

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**PROTOPLAST FÜZYONU KULLANILARAK BAZI
LACTOBACILLUS SUŞLARININ BAKTERİYOSİN
ÜRETİM KAPASİTELERİNİN ARTIRILMASI**

Özlem ERTEN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.04

Sunuş Tarihi : 25.01.2013

Bornova-İZMİR

2013

Özlem ERTEN tarafından doktora tezi olarak sunulan “Protoplast Füzyonu Kullanılarak Bazı *Lactobacillus* Suşlarının Bakteriyosin Üretim Kapasitelerinin Artırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 25.01.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

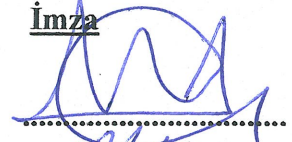
Raportör Üye : Prof. Dr. Özer KINIK

Üye : Doç. Dr. Alev HALİKİ UZTAN

Üye : Doç. Dr. Halil BIYIK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL

İmza











ÖZET**PROTOPLAST FÜZYONU KULLANILARAK BAZI
LACTOBACİLLUS SUŞLARININ BAKTERİYOSİN ÜRETİM
KAPASİTELERİNİN ARTIRILMASI**

ERTEN, Özlem

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ
Ocak 2013, 157 sayfa

Bu araştırmada genom-shuffling yöntemi kullanılarak bakteriyosin üretiminin artırılması gerçekleştirilmiştir. *Lactobacillus gasseri* (JCM 11657 ve JCM 11046) başlangıç suşları olarak seçilmiştir. Bu suşlar başlangıçta mutasyon gerçekleştirilmeden genom-shuffling ile rekombine edilmiştir. Bakteriyosin üretim kapasiteleri indikatör olarak kullanılan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002)'a karşı disk difüzyon tekniği ile tespit edilmiştir. Sadece iki round protoplast füzyonu sonunda bakteriyosin üretim kapasiteleri artırılmış dört füzant elde edilmiştir.

Geliