ml, pH:8-12, 25°C) bulunmuştur.

Nisin yüksek pH'da stabil değildir, inaktif durumdadır. İnaktivasyon mekanizması bilinmemekle beraber bu durum denaturasyon, kimyasal modifikasyon veya her ikisinin kombinasyonu sonucu ortaya çıkabilir (Liu and Hansen, 1990). Nisin molekülünde mevcut DHA ve DHB yüksek pH'da bulunan nükleofiller (örneğin hidroksil grupları) tarafından meydana getirilen modifikasyonlara karşı hassastır (Liu and Hansen, 1990; Harris et al., 1992a). Nisin'in yüksek pH'da reaksiyonu, nükleofilik gruplar ile DHA ve DHB arasındaki intermoleküler (molekül arası) ve intramoleküler (molekül içi) reaksiyonların sonucu olarak multimer ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır. Nükleofilik gruplar ile reaksiyondan sonra DHA ve DHB'nin modifikasyonuna bağlı olarak nisin, antibiyotik etkisini kaybettiği gibi bazik ortamlarda stabilitesini kaybedip çözünürlüğü azalmaktadır (Liu and Hansen, 1990). Liu and Hansen'in (1990) yaptıkları çalışmada denaturasyon işleminde görülen keskin pH geçişi olmadığı için nisin'in yüksek pH'dan kaynaklanan inaktivasyonunun basit bir denaturasyon sonucu olmadığı ortaya çıkmıştır. Liu and Hansen'in (1990) yaptıkları diğer bir çalışmada nisin, CNBr ile muamele edilmiş ve nisin parçaları (nisin 1-21, nisin 22-34) elde edilmiştir. Bu parçaların bakteriyel spor gelişimini zarar

görmemiş nisine göre yaklaşık %90 daha az inhibe ettiği saptanmıştır. Bütün elde edilen sonuçlara göre nisin molekülünde mevcut DHA ve DHB'nin aktivite için önemli olduğu belirlenmiştir.

Ender rastlanan amino asitlerin nisinin birtakım yapısal özelliklerinde, örneğin düşük pH'da otoklavlandıktan sonra stabilitesini kaybetmemesinde önemli olduğu sanılmaktadır (Hansen, 1994). Yapılan bir çalışmada tampon çözeltideki nisinin 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra pH 3'de aktivitesinin tamamını, pH 5'de %35'ini, pH 7'de ise %0,5'ini koruduğu saptanmıştır (Delves-Broughton, 1990b). Başka bir çalışmada tampon çözeltideki nisinin pH 2'de 115°C'de 20 dakika otoklavlandıktan sonra aktivitesinin kaybolmadığı bulunmuştur (Piard et al., 1990). Yapılan çalışmalar, ısıl işlem dikkate alındığından gıdalardaki nisin aktivitesi kaybının tampon çözeltilerde görülen kayba göre daha az olduğunu göstermiştir (Delves-Broughton, 1990a). Bunun nedeni büyük moleküllerin koruyucu etkilerinden kaynaklandığı şeklinde açıklanmıştır.

Nisin aktivitesi kaybı gıdaların depolama süresi boyunca da meydana gelebilir. Bu kayıplar yüksek pH ve yüksek sıcaklıklarda daha fazladır (Delves-Broughton, 1990a).

Yapılan çeşitli çalışmalarda nisin aktivitesi üzerine değişik proteolitik enzimlerin etkisi incelenmiştir. Buna göre daha önce Jarvis and Mahoney tarafından tripsin enzimi ile nisinin aktivitesinde azalma olmadığı belirtilmesine rağmen

(Harris et al., 1992a; Uhlman et al., 1992), Shiba et al.'un yaptığı çalışmada nisinin tripsin ile muamelesinden sonra oluşan ürünlerin (nisin 1-12, nisin 13-20) gerçekte inaktif olduğu belirtilmiştir (Harris et al., 1992a). Yinede tripsin enziminin nisine etki etmediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Klaenhammer, 1988; Kojic et al., 1991; Thuault et al., 1991; Uhlman et al., 1992; Zezza et al., 1993). Nisinin α -kimotripsin enzimi tarafından inaktive edildiği, proteinaz K ve pepsin enzimlerinin ise nisine etki etmediği saptanmıştır (Klaenhammer, 1988; Piard et al., 1990; Kojic et al., 1991; Uhlman et al., 1992; Zezza et al., 1993). Pronaz E enziminin ise bazı çalışmalarda nisine etki etmediği, bazı çalışmalarda ise nisinin pronaz E tarafından inaktive edildiği belirtilmiştir (Klaenhammer, 1988; Kojic et al., 1991; Thuault et al., 1991; Zezza et al., 1993).

2.1.3.1.2 Nisinin etki mekanizması

Nisinin vejetatif hücrelere karşı etki mekanizması ile çeşitli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, sporlara olan etkisi ile yapılan çalışmalar sayıca daha azdır. İlk olarak 1960 yılında katyonik yapısından dolayı nisinin yüzey aktif deterjan gibi davranıp stoplazmik membrana etki ederek UV absorblayan maddelerin hücre dışına sızmasına neden olduğu belirtilmiştir (Henning et al., 1986; Bierbaum and Sahl, 1993; Jack et al., 1995). Daha sonra 1973 yılında yapılan bir

çalışmada nisinin murein sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak bu inhibisyon çok yüksek konsantrasyonlarda gerçekleştiği için, murein sentezi inhibisyonunun primer etki mekanizması olduğuna dair şüpheler artmıştır (Henning et al., 1986; Jack et al., 1995). 1980'lerden sonra nisinin primer etki mekanizmasının sitoplazmik membran üzerine olduğu anlaşılmıştır (Henning et al., 1986; Delves-Broughton and Gasson, 1994; Jack et al., 1995). Henning et al. (1986) yaptıkları bir çalışmada, nisinin *Bacillus subtilis*'te in vivo murein sentezini inhibe ettiği, buna karşın hücre duvarında murein tabakası bulunmayan *Mycoplasma mycoides*'in nisine karşı dirençli olduğunu saptamışlardır. Bu bulgular nisinin sitoplazmik membran üzerine etkili olmadığını düşündürmüştür. Ancak aynı araştırmacılar, *Micrococcus luteus* protoplastında nisin varlığında makromolekül sentezinin inhibisyonunu göstererek nisinin sitoplazmik membran üzerinde de etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, nisinin sitoplazmik membranın, fosfolipid komponentleri ile etkileşime girerek sitoplazmik membranın fonksiyonunu kaybetmesi ile açıklanmıştır. Murein sentezinin inhibisyonu ve membran fonksiyonunun bozulmasının mikroorganizma üzerinde sinerjistik etki oluşturarak inhibitör etkisinin artmasına neden olduğu belirtilmiştir. Nisin ve diğer lantibiyotiklerin varlığında DNA, RNA, protein ve polisakkarit biyosentezi durmaktadır. Böylece hücreler biyosentetik işlemler için yeterli enerjiye sahip olamamakta ve aynı zamanda membran bütünlüğünün

bozulması sonucu, düşük molekül ağırlığına sahip maddeler (ATP, amino asitler, iyonlar gibi) sitoplazmik membranda oluşan gözeneklerden hücre dışına taşınmaktadır (Bierbaum and Sahl,1993; Jack et al., 1995). Membranda gözenekler ise şu şekilde oluşmaktadır: Öncelikle nisin molekülü katyonik yapısından dolayı membranda negatif yüklü fosfolipidlerle etkileşime girmektedir. Ancak bir nisin molekülü tek gözenek oluşturmak için çok küçük olduğundan, birden fazla nisin molekülü sitoplazmik membrana bağlanmaktadır. Bağlanan molekül konformasyonel değişime uğrayarak çubuk şeklini almaktadır. Böylece membranda silindirik yapıda kanallar oluşmaktadır. Nisin moleküllerinin hidrofobik kısımları membranın lipid bölgesine bakarken, hidrofilik kısımları ise su dolu gözenek sınırını oluşturmaktadır.

Gram-negatif bakterilerin sitoplazmik membranları da nisine karşı hassastır. Ancak gram-negatif bakterilerde dış membran zayıflatılmadıktan sonra bu etki görülmez. Dış membranın zayıflatılması ozmotik şok ya da dış membranın lipopolisakkarit tabakasına etki eden işlemlerin (örneğin EDTA) uygulaması ile sağlanabilir (Harris et al., 1992a). Yapılan çalışmalarda nisinin şelat yapıcı ajan olan EDTA ile kombinasyonunun uygulanmasıyla *Salmonella* ve diğer gram-negatif bakterilerinin inhibisyonunun gerçekleştiği belirtilmiştir (Stevens et al., 1991; Vandenbergh,1993; Shefet et al., 1995). Deterjan, boya , antibiyotik gibi molekülün hücre içerisine girmesine izin vermeyen dış membranın lipopolisakkarit

tabakasında magnezyum ve kalsiyum iyonları bulunmaktadır. Şelat yapıcı ajanlardan olan EDTA lipopolisakkarit tabakasında bulunan magnezyum ve kalsiyumu bağlayarak lipopolisakkaritlerin ve lipitlerin dış membrandan kaybolmasına neden olur ve bu durum hücrelerin nisine karşı hassasiyetini artırır (Shefet et al., 1995). Bazı araştırmacılar EDTA'ya ilaveten, sitrik asit monohidrat, sodyum fosfat dibasic, etylenebis (oxyethylene-nitrilo) tetraasetik asit gibi diğer şelat yapıcı ajanların da nisin ile birlikte kullanıldığında *Salmonella* ve diğer gram-negatif bakterilere karşı inhibitör etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Nisinin bakteriyostatik veya bakterisidal etkisi, nisin konsantrasyonu ile vejetatif hücre veya spor konsantrasyonuna bağlıdır. Nisinin sporlara olan etkisi bakterisidal etkiden çok bakteriyostatik etkidir (Delves-Broughton and Gasson,1994). Gıda koruyucu olarak dikkate alındığında, nisinin sporlar üzerinde etkisini sürdürebilmesi için raf ömrü boyunca ortamda belirli oranda bulunması gerekmektedir (Oscroft et al., 1990; Delves-Broughton and Gasson,1994).

Nisinin moleküler düzeyde sporlara olan etkisi çalışılmış buna göre çimlenen sporların membranlarındaki proteinin yapısında bulunan sülfidril gruplarına nisinin bağlanarak etki gösterdiği fosfolipidlerin ise bu noktada önemli olmadığı belirtilmiştir (Delves-Broughton and Gasson,1994; Hansen,1994).

2.1.3.1.3 Nisin üretimi ve nisin üretimine etki eden faktörler

Nisin, *L.lactis* subsp. *lactis*'in bazı suşları tarafından üretilmektedir. Öncü nisin molekülü, hücrelerin aktif büyüme fazının başında sentezlenmekte olup maksimum nisin üretim hızına ise logaritmik üreme fazının sonunda ulaşılmaktadır (De Vuyst and Vandamme, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1993). Bu özellik nisinin sekonder metabolit olmayıp nisin üretiminin primer metabolit kinetiği gösterdiğini belirtmektedir. Nisin üretimi biomass oluşumu ile paralellik taşıdığı için, biomass verimini artırıcı faktörlerin nisin üretimini de artıracakı düşünülmüştür. Bu nedenle biomass verimini dolayısıyla nisin üretimini artırıcı faktörler olarak pH, karbon, azot, fosfor kaynaklarının çeşit ve konsantrasyonu, katyonların etkisi ve sıcaklık değerleri ile çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Nisin üretimi ile sakkaroz fermente etme yeteneği arasındaki ilişki ilk olarak 1950'lerde Hirsch tarafından belirtilmiştir (Klaenhammer, 1988; Harris et al., 1992a). De Vuyst (1994), yaptığı bir çalışmada 27 farklı *L.lactis* subsp. *lactis* suşları arasındaki nisin üretme kapasitelerini incelemiş ve sakkaroz fermentasyon yeteneğinin nisin üretimi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. De Vuyst and Vandamme (1992), nisin üreticisi *L.lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 suşunun farklı sakkaroz konsantrasyonları içeren fermentasyon besiyerinde (Fermentation Medium, FM) nisin üretimlerini pH kontrollü ve pH kontrolsüz

şartlarda incelemişlerdir. Buna göre pH kontrolsüz fermantasyon denemesinin sonucunda en yüksek nisin miktarına yaklaşık 1500 IU*/ml olarak maksimum biomassın olduğu logaritmik fazın sonunda erişilmiştir. Kültürde başlangıçta hızlı biomass oluşumu ve nisin üretimi görülmesine rağmen, sonunda laktik asit birikimine bağlı olarak yüksek biomass ve nisin düzeyleri elde edilmemiştir. Aynı denemede sakkaroz başlangıç dozu 100 g/l'ye çıkarıldığında bile nisin miktarı yaklaşık 2000 IU/ml olmuştur.

Aynı araştırmacıların pH kontrollü fermantasyon denemesinde ise oluşan laktik asitin sürekli nötralizasyonu biomass verimini dolayısıyla nisin miktarını da artırarak maksimum nisin miktarına (1793 IU/ml) ulaşılmıştır. pH kontrollü şartlarda sakkaroz konsantrasyonu 10 g/l'den 40 g/l'ye çıkarıldığında ise maksimum nisin miktarı 3267 IU/ml olarak saptanmıştır. Araştırmacılar 40 g/l'den sonra sakkarozun ortamda kalmaya başladığını ve nisin miktarında azalma olduğunu belirtmişlerdir.

De Vuyst and Vandamme (1993), farklı fosfor ve azot kaynaklarının *L.lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 suşunun gelişmesine ve nisin üretimine etkisini incelemişlerdir. Fosfor kaynağı çeşidinin etkisi pH kontrolsüz şartlarda incelenmiş ve De Vuyst and Vandamme'da (1992) belirtilen sakkaroz bazlı (%2) FM'ye %1 oranında inorganik fosfor kaynakları ilave edilmiştir. Buna göre KH_2PO_4 'ın maksimum kuru hücre ağırlığı ve maksimum nisin miktarı (yaklaşık 2000 IU/ml) oluşmasına neden olduğu gözlenmiştir. KH_2PO_4 konsantrasyonunun etkisi ise pH kontrollü (pH: 6,8) ve pH kontrolsüz şartlarda incelenmiş ve her iki durumda

* 1µg nisin = 40 IU (International Unit) = 40 RU (Reading Unit)

da maksimum kuru hücre ağırlığı ve maksimum nisin üretimi (yaklaşık 3500 IU/ml) %5 KH_2PO_4 konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Azot kaynağı çeşidinin etkisi pH kontrolsüz şartlarda incelenmiştir. Buna göre sakkaroz bazlı (%2) FM'ye azot kaynakları %1 oranında ilave edilmiştir. Pamuk çekirdeği küspesi kullanımının maksimum kuru hücre ağırlığı ve maksimum nisin miktarı (2500 IU/ml) oluşturduğu belirlenmiştir. %3 oranında pamuk çekirdeği küspesi ve %4 oranında soya fasülyesi kaynaklarının da en yüksek nisin aktivite değerleri verdiği ayrıca belirtilmiştir.

Chinachoti et al. (1997), *L.lactis* IO-1 suşu tarafından nisin Z üretimi için alternatif karbon kaynağı olarak ksiloz kullanımını çalışmalarında denemişlerdir. Bunun yanında sıcaklık, doğal kauçuk lateksini ayırma işleminde elde edilen ve içerisinde birçok amino asit, peptid ve inorganik tuz içeren serumun spreyli kurutucu ile kurutulduktan sonra elde edilen serum tozu (NRSP) ve Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} iyonları ile pH'nın nisin Z üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Nisin üreten hücrelerde kalsiyum iyonunun başlıca etkisinin aktif nisin molekülü oluşumu ve bağışıklığı üzerinde olduğu belirtilerek nisinin üretici hücrelere kalsiyum kompleksi şeklinde bağlandığı açıklanmıştır. Denemelerin sonucunda pH kontrolsüz fermentasyon ortamında başlangıç ksiloz konsantrasyonunun 10 g/l'den 70 g/l'ye artırılarak en yüksek nisin miktarının (942 IU/ml), 40g/l ksiloz konsantrasyonunda olduğu gözlenmiştir. Buna göre denemelerde kullanılacak başlangıç ksiloz konsantrasyonu 40 g/l olarak seçilmiştir. Araştırmacıların yaptığı

başka bir denemede pH kontrolsüz ortamda 37°C'de en yüksek hücre yoğunluğu ve nisin üretimi gözlenmiştir. NRSP'nin etkisi ise hem pH kontrolsüz hem pH kontrollü (pH: 6) şartlarda belirlenmiş ve ortama %1,5 oranında NRSP ilave edilmesinin her iki durumda da hücre yoğunluğunu artırdığı ancak nisin Z üretimini etkilemediği bulunmuştur. Diğer bir denemede pH kontrolsüz şartlarda CaCl_2 , MgSO_4 ve MnCl_2 'ün nisin Z üretimine etkisi incelenmiş ve besiyerine 0,1 M olarak ilave edilen katyonlardan MnCl_2 içeren ortamda nisin Z üretimine rastlanmadığı, MgSO_4 ve CaCl_2 'ün ise nisin Z üretimini sırasıyla %11 ve %40 artırdığı bulunmuştur. Aynı araştırmacılar pH kontrollü şartlarda en yüksek nisin Z üretiminin pH 5,5 ve 6,5'e göre pH 6'da olduğunu göstermişlerdir.

Shimizu et al.'un (1999) yaptıkları çalışmada nisin üreticisi *L.lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 suşunun pH kontrollü (pH: 6) ve pH kontrolsüz anaerobik, pH kontrollü (pH: 6) aerobik şartlarda maltoz bazlı besiyerinde nisin üretimlerine bakılmıştır. Denemede elde edilen sonuçlara göre, en yüksek nisin üretimi (58 mg/l) pH kontrollü anaerobik şartlarda gerçekleşmiştir. En düşük nisin miktarı ise üremenin durmasıyla 7,4 mg/l olarak pH kontrolsüz anaerobik şartlarda oluşmuştur.

De Vuyst (1994), farklı *L.lactis* subsp. *lactis* suşları ile yaptığı denemede nisin üretimini arttırmak için daha farklı bir yol önermiştir. Buna göre nisin üretim ve bağışıklık özelliklerinin genetik olarak bağlantılı olduğundan dolayı kendi ürettiği ürüne daha fazla direnç göstererek düşük nisin üretim kapasitesine sahip

suşun daha fazla nisin üretme yeteneği kazandırmanın mümkün olacağını belirtmiştir. Bu durum Qiao et al. (1997) tarafından nisine karşı direnci eritromisin ile artırılmış *L.lactis* LAC 48 suşunun nisin üretiminin parent suşa göre daha fazla olduğu şeklinde gösterilmiştir.

2.1.3.1.4 Nisin üreten *L.lactis* izolasyonu ve nisin aktivitesi tayini

Laktik asit bakterilerinin ürettikleri inhibitör maddelerin saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunların çoğu inhibitör maddelerin katı kültür ortama difüzyonu ve bu ortamda bulunan duyarlı organizma gelişmesinin inhibisyonuna dayanmaktadır (Kociubinski et al., 1996). Agar difüzyon yöntemi, laktik asit bakterileri tarafından üretilen, agar içinde kolaylıkla difüze olabilen inhibitör maddelerin saptanmasında kullanılan uygun bir yöntemdir ve kalitatif olarak bakteriyosinjenik suşların taranmasında kullanılmaktadır.

Spelhaug and Harlander'in (1989) yaptıkları bir çalışmada bakteriyosin üreticisi oldukları bilinen laktik asit bakteri suşlarının bakteriyosine bağlı inhibisyonunun saptanmasında nokta inokülasyon agar difüzyon yönteminden ve bu yöntemin güvenilirliğini etkileyen besiyerlerinden bahsedilmiştir. *L.lactis* subsp. *lactis* 11454 (nisin üreticisi) ve bakteriyosin üreticisi olmayan *L.lactis* subsp. *lactis* LM0230 (negatif kontrol) kültürlerinin 10 mM Tris-HCl'de (pH: 7) hazırlanan 10 kat

(tenfold) dilüsyonları M17-G (%0,5 glukozlu M17), Brain Heart Infusion (BHI) ve MRS Agar ortamlarına nokta inokülasyon yapılmış ve inkübasyondan sonra üzerine indikatör mikroorganizma olarak *L.monocytogenes* 38 içeren yarı katı BHI Agar dökülmüştür. 30°C’de 20 saatlik inkübasyon sonrası petride oluşan zonlar incelenmiş, negatif kontrol ile kıyaslandığında nisin üreticisi kültürün MRS Agar’da oluşturduğu zonun nisin ve asitlikten kaynaklandığı belirlenmiştir. Negatif kontrol suşunun M17-G ve BHI Agarda zon oluşturmadığı görüldüğünden *L.lactis* subsp. *lactis* 11454 suşunun bu besiyerlerinde oluşturdukları zonların sadece nisine bağlı olduğu belirtilmiştir.

Harris et al. (1992b), sauerkraut fermantasyonunda rol oynayan laktik asit bakteri izolatlarının bakteriyosin üretme yeteneklerini nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile Trypticase Soy Agar kullanarak saptamışlardır. Çeşitli indikatör mikroorganizma gruplarına karşı oluşan zonlar bakteriyosin üretimi açısından incelenmiştir. Daha sonra yapılan analizler ile bakteriyosin üreten izolatların ikisi nisin üreten *L.lactis* olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmada, nisin üreticisi olan suşların nisin aktivitesi tayininde kültür süpernatantı kaynar su banyosunda 1 dakika boyunca ısıtıldıktan sonra seri halde iki kat (twofold) dilüsyonları (0,02 M HCl ile) hazırlanmıştır. Her bir dilüsyon, petrilere indikatör mikroorganizma olarak *L.lactis* subsp. *cremoris* ATCC 14365 içeren besiyerine aktarılmış ve inkübe edilmiştir. Nisin titresi, indikatör mikroorganizmayı tamamen inhibe eden en yüksek dilüsyonun karşılığı olarak tanımlanmış ve mililitredeki

aktivite birimi (AU/ml) olarak ifade edilmiştir. Benzer şekilde nisin aktivite tayini Motlagh et al. (1991) tarafından da yapılmıştır. Bu çalışmada, nisin üreticisi olan *L.lactis* subsp. *lactis* DL 16 kültür pH'sı 5,5'e ayarlanıp kaynar su banyosunda 15 dakika bekledikten sonra elde edilen kültür preparatının antimikrobiyal aktivitesinin nisine bağlı olduğu belirtilmiştir. Bu şekilde elde edilen nisin preparatının steril deiyonize su ile hazırlanan dilüsyonları indikatör mikroorganizma olarak *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 içeren besiyerine nokta inokülasyon yapılarak oluşan zonlar incelenmiş ve nisin aktivitesi (AU/ml) hesaplanmıştır.

Zezza et al. (1993), süttten izole edilen laktik asit bakteri izolatlarının bakteriyosin üretme yeteneklerini M17 Agar kullanarak nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile saptamışlardır. Ancak nokta inokülasyon işleminden sonra izolatlar anaerobik inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra koloniler kloroform buharı ile öldürülmüştür. İndikatör mikroorganizma olarak çeşitli *Clostridium* türlerine karşı oluşan inhibisyon zonu bakteriyosin üretimini doğrulayan sonuç olarak belirtilmiştir. Bu şekilde aktif olan suşlar daha sonra yapılan testlerle tanımlanmış ve üç tanesi nisin üreten *L.lactis* olarak belirlenmiştir.

Nisin aktivite tayininde agar kuyu difüzyon yöntemi de kullanılmaktadır. Buna göre De Vuyst and Vandamme (1992), De Vuyst and Vandamme (1993), De Vuyst (1994) ve De Vuyst (1995) FM'de geliştirilen nisin üreticisi *L.lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 suşuna ait kültürün 0,02 M HCl'de hazırlanan 10 kat

(tenfold) dilüsyonunu kaynar su banyosunda 5 dakika beklettikten sonra santrifüj edilerek elde edilen süpernatanttaki nisin aktivite tayinini Tramer and Fowler'da (1964) belirtildiği şekilde *Micrococcus flavus* DSM 1790 suşu kullanılarak agar kuyu difüzyon yöntemi ile saptamışlardır. Buna göre, indikatör mikroorganizma inoküle edilmiş nisin tayin besiyeri (nisin assay medium, NAM) içeren petrilere belirli çapta kuyular açılarak içerisine süpernatant aktarılmış ve inkübasyon sonrası oluşan zonların çapları daha önce standart nisin çözeltileri (1-10 IU/ml) kullanılarak hazırlanan standart eğri ile karşılaştırılmıştır. Chen et al.'un (1997) yaptıkları çalışmada, MRS Broth'da geliştirilen nisin üreticisi *L.lactis* subsp. *lactis* CCRC 14016 suşuna ait kültür, santrifüj edilip filtre ile steril edildikten sonra *L.monocytogenes* inoküle edilmiş MRS Agar içeren petrilere açılan kuyulara süpernatant ve 0,1 M asetat tamponu (pH: 6) ile hazırlanan seri halde iki kat (twofold) dilüsyonlar şeklinde aktarılmıştır. Standart nisin çözeltileri kullanılarak standart eğri çizilmiş ve nisin miktarı regresyon eşitliği ile hesaplanmıştır.

Nisin dışında bakteriyosin üreten diğer laktik asit bakterilerinin saptanmasında ve bakteriyosin aktivite tayininde nokta inokülasyon agar difüzyon ve agar kuyu difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır. Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemiyle yapılan denemelerde laktik asit bakteri kültürlerinin nokta inokülasyon işlemi MRS Agar (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Thuault et al., 1991; Cintas et al., 1995), M17-G Agar (Dufour et al., 1991; Ryan et al., 1996), MRS-0,2 Agar (%0,2 glukozlu MRS

Agar; Schillinger and Lücke, 1989) ve TSAYE (glukozsuz Trypticase Soy Agar + %0,6 maya ekstraktı; Khan et al., 1996) üzerine yapılmıştır. Carminati et al.'un (1989) çalışmasında belirtildiği gibi nötralize olmuş, filtre ile steril edilerek ve katalaz enzimi ilave edilmiş süpernatantlar ile, bazı çalışmalarda da nötralize olmuş filtre ile steril edilmiş süpernatantlar kullanılmıştır (Giraffa et al., 1990; Piard et al., 1990). Aktivite tayininde süpernatantların seri halde iki kat (twofold) dilüsyonları hazırlanarak bakteriyosin titresi saptanmış ve aktivite birimi (AU) olarak ifade edilmiştir. Çeşitli çalışmalarda nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemiyle bakteriyosin ürettiği belirlenen kültürler agar kuyu difüzyon yöntemiyle doğrulanmış ve aktivite birimi (AU) saptanmıştır. Bunun için nötralize olmuş, filtre ile steril edilerek katalaz enzimi ilave edilmiş süpernatant (Schillinger and Lücke, 1989; Cintas et al., 1995), dializ edilerek ve filtre ile steril edilmiş süpernatant (Barefoot and Klaenhammer, 1983) veya sadece filtre ile steril edilmiş süpernatant (Dufour et al., 1991; Ryan et al., 1996) kullanılmıştır. Kojic et al. (1991) ise sadece kültür süpernatantını M17-G Agar üzerine açılan kuyu içerisine aktarmış ve çalışmada bakteriyosin aktivite birimi (AU/ml) hesaplanmıştır.

Agar difüzyon yönteminin yanısıra nisin aktivitesinin saptanmasında mikrotitre analiz yöntemi (Zezza et al., 1993), bioluminesans yöntemi (Waites and Ogden, 1987; Wahlström and Saris, 1999), zıt-faz HPLC yöntemi (Chinachoti et al., 1997) ve ELISA yöntemine (Falahee et al., 1989; Yusof et al., 1993) ait çalışmalar mevcuttur.

2.1.3.1.5 Nisinin antimikrobiyal özellikleri

Diğer bakteriyosinler gibi nisinin mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi sınırlıdır. Gram-negatif bakterileri, maya ve küfleri inhibe etmediği halde, gram-pozitif bakterilere özellikle spor oluşturanlara karşı inhibitör etki göstermektedir (Scott and Taylor, 1981; Magdoub et al., 1984; Henning et al., 1986; Ogden, 1986; Ogden et al., 1988; Splittstoesser and Stoyla, 1989; Bayoumi, 1991; Daeschel et al., 1991; Kanatani et al., 1992; Zezza et al., 1993; Ariyapitipun et al., 1999; Beard et al., 1999; Steeg et al., 1999).

Spor oluşturmaları nedeniyle gıda endüstrisinde önemli bakterilerden olan *Bacillus* ve *Clostridium* türlerine karşı nisinin antimikrobiyal etkisi ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda hem hücrelerin canlı kalma, gelişme hem de eğer toksin üreten suşlar ile çalışılıyorsa toksin üretimine nisinin etkisi araştırılmıştır.

Oscroft et al. (1990), 95°C'de 15 dakika süre ile ısısal strese maruz kalan *Bacillus* spp. (*Bacillus cereus* CRA 193 + *Bacillus licheniformis* CRA 219 + *Bacillus* spp. CRA 190 + *Bacillus* spp. CRA 220 + *Bacillus* spp. CRA 128) sporlarının (10^6 /ml) 1000 IU/ml nisin içeren ortamda pH 6'da 5. günden sonra üremeye başlayabildiğini bildirmişlerdir. Buna karşın pH 5,7'ye düşürüldüğünde ise 250 IU/ml nisin içeren ortamda gelişme ancak 43 gün sonra başlayabilmiştir. Başlangıçtaki spor sayısı azaldıkça

daha az konsantrasyondaki nisinin spor gelişimini önlediği de belirtilmiştir.

Beuchat et al. (1997), farklı nisin konsantrasyonları içeren BHI Broth ve et sosuna inoküle edilen *B.cereus* vejetatif hücreleri (10^5 /ml) üzerine 1 µg/ml gibi az miktardaki nisin konsantrasyonunun et sosundaki öldürücü etkisinin, BHIB'daki etkiye göre daha az olduğunu belirtmişlerdir. Bunun nedeni et sosunu hazırlarken nisin et parçaları üzerine bağlanması ya da et sosunda *B.cereus*'un gelişimini etkileyen yağ asitleri, şeker, tuz ve nişasta gibi maddelerin bulunması şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca çalışmada 8 ve 15°C'de 14 gün depolanan et sosunda hem *B.cereus* vejetatif hücreleri (10^7 /ml) hem de sporlarının (10^7 /ml; inokülasyon öncesi 80°C'de 5 dakika ısıtma işlemi uygulanmış) neden olduğu toksin oluşumunun 8°C için 1 µg/ml, 15°C için 5 µg/ml konsantrasyonlarındaki nisin ile tamamen inhibe olduğu da açıklanmıştır.

Wandling et al. (1999) yaptığı çalışmada mililitresinde 10^7 *B.cereus* veya *B.stearothermophilus* sporları (inokülasyon öncesi 100°C'de 15 dakika ısıtma işlemi uygulanmış) içeren süte farklı oranlarda nisin (2000, 4000 IU/ml) ilave ederek, her iki bakteri için farklı sıcaklıklarda D değerlerini saptamışlardır. Denemenin sonucunda nisin ilavesinin kontrol örneklerle kıyasla D değerini azalttığı görülmüştür.

Nisinin *Clostridium botulinum* tip A, tip B ve tip E sporlarının gelişmesinin önlenmesinde etkili olduğu çalışmada, tip E sporlarının nisine en duyarlı, tip A sporlarının ise en dirençli

oldukları bulunmuştur. (Scott and Taylor, 1981). Aynı çalışmada, tip E sporlarının 7 günlük inkübasyon sonrası ortamda üremenin önlenmesi için başlangıç spor yüküne ($10^2/\text{ml}$, $10^4/\text{ml}$) bağlı olarak gerekli nisin miktarı 50-1000 IU/ml iken, tip B sporları için bu değer 500-2000 IU/ml, tip A sporları için ise mililitrede 1000-2500 IU'den fazla olarak saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarla kıyaslandığında genel olarak *Clostridium* sporlarının *Bacillus* sporlarına göre nisine daha dirençli oldukları araştırmacılar tarafından açıklanmıştır.

Taylor et al. (1990), morina ve ringa filetoları ile sıcak tutsüleme uygulanmış uskumru filetolarının gramında 250, 500 ve 1000 IU nisin olacak şekilde örneklerle nisin çözeltileri sprey ederek, anaerobik ortamda *C.botulinum* tip E sporları inoküle etmişlerdir. Her 3 balık türü için 10°C ' de depolanan örneklerde toksin üretiminin 26°C 'de depolanan örneklerle göre daha uzun sürede ve daha az nisin konsantrasyonu kullanılmasıyla ortaya çıktığı belirtilmiştir.

Roberts and Zottola (1993) çalışmalarında *C.sporogenes* sporları üzerine nisinin etkisini krem peynir yapımında nisin üreten kültür kullanarak göstermişlerdir. Bu amaçla *C.sporogenes* sporları ($10^3/\text{g}$) inoküle edilen pastörize eritme peynirlerinin 22 ile 37°C 'de depolanan ve nisin içeren partisinde (%53 nem içeren peynirlerde 387 IU/g; %60 nem içeren peynirlerde 301 IU/g) gaz oluşumu ve/veya kötü koku oluşumu ile bozulmanın başlamasının ticari starter kültür kullanılarak yapılan krem peynirlerine göre daha uzun zaman sonra ortaya çıktığı gösterilmiştir. Genel olarak 37°C 'de

nisinin koruyucu etkisinin 22°C'ye göre daha az olduğu da belirtilmiştir.

Önemli gıda kaynaklı patojenlerden olan *Listeria monocytogenes* ve diğer patojenler üzerine nisinin etkisini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Chung et al. (1989), sığır etini önce nisin çözeltisine (10^4 IU/ml) daha sonra ayrı ayrı *L.monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa* içeren bakteri kültürüne (10^7 /ml) daldırdığı gibi diğer bir denemede et örnekleri önce bakteri kültürü sonra nisin çözeltisine daldırılmıştır. Her iki deneme sonucunda *L.monocytogenes* ile *S.aureus* üzerine nisinin önemli derecede ($p<0,05$) inhibitör etkisinin ilk 2 dakika içerisinde meydana geldiği saptanmıştır. Gram-negatif bakteriler açısından nisinin önemli etki yaratmadığı görülmüştür. Buna benzer sonuç Motlagh et al. (1991) tarafından disk yöntemi ile yapılan denemede elde edilmiştir. *Listeria* türlerine ait 11 suş ile *S.typhimurium*, *S.anatum*, *E.coli*, *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia enterocolitica* kültürlerini ayrı ayrı içeren ortamda *Listeria* türlerine ait 11 suşa karşı *L.lactis* subsp. *lactis* DL 16 tarafından üretilen nisin içeren preparat (600 AU/20µl) ve Nisaplin (Nisinin ticari adı; 20000 AU/20µl) tarafından inhibisyon zonu oluştuğu ancak gram-negatif bakterilere karşı zonun görülmediği belirtilmiştir. Bu denemelerin yanısıra Chung et al. (1989) tarafından 5 ve 37°C'de depolanan önce nisin çözeltisine daldırılıp sonra yapay inokülasyon yapılmış etler üzerine nisinin düşük sıcaklıkta kontrol örneklerle kıyasla daha etkili olduğu

belirtilmiştir. Araştırmacılar nisin aktivitesinin zamanla azaldığını ancak bu azalmanın yüksek sıcaklıkta daha fazla olduğunu belirtmişler ve nisin et üzerinde koruyucu etki yaratmasının tek başına yeterli olmadığını açıklamışlardır.

Dean and Zottola (1996) ise soğuğa dirençli *L.monocytogenes*'in canlı kalma süresini dondurmada incelemişler ve -18°C'de 3 ay boyunca depolanan nisin ilave edilmeyen dondurma örneklerinde *L.monocytogenes* sayısının ($10^3/g$) değişmeden kaldığı halde dondurma miksine 535 IU/g olacak şekilde Nisaplin ilave edilen örneklerde *L.monocytogenes* sayısının önemli derecede ($p<0,05$) azaldığını göstermişlerdir Bu azalmanın %3 yağlı dondurmada, %10 yağlı dondurmaya göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bunu nedeni, yağın bakteri hücrelerinin dondurma işleminden gelen hasara karşı koruyucu etki göstermesi şeklinde açıklanmıştır.

Laktik asit bakterileri (LAB) birçok gıdanın bozulmasından sorumlu olan mikroorganizma gruplarıdır. Genel olarak bakteriyosinler üretici bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal etki gösterdiklerinden dolayı nisin besiyeri ortamının haricinde değişik gıda gruplarında LAB'ne karşı inhibitör etki gösteren örnekler mevcuttur.

Kalra and Dudani (1975) yoğurt yapımında yoğurt kültürü (%3) ile birlikte %1 oranında nisin üreten kültür (*L.lactis*-4) kullanımının, *Lb.bulgaricus* üzerine etki göstererek fazla miktardaki asit üretiminin baskılandığı bildirmişlerdir. Böylece yoğurt kalitesinin 22°C'de 72 saat, 30°C'de ise 48 saat kadar

korunduğu araştırmacılar tarafından açıklanmıştır. Gupta and Prasad (1989) ise çalışmalarında, katı yoğurt üretiminden sonra farklı oranlarda nisin ilave ederek akışkan yoğurt elde etmişlerdir. Kontrol (nisin içermeyen) rnekleri 18-22°C’de 3. günde duyuasal olarak kabul edilemez olarak belirlendiği halde, 100 RU/g nisin içeren yoğurt örneklerinin lezzet, yapı ve kıvamında fazla değişiklik olmadan 7 güne kadar tketelebileceği saptanmıştır.

Collins-Thompson et al. (1985), değişik krlenmiş et ürünlerinden izole edilen 30 adet LAB suşunun (10^5 /ml; *Lb.lactis*, *Lb.plantarum*, *Lb.brevis*, *Lb.viridescens*, *Lb.mesenteroides* ve atipik laktobasiller) birçoğunun maksimum 25 IU/ml veya daha az konsantrasyonda nisin içeren ortamda gelişebildiğini bildirmişlerdir. Buna karşın *Lb.plantarum*, *Lb.lactis* ve *Lb.viridescens* suşlarının ise daha dirençli oldukları bulunmuştur (50 IU/ml). *Lb.brevis*’in bir suşunun ise 250 IU/ml nisin içeren ortamda gelişebildiği görülmüştür. Ogden and Tubb’ın (1985) yaptığı çalışmada çoğu bira zararlısı olan 149 bakteri suşu ve 12 bira mayasının nisin duyarlılığı agar kuyu difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Buna göre gram-pozitif bakterilerinin büyük çoğunluğunun (%92) nisine, (100 IU/ml kuyu) karşı inhibisyon zonu oluşturduğu, 32 gram-negatif bakteri suşu ve bira mayalarının ise zon oluşturmadığı görülmüştür. Buna benzer bir alışma Radler’in (1990) şarap, üzüm ve asma yapraklarından izole ettiği LAB suşları (*Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* spp.) zerine yapılmış ve LAB’nin yaklaşık %82’sinin 10 IU/0,1ml nisin konsantrasyonunda 1cm’den büyük zon oluşturduğu belirtilmiştir.

El-Bedaway et al. (1985) yaptıkları çalışmada bir çeşit tatlı su balığı olan *Tilapia nilotica* +4°C'de depolanmadan önce nisin çözeltilerine (500-1000 RU/g, 20 ve 30 dakika) daldırılmıştır. Genel olarak nisin ile muamele edilen örneklerde toplam canlı, koliform, LAB sayımlarının kontrol örneklerle kıyasla daha düşük olduğu, küf ve maya sayımları üzerine ise nisinin etkili olmadığı bulunmuştur. 12 gün sonunda kontrol örneklerine ait sayımlar (toplam canlı, koliform, LAB) 10^7 - 10^9 /g arasında değişirken 1000 RU/g, 30 dakikalık uygulamaya ait sayımlar kontrol örneğe göre 1-1,5 logaritmik birim azalma göstermiştir.

Joosten and Nunez (1996), Manchego peynir yapımında süte nisin üreten *L.lactis* ESI 561 suşu ile histamin üreticisi olan *Lb.buchneri* St 2A suşu (1,9; 19; 190/ml) inoküle etmişlerdir. 14°C'de 4 ay depolamadan sonra kontrol örneklerde *Lb.buchneri* St 2A sayısı 10^6 - 10^8 /g arasında değişirken, *L.lactis* ESI 561 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde *Lb.buchneri* sayısı <100/g, histamin miktarı ise <10 mg/kg olarak saptanmıştır.

Davies et al. (1999), Bolonya tipi sosis miksine, nisin (25 µg/g) ile birlikte son konsatrasyon 10^4 /g olacak şekilde LAB karışımı (*Lb.curvatus*, *Lb.sake*, *Leu.mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leu.carnosum*) ilave etmişlerdir. Sosis örnekleri vakum paketlenerek 8°C'de inkübe edildiklerinde kontrol örneklerinin (nisin içermeyen) 7 gün içinde bozulurken (LAB sayısı $\geq 10^8$ /g), nisin içeren örneklerin 50 günden fazla bozulmadan kaldığı tesbit edilmiştir.

1990 yılından sonra yapılan çalışmalarda nisin bazı gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğu belirtilmiştir. İlk olarak Blackburn et al. tarafından gram-negatif bakterilerin gelişimini önlemek için nisin kullanılmış ve yapılan çalışmada nisin şelat yapma özelliğine sahip maddeler ile birlikte kullanıldığında gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğu saptanmıştır (Vandenbergh, 1993).

Stevens et al. (1991), 20 adet *Salmonella* türleri (10^7 /ml) ile diğer gram-negatif bakterilerinin (10^7 /ml; *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*) 50 µg/ml nisin ve 20 mM EDTA içeren ortamdaki sayılarında 37°C'de 30 ve 60 dakika sonra 2,5-6,9 logaritmik birim azalma kaydederken, sadece nisin ya da EDTA içeren ortamda bakterilere ait sayımlarda değişiklik görülmemiştir. Araştırmacılar nisin ve EDTA kombinasyonu tarafından meydana gelen inhibisyonun zamana bağlı bir olay olduğunu bildirmişlerdir.

Shefet et al. (1995), tarafından yapılan bir çalışmada, nisin + EDTA uygulamasına dirençli *S.typhimurium* NAR hücreleri (10^8 - 10^9 /ml) tavuk derisine inoküle edildikten sonra örnekler nisin (100 µg/ml) bazlı farklı konsantrasyonlarda şelat yapıcı maddelerden EDTA ve sitrik asit ile yüzey aktif madde olan tween 20 içeren çözeltiler ile 20 ppm klor çözeltilerine daldırılmıştır. Nisin içeren çözeltilere daldırılan deri örneklerinden sayım (çalkalama yöntemi ile yapılmış) alınan en yüksek *Salmonella* sayısı $10^{0.51}$ /ml iken, klor içeren çözeltiliye daldırılan örnekte bu sayı $10^{4.78}$ /ml olarak saptanmıştır. Aynı şekilde uygulama sonrası çözeltilerden sayım

alındığında da en yüksek *Salmonella* sayısı klora ait uygulamada bulunmuştur ($10^{4,81}$ /ml). Araştırmacılar, dezenfektan olarak geniş kullanım alanına sahip olan klorun nisin içeren formülasyonlara göre daha az etkili olduğunu ve (100 µg/ml nisin; 5 mM EDTA; %3 sitrik asit; %0,5 tween 20; pH, 3,5) formülasyonun dekontaminasyon için en etkili olduğunu bildirmişleridir.

Sonuç olarak, nisinin sahip olduğu antimikrobiyal özelliğinin belirli kriterlere bağlı olduğu söylenebilir. Ortamın pH'sı, sıcaklığı, besin kompozisyonu, hedef mikroorganizmanın türü, ortamdaki nisin konsantrasyonu bu kriterler arasında sayılabilir. Koruyucu olarak nisin kullanılarak belirli bir gıdanın raf ömrünün uzatılması isteniyorsa, raf ömrü boyunca hedef mikroorganizmanın ve/veya mikroorganizmaların gelişmesini engelleyecek kadar ortamda nisin bulunması gereklidir. Bilindiği gibi depolama boyunca nisin miktarında kayıplar görülmektedir. Bu kayıplar örneğin yüksek pH, yüksek sıcaklık gibi durumlarda daha fazladır. Aynı zamanda ortamda bulunan bazı mikroorganizmaların sahip olduğu proteolitik enzimler (nisinaz aktivitesi) yüzünden, nisin inaktif duruma gelmektedir.

Bazı gıda sistemlerinde örneğin et için nisin uygulamasının uygun olmadığı belirtilmiştir. Bu durum, etin heterojen bir yapıda olup nisinin bu gıda grubu için düzgün bir dağılım göstermemesine ve nisinin et proteinleri ile bağ oluşturarak aktivitesinin azalması şeklinde açıklanmıştır. Hem yukarıdaki nedenlerden dolayı hem de maliyet açısından nisinin tek başına yeterli olmadığı durumlarda başka koruyucularla birlikte kullanılması önerilmektedir.

2.1.3.1.6 Nisinin gıdalarda kullanım alanları

Nisin düşük konsantrasyonlarda süt ve peynir gibi gıdalarda doğal olarak bulunmakta ve herhangi bir hastalık etkisi yaratmadan insanlar tarafından tüketilmektedir. Nisin ile yapılan akut toksisite ve doğal olarak tüketilen miktardan 100 kat daha fazla alınarak yapılan uzun dönem toksisite çalışmaları, nisinin toksik etkisinin olmadığını göstermiştir (Delves-Broughton, 1987). Kilogram vücut ağırlığı başına 3300000 IU nisinin (82,5 mg) olumsuz etki yaratmadığı bu çalışmada gösterilmiştir. Sıçanlarda nisinin oral toksisitesi ise oldukça düşüktür (LD_{50} : 7 g/kg; Bierbaum and Sahl, 1993). Nisin vücuda alındıktan sonra barsaklardaki sindirim enzimleri tarafından hızlı bir şekilde inaktive olur. Yapılan bir çalışmada nisin içeren sıvının tüketilmesinden 10 dakika sonra insan tükürüğünde nisin saptanmamıştır (Delves-Broughton, 1990a).

1969 yılında FAO/WHO ortak komitesi tarafından nisinin gıda katkısı olarak kullanılmasına izin verilmiş olup dünyada 50'nin üzerinde ülkede güvenli ve etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Roller, 1991; Gorris, 1994; Roller and Lusengo, 1997). 1988 yılından beri FDA tarafından pastörize işlem görmüş peynirlerde *C.botulinum* sporlarının gelişmesinde ve toksin oluşumunu önlemek amacıyla GRAS (Generally Regarded As Safe) olarak kullanımına izin verilmiştir (Roberts et al., 1992; Gorris, 1994). Avrupa Birliği ülkelerinde ise irmik ve tapioka pudingler, olgunlaştırılmış ve işlem görmüş peynirler ile ekşitilmiş kremada nisin (E 234) kullanımına izin verilmektedir (Roller and

Lusengo, 1997). Ülkemizde de halen Avrupa Birliği ülkelerinde geçerli olan gıdalarda aşağıda belirtilen miktarlarda (maksimum doz) kullanılmaktadır (TGKY, 1997):

İrmik ve tapioka pudingler

ve benzer ürünler : 3 mg/kg

Olgunlaştırılmış ve işlem

görmüş peynirler :12,5mg/kg (Bazı peynirlerde fermentasyon sonucu bulunur.)

Ekşitilmiş krema : 10 mg/kg

Nisin ticari olarak üretilen tek bakteriyosin olup, İngiltere’de “Nisaplin” adı altında Aplin and Barrett Ltd. şirketi tarafından üretilmektedir. Çizelge 2.5’te 1989 yılında Aplin and Barrett Ltd. şirketi tarafından yayınlanan ve bazı ülkelerde izin verilen maksimum nisin miktarları ile kullanıldığı gıdalar gösterilmiştir (Delves-Broughton, 1990a). Çizelge 2.5’ten de görüldüğü gibi nisinin yasal olarak kullanıldığı gıdalar daha çok süt ve süt ürünleri ile bazı konserve gıdalar olmasına karşın nisinin birçok gıdada uygulanabilirliği konusunda çalışmalar devam etmektedir.

Çizelge 2.5 Bazı ülkelerde nisin kullanımına izin verilen gıdalar ve maksimum nisin miktarları (Delves-Broughton, 1990a).

Ülke	Gıda	Maksimum miktar (IU/g)
ABD	Çeşitli işlem görmüş eritme peynirler	10000
Arjantin	İşlem görmüş peynir	500
Avustralya	Peynir Konserve domates Konserve domates püresi ve salçası Konserve çorbalar	Sınırsız
Bulgaristan	Peynir Taze balıkları depolamada kullanılan buz	200 mg/kg
Çekoslovakya	Hububat ürünleri Mayonez İşlem görmüş peynir Hazır gıdalar Yarı-hazır gıdalar Konserve sebzeler Bebek gıdaları	500
Katar	Süt ve süt ürünleri	Sınırsız
Polonya	Olgunlaştırılmış peynir	4000
Singapur	Peynir Konserve gıdalar	Sınırsız

Blok ve eritme peynirleri bakteriyel sporların gelişmesi ve çimlenmesi ile birlikte bozulmaya maruz kalırlar. Başlıca bozulmaya neden olan bakteriler arasında *C.sporogenes*, *C.butyricum* ve *C.tyrobutyricum* sayılabilir nadiren *Bacillus* türleri de görülmektedir (Delves-Broughton and Gasson, 1994). Bu bakteri sporları çoğunlukla silajdan çiğ süte bulaşırlar ve pastörizasyon sırasında canlılıklarını korurlar (Eckner, 1992). Bunun yanında *C.botulinum* da potansiyel tehlike durumundadır. Peynirlerde bakteri tipi ile birlikte, spor yükü, ısıl işlemin derecesi, peynirin pH'sı, peynirin kompozisyonu, depolama süresi ve depolama sıcaklığı nisin ilavesine etki eden faktörleri oluşturmaktadır (Delves-Broughton and Gasson, 1994). Bunun yanısıra nisin üreten kültür kullanarak peynir yapımına ait çalışmalar da mevcuttur. Ilıman iklime sahip ve yetersiz soğutmadan dolayı raf ömrü problemleri olan ülkelerde tüketicilere iyi kalitede süt sağlamak zor olmaktadır. Isıya dirençli bakteri sporları içerebilen gerek pastörize gerek steril sütlerle nisin ilavesi sütlerin raf ömrünün uzatılmasında yeterli olabilmektedir (Delves-Broughton, 1987). Bunun yanısıra sütlü tatlılar ile yoğurt yapımında da nisin kullanılmasıyla ürünlerin raf ömürlerinde artış sağlanabildiği gösterilmiştir (Vandenbergh, 1993). Yoğurt yapımında yoğurt kültürü ile birlikte nisin üreten kültür kullanarak raf ömrünün uzatılmasına ait çalışmalar da bulunmaktadır.

Nisinin stabilitesi ve aktivitesi azalan pH ile arttığından nisin, aside toleranslı bozulma yapan florayı kontrol altına almak için yüksek asitli ($\text{pH} < 4,5$) konserve gıdalarda kullanıldığı gibi,

düşük asitli ($\text{pH} > 4,5$) konserve gıdalarda da koruyucu olarak kullanılmaktadır (Hurst, 1978; Delves-Broughton, 1990a). Genel olarak düşük asitli konserve gıdalarda *C.botulinum* sporlarını yok edecek ısı işlem uygulaması gereklidir. Bu organizmanın suşları diğer *Clostridium* türlerine göre nisine daha duyarlıdır (Hurst, 1978). Ancak bazı bozulmaya neden olan termofilik bakteriler (*B.stearothermophilus*, *C.thermosaccharolyticum*), *C.botulinum*'dan daha fazla ısıya dirençli olduklarından, konserve gıdalar *C.botulinum* sporlarını yok etmek için uygulanan ısı işlemin ötesinde bir ısı işleme tabi tutulurlar. Bu şekilde gıdaların doku, tat ve görünüşlerinde ısı zararlar ortaya çıkabilir. Ancak bu organizmalar da nisine karşı duyarlı oldukları için, nisin kullanılarak konserve gıdalarda termofilik bozulmalar kontrol altına alınabilir ayrıca ekstra ısı işlem uygulanması önlenmiş olur. Isı işlem boyunca yüksek pH ile birlikte ($\text{pH} > 4,5$) nisin yaklaşık %70-90'ı degrade olmasına rağmen kalan nisin miktarı bakteri sporlarına karşı etkili durumdadır (Delves-Broughton and Gasson, 1994).

Nisinin et ve et ürünlerinde uygulanabilirliği, fermente ürünlerde nisin üreten starter kullanarak ya da nisin ilavesiyle bozulma yapan florayı kontrol altına almak veya toksikolojik açıdan nitrit ele alındığında, nisin kullanımıyla nitrit düzeyini azaltarak *C.botulinum*'un gelişimini önlemek şeklinde olabildiği gibi taze etlerin nisin içeren çözeltilere daldırarak raf ömrünü uzatmak şeklinde de olabilmektedir (Delves-Broughton and Gasson, 1994). Nisin, konserve gıdalar olarak et ürünlerinde zaten

kullanılmaktadır. Genel olarak, etlerde kullanılan nisin ile değişken sonuçlar olmak mümkündür. Bunun nedeni daha önce nisinin antimikrobiyal özelliklerinde de belirtildiği gibi nisinin et parçalarına ve yüzeyine bağlanması, et sistemlerinde homojen olmayan dağılımı, zayıf çözünürlüğü ve fosfolipidlerle etkileşimi ile açıklanabilir (Delves-Broughton, 1987; Delves-Broughton and Gasson, 1994).

Özellikle bira ve şarap üretiminde laktik asit bakterileri fermantasyon boyunca gelişerek bozulmaya neden olmaktadır. Bunun sonucunda bulanıklık, asit artışı, kötü lezzet oluşumu ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda belirli miktarda nisin ilavesi bira ve şarap mayalarına zarar vermeden istenmeyen laktik asit bakterilerinin gelişmesini durdurmada yeterli bulunmuştur (Delves-Broughton, 1987; Delves-Broughton and Gasson, 1994). Biracılıkta diğer önemli bir konu, kullanılan mayanın kontaminasyonudur. Mayanın nisin ile yıkanması sonucu kontamine laktik asit bakterileri kısa sürede ölmekte ve asit ile yıkamaya göre mayanın performansında da azalma meydana gelmemektedir (Delves-Broughton and Gasson, 1994).

Nisinin yukarıda bahsedilen gıdalar yanında sıvı yumurta, balık ve unlu gıdalarda da uygulanabilirliği konusunda çalışmalar yapılmaktadır (Delves-Broughton, 1990a). Gıdalarda kullanılan nisin miktarı gıdadan gıdaya, ülkeden ülkeye değişmektedir. Bugün bazı ülkelerde nisin, antibiyotik olarak adlandırıldığı için gıdalarda kullanımı yasaktır. Ancak nisin bir bakteriyosin olup, güvenli bir koruyucu olarak kullanılmasında sakınca yoktur. Bazı gıdalarda ısıt

işlem ile birlikte kullanıldığında, ısıl işlemin azalmasına bağlı olarak proses masraflarının azalmasına, gıdaların lezzet, görüntü ve besin değerinin iyileşmesine yardımcı olmaktadır. Nisinin gelecekte de koruyucu olarak kullanılmasına devam edilecektir. Özellikle genetik yöntemler sayesinde daha geniş mikrobiyal spektruma ve daha fazla aktiviteye sahip olan modifiye nisin molekülleri elde etmek mümkün olacaktır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kùltürler

Nisin üreten *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCFB 497 (Bundan sonra *L.lactis* 497 olarak belirtilecektir) ve indikatör mikroorganizma *Micrococcus luteus* NCFB 982 (Bundan sonra *M.luteus* 982 olarak belirtilecektir) suşları National Collection of Food Bacteria'dan (NCFB, İngiltere) liyofilize halde temin edilmiştir. Diğer indikatör mikroorganizmalar *L.monocytogenes* Scott A ve *S.aureus* ATCC 6538 P, E.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı (Bornova-İZMİR) kùltür koleksiyonundan sırasıyla yatık Tryptone Soya Agar (TSA) ve yatık BHI Agar'da, *Lactobacillus* spp. D17 ise Institut Für Hygiene und Toxikologie (Almanya) bölümünden dik MRS Agar'da temin edilmiştir.

3.1.2 Besiyerleri

Laktik asit bakterisi izolasyonunda yapılan ön denemelerde besiyeri olarak tamponlanmış Elliker Agar [EA; g/l: tripton (Oxoid, L42), 20; maya ekstraktı (Oxoid, L21), 5; jelatin (Oxoid, L8), 2,5; glukoz (Riedel-De-Haen, 16325), 5; laktoz (Oxoid, L70), 5; sakkaroz (Merck, 1.07653.1000), 5; NaCl (Horasan Kimya), 4; sodyum asetat (Merck, 106265), 1,5; askorbik asit (Merck,

Art.127), 0,5; agar (Merck, Art.1615), 15 + %0,4 (w/v) diamonyum fosfat : Na_2HPO_4 ; Merck, Art.6586 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck, 106345], asıl denemelerde ise MRS Agar [MRS Broth (Oxoid, CM 359) + % 1,5 agar] kullanılmıştır (Teuber et al., 1992).

Laktik asit bakteri kültürlerini aktive etmek için MRS Broth, *M.luteus* 982 kültürünü aktive etmek için Yeast Glucose Broth [YGB; g/l: nutrient broth no.2 (Oxoid, CM 67), 25; glukoz (Riedel-De-Haen, 16325), 5; maya ekstraktı (Oxoid, L21), 3; pH: 6,8] veya BHI Broth (Oxoid, CM 225), *L.monocytogenes* Scott A kültürü için Tryptone Soya Broth (TSB; Oxoid, CM 129) ve *S.aureus* ATCC 6538 P kültürü için BHI Broth kullanıldığı halde agar difüzyon yöntemlerinde indikatör mikroorganizmaların gelişmesi için yukarıda belirtilen besiyerlerinin % 1,5 agar içeren katı formları veya sadece nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemine ait asıl denemelerde *M.luteus* 982 kültürünün gelişmesi için yarı katı BHI Agar (% 0,75 agar içeren) kullanılmıştır.

Laktik asit bakterilerini stok olarak saklamak için %10'luk yağsız süttozu besiyeri [YSB; g/l: yağsız süttozu (Pınar süt), 100; CaCO_3 (Carlo Erba, 327059), 10; glukoz (Riedel-De-Haen, 16325), 10; maya ekstraktı (Oxoid, L21), 3], *M.luteus* 982 kültürünü saklamak için yatık Yeast Glucose Agar (YGA; YGB + % 1,5 agar), *L.monocytogenes* Scott A kültürünü saklamak için yatık TSA (TSB + % 1,5 agar) ve *S.aureus* ATCC 6538 P kültürü için ise yatık BHI Agar (BHI Broth + % 1,5 agar) kullanılmıştır (Hardie, 1986; Jackman et al., 1990).

Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesine ait ön denemede yayma plak yönteminin uygulandığı besiyeri olarak MRS Agar kullanılmıştır. Asıl denemelerde iğne öze ile nokta inokülasyon işleminin uygulandığı ve şüpheli bakteriyosin üreticisi laktik asit bakterisi ile yapılan denemede ise yayma plak yönteminin uygulandığı besiyeri olarak izolatların asit üretimini engellemek amacıyla YGA'nın içeriğinden glukoz çıkarılmış ve maya ekstraktı içeriği ise %0,6 olarak değiştirilmiş yeast agar (YA) kullanılmıştır (Khan et al., 1996).

Standart eğrinin oluşturulmasında yapılan ön denemede FM (g/l; sakkaroz (Merck, 1.07653.1000), 10; pepton (Oxoid, L37), 10; maya ekstraktı (Oxoid, L21), 10; KH_2PO_4 (Riedel-De-Haen, 962815), 10; NaCl (Horasan Kimya), 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Riedel), 0,2; pH: 6,8), nisin aktivitesinin saptanmasında yapılan ön denemede *L.lactis* 497 kültürünün gelişimi için inokülasyon ortamı (FM'nin içeriğinden pepton çıkarılmış) ve FM kullanılmıştır (De Vuyst and Vandamme, 1992). Asıl denemede ise hem standart eğrinin oluşturulması hem de kültürün gelişmesi için MRS Broth kullanılmıştır.

Standart eğrinin oluşturulması ve nisin aktivitesinin saptanmasına ait ön ve asıl denemelerde Tramer and Fowler (1964) tarafından önerilen besiyeri olarak NAM [g/l: pepton (Oxoid, L37), 10; et ekstraktı (beef extract; Oxoid, 0126-01), 3; NaCl (Horasan Kimya), 3; maya ekstraktı (Oxoid, L21), 1,5; esmer şeker (Takita), 1; agar, 15; pH: 6,8; sterilizasyon sonrası %2 oranında tween 20

(Merck, Art.822184) ve steril destile su (1:1) ilavesi] veya YGA kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Lactococcus* izolasyonu

10 g katı veya 10 ml sıvı örnek alınarak 90 ml peptonlu su (%0,1'lik pepton, Oxoid L37) içine aktarılmıştır. Katı örnekler 1 dakika boyunca Laboratory Blender Stomacher 400'de homojenize edilmiştir. Hazırlanan 10^{-1} 'lik dilüsyondan aynı dilüsyon sıvısı kullanılarak diğer desimal dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan besiyeri olarak EA veya MRS Agar kullanılarak çift tabaka yöntemi ile çift paralelli ekim yapılmış, ekim yapılan petriler 30°C'de 3 gün inkübe edilmiştir (Sharpe et al., 1966; Kandler and Weiss, 1986; Teuber et al., 1992). İnkübasyon sonunda oluşan kolonilerden her örnek için ortalama 5 koloni izolat olarak MRS Broth'a aktarılmış ve 30°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İzolatların saflığı çizim yöntemi (MRS Agar'da) ve Gram boyama ile kontrol edildikten sonra izolatlara katalaz testi uygulanmıştır. Bu şekilde gram-pozitif kok şeklinde ve katalaz-negatif olan kültürler 'kok şeklinde laktik asit bakterisi' (KLAB) olarak YSB'ne alınmış ve besiyeri pıhtılaşınca kadar 30°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Schillinger and Lücke, 1987). Glukozdan gaz üretimi negatif olan homofermantatif koklar (KHLAB), farklı sıcaklıklarda üreme, pH 9,2'de sıvı besiyerinde üreme, % 4 NaCl içeren sıvı besiyerinde üreme, arginin hidrolizi ve

karbonhidrat fermentasyon testlerinin bölüm 3.2.3'de belirtilen sonuçlarına göre "*L.lactis* olma olasılığı yüksek kültürler" olarak YSB'ne alınmış ve pıhtılaşmaya kadar 30°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Mundt, 1986; Schillinger and Lücke, 1987).

Böylece EA kullanılarak 2 adet çiğ süt örneğinden 32 izolat, MRS Agar kullanılarak 68 adet peynir, 14 adet çiğ süt ve 1 adet beyaz lahana olmak üzere toplam 83 örneğin 67'sinden 273 izolat elde edilmiştir.

3.2.2 Kültürlerin hazırlanması

Liyofilize *L.lactis* 497 kültürüne 0,5 ml MRS Broth ilave edilerek bu karışım 10 ml MRS Broth'a aktarılmış ve 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde aktive edilen *L.lactis* 497 kültürü MRS Broth'a %2 oranında inoküle edilerek 30°C'de 24 saat ikinci kez inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, ikinci kez aktive edilen bu kültür YSB'ye %2 oranında inoküle edilerek 30°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve stok kültür olarak buzdolabı koşullarında saklanmıştır (Hardie, 1986). Liyofilize *M.luteus* 982 kültürüne 0,5 ml YGB ilave edilerek süspanse edilmiştir (Jackman et al., 1990). Bu karışım 10 ml YGB'ye aktarılmış ve 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Aktive edilen *M.luteus* 982 kültürü %2 oranında YGB'ye inoküle edilerek 30°C'de 48 saat ikinci kez aktive edilmiştir. Daha sonra kültür, yatkı YGA'ya inoküle edilerek 30°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmış ve stok kültür olarak buzdolabı koşullarında saklanmıştır.

Stok laktik asit bakteri kültürlerini aktive etmek için MRS Broth'a %5'lik (dik MRS Agar'da temin edilen *Lactobacillus* spp. D17 kültürünü aktive etmek için MRS Broth'a iğne öze ile), *M.luteus* 982 kültürünü aktive etmek için YGB'ye veya BHI Broth'a, *L.monocytogenes* Scott A kültürü için TSB'ye ve *S.aureus* ATCC 6538 P kültürü için ise BHI Broth'a birer öze dolusu ekim yapılarak laktik asit bakterisi içeren tüpler 30°C'de 24 saat, diğerleri 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

İzolatların tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testlerde, stok laktik asit bakteri kültürleri bir kez aktive edildikten sonra yatık MRS Agar'a alınarak 30°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve biyokimyasal test ortamlarına inokülüm olarak kullanılmıştır.

Standart eğrinin oluşturulması ve nisin aktivitesinin saptanmasına ait ön ve asıl denemelerde kullanılmak üzere YGB'de canlandırılan *M.luteus* 982 kültürü yatık YGA'ya inoküle edilerek 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürün üzerine 7 ml steril fizyolojik su (% 0,85 NaCl içeren saf su) ilave edilerek süspanse edilmiş ve steril fizyolojik su kullanarak kültür 10 kat seyreltilmiştir (Tramer and Fowler, 1964). Böylece *M.luteus* 982 kültürü NAM ve YGA'ya inokülasyon için hazır duruma getirilmiştir.

3.2.3 İzolatların tanımlanması

İzolatların tanımlanması Çizelge 3.1'deki şemaya göre yapılmıştır.

Çizelge 3.1 İzolatların *L.lactis* subsp. *lactis* olarak tanımlanmasında kullanılan testler (Mundt, 1986; Schillinger and Lücke, 1987; Teuber et al., 1992).

Gram reaksiyonu	Gram-pozitif, kok
Katalaz üretimi	negatif
Glukozdan gaz üretimi	negatif
10°C'de üreme	pozitif
40°C'de üreme	pozitif
45°C'de üreme	negatif
pH 9,2'de sıvı besiyerinde üreme	pozitif
%4 NaCl içeren sıvı besiyerinde üreme	pozitif
Arginin hidrolizi	pozitif
Dekstrinden asit üretimi	negatif
Rafinozdan asit üretimi	negatif
Ramnozdan asit üretimi	negatif
Ribozdan asit üretimi	pozitif
Sorbitolden asit üretimi	negatif
%0,1 metilen mavisi içeren sütte üreme	pozitif
%40 safra içeren ortamda üreme	pozitif
İzopren kinon üretimi	pozitif
Sitrattan CO ₂ üretimi	negatif
Diasetil ve asetoin üretimi	negatif

3.2.3.1 Katalaz testi

Temiz bir lam üzerinde %10'luk H_2O_2 çözeltisinden 1 damla, yatık MRS Agar'da gelişmiş öze dolusu kültür ile süspanse edilmiş ve gaz kabarcıkları çıkışı gözlenmiştir (Harrigan and McCance, 1976). Gaz kabarcıklarının gözlenmesi katalaz-pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.2 Glukozdan gaz üretimi

Denemede, içeriğinden sitrat çıkarılmış durham tüpü bulunan MRS Broth besiyeri olarak kullanılmıştır (Schillinger and Lücke, 1987). Ekim yapılan tüpler $30^\circ C$ 'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır (Boubekri and Ohta, 1996). Glukozdan gaz üretimi durham tüplerinde gaz oluşumu ile gözlenmiştir.

3.2.3.3 Farklı sıcaklıklarda üreme

İçerisinde MRS Broth bulunan tüplere ekim yapılmıştır (Schillinger and Lücke, 1987). Tüpler $45^\circ C$ 'de 3 gün, $10^\circ C$ 'de 7 gün ve $40^\circ C$ 'de 3 gün inkübe edilmiştir (Ledford and Brown, 1979). $40^\circ C$ ve $45^\circ C$ 'deki denemeler su banyosunda gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası bulanıklık gözlenen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.4 pH 9,2'de sıvı besiyerinde üreme

pH'sı steril 1 N ve 0,1 N NaOH ile 9,2'ye ayarlanmış MRS Broth kullanılmıştır. Ekim yapılan tüpler 30°C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır (Ledford and Brown, 1979; Schillinger and Lücke, 1987). İnkübasyon sonrası bulanıklık gözlenen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.5 %4 NaCl içeren sıvı besiyerinde üreme

MRS Broth'a %4 oranında NaCl (Horasan Kimya) ilave edilerek besiyeri hazırlanmıştır. Tüpler ekim yapıldıktan sonra 30°C'de 3 gün inkübe edilmiştir (Boubekri and Ohta, 1996). Bulanıklık gözlenen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.6 Arginin hidrolizi

Denemede, içeriğinden glukoz ve et ekstraktı (lab lamco powder; Oxoid, L29) çıkarılmış ve %0,3 oranında arginin (Merck, Art.1542) ve %0,2 oranında sodyum sitrat (Riedel-De-Haen, 25116) ilave edilmiş MRS Broth kullanılmıştır (Schillinger and Lücke, 1987). Ekim yapılan tüpler 30°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültürün 1 ml'si temiz bir test tüpüne aktarılarak üzerine 1 ml Nessler ayırıcı ilave edilmiştir. Kahverengi veya portakal kırmızısı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Harrigan and Mc Cance, 1976).

3.2.3.7 Karbonhidrat fermantasyon testleri

Bazal besiyeri olarak içeriğinden glukoz ve et ekstraktı çıkarılmış ve %0,004 oranında bromcresol purple (Merck, Art.3025) ilave edilmiş MRS Broth kullanılmıştır (Schillinger and Lücke, 1987; De Vuyst, 1994). Riboz (Sigma, R-7500), rafinoz (Merck, Art.7419), ramnoz (Difco, 0175-13), sorbitol (Sigma, S-1876) ve dekstrin (Difco, 0161-17)'in %10'luk çözeltileri hazırlanıp, dekstrin dışındakiler membran filtrasyon (Millipore, type HA, pore size: 0,45 µm) ile steril edilmiştir (Mundt, 1986; Boubekri and Ohta, 1996). Dekstrinin %10'luk bulanık çözeltisi önce 100°C'de kaynar su banyosunda 15 dakika bekletilip berrak duruma geldikten sonra membran filtreden geçirilmiştir. Şeker çözeltileri aseptik olarak içerisinde bazal besiyeri olan tüplere son konsantrasyon %1 olacak şekilde ilave edilmiştir. Ekim yapılan tüpler 30°C'de 2 gün inkübe edilmiştir (Passos et al., 1984). İnkübasyon süresi sonunda besiyeri renginin sarıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4 Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi

3.2.4.1 Agar kuyu difüzyon yöntemi

3.2.4.1.1 Kültür süpernatantlarının hazırlanması

İzolatlar bölüm 3.2.2'de bahsedildiği şekilde bir kez aktive edildikten sonra %2 oranında içerisinde MRS Broth bulunan

santrifüj tüplerine inoküle edilerek 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Schillinger and Lücke, 1989). İnkübasyon sonunda kültürler 15 dakika santrifüj (Hettich Rotofix II, 2500×g) edildikten sonra süpernatantların pH’sı oluşan asitliği nötralize etmek amacıyla 5 N; 1 N ve / veya 0,1 N NaOH ile 6,5’e ayarlanmıştır (Carminati et al., 1989; Schillinger and Lücke, 1989). Nötralize edilen süpernatantlar membran filtrasyon (Millipore, type HA, pore size: 0,45 µm) ile steril edilerek (Carminati et al., 1989; Dufour et al., 1991) son konsantrasyon mililitrede 5 mg olacak şekilde H₂O₂’ten gelen inhibisyonu önlemek amacıyla katalaz enzimi (Sigma, C-9322) ilave edilmiştir (Schillinger and Lücke, 1989). Bunun için 10 mM potasyum fosfat tamponu [pH:7, K₂HPO₄ (Merck, 1.05101.1000), KH₂PO₄ (Merck, 4871)] içerisinde %5’lik katalaz çözeltisi hazırlanarak membran filtrasyon (Millipore, type HA, pore size: 0,45 µm) ile steril edilmiştir (Carminati et al., 1989). Katalaz ilave edilen süpernatantlar 25°C’de 30 dakika bekletilmiştir (Carminati et al., 1989).

3.2.4.1.2 Antagonistik etkinin saptanması

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde aktive edilen *M.luteus* 982 kültürü 20 ml YGA’ya 1 ml olacak şekilde ilave edilmiş ve petrilere 20’şer ml olarak paylaştırılmıştır. Daha sonra petriler 4°C’de 1 saat bekletilmiştir (Tramer and Fowler, 1964). Her *M.luteus* 982 kültürü içeren YGA petrisinde 4 kuyu olacak şekilde 5 mm çapındaki steril delik açıcı yardımıyla kuyular açılarak

içerisine, bölüm 3.2.4.1.1'de anlatıldığı üzere hazırlanan 30 µl kültür süpernatantları ilave edilmiştir. Petriler 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Böylece 17 adet *L.lactis* olma olasılığı yüksek izolat, 61 adet KHLAB ve 35 adet KLAB izolatları olmak üzere toplam 113 bakteri izolatı agar kuyu difüzyon yöntemiyle bakteriyosin üretimi açısından taranmıştır.

3.2.4.1.3 Kontrol örneklerinin inhibitör etkisinin incelenmesi

Kontrol örnekleri olarak 10 mM fosfat tamponu, bölüm 3.2.4.1.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan katalaz çözeltisi ve 5N, 1N ve/veya 0,1 N NaOH ile nötralize edilmiş %1'lik laktik asit (Merck, Art.366) çözeltisi kullanılmıştır (Carminati et al, 1989). Örneklerin hepsi membran filtrasyon (Millipore, type HA, pore size: 0,45 µm) ile steril edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan kontrol örneklerinin inhibitör etkisi bölüm 3.2.4.1.2'de anlatıldığı şekilde incelenmiştir.

3.2.4.2 Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi

Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile yapılan ön denemede peynir örneğinden bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde dilüsyonlar hazırlanarak, uygun dilüsyonlardan MRS Agar petrilere yayma plak yöntemi ile ekim yapılmış ve yarım saat

sonra petrilerin üzeri yarı katı MRS Agar ile kaplanmıştır (Thuault et al., 1991). 30°C'de 48 saat sonra petrilerin üzerine 3. kat olarak bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde aktive edilen *M.luteus* 982 (YGB'de aktive edilmiş), *L.monocytogenes* Scott A, *S.aureus* ATCC 6538 P, *Lactobacillus* spp. D17 kültürlerini ayrı ayrı içeren sırasıyla YGA, TSA, BHI Agar ve MRS Agar (0,75 ml kültür/15 ml besiyeri) dökülmüştür. 30°C'de 24 saat inkübasyon sonrası kolonilerin etrafında oluşan inhibisyon zonları incelenmiştir. İnhibisyon zonu oluşturan kolonilerden bölüm 3.2.1'de belirtildiği üzere KLAB olarak tanımlanan 15 izolatın bakteriyosin üretme yetenekleri agar kuyu difüzyon yöntemine benzer nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile doğrulanmıştır. Ancak bölüm 3.2.4.1.1'de anlatıldığı şekilde laktik asit bakterisi kültür süpernatantlarının hazırlanmasında sterilizasyon amacıyla membran filtrasyon işlemi yerine ısı işlem uygulanmıştır (Qiao et al., 1997). Bunun için nötralize edilen süpernatantlardan 1'er ml alınarak 15 adet 5 ml'lik steril cam şişelere aktarılmış ve şişeler su banyosunda 65°C'de 15 dakika boyunca bekletilmiştir.

Antagonistik etkinin saptanmasında ise bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi aktive edilen *M.luteus* 982 (YGB'de aktive edilmiş), *L.monocytogenes* Scott A, *S.aureus* ATCC 6538 P, *Lactobacillus* spp. D17 kültürleri ayrı ayrı 20 ml besiyerine (sırasıyla YGA, TSA, BHI Agar ve MRS Agar) 1 ml olacak şekilde ilave edilmiş ve petrilere 20'şer ml olarak paylaştırılmıştır. Her bir indikatör mikroorganizma kültürünü içeren besiyeri petrisinde 5 izolata ait süpernatant olacak şekilde yukarıda anlatıldığı üzere

hazırlanan 3'er µl laktik asit bakteri kültür süpernatantları petrilerin üzerine aktarılmış ve petriler 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile yapılan asıl denemede ise bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere inokulum olarak hazırlanan laktik asit bakteri kültürleri her YA petrisinde 5 izolat olacak şekilde iğne öze ile nokta ekim yapılarak 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. *M.luteus* 982 kültürü ise BHI Broth'da canlandırıldıktan sonra, 0,1 ml kültür 10 ml yarı katı BHI Agar'a ilave edilerek daha önce nokta ekim yapılmış olan YA petrilerinin üzerine dökülmüştür. 30°C'de 24 saat inkübasyondan sonra etrafında inhibisyon zonu oluşan koloniler şüpheli bakteriyosin üreten izolatlar olarak tanımlanmıştır (Khan et al., 1996). İzolatların bakteriyosin üretme yetenekleri agar kuyu difüzyon yöntemi ile doğrulanmıştır. Toplam 160 adet KLAB izolatu nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üretimi açısından taranmıştır.

Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile şüpheli bakteriyosin üreticisi şeklinde tanımlanarak YSB'de stok olarak saklanan laktik asit bakteri kültürünün bakteriyosin üretme yeteneğini tekrar test etmek için YSB'den 1 ml alınarak 9 ml peptonlu su (% 0,1'lik pepton, Oxoid, L37) içine aktarılmıştır. Hazırlanan 10⁻¹'lik dilüsyondan aynı dilüsyon sıvısı kullanılarak diğer desimal dilüsyonlar hazırlanmış ve uygun dilüsyonlardan yayma plak yöntemi ile YA petrilerine ekim yapılmıştır. 30°C'de 24 saat sonra yukarıda anlatıldığı üzere hazırlanan *M.luteus* 982 kültürü içeren yarı katı BHI Agar petriler üzerine dökülmüştür.

30°C'de 24 saat inkübasyon sonrası kolonilerin etrafında oluşan inhibisyon zonları incelenmiştir. İnhibisyon zonu görülen kolonilerin (12 adet) bakteriyosin üretme yetenekleri agar kuyu difüzyon yöntemi ile doğrulanmıştır.

3.2.5 Standart eğrinin çizilmesi ve nisin aktivitesinin saptanması

3.2.5.1 Standart eğrinin çizilmesi

Standart eğrinin çizilmesinde yapılan ön denemede nisinin (Sigma, N 5764) 1000 IU/ml olacak şekilde stok çözeltisi kullanılmıştır. Bunu hazırlamak için 100 mg nisin 90 ml steril 0,02 M HCl'de çözülmüş ve oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir (Tramer and Fowler, 1964). Üzerine daha sonra 10 ml steril FM ilave edilmiştir (De Vuyst and Vandamme, 1992). Karışımdan 10 ml alınarak steril bir tüpe konulmuş, 100°C'de kaynar su banyosunda 5 dakika bekledikten sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur. Daha sonra çözelti 15 dakika santrifüj (Hettich Rotofix II, 2500×g) edilmiştir. Bu stok çözeltiden 0,02 M HCl ile seyreltme yapılarak 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 IU/ml konsatrasyonlarında nisin çözeltileri hazırlanmıştır (Tramer and Fowler, 1964). Hazırlanan nisin çözeltilerinin antagonistik etkisi NAM'da saptanmıştır. Bunun için bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan *M.luteus* 982 kültüründen NAM'a %2 oranında inoküle edilerek petrilere yaklaşık 20 ml olarak dökülmüş ve 4°C'de 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra 7 mm çapında kuyular açılarak her

kuyuya 70 µl standart nisin çözeltileri ilave edilmiştir. Petriler 30°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Her bir konsantrasyon 3 paralelli çalışılarak elde edilen ortalama inhibisyon zon çaplarına karşılık nisin konsantrasyonlarının logaritması alınmış ve MS Exel 97 programı kullanarak standart eğri çizilmiştir.

Standart eğrinin çizilmesi ile yapılan asıl denemede ise yukarıda bahsedilen ön denemedeki işlemlerin aynısı uygulanmıştır. Ancak FM yerine MRS Broth kullanılmış ve 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200 ve 400 IU/ml konsantrasyonlarında nisin çözeltileri hazırlanmıştır.

3.2.5.2 Nisin aktivitesinin saptanması

L.lactis 497 kültürünün nisin aktivitesinin saptanmasına ait ön denemede stok olarak YSB’de muhafaza edilen kültürden 9 ml inokülasyon ortamına %5’lik inokülasyon yapılarak tüp 30°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürden 250 ml’lik erlendeki 150 ml FM’ye %2 oranında inokülasyon yapılmış ve erlen 30°C’de 24 saat inkübe edilmiştir (De Vuyst and Vandamme, 1992). İnkübasyon sonunda kültürden 1 ml alınarak 0,02 M HCl ile seyreltme yapılmış ve 1/10’luk dilüsyon oranı hazırlanmıştır. Bu aşamadan sonra işlem basamaklarına bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği şekilde santrifüj işlemine kadar devam edilmiştir. Ancak santrifüj işleminden sonra hücrelerin ortamdan tamamen elimine olduklarından emin olmak için süpernatant membran filtrasyon (Millipore, type HA, pore size: 0,45 µm) ile steril edilmiştir.

Böylece steril 1/10'luk süpernatanttan 0,02 M HCl ile 1/100 ve 1/500'lük süpernatantlar hazırlanarak süpernatantların *M.luteus* 982 kültürüne karşı antagonistik etkisi bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı şekilde NAM'da saptanmıştır.

L.lactis 497 kültürünün nisin aktivitesinin saptanmasına ait asıl denemede ise 3 farklı yol (A, B, C) denenmiştir. Bunun için öncelikle her 3 yol için izlenen işlem basamakları bölüm 3.2.4.1.1'de agar kuyu difüzyon yöntemi için kültür süpernatantlarının hazırlanmasında anlatıldığı üzere santrifüj işlemine kadar aynı tutulmuştur. Santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant 2'ye ayrılmış bir kısmı A yolu, diğer kısmı B ve C yolları için kullanılmıştır. A yolu için işlem, bölüm 3.2.4.1.1'de kültür süpernatantlarının hazırlanmasında santrifüj işleminden sonra katalaz enzimi ilavesine kadar devam etmiştir. Katalaz enzimi ilavesinden sonra süpernatantın (orijinal) fosfat tamponu (pH: 7, bölüm 3.2.4.1.1) ile 1/10 ve 1/50'lik dilüsyonları elde edilmiştir. B ve C yolları için kullanılan süpernatantın pH'sı 2 M ve 0,2 M HCl ile 2,35'e ayarlanarak membran filtrasyon (Millipore, type HA, pore size: 0,45 µm) ile steril edilmiştir. Bu aşamadan sonra süpernatant 2'ye ayrılmış (bir kısmı B yolu, bir kısmı C yolu), B yolu için kullanılan süpernatant 100°C'de 5 dakika bekledikten sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur. Süpernatant (orijinal) 0,02 M HCl ile seyreltme yapılarak A yolundaki dilüsyon oranları hazırlanmıştır. C yolu için kullanılan süpernatant (orijinal) ise ısıl işleme tabi tutulmadan 0,02 M HCl ile seyreltilerek A yolundaki dilüsyon oranları hazırlanmıştır. A, B ve C yollarına ait

orijinal süpernatantların ve dilüsyon oranlarının *M.luteus* 982 kültürüne karşı antagonistik etkisi bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı şekilde hem NAM hem YGA’da saptanmıştır.

3.2.6 Nisin üretimine etki eden faktörlerin belirlenmesi

3.2.6.1 Karbon kaynaklarının nisin üretimine etkisinin saptanması

Karbon kaynakları olarak glukoz (MRS Broth’un normal içeriği), sakkaroz (Merck, 1.07653.1000), laktoz (Oxoid, L70) ve fruktozun (Merck, 5321) nisin üretimine etkisi incelenmiştir. Karbon kaynaklarının nisin üretimine etkisi bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde B yolu ve NAM kullanılarak gerçekleştirilmiş ancak ikinci inokülasyon aşamasından önce 2 kez fizyolojik su ile yıkanmış *L.lactis* 497 kültürü MRS Broth’un yanısıra içeriğinden glukoz çıkarılmış ve %2 oranında sakkaroz, laktoz ve fruktoz içeren MRS Broth tüplerine inoküle edilmiştir. Denemede orijinal süpernatantlar 0,02 M HCl ile 2 kat seyreltilerek 1/8, 1/16, 1/64, 1/128, 1/256 ve 1/512’lik dilüsyonlar hazırlanmıştır.

3.2.6.2 Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının nisin üretimine etkisinin saptanması

Denemede %0,5; %1; %2 ve %4 oranında maya ekstraktı (Oxoid, L21) konsantrasyonları kullanılmıştır. Bunun için bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde B yolu ve NAM kullanılarak deneme

gerçekleştirilmiştir. Ancak *L.lactis* 497 kültürü ikinci inokülasyon aşamasında içeriğinden glukoz çıkarılmış, %2 sakkaroz (Merck, 1.07653.1000) ve yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda maya ekstraktı içeren MRS Broth tüplerine inoküle edilmiştir. Orijinal süpernatantlar 0,02 M HCl ile 2 kat seyreltme yapılarak 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048 ve 1/4096 dilüsyon oranları hazırlanmıştır.

3.2.6.3 %0,5 maya ekstraktı ve farklı oranlarda sakkaroz konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması

Deneme bölüm 3.2.5.2'de belirtildiği şekilde B yolu ve NAM kullanılarak yapılmıştır. Ancak *L.lactis* 497 kültürü ikinci inokülasyon aşamasında içeriğinden glukoz çıkarılmış, %0,5 maya ekstraktı (Oxoid, L21) ve %2, %6 ve %10 oranlarda sakkaroz (Merck, 1.07653.1000) içeren MRS Broth tüplerine inoküle edilmiştir. Denemede bölüm 3.2.6.2'de belirtilen dilüsyon oranları kullanılmıştır.

3.2.6.4 %4 maya ekstraktı ve farklı oranlarda sakkaroz konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması

Deneme bölüm 3.2.5.2'de belirtildiği şekilde B yolu ve NAM kullanılarak yapılmıştır. Ancak *L.lactis* 497 kültürü ikinci inokülasyon aşamasında içeriğinden glukoz çıkarılmış, %4 maya

ekstraktlı (Oxoid, L21) ve %2, %6 ve %10 oranlarda sakkaroz (Merck, 1.07653.1000) içeren MRS Broth tüplerine inoküle edilmiştir. Denemede bölüm 3.2.6.2’de belirtilen dilüsyon oranları kullanılmıştır.

3.2.6.5 Farklı mangan iyonu konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması

Bu çalışmada 0 ppm, 120 ppm ve 1200 ppm mangan iyonunun ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; BDH, 10153) nisin üretimine etkisi incelenmiştir. Deneme bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde B yolu ve NAM kullanılarak yapılmıştır. Ancak *L.lactis* 497 kültürü ikinci inokülasyon aşamasında içeriğinden glukoz çıkarılmış, %2 sakkarozlu (Merck, 1.07653.1000) ve yukarıda belirtilen miktarlarda mangan iyonu içeren MRS Broth tüplerine inoküle edilmiştir. Mn^{+2} iyonunun etkisi incelenirken $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 ppm) MRS Broth besiyerinin içeriğinden çıkarılmamıştır. Denemede bölüm 3.2.6.2’de belirtilen dilüsyon oranları kullanılmıştır.

3.2.6.6 Farklı magnezyum iyonu konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması

Çalışmada 0 ppm, 100 ppm ve 1000 ppm magnezyum iyonunun ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Uparc, Pr.No. 12246402) nisin üretimine etkisi incelenmiştir. Deneme bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde B

yolu ve NAM kullanılarak yapılmıştır. Ancak *L.lactis* 497 kültürü ikinci inokülasyon aşamasında içeriğinden glukoz çıkarılmış, %2 sakkarozlu (Merck, 1.07653.1000) ve yukarıda belirtilen miktarlarda magnezyum iyonu içeren MRS Broth tüplerine inoküle edilmiştir. Mg^{+2} iyonunun etkisi incelenirken $MnSO_4.4H_2O$ (12 ppm) MRS Broth besiyerinin içeriğinden çıkarılmamıştır. Denemede bölüm 3.2.6.2’de belirtilen dilüsyon oranları kullanılmıştır.

3.2.6.7 Farklı kalsiyum iyonu konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanması

Çalışmada 100 ppm, 1000 ppm ve 4000 ppm kalsiyum iyonunun ($CaCl_2.2H_2O$; Riedel-De-Haen, 12064) nisin üretimine etkisi incelenmiştir. Deneme bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde B yolu ve NAM kullanılarak yapılmıştır. Ancak *L.lactis* 497 kültürü ikinci inokülasyon aşamasında içeriğinden glukoz çıkarılmış, %2 sakkarozlu (Merck, 1.07653.1000) ve yukarıda belirtilen miktarlarda kalsiyum iyonu içeren MRS Broth tüplerine inoküle edilmiştir. Ca^{+2} iyonunun etkisi incelenirken $MgSO_4.7H_2O$ (10 ppm) ve $MnSO_4.4H_2O$ (12 ppm) MRS Broth besiyerinin içeriğinden çıkarılmamıştır. Denemede bölüm 3.2.6.2’de belirtilen dilüsyon oranları kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *Lactococcus* İzolasyonu

Bu çalışmada, genellikle laktokokların izolasyon ve sayımında kullanılan EA ile yapılan ön denemelerde, 2 adet çiğ süt örneğinden izole edilen 32 adet laktik asit bakterisi izolatlarının hiçbirisi *Lactococcus* olarak tanımlanmadığından bu aşamadan sonra bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin izolasyonunda MRS Agar kullanılmıştır. Böylece 83 örnekten 273 adet laktik asit bakteri izolatı elde edilmiştir.

Çizelge 3.1'de verilen Gram reaksiyonu (Gram-pozitif, kok), katalaz üretimi (katalaz-negatif) ve glukozdan gaz üretimi (negatif), KHLAB tanımlamasında kullanılan testler olup, bunların yanında 10°C'de üreme ve 45°C'de üreme *Lactococcus* cinsinin tanımlanmasında kullanılan testlerdir (Schillinger and Lücke, 1989). Çizelge 3.1'e göre izolatların *L.lactis* subsp. *lactis* olarak tanımlanabilmesi için, bu çalışmada yapılan Gram reaksiyonu, katalaz üretimi, glukozdan gaz üretimi, farklı sıcaklıklarda üreme (10°C, 40°C, 45°C), pH 9,2'de sıvı besiyerinde üreme, arginin hidrolizi ve karbonhidrat (dekstrin, rafinoz, ramnoz, riboz, sorbitol) fermentasyon testlerine ilaveten %0,1 metilen mavisi içeren sütte üreme, %40 safra içeren ortamda üreme, izopren kinon üretimi, sitrattan CO₂ üretimi, diasetil ve asetoin oluşumu testlerinin yapılması gerekmektedir (Mundt,1986; Teuber et al., 1992). Ancak bu çalışmada elde edilen izolatlara öncelikle sadece bölüm 3.2.3'de

belirtilen testler uygulanmış ve '*L.lactis* olma olasılığı yüksek kültürler' olarak tanımlanan bu izolatlardan bakteriyosin pozitif olduğu belirlenen kültürlere daha sonra diğer testlerin uygulanmasına karar verilmiştir. Böylece ilk aşamada 3 örneğin 2'sinden 41 adet KHLAB izole edilmiş ve 17'si '*L.lactis* olma olasılığı yüksek izolat' olarak tanımlanmıştır. Bu 17 izolatın bölüm 3.2.4.1'de bahsedilmiş olan agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak bakteriyosin üretimine bakılmıştır. Sonuçta izolatların bakteriyosin üretmediği görüldüğünden Çizelge 3.1'de belirtilen son 5 testin yapılmasına gerek duyulmamıştır. Bundan sonra, bakteriyosin üretimi test edilecek izolat elde edilmesinde, izolatların bakteriyosin üretmeme olasılığı göz önüne alınmıştır. Bu nedenle bu aşamadan sonra zaman kaybını önlemek amacıyla izolatlar cins düzeyinde tanımlanmadan sadece KHLAB veya KLAB olarak elde edilmiştir. Böylece 17 adet *L.lactis* olma olasılığı yüksek izolat, 61 adet KHLAB ve 195 adet KLAB olmak üzere toplam 273 izolat bakteriyosin üretimi açısından test edilmiştir.

4.2 Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi

Yukarıda belirtildiği gibi elde edilen *L.lactis* olma olasılığı yüksek izolatlar ile KHLAB ve KLAB izolatlarının önce bakteriyosin üretme yetenekleri test edilmiştir. Nitekim Harris et al. (1992b) ve Zezza et al. (1993) yapmış oldukları bakteriyosin üreten

laktik asit bakterisi izolasyonu çalışmalarında benzer yol izlemişlerdir.

Nisin üreten *L.lactis* izolasyonu ile ilgili çalışmalarda nisin üreten *L.lactis*'in bulunma olasılığı belirtilmiştir. Delves-Broughton (1990a), Aplin and Barrett Ltd. şirketinin 9 ülkede yaptığı çalışmada 251 çiğ süt örneğinin 109'unun nisin üreten *L.lactis* içerdiğini belirtmiştir. Harris et al. (1992b), sauerkraut salamurasından izole edilen 153 laktik asit bakteri izolatından bakteriyosin üreten 14 kültürün 2 tanesini nisin üreten *L.lactis* olarak belirlerken, Zezza et al. (1993) ise süttten izole edilen 2000 laktik asit bakteri izolatından bakteriyosin üretenlerin arasından sadece 3 tanesini nisin üreten *L.lactis* olarak saptamışlardır. Bu çalışmaların yanında, nisin dışında bakteriyosin üreten *L.lactis* izolasyon çalışmaları mevcuttur. Thuault et al. (1991) yaptıkları çalışmada 40 çiğ süt örneğinden izole edilen laktik asit bakterilerinden 4 tanesi bakteriyosin üreten *L.lactis* olarak tanımlanmıştır. Uhlman et al. (1992) karışık salata ve fermente olmuş havuçtan izole edilen 123 laktik asit bakterisinden 2'sini, Garver and Muriana (1993) ise perakende satılan gıda örneklerinden izole edilen bakteriyosin üreten 40 izolat arasından 9'unu bakteriyosin üreten *L.lactis* olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmalar göz önüne alındığında, izolat sayısı ile bakteriyosin üreten *L.lactis* sayısı arasındaki oran açısından bakteriyosin üreten *L.lactis* yakalama olasılığının düşük olduğu görülmektedir. Yukarıdaki literatür bilgilerine göre bakteriyosin üreticisi *L.lactis* izolasyon olasılığı %1-2 düzeylerinde olmasına karşın bu

çalışmada elde edilen 273 izolattan bakteriyosin üreten hiçbir izolata rastlanmamıştır.

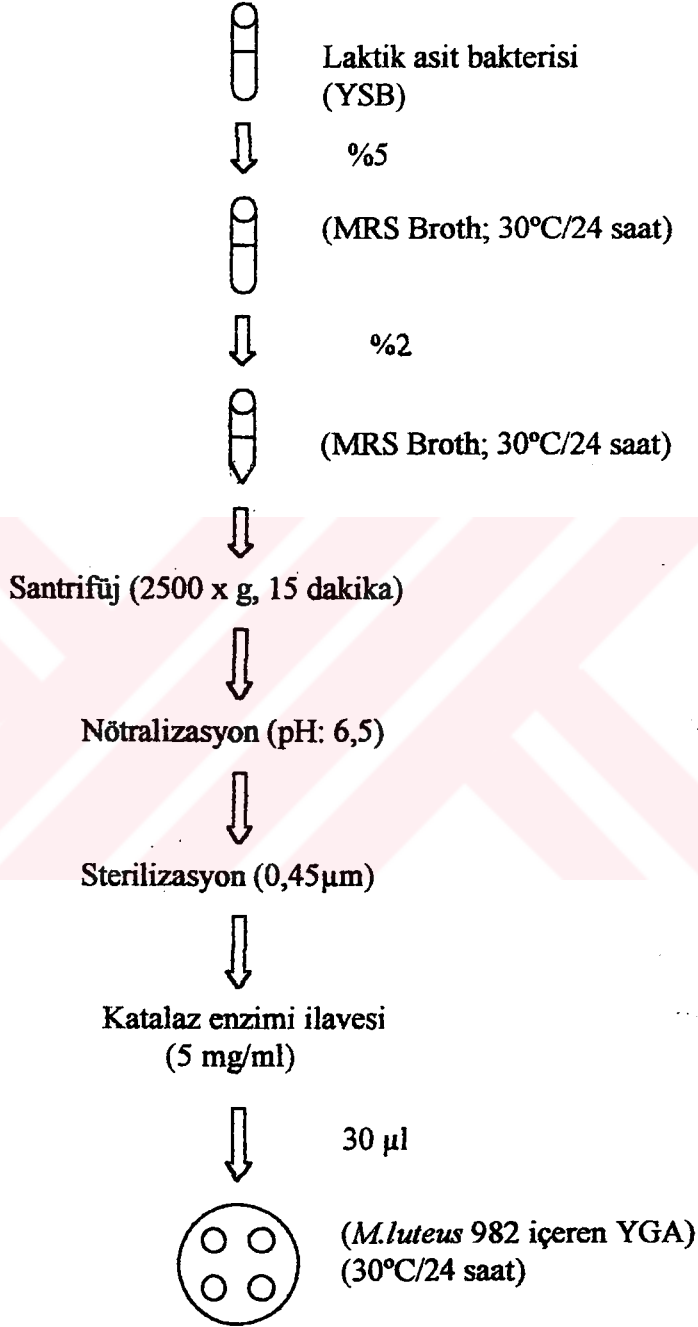
4.2.1 Agar kuyu difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi

Agar kuyu difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesinde ilk adım kültür süpernatantlarının hazırlanması işlemidir. Süpernatantların hazırlanması ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. Önce, uygun bir besiyerinde geliştirilen izolatların santrifüj işlemiyle süpernatantlarının elde edilmesi gerekmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda en yüksek nisin üretiminin en yüksek biomass üretimine bağlı olarak logaritmik üreme fazının sonunda ortaya çıktığı saptanmıştır (De Vuyst and Vandamme, 1992; Chinachoti et al, 1997). Bu nedenle, daha önce nisin üreten *L.lactis* 497 suşu ile yapılan denemelerin sonucunda kültürün, bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde bir kez aktive edildikten sonra, %2'lik inokülasyon oranı ile MRS Broth besiyerinde 24 saat sonra logaritmik fazın sonuna geldiği belirlenmiştir. Bundan dolayı, diğer laktik asit bakterisi izolatları için de aynı inkübasyon süresi uygulanmıştır. Santrifüj işleminden sonra yapılacak olan nötralizasyon işlemi süpernatantların hazırlanmasında en önemli bölümü oluşturmaktadır. Bu işlemin amacı laktik asit bakterilerinin üretmiş oldukları organik asitlerden meydana gelebilecek inhibisyonun ortadan kaldırılmasıdır. Bu amaçla süpernatantların

pH'sı 6,5'e belirli normalitelerdeki (5N, 1N, 0,1N) NaOH ile ayarlanabildiği gibi (Carminati et al., 1989; Schillinger and Lücke, 1989; Giraffa et al., 1990; Piard et al., 1990; Uhlman et al., 1992; Cintas et al., 1995), nötralizasyon amacıyla süpernatantlar dializ de edilebilir (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Schillinger and Lücke 1989; Thuault et al., 1991; Farias et al., 1994). Bu çalışmada süpernatantların pH'sı 6,5'e ayarlandıktan sonra membran filtre ile steril edilmiştir. Membran filtrasyonun amacı, açılan kuyulara aktarılan süpernatantta santrifüj işleminden sonra kalan hücrelerin inkübasyon sırasında kuyu içerisinde gelişerek organik asit oluşumuna bağlı olarak inhibisyon zonu oluşturmalarının engellenmesidir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantta kalan hücrelerin uzaklaştırılması ya membran filtrasyon ile (0,22µm veya 0,45µm; Barefoot and Klaenhammer, 1983; Carminati et al., 1989; Schillinger and Lücke, 1989; Giraffa et al., 1990; Piard et al., 1990; Cintas et al., 1995) ya da ısıtım işlemi uygulanarak [100°C'de 15 dakika (Motlagh et al., 1991); 100°C'de 3 dakika (Uhlman et al., 1992); 65°C'de 15 dakika (Qiao et al., 1997)] gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada membran filtrasyon (0,45µm) yöntemi seçilmiştir. Bundan sonraki işlem laktik asit bakterilerinin ürettiği H₂O₂'ten gelen inhibisyonun önleme aşaması olan katalaz enzimi ilavesidir. Ancak literatürlerde süpernatantların hazırlanmasında, katalaz enzimi ilavesi ile ilgili çalışmalar sınırlıdır (Carminati et al., 1989; Schillinger and Lücke, 1989; Cintas et al., 1995). Schillinger and Lücke (1989) ile Spelhaug and Harlander (1989) yaptıkları çalışmalarda bakteriyosin üreten laktik asit

bakteri izolatlarının, katalaz enzimi ilavesiyle yapılan denemede, enzim ilave edilmeden yapılan denemeye kıyasla, indikatör mikroorganizmaya karşı oluşan inhibisyon zonunda değişiklik meydana gelmediğini belirtmişlerdir. Ancak bazı durumlarda yeterli miktardaki H_2O_2 'in patojen mikroorganizmaları inhibe ettiği açıklanmıştır (Spelhaug and Harlander,1989). Denemede, izolatların yeterli miktarda H_2O_2 oluşturabileceği olasılığı göz önüne alındığı için süpernatanttaki son konsantrasyon 5 mg/ml olacak şekilde katalaz enzimi ilavesi yapılmıştır. Böylece kültür süpernatantların hazırlanmasında Carminati et al. (1989), Schillinger and Lücke (1989) ile Cintas et al.'un (1995) yaptıkları işlem basamakları (santrifüjleme, nötralizasyon, membran filtrasyon ile sterilizasyon ve katalaz enzimi ilavesi) uygulanmıştır.

Agar kuyu difüzyon yöntemi ile 17 adet "*L.lactis* olma olasılığı yüksek" izolat, 61 adet KHLAB ve 35 adet KLAB olmak üzere toplam 113 izolat bakteriyosin üretimi açısından taranmıştır (Şekil 4.1). Her denemede nisin üreticisi *L.lactis* 497 kültürü kontrol suş olarak kullanılmış ve bu suşun yaklaşık 13 mm çapında zon (kuyu çapı dahil) oluşturduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde kontrol örneklerinin de inhibitör etkisi incelenmiş ve bu örneklerle ait inhibisyon zonu gözlenmemiştir.



Şekil 4.1 Agar kuyu difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi

Gerek agar kuyu difüzyon yönteminde gerek bölüm 3.2.4.2 "Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi"ne ait asıl denemede anlatıldığı gibi indikatör mikroorganizma olarak *M.luteus* 982 kültürü seçilmiştir. Literatürlerde nisin aktivitesi tayininde (bölüm 2.1.3.1.4) *L.monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum* ve bakteriyosin üreticisi olmayan *L.lactis* subsp. *lactis* gibi çeşitli indikatör mikroorganizmalar kullanılmasına rağmen, gerek gıdalarda gerek nisin üreten kültürlerde nisin aktivite tayininde çoğunlukla indikatör mikroorganizma olarak *M.luteus* kullanılmıştır (Tramer and Fowler, 1964; Calderon et al., 1985; Chung et al., 1989; Gupta and Prasad, 1989; Taylor et al., 1990; De Vuyst and Vandamme, 1992; Roberts et al., 1992; Roberts and Zottola, 1993; Dean and Zottola, 1996; Davies et al., 1999).

Bu deneme süresince 3 adet şüpheli bakteriyosin üreten izolat tespit edilmiştir. Şekil 4.2'ye bakıldığında 1 ve 3 nolu izolatlar bakteriyosin üretmeyen kültürleri, K kodlu izolat nisin üreticisi olan *L. lactis* 497 kontrol suşunu, 2 nolu izolat ise şüpheli bakteriyosin üreticisini göstermektedir.



Şekil 4.2 Agar kuyu difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten ve üretmeyen laktik asit bakterilerinin *M.luteus* 982 içeren YGA petrisinde görüntüsü.

1, 3 : Bakteriyosin üretmeyen izolatlar

2 : Şüpheli izolat

K : *L.lactis* 497 (nisin üreticisi)

Şekil 4.2'den de anlaşılacağı gibi kontrol suşuna ait zonun berrak olduğu, 2 nolu izolata ait zonun ise bulanık olduğu, kuyu içerisinde ve kenarlarda üreme olduğu görülmektedir. Bu şekilde üreme olan yerlerden preparat hazırlanıp mikroskop altında incelendiğinde laktik asit bakterilerinin varlığı gözlenmiştir. Bu durum membran filtrasyon sırasında laktik asit bakterilerinin süpernatanta geçip, inkübasyon sırasında YGA'da gelişerek asit oluşumuna bağlı olarak zon oluşturması şeklinde açıklanmıştır. Gerçekten bu şüpheli izolatlar agar kuyu difüzyon yöntemiyle tekrar bakteriyosin üretimi açısından incelendiklerinde, izolatların bakteriyosin üreticisi olmadıkları görülmüştür. Böylece membran filtrasyon işleminin daha doğru bir deyişle süpernatanttaki hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılmasının önemi ortaya çıkmaktadır.

Agar kuyu difüzyon yönteminin zaman alıcı ve fazla işgücü gerektirmesi nedeniyle bu aşamadan sonra Khan et al. (1996) tarafından önerilen ve daha kısa sürede daha fazla sayıda izolatu bakteriyosin üretimi açısından taranmasına olanak tanıyan aşağıda açıklanan 'Nokta inokülasyon agar difüzyon' yöntemi uygulanmıştır.

4.2.2 Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi

Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesinde uygun besiyerleri üzerine katı kültür ve sıvı kültür izolatları nokta inokülasyon

yapılabildiği gibi (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Schillinger and Lücke, 1989; Motlagh et al., 1991; Harris et al., 1992b; Cintas et al., 1995; Ryan et al., 1996) ayrıca izolatların süpernatantları da kullanılabilir (Carminati et al., 1989; Giraffa et al., 1990; Piard et al., 1990; Harris et al., 1992b). Bunun yanı sıra gıda örneğinin (Thuault et al., 1991; Khan et al., 1996) ya da bakteri izolatının (Dufour et al., 1991) uygun desimal dilüsyonlarından ekim yapılan petrilere oluşan kolonilerin bakteriyosin üretme yetenekleri de incelenebilmektedir.

Yukarıda bahsedildiği gibi nokta inokülasyon agar difüzyon yönteminde izolatlara ait süpernatantların kullanıldığı Carminati et al. (1989), Giraffa et al. (1990), Piard et al.'un (1990) yaptıkları çalışmalarda agar kuyu difüzyon yönteminde olduğu gibi süpernatantlara nötralizasyon uygulanıp filtre ile steril edilerek ve/veya katalaz enzimi ilave edilmiştir. Bu tür bir uygulama tıpkı agar kuyu difüzyon yönteminde olduğu gibi zaman alıcı ve fazla işgücü gerektirmesi nedeniyle tercih edilmemiştir.

Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi kullanılarak peynir örneği ile yapılan ön denemede (bölüm 3.2.4.2) inkübasyon süresi sonunda farklı indikatör mikroorganizma gruplarını içeren MRS Agar petrilere oluşan koloniler incelendiklerinde, tek tük kolonilerin haricinde hepsinin etrafında berrak zon gözlenmiştir. *M.luteus* 982, *L.monocytogenes* Scott A, *S.aureus* ATCC 6538 P ve *Lactobacillus* spp. D17 kültürlerine karşı inhibisyon zonu oluşturan kolonilerden toplam 15 adet KLAB seçilmiş ve bölüm 3.2.4.2'de belirtildiği şekilde izolatların bakteriyosin üretme yetenekleri test

edilmiştir. Bunun sonucunda hiçbir izolata ait inhibisyon zonu gözlenmemiştir.

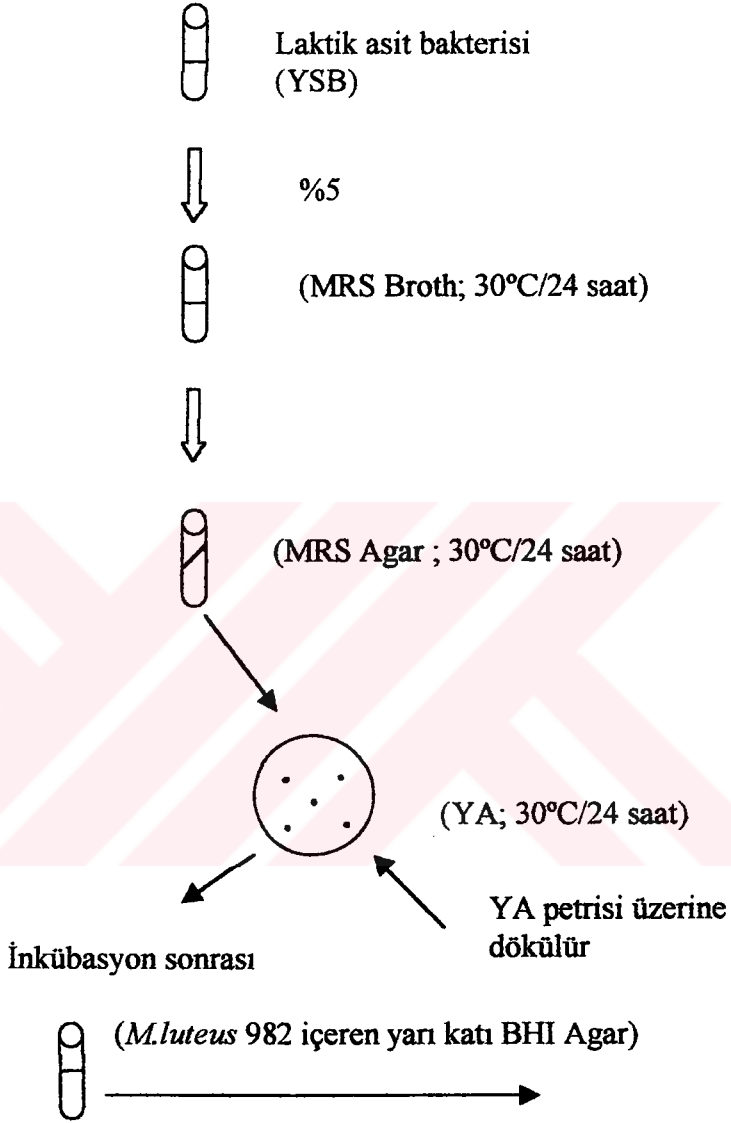
Spelhaug and Harlander (1989) nisin üreticisi *L.lactis* subsp. *lactis* 11454 suşu ile yaptıkları bir çalışmada nokta inokülasyon işleminde kullanılacak besiyerinin önemini vurgulamışlardır. Araştırmacıların yaptıkları bu çalışmada, nokta inokülasyon işleminin uygulandığı besiyerinin içerisinde bulunan fermente edilebilir karbon kaynağı miktarının, indikatör mikroorganizmaya karşı oluşan inhibisyon zonunu etkilediği sonucuna varılmıştır. Araştırmacılar besiyeri olarak %2 glukoz içeriği olan MRS Agar'da gözlenen zonun oluşan asitlikten kaynaklandığını, %0,5 ve %0,25 glukoz içeren sırasıyla M17-G ve BHI Agar da ise fermente edilebilir karbon kaynağı kısıtlandığı için bu ortamlarda oluşan zonların asit oluşumundan kaynaklanmayıp bakteriyosine ait olduğu belirtilmiştir. Barefoot and Klaenhammer (1983), Thuault et al. (1991) ve Cintas et al. (1995), nokta inokülasyon işleminde MRS Agar kullanmışlar ve oluşan inhibisyon zonunu bakteriyosin üretimi açısından pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Ancak Spelhaug and Harlander'in (1989) yapmış oldukları çalışma dikkate alındığında hemen hemen bütün izolatların asitlikten dolayı inhibisyon zonu oluşturacakları tahmin edildiğinden bu şekilde bakteriyosin üreten izolat elde edilmesi uygun değildir. Aynı şekilde çalışmamızın sonucu, MRS Agar kullanıldığında kolonilerin etrafında oluşan zonların asit zonu olduğunu doğrulamaktadır. Thuault et al. (1991) ve Cintas et al. (1995) yaptıkları çalışmalarda nokta inokülasyon agar difüzyon

yönteminde MRS Agar kullanarak pozitif sonuç veren izolatların ancak %10-20'sinin agar kuyu difüzyon yönteminde bakteriyosin üretimi açısından olumlu sonuç verdiklerini saptamışlardır.

MRS Agar ile yapılan çalışmaların yanında nokta inokülasyon agar difüzyon yönteminde fermente edilebilir karbon kaynağı sınırlandırılmış besiyerleri de (Trypticase Soy Agar, M17 Agar, M17-G Agar, MRS-0,2 Agar) kullanılmıştır. Ancak Schillinger and Lücke (1989), Spelhaug and Harlander'in (1989) yaptıkları çalışmada sınırlandırılmış karbon kaynağı içeren besiyeri kullanılsa dahi asit üretiminden gelen inhibisyon zonunun görülebileceğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar anaerobik inkübasyon ile izolatların H_2O_2 oluşumunu da elimine etmişlerdir. Böylece araştırmacıların bu çalışmasında MRS-0,2 Agar kullanılarak nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile pozitif sonuç veren 19 izolatın, agar kuyu difüzyon yöntemi ile tekrar test edildiklerinde ancak 6'sının asitlik ve H_2O_2 'ten gelen inhibisyonun dışında bir inhibitör etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Gerçekten bölüm 4.2.1'de bahsedilen şüpheli bakteriyosin üreticisi izolatların süpernatanta geçerek %0,5 glukoz içeren YGA'da inhibisyon zonu oluşturmaları sınırlandırılmış karbon kaynağı kullanımının da yanlış sonuç vermesine neden olduğunu göstermektedir. Bu amaçla izolatların bakteriyosin üretimi açısından taranmasında asit üretimini elimine etmek için karbon kaynağı çıkarılarak maya ekstraktı oranı artırılmış YA kullanılmıştır (Şekil 4.3). Böylece nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile toplam 160 adet KLAB bakteriyosin üretimi açısından

taranmıştır. Nisin üretici *L.lactis* 497 kùltürünün her denemede ayrı bir YA petrisine tek olarak ekimi yapılmış ve yaklaşık 20 mm çapında berrak zon oluşturduğu gözlenmiştir.





Şekil 4.3 Nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin belirlenmesi

Bu deneme süresince ilk 87 KLAB izolatu arasından berrak zon çapı yaklaşık 4 ile 12 mm olacak şekilde toplam 4 adet, kalan 73 KLAB izolatu arasından da nisin üreticisi *L.lactis* 497 kontrol suşunun oluşturduğu berrak zona yakın büyüklükte zon oluşturan 1 adet şüpheli bakteriyosin üreticisi izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar agar kuyu difüzyon yöntemiyle tekrar bakteriyosin üretimleri açısından test edildiklerinde, izolatların bakteriyosin üreticisi olmadıkları görülmüştür. Ancak kontrol suşa yakın büyüklükte berrak zon oluşturan izolata (şüpheli bakteriyosin üreticisi) ait kültürden bölüm 3.2.4.2’de anlatıldığı şekilde YA petrilere ekim yapıp kolonilerin *M.luteus* 982 kültürüne karşı oluşturduğu antagonistik etki incelendiğinde, kolonilerin çoğunluğunun etrafında inhibisyon zonunun oluşmadığı gözlenmiştir. İnhibisyon zonu görülen kolonilerin 12 tanesi stoğa alınarak tekrar agar kuyu difüzyon yöntemiyle test edildiklerinde sonucun bakteriyosin üretimi açısından olumsuz olduğu saptanmıştır. Bu durumda, asit üretimini elimine etmek için karbon kaynağı çıkarılarak hazırlanan besiyerlerinde bile elde edilen sonucun muhakkak agar kuyu difüzyon yöntemiyle doğrulanması gerektiği açıkça görülmektedir. Bunun yanı sıra, YA petrilere inhibisyon zonu görülen kolonilerin plazmid kodlu bakteriyosin ürettikleri ve transferler arasında stabil olmamaları ya da inhibisyon zonu görülen kolonileri oluşturan hücreler içerisinde transferler arasında bakteriyosin üreticisi olmayanların ortama hakim olup sayıca fazla olmaları gibi bu durumu aydınlatıcı açıklamalar yapmak mümkündür.

Gerek agar kuyu difüzyon gerek nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemi ile yapılan izolasyon çalışmalarında olumlu sonuç alınmadığı için bundan sonraki denemelerde *L.lactis* 497 kontrol suşu kullanılarak nisin üretimine etki eden faktörler incelenmiştir.

4.3 *L.lactis* 497 Kültürünün Nisin Aktivitesi

L.lactis 497 kültürünün nisin aktivitesinin saptanmasında agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemi kullanarak nisin aktivitesi 2 şekilde belirlenebilir. Bunlardan birisi, nisin titresi olarak ifade edilen ve süpernatantın seri halde hazırlanmış iki katlı dilüsyonları arasında indikatör mikroorganizmayı tamamen inhibe eden en yüksek dilüsyonun karşılığıdır ve mililitredeki aktivite birimi (arbitrary activity unit; AU/ml), dilüsyon faktörü ve kuyulara aktarılan süpernatant miktarı göz önüne alınarak aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanabilir (Harris et al.,1992b; Farias et al., 1994):

$$(1000 / X) \times (1 / D) ; \quad X: \text{aktarılan süpernatant miktarı } (\mu\text{l})$$

$$D: \text{indikatör mikroorganizmanın inhibe olduğu dilüsyon faktörü (titre)}$$

$$1000: 1 \text{ ml} = 1000 \mu\text{l}$$

İkinci yöntem ise, standart nisin çözeltileri kullanılarak oluşan inhibisyon zon çapları ile bunlara karşı gelen nisin konsantrasyonlarının logaritması arasında standart eğri çizilmesi ve bu eğri yardımıyla kültür süpernatantlarının seri halde hazırlanan

dilüsyonlarının oluşturdukları inhibisyon zonlarına karşılık gelen nisin miktarının (IU/ml) regresyon eşitliği kullanılarak hesaplanmasıdır (Tramer and Fowler, 1964; Calderon et al., 1985; Waites and Ogden, 1987; Chung et al., 1989; Gupta and Prasad, 1989; Taylor et al., 1990; Rogers and Montville, 1991; De Vuyst and Vandamme, 1992; Roberts et al., 1992; De Vuyst and Vandamme, 1993; De Vuyst, 1994; De Vuyst, 1995; Dean and Zottola, 1996; Chen et al., 1997; Davies et al., 1999).

Bu çalışmada nisin üreticisi *L.lactis* 497 suşuna ait nisin aktivitesi, standart eğrinin çizilmesi ve regresyon eşitliği kullanılması ile saptanmıştır. Ancak nisin üretimine etki eden faktörlerin incelenmesinde nisin aktivitesi hem “AU”, hem de “IU/ml” olarak belirlenmiştir. Mevcut literatürlerde bulunan çalışmaların büyük çoğunluğu, standart eğri oluşturularak nisin aktivitesinin saptanması konusunda Tramer and Fowler’a (1964) atıf yapmışlardır. Bu nedenle nisin aktivitesi tayini Tramer and Fowler (1964) ile De Vuyst and Vandamme (1992) tarafından belirtilen işlem basamakları dikkate alınarak yapılmıştır.

Tramer and Fowler (1964) çalışmalarında, standart eğri oluşturulurken mililitrede 10 IU nisin aktivitesi düzeyine kadar nisin konsantrasyonlarının logaritması ile inhibisyon zon çapları arasında doğrusal ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Aynı durum De Vuyst and Vandamme’ın (1992) yaptıkları çalışmada da belirtilmiştir. Ancak, Rogers and Montville (1991) ve Roberts et al. (1992), sırasıyla log 1000 IU/ml ve log 100 IU/ml nisin konsantrasyonlarına kadar doğrusal ilişki görülebileceğini

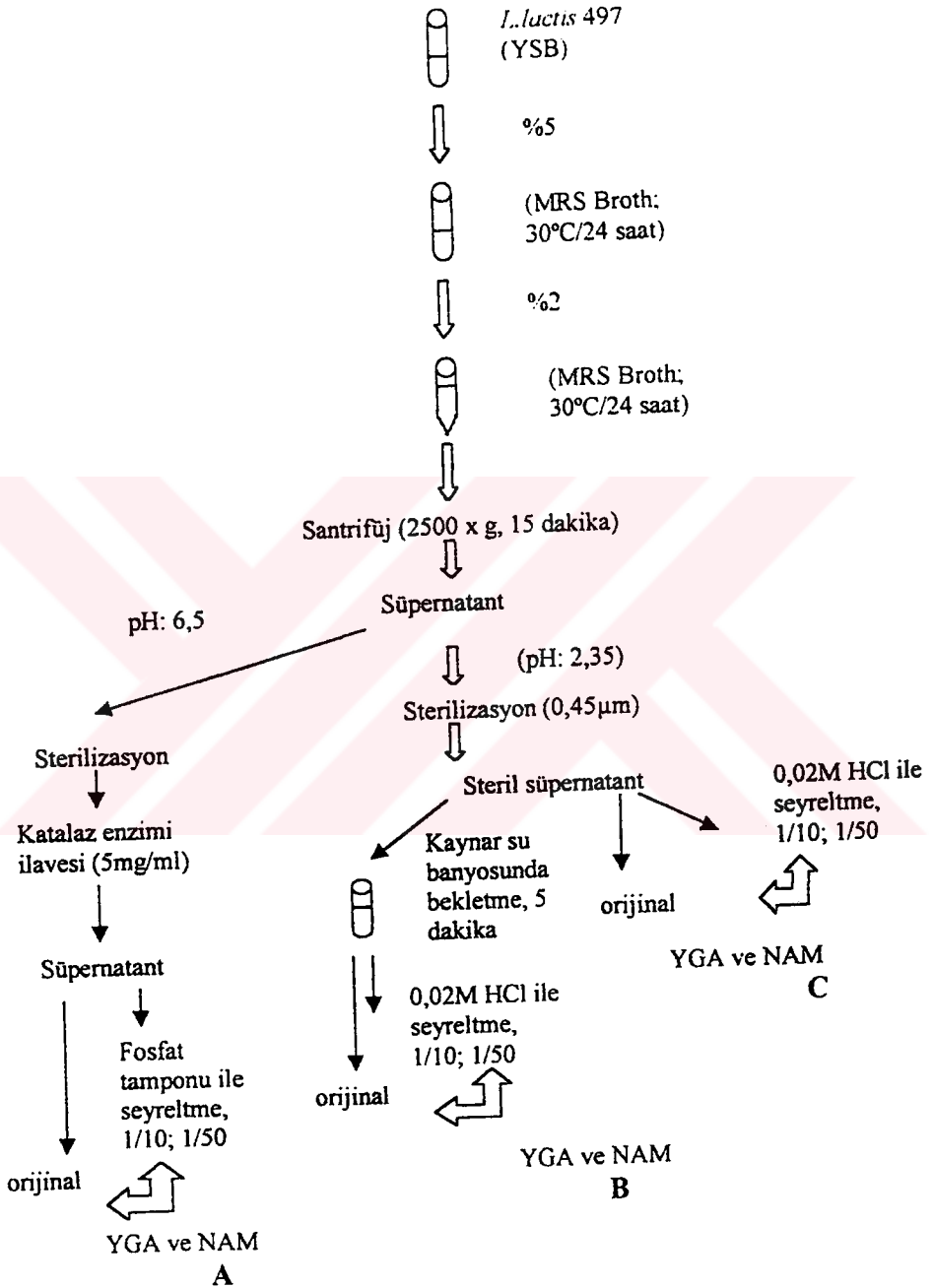
açıklamışlardır. Rogers and Montville (1991) aynı çalışmada indikatör mikroorganizma olarak *M.luteus* 10240 kültürünün yanısıra *Lb.sake* 15521 kültürünü kullanmışlar ve *Lb.sake*'nin *M.lutes*'a kıyasla nisine karşı daha hassas olduğunu ve daha büyük zon oluşturduğunu saptamışlardır. Her iki mikroorganizma için oluşturulan standart eğride regresyon katsayısının (R^2) 0,98'den büyük olduğu da açıklanmıştır. Waites and Ogden (1987) ise standart eğri oluştururken indikatör mikroorganizma olarak *Lb.brevis* BSO 28 suşu kullanarak, (inhibisyon zon çapı - kuyu çapı)² ile 1-1000 IU/ml nisin konsantrasyonlarının logaritması arasında standart eğri oluşturmuşlardır. Araştırmacılar oluşturdukları standart eğrinin 1-100 IU/ml nisin konsantrasyonları için uygun olmadığını ancak 100-1000 IU/ml nisin konsantrasyonları için doğrusal ilişki verebileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmaların ışığı altında standart eğrinin çizilmesinde yapılan ön denemede (bölüm 3.2.5.1) De Vuyst and Vandamme'ın (1992) çalışmalarında belirttiği FM kullanılarak 10 IU/ml konsantrasyonuna kadar nisin çözeltileri hazırlanmıştır. *M.luteus* 982 kültürüne karşı oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek standart eğri elde edilmiştir. 1 IU/ml nisin konsantrasyonuna karşılık gelen ortalama inhibisyon zon çapı 8 mm (kuyu çapı dahil), 10 IU/ml nisin konsantrasyonuna karşılık gelen ortalama zon çapı ise 10 mm (kuyu çapı dahil) olarak ölçülmüştür. Zon çapları arasındaki farkın az olduğu (2 mm) görülmektedir. De Vuyst and Vandamme (1992) çalışmalarında standart eğriye ait bilgi vermemişlerdir. Ancak besiyeri olarak NAM kullanan Tramer and Fowler (1964) ile

Tween 20 içeren nutrient agar kullanan Rogers and Montville'in (1991) çalışmalarında yukarıdaki nisin konsantrasyonlarına karşılık gelen inhibisyon zon çapları arasındaki fark sırasıyla yaklaşık 6 mm ile 4 mm olarak saptanmıştır. Aynı şekilde inokülasyon ortamı ve FM'de geliştirilen *L.lactis* 497 suşunun nisin aktivite tayini için yapılan ön denemede (bölüm 3.2.5.2), hazırlanan 1/10, 1/100 ve 1/500'lük süpernatantların *M.luteus* 982 kültürüne karşı oluşturduğu antagonistik etki incelenmiş ve petrilerde inhibisyon zonu görülmemiştir. De Vuyst and Vandamme (1992), nisin üreticisi *L.lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 suşu ile aynı besiyerinde yaptıkları çalışmada belirli zaman aralıklarında nisin aktivitesini ölçmüşler ve 4 saat sonra nisin aktivitesinin saptanabilir düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar en yüksek biomass üretiminin olduğu 8. saatte en yüksek nisin konsantrasyonunu (~1500 IU/ml) gözlemlemişlerdir. Daha önceleri de belirtildiği gibi nisin üreticisi *L.lactis* 497 suşu en yüksek biomass üretimine MRS Broth'da 24 saat sonra ulaşmaktadır. Bu durumda yukarıda belirtilen inhibisyon zonunun görülmemesinin nedeni *L.lactis* 497 suşunun FM'de 24 saat sonra saptanabilir düzeyde nisin üretememesi ya da az üretmesi sonucu 1/10'luk dilusyonun seyreltik gelmesi şeklinde açıklanabilir. Bu noktada dikkat çekici bir durum, nisinden gelen inhibisyon zonu olmamasına rağmen pH'ları 2'ye yakın süpernatantların asitlikten dolayı *M.luteus* 982 kültürüne karşı inhibisyon zonu oluşturmamasıdır. Bu durum indikatör mikroorganizmanın *L.lactis* 497 suşunun ürettiği laktik asite karşı duyarlı olması ile

süpernatantların aktarıldığı besiyerinin tamponlama özelliğinden kaynaklanabilir. Gerçekten *M.luteus* kültürü içeren YGA petrilere açılan kuyulara 0,02 M HCl (pH:2) aktarıldığında inkübasyon sonrası hiçbir zona rastlanmamıştır.

Böylece standart eğrinin çizilmesi ile yapılan ön denemede inhibisyon zon çapları arasındaki farkın az olması hem de *L.lactis* 497 kültürünün nisin aktivitesi ile yapılan ön denemede FM'de geliştirilen kontrol suşun NAM'da inhibisyon zonu oluşturmaması nedeniyle denemenin FM yerine MRS Broth kullanılarak yapılmasına karar verilmiş ve nisin üreticisi *L.lactis* 497 suşunun aktivite tayini MRS Broth'da 3 farklı yol denenerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4). Şekil 4.4'e bakıldığında, Şekil 4.1'de agar kuyu difüzyon yönteminde kullanılan işlem basamakları, katalaz enzimi ilave edilmesine kadar A yolu için aynı tutulmuştur. Katalaz enzimi ilavesinden sonra süpernatantın fosfat tamponu ile 1/10 ve 1/50'lik dilüsyonları elde edilmiştir. B yolu, De Vuyst and Vandamme'm (1992) nisin aktivite çalışmalarına ait bazı modifikasyonlar içermektedir. C yoluna bakıldığında kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatma işlemi hariç B yolunun aynısı olduğu görülmektedir. A, B ve C yollarına ait aktivite tayininde *M.luteus* 982 kültürü %2 oranında hem YGA hem NAM'a inoküle edilerek petrilere dökülmüştür. Denemede her 3 yol için bölüm 3.2.5.1'de belirtildiği üzere hem YGA hem NAM üzerine kuyular açılarak ortalama inhibisyon zon çapları (kuyu çapı dahil) ölçülmüştür (Çizelge 4.1).



Şekil 4.4 *L. lactis* suşunun nisin aktivitesinin saptanması

Çizelge 4.1 *L.lactis* 497 kültürünün 3 farklı yöntem kullanılarak elde edilen süpernatant dilüsyonlarının YGA ve NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm)

Yöntem	Besiyeri	Süpernatant Dilüsyonları		
		Orijinal	1/10	1/50
A	NAM	20,0(*)	16,0(*)	14,0(*)
	YGA	17,0	12,0	10,0
B	NAM	26,0(*)	16,5	13,8
	YGA	23,5(*)	13,7	11,5
C	NAM	27,3(*)	15,7	13,7
	YGA	22,5(*)	14,3	11,2

* : *L.lactis* 497 kontaminasyonu gözlenmiştir.

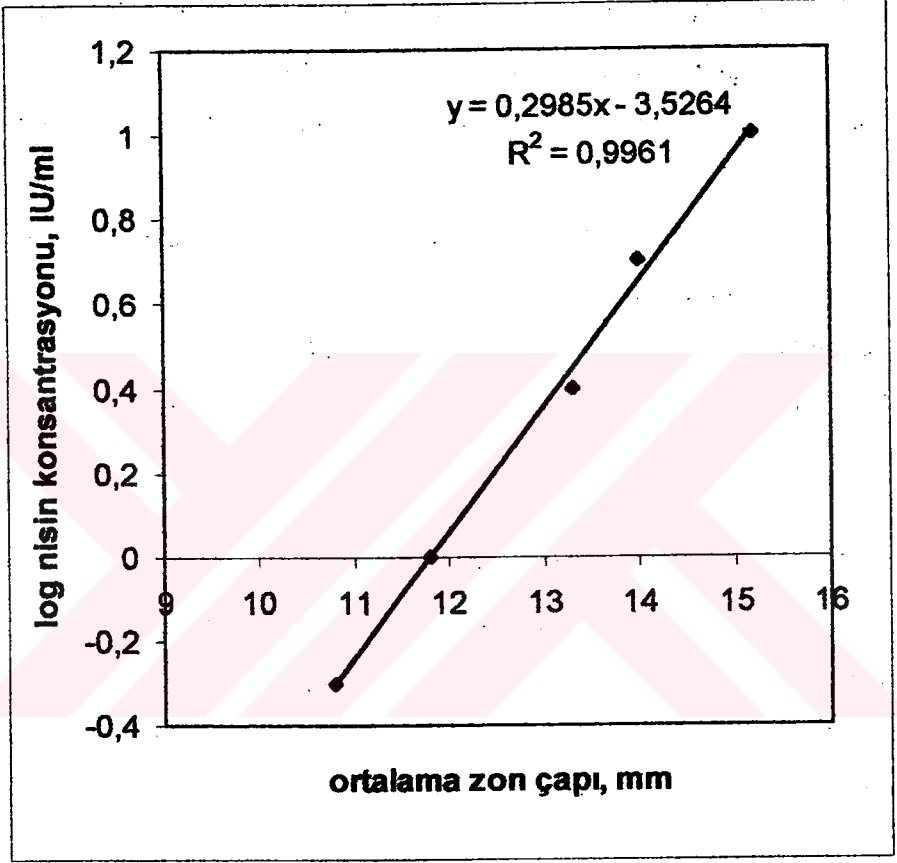
Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi bazı ölçümlerde: (*) kontaminasyon gözlenmiş bu nedenle de (*) olarak belirtilen ölçümler dikkate alınmamıştır. Çizelge 4.1 incelendiğinde, en küçük ortalama inhibisyon zon çapları A yolu kullanıldığında ölçülmüştür. Bunun nedeni, daha önce de değinildiği gibi kültür ortamında protein üzerine adsorbe olmuş nisinin serbest hale geçmesi için asitle muamele ve kaynar su banyosunda bekletme işlemlerinin yer almaması şeklinde açıklanabilir. Bu nedenle, agar kuyu difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin saptanmasında uygulanan yolun aktivite tayini için yeterli olmadığı gözlenmiştir. Çizelgede B ve C yollarına ait ölçümler incelendiğinde ise B yoluna ait ölçümlerin C yoluna

kıyasla biraz daha büyük olduğu görülmektedir. Bu şekilde, asitle muamelenin yanında kaynatma işleminin de sonucu etkilediği belirlenmiştir. B ve C yolları için kültür süpernatant pH'sının 2,35'e ayarlanması'nın nedeni, daha önce FM kullanılarak yapılan ön denemede *L.lactis* 497 suşunun nisin aktivite tayininde 1/10'luk dilüsyon pH'sının bu değerde olmasıdır. NAM ve YGA açısından çizelge incelendiğinde ise NAM'da oluşan ortalama zon çaplarının YGA'ya göre daha büyük olduğu da gözlenmiştir. Tramer and Fowler (1964) , NAM içeriğinde bulunan Tween 20 sayesinde nisin agar içinde daha hızlı difüze olabileceğini belirtmişlerdir. Gerçekten yukarıda elde edilen sonuç bunu doğrulamaktadır. Kontaminasyon olan kuyulardaki ölçümler dikkate alınmadan çizelge bir bütün olarak incelendiğinde B yolunun ve NAM kullanımının hem aktivite tayini hem de standart eğri çizimi için uygun olduğu görülmektedir. Daha önce belirtildiği gibi bu çalışmaya ait modifikasyonlardan birisi De Vuyst and Vandamme'ın (1992) çalışmalarında, fermantasyon ortamında geliştirilen nisin üreticisi kültür 10 kat seyrelcek şekilde kuvvetli asitle muamele edildiği halde bu çalışmada *L.lactis* 497 suşunun süpernatanttaki nisin konsantrasyonunu seyreltmemek için 2 M ve 0,2 M HCl ile pH'sı ayarlanmış ve çizelgede bu "orijinal" dilüsyon olarak tanımlanmıştır.

Chen et al.'un (1997) yaptıkları çalışmada nisin aktivite tayininde A yoluna benzer bir yöntem kullanılmıştır. Araştırmacıların yaptıkları bu denemede kuyu içerisine santrifüj edilerek membrandan geçirilen nisin üreticisi *L.lactis* subsp.*lactis*

CCRC 14016 kültür süpernatantı ve bu süpernatantın 0,1 M asetat tamponunda (pH:6) hazırlanan dilüsyonları kuyulara aktarılmıştır. Ancak süpernatant etrafında oluşan inhibisyon zonunun kültürün üretmiş olduğu laktik asit ve nisinden geleceği araştırmacılar tarafından göz ardı edilmiştir. Aynı çalışmada dilüsyonlara ait zonlar, asetat tamponu sayesinde nötralizasyon işlemi bir şekilde gerçekleştiği için, nisine bağlı olabileceği halde bu kez nisinin protein üzerine adsorbe olmuş durumdan serbest hale geçmesi için asitle muamele ve kaynar su banyosunda bekletme işlemleri yapılmadığından oluşan zonların gerçek nisin aktivitesini belirleyemeyeceği açıktır. Araştırmacıların çalışmalarında nisin aktivite tayinini bu şekilde ölçtüklerini belirtmeleri şaşırtıcıdır. Aynı araştırmacılar çalışmalarında standart eğri oluşturulmasına ait herhangi bir bilgi de vermemişlerdir.

L.lactis 497 suşu ile yapılan nisin aktivite tayini denemesinin sonucuna göre standart eğri bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı şekilde 0,5-400 IU/ml konsantrasyonlarında standart eğri çizilmiştir. Bu şekilde elde edilen standart eğrinin denklemi $y = 0,3457x - 4,1372$ ve $R^2 = 0,9895$ olmasına rağmen, 0,5-10 IU/ml konsantrasyonları arasında kalan eğri dikkate alındığında $y = 0,2985x - 3,5264$ ve $R^2 = 0,9961$ olarak saptanmıştır. Bu nedenle ikinci denklemde regresyon katsayısı daha büyük olduğu için 0,5-10 IU/ml konsantrasyonları arasındaki standart eğri dikkate alınmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Standart nisin eğrisi (0,5-10 IU/ml)

Çizelge 4.2'de ise standart nisin konsantrasyonlarına karşılık gelen ortalama inhibisyon zon çapları (kuyu çapı dahil) görülmektedir. 0,5 IU/ml nisin konsantrasyonuna karşılık gelen ortalama zon çapı 10,8 mm, 10 IU/ml nisin konsantrasyonuna karşılık gelen ortalama zon çapı 15,2 mm olarak ölçülmüştür. Zon çapları arasındaki fark 4,4 mm'dir. Tramer and Fowler (1964) ile Rogers and Montville'in (1991) çalışmalarında yukarıda belirtilen nisin konsantrasyonlarına karşılık gelen inhibisyon zon çapları arasındaki fark yaklaşık 7 mm olarak saptanmıştır. Çizelge 4.2'den görüldüğü gibi ortalama zon çapları arasında yaklaşık 1 mm'lik fark nisin aktivitesini %100 değiştirmektedir. Örneğin, ortalama zon çapı 13,3 mm'ye karşılık gelen nisin aktivitesi 2,5 IU/ml iken, 14 mm'ye karşılık gelen aktivite 5 IU/ml olmaktadır. 3 paralelli olarak yapılan inhibisyon zon çapları ölçümleri arasında bile çizelgeden de görüldüğü gibi 0,5 mm'lik fark ortaya çıkabilmektedir. Bu durumda paraleller arasında bile nisin aktivitesi açısından %50'ye yakın farklılıklar görülebilmektedir. Bu yöntemi kullanarak nisin aktivite tayini yapan çalışmaların bazılarında standart eğri çizilmesi konusunda bilgi verilmemiştir. Tramer and Fowler (1964) ile Rogers and Montville'in (1991) çalışmalarında ise ortalama zon çapları arasında yaklaşık 2 mm'lik fark nisin aktivitesini %100 değiştirmektedir. Nisin aktivitesinin bu şekilde milimetrik ölçüme dayalı olarak belirlenmesi sağlıklı ve hassas bir yöntem değildir. Ancak yine de literatürlerde standart eğri kullanılarak aktivite tayini yapan çalışmalar mevcuttur. De Vuyst and Vandamme (1992) ile Chen et al. (1997) çalışmalarında

nisin aktivitesi değerlerini sırasıyla 1500 IU/ml ve 230 IU/ml olarak belirlemişlerdir. De Vuyst (1994), çeşitli *L.lactis* suşlarının nisin üretim kapasitelerini saptamış ve suşların 1 IU/ml ile 1886 IU/ml nisin konsantrasyonları arasında çeşitli aktivite değerlerine sahip olduklarını ifade etmişlerdir.

Çizelge 4.2 B yolu kullanılarak hazırlanan farklı nisin konsantrasyonlarının *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları

Nisin konsantrasyonu (IU/ml)	Zon çapları (mm)	Ortalama zon çapları (mm)
0,5	11,0 - 11,0 - 10,5	10,8
1	12,0 - 12,0 - 11,5	11,8
2,5	13,0 - 13,5 - 13,5	13,3
5	14,0 - 14,0 - 14,0	14,0
10	15,0 - 15,0 - 15,5	15,2

Şekil 4.5'de belirtilen standart eğri dikkate alınarak, Çizelge 4.1'de B yoluna ait ve NAM kullanılarak yapılan ortalama inhibisyon zon çaplarına karşılık gelen nisin aktivitesi saptanabilir. Ancak, bu standart eğrinin kullanılabilmesi için ortalama inhibisyon zon çapları 10,8-15,2 mm arasında olmalıdır. Buna göre Çizelge 4.1'den 1/50'lik dilüsyona ait 13,8 mm inhibisyon zonu aktivite tayini için uygun olmaktadır. Eğriye ait regresyon eşitliği kullanılarak;

$y = 0,2985x - 3,5264$ denkleminde, $x = 13,8$ mm ise,

$y = 0,5929$, nisin aktivitesi (IU/ml) = $50 \times \text{antilog}(0,5929)$

nisin aktivitesi (IU/ml) = 195 olarak hesaplanabilir.

Böylece *L.lactis* 497 suşuna ait nisin aktivitesi 195 IU/ml olarak bulunmuştur.

4.4 Nisin Üretimine Etki Eden Faktörler

L.lactis 497 suşunun nisin üretimine etki eden faktörler olarak karbon kaynaklarının (glukoz, sakkaroz, fruktoz ve laktoz) çeşit ve konsantrasyonu, maya ekstraktı konsantrasyonu ile mangan iyonu, magnezyum iyonu ve kalsiyum iyonu konsantrasyonları çalışılmıştır. Daha önce de ifade edildiği gibi nisin üretimine etki eden faktörlerin incelenmesinde nisin aktivitesi hem 'IU/ml' hem de 'AU' olarak belirlenmiştir.

Motlagh et al. (1991) nisin üreticisi *L.lactis* subsp. *lactis* D16 suşunun nisin aktivitesi tayininde (AU olarak) kültür pH'sını 5,5'e ayarladıktan sonra kaynar su banyosunda bekletmişlerdir. Halbuki kültür ortamında adsorbe olan nisin proteinlerden ayrılması için öncelikle kuvvetli asitle muamele edilmesi gerekmektedir. Bu şekildeki aktivite tayininde, oluşan zonun gerçek nisin aktivitesini belirleyemeyeceği açıktır. Benzer şekilde birçok araştırmacı tarafından agar kuyu difüzyon yöntemiyle bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin saptanmasında kullanılan pH'sı 6,5'e ayarlanmış, filtre ile steril edilerek ve/veya

katalaz enzimi ilave edilmiş süpernatantların seri halde 2 kat dilüsyonları hazırlanarak bakteriyosin aktiviteleri “AU” olarak saptanmıştır (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Carminati et al., 1989; Schillinger and Lücke, 1989; Giraffa et al., 1990; Piard et al., 1990; Cintas et al., 1995). Dufour et al. (1991) ve Ryan et al. (1996) çalışmalarında sadece filtre ile steril edilmiş bakteriyosin üreticisi laktik asit bakteri süpernatantları ve dilüsyonlarını aktivite tayininde (AU olarak) kullanmışlardır. Halbuki süpernatantların oluşturdukları zonların laktik asit bakterilerinin ürettikleri bakteriyosin ve asitten meydana geldiği açıktır ve bu şekilde aktivite tayini yapılması yanlış sonuç verecektir. Kojic et al. (1991) ise sadece bakteriyosin üreticisi laktik asit bakteri kültür süpernatantını ve dilüsyonlarını aktivite tayininde (AU olarak) kullanmışlardır. Bu şekilde bakteriyosin aktivite tayininde bulunulması süpernatantın oluşturduğu inhibisyon zonunun laktik asit bakterisinin ürettiği bakteriyosin ve asitten meydana gelmesi ve laktik asit bakteri hücreleri ortamdan uzaklaştırılmadığı için inkübasyon ile besiyerinde asit oluşturması sonucunda yanlış olarak belirlenecektir.

Yukarıdaki çalışmalar dikkate alınarak nisin üretimine etki eden faktörlerin incelenmesinde B yolu ve NAM kullanılmıştır.

4.4.1 Karbon kaynaklarının nisin üretimine etkisi

Bu çalışmada karbon kaynakları olarak %2 oranında glukoz (MRS Broth'un normal içeriği), sakkaroz, laktoz ve fruktoz içeren MRS Broth kullanılmıştır.

Çizelge 4.3'te %2 oranında şeker içeren MRS Broth'da 30°C'de 24 saat inkübe edilen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları görülmektedir. Şekil 4.6(a, b, c, d)'da ise %2 sakkaroz içeren MRS Broth'da gelişen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları zonların fotoğrafları görülmektedir. Karbon kaynaklarının nisin üretimine etkisini anlamak için nisin aktivitesinin saptanması gerekmektedir. Eğer nisin aktivitesi, nisin titresi olarak ifade edilmek istenirse Çizelge 4.3'e bakarak süpernatant dilüsyonlarından inhibisyon zonunun oluşmadığı dilüsyonu bulmak gerekir. Bu durumda, glukoz, fruktoz ve laktoz kaynakları için nisin titresi "512 AU" olduğu halde sakkaroz kaynağı kullanıldığında 1/512'lik dilüsyonda inhibisyon zonu oluşmuştur. Ancak oluşan zon fazla büyük olmadığı için (8,5 mm), denemede yapılmadığı halde bir sonraki iki kat dilüsyonda (1/1024) inhibisyon zonunun oluşmayacağı açıktır. Dolayısıyla sakkaroz kaynağı için nisin titresi "1024 AU" olarak ifade edilebilir. Bu durumdan da anlaşıldığı gibi karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanımının nisin aktivitesini artırdığı söylenebilir. Ancak aynı çizelge orijinal dilüsyonların oluşturdukları inhibisyon zonlarının

büyüklüğü açısından incelenecek olursa, glukoz karbon kaynağı olarak kullanıldığında en büyük zonun oluştuğu görülmektedir. Daha sonra sırasıyla fruktoz, sakkaroz ve laktoz gelmektedir. Bu durumda nisin aktivitesini artıran karbon kaynağı olarak sakkaroz 3. sırada yer almaktadır. Halbuki süpernatant dilüsyonları seyreltikçe (1/16'lık dilüsyondan sonra) diğer karbon kaynaklarına kıyasla sakkarozun nisin aktivitesini artırdığı görülmektedir. Böyle bir durumda sakkarozu ait orijinal dilüsyonda da en büyük zonun oluşması beklenmesine rağmen bu şekilde bir sonuç gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3 %2 şeker içeren MRS Broth'da gelişen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M. luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm)^a

Karbon Kaynağı	Süpernatant Dilüsyonları						
	Orijinal	1/8	1/16	1/64	1/128	1/256	1/512
Glukoz	21,7	15,3	14,0	11,7	10,0	8,2	7,0
Sakkaroz	19,2	15,3	14,5	12,0	11,0	10,0	8,5
Fruktoz	19,7	14,9	13,5	10,9	10,0	8,0	7,0
Laktoz	17,3	14,2	13,5	10,3	8,7	7,3	7,0

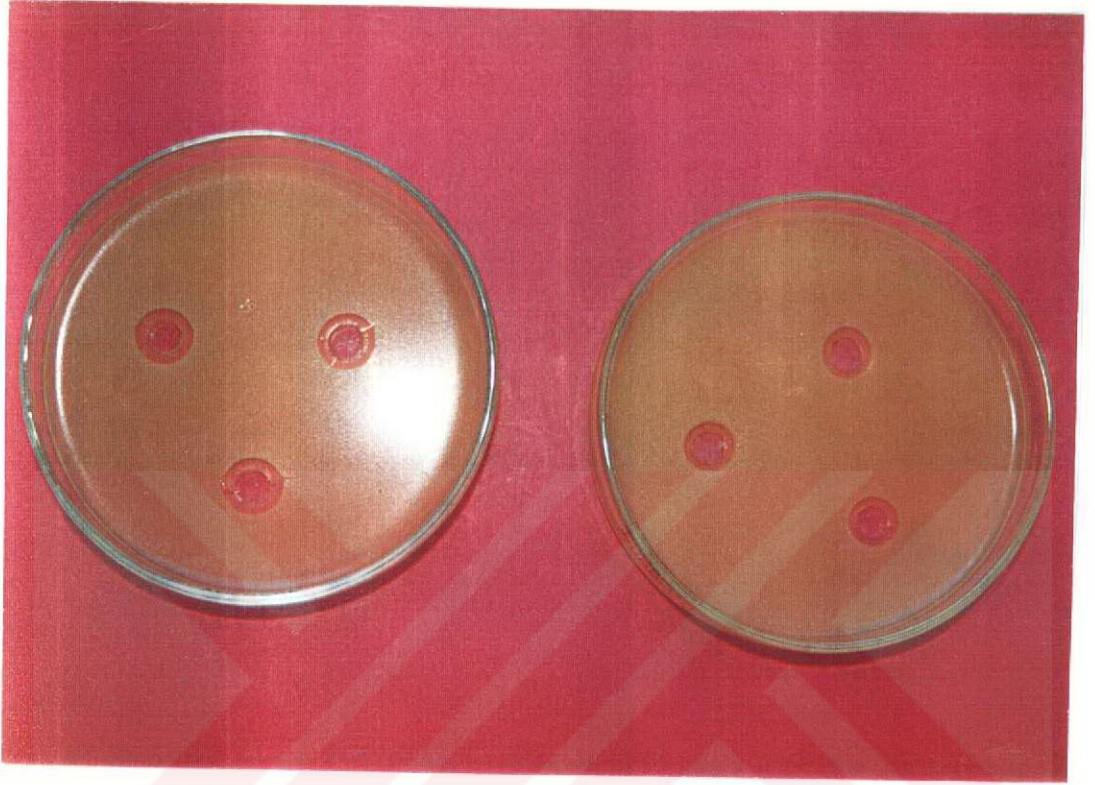
^a : Kuyu çapı 7 mm'dir, diğer çizelgeler için bu ölçüm geçerlidir.



Şekil 4.6 (a)



Şekil 4.6 (b)



Şekil 4.6 (c)



Şekil 4.6 (d)

Şekil 4.6 (a, b, c, d) % 2 sakkaroz içeren MRS Broth'da gelişen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdıkları inhibisyon zonları

Soldan sağa; a) orijinal, 1/8, b) 1/16, 1/64, c) 1/128, 1/256, d) 1/512

Çizelge 4.3 kullanılarak sonuç bir kez de regresyon eşitliği yardımıyla hesaplanabilir. Bunun için daha önce çizilen standart eğri (Şekil 4.5) dikkate alınmalıdır. Standart eğrinin kullanılabilmesi için ortalama inhibisyon zon çaplarının 10,8-15,2 mm arasında olması gerektiği hatırlanarak, glukoz için 1/16, 1/64, sakkaroz için 1/16, 1/64, 1/128, fruktoz için 1/8, 1/16, 1/64 ve laktoz için 1/8, 1/16 süpernatant dilüsyonlarına karşılık gelen ortalama inhibisyon zon çaplarının hesaplama için uygun oldukları görülmektedir. Eğer bu dilüsyonlara karşılık gelen nisin aktivitesi regresyon eşitliği kullanılarak hesaplanacak olursa;

$y = 0,2985 x - 3,5264$ denklemi için,

Glukoz:

$x = 14 \text{ mm}$ $y = 0,6526$ nisin aktivitesi IU/ml = 71,89

$x = 11,7 \text{ mm}$ $y = -0,03395$ nisin aktivitesi IU/ml = 59,18

Sakkaroz:

$x = 14,5 \text{ mm}$ $y = 0,80185$ nisin aktivitesi IU/ml = 101,38

$x = 12 \text{ mm}$ $y = 0,0556$ nisin aktivitesi IU/ml = 72,74

$x = 11 \text{ mm}$ $y = -0,2429$ nisin aktivitesi IU/ml = 73,16

Fruktoz:

$x = 14,9 \text{ mm}$ $y = 0,92125$ nisin aktivitesi IU/ml = 66,73

$x = 13,5 \text{ mm}$ $y = 0,50335$ nisin aktivitesi IU/ml = 50,98

$x = 10,9 \text{ mm}$ $y = -0,27275$ nisin aktivitesi IU/ml = 34,15

Laktoz:

$x = 14,2 \text{ mm}$ $y = 0,7123$ nisin aktivitesi IU/ml = 41,24

$x = 13,5 \text{ mm}$ $y = 0,50335$ nisin aktivitesi IU/ml = 50,98;

bulunur.

Yukarıdan da görüldüğü gibi karbon kaynaklarına ait her dilüsyon oranı için farklı bir aktivite değeri ortaya çıkmaktadır. Hatta bu farklılıklar nisin üretimine etki eden diğer faktörlerin incelenmesine ait çizelgelerde daha büyük değerlere ulaşmıştır. Daha önce bölüm 4.3'de ortalama inhibisyon zon aralığına düşen tek bir dilüsyon olduğu için *L.lactis* 497 suşunun 195 IU/ml olarak hesaplanan nisin aktivitesi (%2 glukozlu MRS Broth besiyerinde) bu denemede aynı besiyeri için 71,89 IU/ml (1/16'lük dilüsyon) ve 59,18 IU/ml (1/64'lük dilüsyon) aktivite değerleri bulunmuştur. *L.lactis* 497 suşunun nisin aktivite değerinin iki denemede farklı çıktığı görülmektedir. Karbon kaynaklarının nisin üretimine etkisinin saptanmasında, *L.lactis* 497 kültürünün bir kez aktive edildikten sonra 2 kez fizyolojik su ile yıkanması haricinde bütün işlem basamakları nisin aktivite tayininde belirtildiği gibi yapılmıştır. Aktiviteler arasında bu nedenden dolayı farklılık olabileceği söylenebilir. Ancak maya ekstraktı konsantrasyonunun nisin üretimine etkisinin saptanmasında (bölüm 4.4.2) bu denemede işlem basamakları kullanıldığı halde, her iki denemede aynı formülasyona ait *L.lactis* 497 suşunun nisin aktivite değerleri büyük farklılık göstermiştir.

Bu aşamadan sonra nisin titresi dikkate alınmış ve yüksek nisin aktivitesinin sakkarozlu besiyerinde elde edildiği kabul edilerek bundan sonraki nisin üretimini etki eden faktörlerin incelenmesinde karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanılmıştır.

Çeşitli araştırmacılar *L.lactis* suşları ile yaptıkları denemelerde glukoz ve sakkarozun yanında ksiloz, maltoz gibi

farklı karbon kaynakları kullanarak suşların nisin aktivitelerini saptamışlardır. Ancak karbon kaynakları çeşidinin nisin üretimine etkisini inceleyen çalışmalar az sayıdadır. Harris et al. (1992b), nisin üreticisi izolatların nisin aktivitelerini MRS Broth, M17-G Broth, BHI Broth ve CJ Broth'da (lahana suyu) tayin ederek suşların en fazla nisini (1600 AU/ml) MRS Broth'da ürettiklerini bildirmişlerdir. Chinachoti et al. (1997) ise, %1 glukoz ve %1 ksiloz içeren besiyerlerinde *L.lactis* IO-1 suşunun nisin aktivitesini tayin etmişler ve %1 ksiloz içeren besiyerindeki nisin Z aktivitesinin (810 IU/ml) daha fazla olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada *L.lactis* 497 suşu, Harris et al. (1992b) tarafından belirtilen %2 glukozlu MRS Broth yerine %2 sakkaroz içeren MRS Broth'da en fazla nisini üretmiştir. Diğer karbon kaynaklarının ise nisin üretimini etkilemediği görülmüştür.

4.4.2 Maya ekstraktı konsantrasyonunun nisin üretimine etkisi

Bu çalışma %2 sakkaroz, %0,5; %1; %2 ve %4 maya ekstraktı içeren MRS Broth kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 4.4'de % 2 sakkaroz ve farklı oranlarda maya ekstraktı içeren MRS Broth'da 30°C 24 saat inkübe edilen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları görülmektedir. Dört maya ekstraktı konsantrasyonu için de nisin titresinin aynı olduğu görülmektedir (2048 AU). Çizelgede orijinal dilüsyonların

oluşturdukları inhibisyon zonu incelenecek olursa, maya ekstraktı oranının %4'e çıkarılması sonucunda en büyük inhibisyon zonunun olduğu görülmektedir. Ancak 1/256'lık dilüsyondan sonra bütün maya ekstraktı oranları için hemen hemen inhibisyon zonları eşitlenmekte ve sonuçta aynı titreye ulaşılmaktadır. Bu durumda nisin titresi açısından bakıldığında maya ekstraktı artışıyla birlikte nisin aktivitesinde bir artış meydana gelmediği söylenebilir.

Çizelge 4.4 %2 sakkaroz ve farklı oranlarda maya ekstraktı içeren MRS Broth'da gelişen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm)

Maya ekstraktı	Süpernatant Dilüsyonları						
	Orjinal	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
% 0,5	19,8	13,8	11,3	9,8	9,0	7,0	7,0
% 1	20,7	14,0	11,3	10,2	8,8	7,0	7,0
% 2	19,8	12,5	11,0	9,5	8,0	7,0	7,0
% 4	23,5	13,8	11,7	10,3	8,2	7,0	7,0

Aynı çizelge (Çizelge 4.4) kullanılarak nisin aktivitesi regresyon eşitliği yardımıyla hesaplandığında, bölüm 4.4.1'de karbon kaynakları için yapılan denemede ki durum meydana gelmiş her dilüsyon için farklı bir aktivite değeri bulunmuştur. Çizelgede 4 farklı maya ekstraktı konsantrasyonları için aktivite hesaplaması yapılacak uygun dilüsyonların 1/128 ve 1/256 oldukları görülmektedir. Her biri için nisin aktivitesi hesaplanacak olursa,

$y = 0,2985 x - 3,5264$ denklemi için,

%0,5 maya ekstraktı:

$x = 13,8 \text{ mm}$ $y = 0,5929$ nisin aktivitesi IU/ml = 501,31

$x = 11,3 \text{ mm}$ $y = -0,15335$ nisin aktivitesi IU/ml = 179,84

%1 maya ekstraktı:

$x = 14 \text{ mm}$ $y = 0,6526$ nisin aktivitesi IU/ml = 575,18

$x = 11,3 \text{ mm}$ $y = -0,15335$ nisin aktivitesi IU/ml = 179,84

%2 maya ekstraktı:

$x = 12,5 \text{ mm}$ $y = 0,20485$ nisin aktivitesi IU/ml = 205,14

$x = 11 \text{ mm}$ $y = -0,2429$ nisin aktivitesi IU/ml = 146,33

%4 maya ekstraktı:

$x = 13,8 \text{ mm}$ $y = 0,5929$ nisin aktivitesi IU/ml = 501,31

$x = 11,7 \text{ mm}$ $y = -0,03395$ nisin aktivitesi IU/ml = 236,74;
bulunur.

Yukarıdan da görüldüğü gibi bu denemede dilüsyonlara ait aktiviteler arasındaki fark daha fazladır. Çizelge 4.4'te %0,5 maya ekstraktı içeren kombinasyon bölüm 4.4.1'de karbon kaynakları için yapılan denemede sakkaroz içeren formülasyonla aynıdır. Bölüm 4.4.1'de sakkaroz içeren formülasyondaki nisin titresi "1024 AU" iken, bu denemede nisin titresi "2048 AU" olarak bulunmuştur. Regresyon eşitliği kullanılarak yapılan nisin aktivitesi tayininde bölüm 4.4.1'de 1/128'lik dilüsyona ait aktivite 73, 16 IU/ml iken, bu denemede aynı dilüsyona ait aktivite 501, 31 IU/ml olarak hesaplanmıştır. Regresyon eşitliği kullanılarak nisin aktivitesi tayininin çok farklı sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu aşamadan sonra regresyon eşitliği kullanılarak aktivite tayini

yapılmayarak sadece nisin titresi değerlendirilmiştir. Gerek nisin titresi olarak gerek regresyon eşitliği kullanılarak yapılan aktivite tayininde, nisin üretimini etkileyen faktörler aktivitede %20-30 gibi bir artışa neden olsalar bile bu yöntemler kullanılarak böyle bir artışı ölçmek imkansızdır. Ancak aktivitede çok büyük bir artışa neden oldukları takdirde zon çaplarının büyümesine bağlı olarak bunu takip etmek mümkün olacaktır. Yine de milimetrik ölçümlere dayandıkları için bu yöntemlerin hassas olmadıkları bir kez daha vurgulanmalıdır.

Maya ekstraktına ait denemenin sonucunda, karbon kaynağı oranının sabit kalıp sınırlayıcı faktör olma olasılığından dolayı bundan sonraki denemelerde maya ekstraktına ait oranlar sabit tutularak (en düşük; %0,5 ve en yüksek; %4) sakkaroz oranının artırılmasına karar verilmiştir. Dört maya ekstraktı konsantrasyonuna ait nisin titreleri aynı olduğu için %1 ve %2'lik maya ekstraktı içeren kombinasyonlar daha sonraki denemelerde kullanılmamıştır.

4.4.3 %0,5 ve %4 maya ekstraktı ile farklı oranlarda sakkaroz konsantrasyonunun nisin üretimine etkisi

Bu çalışmada %0,5 ve %4 maya ekstraktı konsantrasyonları için %2, 6 ve 10 oranlarında sakkaroz konsantrasyonunun nisin üretimini nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Çizelge 4.5, %0,5 ve %4 maya ekstraktı ve farklı oranlarda sakkaroz içeren MRS Broth'da 30°C'de 24 saat inkübe edilen

L.lactis 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları görülmektedir. Çizelgeye göre %0,5 maya ekstraktı içeren her 3 sakkaroz konsantrasyonu için nisin titresinin aynı olduğu (2048 AU) görülmektedir. Bu denemede %2 sakkaroz karşılık "2048 AU" olarak ölçülen nisin titresini daha önce bölüm 4.4.2'de %0,5 maya ekstraktı ve %2 sakkaroz içeren ortamda ölçülen nisin titresini ile aynı çıkmıştır. Ancak bölüm 4.4.1'de %2 sakkaroz içeren aynı besiyerindeki nisin titresinden (1024 AU) farklıdır.



Çizelge 4.5 %0,5 ve %4 maya ekstraktı ve farklı oranlarda sakkaroz içeren MRS Broth'da gelişen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdıkları ortalama zon çapları (mm)

Sakkaroz	Supernatant Dilüsyonları							
	<u>Original</u> %0,5 %4	<u>1/128</u> %0,5 %4	<u>1/256</u> %0,5 %4	<u>1/512</u> %0,5 %4	<u>1/1024</u> %0,5 %4	<u>1/2048</u> %0,5 %4	<u>1/4096</u> %0,5 %4	
%2	24,5 31,3	13,2 17,9	11,7 14,8	10,5 11,8	8,9 8,5	7,0 7,0	7,0 7,0	
%6	22,7 29,3	13,4 16,0	11,0 14,5	9,9 12,8	8,3 10,3	7,0 7,0	7,0 7,0	
%10	24,2 29,2	13,0 17,0	11,5 14,0	10,9 11,3	9,0 7,0	7,0 7,0	7,0 7,0	

Çizelgede %4 maya ekstraktı ve %2 ile %6 sakkaroz içeren ortamdaki nisin titresini aynı olduğu halde (2048 AU), %10 sakkaroz içeren ortamda nisin titresinde azalma görülmüştür (1024 AU). De vuyst and Vandamme (1992) pH kontrolsüz şartlarda yaptıkları çalışmada, FM ortamında sakkaroz konsantrasyonunun %1'den %10'a çıkartıldığında ortamda fazla miktarda sakkarozun tüketilmeden kaldığı belirtilerek nisin aktivitesinin 1500 IU/ml'den ancak 2000 IU/ml'ye çıktığını bildirmişlerdir. Araştırmacıların yaptıkları çalışmada nisin aktivitesinde yaklaşık %33 artış olduğu görülmektedir. Bu çalışmada ise artan sakkaroz konsantrasyonu ile aktivitede yukarıda belirtilen düzeylerde artış olsa bile agar kuyu difüzyon yöntemi ile bunu saptamak mümkün değildir. Chinachoti et al. (1997) ise pH kontrolsüz şartlarda nisin üretiminde kullanılan ortamdaki ksiloz konsantrasyonunu %1'den %7'ye kadar artırarak nisin aktivitesini ölçmüşler ve buna göre en yüksek nisin miktarının %4 ksiloz içeren ortamda oluştuğunu saptamışlardır. %4 ksiloz konsantrasyonundan sonra artan ksiloz konsantrasyonu ile birlikte oluşan laktik asitin artışına bağlı olarak nisin Z miktarında azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada %4 maya ekstraktı ve %10 sakkaroz içeren ortamda nisin titresindeki azalma aynı mekanizma ile bağlantılı olabilir.

Çizelge daha önce olduğu gibi, orijinal dilüsyonların oluşturdukları inhibisyon zonları açısından incelenecek olursa, maya ekstraktı oranının artmasıyla nisin aktivitesinin arttığı söylenebilir. Hatta bu durumun 1/1024'lük süpernatant dilüsyonuna kadar devam görülmektedir. Ancak sonuç titre açısından

incelendiğinde maya ekstraktı konsantrasyonunun artması ile nisin aktivitesinde artışın meydana gelmediği görülmektedir.

Agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak farklı maya ekstraktı ve farklı sakkaroz konsantrasyonları ile yapılan denemelerin sonucunda, maya ekstraktı ve sakkaroz konsantrasyonlarındaki artışın nisin aktivitesinde artışa neden olmadığı görüldüğünden, katyonların etkisinin incelendiği denemelerde MRS Broth içeriğindeki maya ekstraktı %0,5 ve sakkaroz konsantrasyonu %2 olarak kullanılmıştır.

4.4.4 Katyonların nisin üretimine etkisi

Bu çalışmada katyonlar olarak Mn^{+2} , Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının nisin üretimine etkisi incelenmiştir.

Çizelge 4.6, 4.7 ve 4.8’de %2 sakkaroz, %0,5 maya ekstraktı ve sırasıyla farklı oranlarda Mn^{+2} , Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonları içeren MRS Broth’da 30°C’de 24 saat inkübe edilen *L.lactis* 497 kültür süpernatantlarının *M.luteus* 982 içeren NAM’da oluşturdukları ortalama zon çapları görülmektedir. Daha önce yapılan denemelerde %2 sakkaroz ve %0,5 maya ekstraktı içeren MRS Broth’da (12 ppm Mn^{+2} , 10 ppm Mg^{+2}) gelişen *L.lactis* 497 suşunun nisin titresinin “2048 AU” olduğu bilinmektedir. Çizelge 4.6 incelendiğinde, Mn^{+2} iyonu içermeyen ve 1200 ppm Mn^{+2} iyonu içeren ortamda *L. lactis* 497 suşunun nisin titresi “1024 AU” olarak gözlenirken, 120 ppm Mn^{+2} iyonu içeren ortamda ise nisin titresinin “512 AU” olduğu görülmektedir. Chinachoti et al. (1997)

tarafından katyon olarak sadece 5500 ppm (0,1 M) Mn^{+2} iyonunun nisin üretimini tamamen engellediği belirtilmesine rağmen, bu denemede Mg^{+2} iyonu (10 ppm) ile birlikte Mn^{+2} iyonunun olmaması ve Mn^{+2} iyon konsantrasyonunun artırılması nisin aktivitesinde belirli bir azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle MRS Broth'un içeriğindeki Mn^{+2} iyonu konsantrasyonundaki nisin titresinin daha yüksek olmasından dolayı diğer denemelerde bu miktar (12 ppm) kullanılmıştır.

Çizelge 4.6 %2 sakkaroz, %0,5 maya ekstraktı ve farklı oranlarda Mn^{+2} iyonu içeren MRS Broth'da gelişen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm)

Mangan, Mn^{+2} (ppm)	Süpernatant Dilüsyonları						
	Orijinal	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
0	27,5	14,3	10,8	9,2	7,0	7,0	7,0
120	26,8	14,2	11,3	7,0	7,0	7,0	7,0
1200	27,0	14,0	9,8	9,0	7,0	7,0	7,0

Çizelge 4.7'de Mg^{+2} iyonu içermeyen ve 100 ppm Mg^{+2} iyonu içeren ortamda nisin titresinin "2048 AU", 1000 ppm Mg^{+2} içeren ortamda ise "1024 AU" olduğu görülmektedir. %2 sakkaroz ve %0,5 maya ekstraktı içeren MRS Broth'da (12 ppm Mn^{+2} , 10 ppm Mg^{+2}) *L. lactis* 497 suşunun nisin titresi "2048 AU" olduğu halde, Mn^{+2} iyonu (12 ppm) ile birlikte Mg^{+2} iyonunun olmaması ve

Mg^{+2} iyon konsantrasyonunun 10 kat artırılması aktivitede değişiklik yaratmamıştır. 100 kat artırıldığında ise titrede azalma meydana gelmiştir. Bu nedenle MRS Broth içeriğindeki Mg^{+2} iyonu konsantrasyonu değiştirilmeden 10 ppm olarak diğer denemelerde kullanılmıştır.

Çizelge 4.7 %2 sakkaroz, %0,5 maya ekstraktı ve farklı oranlarda Mg^{+2} iyonu içeren MRS Broth'da gelişen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm)

Magnezyum, Mg^{+2} (ppm)	Süpernatant Dilüsyonları						
	Orijinal	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
0	25,8	14,0	11,3	11,3 ^(*)	8,3	7,0	7,0
100	25,8	14,0	11,7	10,5	8,0	7,0	7,0
1000	26,0	14,7	11,8	8,7	7,0	7,0	7,0

*: *L.lactis* 497 kontaminasyonu gözlenmiştir.

Çizelge 4.8 incelendiğinde ise 100 ppm ve 1000 ppm Ca^{+2} iyonu konsantrasyonları içeren MRS Broth'da *L.lactis* 497 suşunun nisin titresinin "1024 AU" olduğu görülmektedir. Chinachoti et al. (1997) çalışmalarında olduğu gibi 4000 ppm (0,1 M) Ca^{+2} iyonu kullanıldığında ise titrenin "512 AU"e düştüğü gözlenmiştir. Daha önce Ca^{+2} iyonu içermeyen MRS Broth'da ölçülen nisin titresinin "2048 AU" olduğu hatırlanacak olursa, Ca^{+2} iyonu ilavesinin aktivitede artış meydana getirmediği görülmektedir. Halbuki Chinachoti et al. (1997) çalışmalarında 0,1 M Ca^{+2} iyonunun nisin

üretimini %40, 0,1 M (2400 ppm) Mg^{+2} iyonunun ise %11 artırdığını bildirmişlerdir. Ancak daha önceden de açıklandığı gibi agar kuyu difüzyon yöntemi kullanarak yukarıda belirtilen oranlardaki artışı belirlemek mümkün değildir.

Çizelge 4.8 %2 sakkaroz, %0,5 maya ekstraktı ve farklı oranlarda Ca^{+2} iyonu içeren MRS Broth'da gelişen *L.lactis* 497 kültürüne ait süpernatantların *M.luteus* 982 içeren NAM'da oluşturdukları ortalama zon çapları (mm)

Kalsiyum Ca^{+2} (ppm)	Süpernatant Dilüsyonları						
	Orijinal	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
100	25,8	15,0	11,3	9,3	7,0	7,0	7,0
1000	25,3	13,3	11,3	8,0	7,0	7,0	7,0
4000	27,7	15,0	11,3	7,0	7,0	7,0	7,0

Sonuç olarak agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak katyonların nisin üretimine etkisi incelendiğinde, mevcut literatürlerde bu konuyla ilgili çalışmalar çok az olmakla beraber, katyonların nisin üretimini büyük oranda azaltan ya da artıran etkiye sahip olmadıkları saptanmıştır.

5. SONUÇ

‘Nisin üreten *L.lactis* izolasyonu ve nisin üretimine etki eden faktörler’ konulu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Toplam 83 peynir, çiğ süt ve lahana örneğinden izole edilen 273 laktik asit bakterisi agar kuyu difüzyon ve nokta inokülasyon agar difüzyon yöntemleri uygulanarak bakteriyosin üretimi açısından taranmış ve bakteriyosin üreten bir izolata rastlanmamıştır.

2. Bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri izolasyonunun ilk aşamasında agar kuyu difüzyon yöntemine kıyasla daha kısa sürede daha fazla sayıda izolatan bakteriyosin üretimi açısından taranmasına olanak tanıyan nokta inokülasyon agar difüzyon yönteminin kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

3. *L.lactis* 497 suşunun nisin aktivitesi tayininde, kültür süpernatantında proteinler üzerine adsorbe olmuş nisin serbest hale geçmesi için kuvvetli asitle muamele ve kaynar su banyosunda bekletme işlemlerinin uygulanmasının gerekli olduğuna karar verilmiştir.

4. Nisin aktivitesi tayininde literatürde yaygın olarak kullanılan agar kuyu difüzyon yönteminin hassas olmadığı bu nedenle kullanılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle regresyon eşitliği kullanılarak saptanan nisin aktivite değerleri nisin titresi olarak saptanan değerlere kıyasla daha fazla değişken sonuçlar verdiği için nisin üretimine etki eden faktörlerin belirlenmesinde nisin aktivitesi, nisin titresi olarak ifade edilmiştir.

5. *L.lactis* 497 suşu ile yapılan çalışmada karbon kaynakları olarak glukoz, sakkaroz, fruktoz ve laktoz arasında nisin titresini ifade edilen en yüksek nisin üretimi %2 sakkarozlu MRS Broth'da gerçekleşmiştir. Besi ortamına ilave edilen 1200 ppm mangan, 1000 ppm magnezyum ve 4000 ppm kalsiyum iyonlarının nisin üretimleri üzerinde etkisinin olmadığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ariyapitipun, T., Mustapha, A. and Clarke, A.D., 1999, Microbial shelf-life determination of vacuum-packaged fresh beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin solutions, *J. of Food Protection*, 62(8), 913-920.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R., 1983, Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *L.acidophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6), 1808-1815.
- Bayoumi, S., 1991, Nisin and yoghurt manufacture, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 13, 65-69.
- Beard, B.M., Sheldon, B.W. and Foegeding, P.M., 1999, Thermal resistance of bacterial spores in milk-based beverages supplemented with nisin, *J. of Food Protection*, 62(5), 484-491.
- Beuchat, L.R., Rocelle, M., Clavero, S. and Jaquette, C.B., 1997, Effects of nisin and temperature on survival, growth and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 1953-1958.
- Bierbaum, G. and Sahl, H., 1993, Lantibiotics-unusually modified bacteriocin-like peptides from gram-positive bacteria, *Zbl. Bakt.*, 278, 1-22.

- Boubekri, K. and Ohta, Y.,** 1996, Identification lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, El-Klia, *J. Sci. Food Agric.*, 70, 501-505.
- Calderon, C., Collins-Thompson, D.L. and Usborne, W.R.,** 1985, Shelf-life studies of vacuum-packaged bacon treated with nisin, *J. of Food Protection*, 48(4), 330-333.
- Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M.G.,** 1989, Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*, *J. of Food Protection*, 52(9), 614-617.
- Chen, H., Chen, M. and Chang, Y.,** 1997, Processing of low-salted mackerel fillets using biopreservative, 297-306, The Sixth International Congress on Food Industry 'New Aspects on Food Processing', Üçüncü, M., Güvenç, U., Serdaroglu, M., Çetin, M. and Göksungur, Y. (Eds.), E.Ü. Basımevi, Bornova-İZMİR.
- Chinachoti, N., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A.,** 1997, Utilization of xylose as an alternative carbon source for nisin Z production by *L.lactis* IO-1, *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 42(1-2), 171-181.
- Chung, K., Dickson, J.S. and Crouse, J.D.,** 1989, Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat, *Applied and Environmental Microbiology*, 55(6), 1329-1333.
- Cintas, L.M., Roriguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernandez, P.E. and Holo, H.,** 1995, Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum,

Applied and Environmental Microbiology, 61(7), 2643-2648.

Collins-Thompson, D.L., Calderon, C. and Usborne, W.R., 1985, Nisin sensitivity of lactic acid bacteria isolated from cured and fermented meat products, *J. of Food Protection*, 48(8), 668-670.

Daeschel, M.A., Jung, D. and Watson, B.T., 1991, Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leu. oenos*, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 601-603.

Davies, E.A., Milne, C.F., Bevis, H.E., Potter, R.W., Harris, J.M., Williams, G.C., Thomas, L.V. and Delves-Broughton, J., 1999, Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage, *J. of Food Protection*, 62(9), 1004-1010.

Dean, J.P. and Zottola, E.A., 1996, Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *L.monocytogenes*, *J. of Food Protection*, 59(5), 476-480.

Delves-Broughton, J., 1987, Nisin in food preservation, *North-European-Dairy-Journal*, 53(1), 1-8.

Delves-Broughton, J., 1990a, Nisin and its uses as a food preservative, *Food Technology*, 44(11), 100, 102, 104, 106, 108, 111-112, 117.

Delves-Broughton, J., 1990b, Nisin and its application as a food preservative, *J. Society Dairy Technol.*, 43(3), 73-76.

- Delves-Broughton, J. and Gasson, M.J.**, 1994, Nisin, 99-131, Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation, Dillon, V.M. and Board, R.G. (Eds.), CAB International, Wallingford, Oxon.
- De Vuyst, L.**, 1994, Nisin production variability between natural *L.lactis* subsp. *lactis* strains, *Biotechnology Letters*, 16(3), 287-292.
- De Vuyst, L.**, 1995, Nutritional factors affecting nisin production by *L.lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium, *J. of Applied Bacteriology*, 78, 28-33.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J.**, 1992, Influence of the carbon source on nisin production in *L.lactis* subsp. *lactis* batch fermentations, *Journal of General Microbiology*, 138, 571-578.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J.**, 1993, Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *L.lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 17-22.
- Dufour, A., Thuault, D., Boulliou, A., Bourgeois, C.M. and Le Pennec, J.**, 1991, Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *L.lactis* strain and purification of the inhibitory peptide, *J. of General Microbiology*, 137, 2423-2429.
- Eckner, K.F.**, 1992, Bacteriocins and food applications, *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 12(4), 204-209.

- El-Bedawey, A.E., Zaki, M.S., El-sherbiney, A.M. and Khalil, A.H.**, 1985, The effect of certain antibiotics on boliti fish (*Tilapia nilotica*) preservation, *Die Nahrung*, 29(3), 303-308.
- Falahee, M.B., Adams, M.R., Dale, J.W. and Gower, J.G.**, 1989, Development of an immunoassay for nisin, *J. Appl. Bacteriology*, 67(6), XXVI.
- Farias, M.E., De Ruiz Holgado, A.A.P. and Sesma, F.**, 1994, Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens, *J. of Food Protection*, 57(11), 1013-1015.
- Garver, K.I. and Muriana, P.M.**, 1993, Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products, *Int. J. Food Microbiology*, 19, 241-258.
- Giraffa, G., Neviani, E. and Veneroni, A.**, 1990, Use of conductance to detect bacteriocin activity, *J. of Food Protection*, 53(9), 772-776.
- Gorris, L.G.M.**, 1994, Bacteriocins: potential applications in food preservation, 79-84, Food Preservation by Combined Process, Final Report, FLAIR Concerted Action No. 7, Subgroup B, Leistner, L. and Gorris, L.G.M. (Eds.), European Commission.
- Gudmundsdottir, E.**, 1993, Antagonistic Properties of Lactic Acid Bacteria, Licentiate Thesis, Department of Food Science,

Chalmers University and Swedish Institute for Food Research, 62p.

Gupta, R.K. and Prasad, D.N., 1989, Nisin in the preservation of stirred yogurt under non-refrigerated storage, *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 7, 123-129.

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

Hardie, J.M., 1986, Genus *Streptococcus*, 1043-1071, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Eds.), Williams&Williams, Baltimore.

Harrigan, W.F. and McCance, M.E., 1976, Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, Academic Press, 452p.

Harris, L.J., Fleming, P.F. and Klaenhammer, T.R., 1992a, Developments in nisin research, *Food Research International*, 25, 57-66.

Harris, L.J., Fleming, H.P. and Klaenhammer, T.R., 1992b, Characterization of two nisin-producing *L.lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1477-1483.

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

Hurst, A., 1972, Interactions of food starter cultures and foodborne pathogens: the antagonism between *Str.lactis* and

sporeforming microbes, *J. Milk and Food Technol.*, 35(7), 418-423.

Hurst, A., 1978, Nisin: its preservative effect and function in the growth cycle of the producer organism, 297-314, *The Streptococci*, Symposia of the Soc. Appl. Bacteriol., Academic Press.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B., 1995, Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Microbiological Reviews*, 59(2), 171-200.

Jackman, P.J.H., Phillips, B.A., Farrow, J.A.E. and Painting, K.A., 1990, National Collection of Food Bacteria, Catalogue of Cultures 1990, 4th Edt., Agricultural and Food Research Council, 158p.

Joosten, H.M. and Nunez, M., 1996, Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1178-1181.

Kalra, M.S. and Dudani, A.T., 1975, Stoppage in increase in acid production of yogurt by incorporating a nisin-producing culture, *Indian J. Dairy Sci.*, 28(1), 71-72.

Kanatani, K., Tahara, T., Yoshida, K., Yamada, K., Miura, H., Sakamoto, M. and Oshimura, M., 1992, Inhibition of histamine-producing bacteria by nisin, *J. of Fermentation and Bioengineering*, 74(3), 194-195.

Kandler, O. and Weiss, N., 1986, Regular, nonsporing gram-positive rods, 1208-1260, *Bergey's Manual of Systematic*

- Bacteriology, Vol. 2, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Eds.), Williams&Williams, Baltimore.
- Khan, M.A., Gürakan, G.C. and Bozoğlu, T.F., 1996,** Screening of lactic acid bacteria from meat and meat products for bacteriocin production: *E.faecium*, inhibitory to *L.monocytogenes*, *Gıda Teknolojisi*, 1(7), 53-57.
- Klaenhammer, T.R., 1988,** Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochemie*, 70, 337-349.
- Kociubinski, G.L., Perez, P.F., Anon, M.C. and De Antoni, G.L., 1996,** A method of screening for highly inhibitory lactic acid bacteria, *J. of Food Protection*, 59(7), 739-745.
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. and Topisirovic, L., 1991,** Bacteriocin-producing strain of *L.lactis* subsp. *diacitilactis* S50, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1835-1837.
- Ledford, R.A. and Brown, J.M., 1979,** Characterization of groups N and D *Streptococci* isolated from rumen fluids, *J. dairy Sci.*, 62, 339-342.
- Leininger, H.V., 1976,** Equipment, media, reagents, routine tests and stains (Chapter 2), 10-94, Compendium Methods for the Microbiological Examination of Foods, Speck, M.L. (Ed.), American Public Health Association, USA, 702p.
- Liu, W. and Hansen, J.N., 1990,** Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *L.lactis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2551-2558.

- Magdoub, M.N.I., Shehata, A.E., El-Samragy, Y.A. and Hassan, A.A.,** 1984, Interaction of heat shock, manganese, L-alanine, B-alanine and nisin in spore germination of some psychrotrophic *Bacillus* strains in milk, *Milchwissenschaft*, 39(3), 159-162.
- Motlagh, A.M., Johnson, M.C. and Ray, B.,** 1991, Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites, *J. of Food Protection*, 54(11), 873-878, 884.
- Mundt, J.O.,** 1986, Lactic acid Streptococci, 1065-1066, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Eds.), Williams&Williams, Baltimore.
- Ogden, K.,** 1986, Nisin: a bacteriocin with a potential use in brewing, *J. Inst. Brew.*, 92, 379-383.
- Ogden, K. and Tubb, R.S.,** 1985, Inhibition of beer-spoilage lactic acid bacteria by nisin, *J. Inst. Brew.*, 91, 390-392.
- Ogden, K., Waites, M.J. and Hammond, J.R.M.,** 1988, Nisin and brewing, *J. Inst. Brew.*, 94, 233-238.
- Oscroft, C.A., Banks, J.G. and McPhee, S.,** 1990, Inhibition of thermally-stressed *Bacillus* spores by combinations of nisin, pH and organic acids, *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, 23, 538-544.
- Ouwehand, A.C.,** 1998, Antimicrobial components from lactic acid bacteria, 139-159, Lactic Acid Bacteria (2nd Edt.), Salminen, S. and von Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 617p.

- Passos, F.M., Silva, D.O., Lopez, A., Ferreira, C.L.L.F. and Guimares, W.V., 1984, Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia, *J. Food Sci.*, 49, 205-208.**
- Piard, J.C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J. and Desmazeaud, M., 1990, Evidence for a bacteriocin produced by *L.lactis* CNRZ 481, *Neth. Milk Dairy J.*, 44, 143-158.**
- Pridmore, D., Rekhif, N., Pittet, A.C., Suri, B. and Mollet, B., 1996, Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: comparison to lacticin 481 of *L.lactis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1799-1802.**
- Qiao, M., Omaetxebarria, M.J., Ra, R., Oruetxebarria, I. and Saris, P.E.J., 1997, Isolation of a *L.lactis* strain with a high resistance to nisin and increased nisin production, *Biotechnology Letters*, 19(2), 199-202.**
- Radler, F., 1990, Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media, *Am. J. Enol. Vitic.*, 41(1), 1-6.**
- Roberts, R.F. and Zottola, E.A., 1993, Shelf-life of pasteurized process cheese spreads made from cheddar cheese manufactured with a nisin-producing starter culture, *J. Dairy Sci.*, 76, 1829-1836.**

- Roberts, R.F., Zottola, E.A. and McKay, L.L.**, 1992, Use of nisin-producing starter culture suitable for cheddar cheese manufacture, *J. Dairy Sci.*, 75, 2353-2363.
- Rogers, A.M. and Montville, T.J.**, 1991, Improved agar diffusion assay for nisin quantification, *Food Biotechnology*, 5(2), 161-168.
- Roller, S.**, 1991, The biotechnological development of new food preservatives, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 9, December, 183-206.
- Roller, S. and Lusengo, J.**, 1997, Developments in natural food preservatives, *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, July/August, 22-25.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C. and Ross, R.P.**, 1996, An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *L.lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 612-619.
- Schillinger, U. and Lücke, F.**, 1987, Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products, *Food Microbiology*, 4, 199-208.
- Schillinger, U. and Lücke, F.**, 1989, Antibacterial activity of *Lb.sake* isolated from meat, *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901-1906.
- Scott, V.N. and Taylor, S.L.**, 1981, Effect of nisin on the outgrowth of *C.botulinum* spores, *J. of Food Science*, 46, 117-120, 126.

- Sharpe, M.E., Fryer, E. and Smith, D.G., 1966, Identification of lactic acid bacteria, 65-79, Identification Method for Microbiologists Part A, Gibbs, B.M. and Skinner, F.A. (Eds.), Academic Press, London.**
- Shefet, S.M., Sheldon, B.W. and Klaenhammer, T.R., 1995, Efficacy of optimized nisin-based treatments to inhibit *Styphimurium* and extend shelf-life of broiler carcasses, *J. of Food Protection*, 58(10), 1077-1082.**
- Shimizu, H., Mizuguchi, T., Tanaka, E. and Shioya, S., 1999, Nisin production by a mixed-culture system consisting of *L.lactis* and *Kluyveromyces marxianus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3134-3141.**
- Spelhaug, S.R. and Harlender, S.K., 1989, Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *L.lactis* and *P.pentosaceous*, *J. of Food Protection*, 52(12), 856-862.**
- Splittstoesser, D.F. and Stoyla, B.O., 1989, Effect of various inhibitors on the growth of lactic acid bacteria in a model grape juice system, *J. of Food Protection*, 52(4), 240-243.**
- Steeg, P.F., Hellemons, J.C. and Kok, A.E., 1999, Synergistic actions of nisin, sublethal ultrahigh pressure and reduced temperature on bacteria and yeast, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4148-4154.**
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T.R., 1991, Nisin treatment for inactivation of *Salmonella***

species and other gram-negative bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3613-3615.

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

Teuber, M., Geis, A. and Neve, H., 1992, The Genus *Lactococcus*, 1482-1501, The Prokaryotes (2nd Edt.), Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. (Eds.), Springer-Verlag, New York, USA.

TGKY (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği), 1997, T.C. Resmi Gazete, Sayı: 23172 Mükerrer.

Thuault, D., Beliard, E., Le Guern, J. and Bourgeois, C., 1991, Inhibition of *C.tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria, *J. Dairy Sci.*, 74, 1145-1150.

Tramer, J. and Fowler, G.G., 1964, Estimation of nisin in foods, *J. of The Science of Food and Agriculture*, 8, 522-528.

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. of Food Microbiology*, 16(2), 141-151.

Vandenbergh, P.A., 1993, Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth, *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 221-238.

von Wright, A. and Sibakov, M., 1998, Genetic modification of lactic acid bacteria, 161-210, *Lactic Acid Bacteria* (2nd

Edt.), Salminen, S. and von Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 617p.

Wahlström, G. and Saris, P.E.J., 1999, A nisin bioassay based on bioluminescence, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3742-3745.

Waites, M.J. and Ogden, K., 1987, The estimation of nisin using ATP-Bioluminometry, *J. Inst. Brew.*, 93, 30-32.

Wandling, L.R., Sheldon, B.W. and Foegeding, P.M., 1999, Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors, *J. of Food Protection*, 62(5), 492-498.

Yusof, R.M., Morgan, J.b. and Adams, M.R., 1993, Bacteriological safety of a fermented weaning food containing L-lactate and nisin, *J. of Food Protection*, 56(5), 414-417.

Zezza, N., Pasini, G., Lombardi, A., Merceiner, A., Spettoli, P., Zamorani, A. and Nuti, M.P., 1993, Protection of a bacteriocin active on lactate-fermenting *Clostridia* by *L.lactis* subsp. *lactis* immobilized in coated alginate beads, *J. of Dairy Research*, 60, 581-591.

ÖZGEÇMİŞ

1969 Isparta doğumlu Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olan Duygu KIŞLA, 1991 yılında E.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimini tamamladıktan sonra, 1992 yılında aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başlamıştır. Yüksek Lisans eğitimini 1994 yılında tamamlayarak 1996 yılında E.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü'nde sürdürdüğü görevinden ayrılmış ve aynı yıl E.Ü. Su Ürünleri Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başlamıştır. Evli ve 1 kız çocuk annesi olan Duygu KIŞLA, halen E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Avlama ve İşleme Teknolojisi Bölümü İşleme Teknolojisi Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir.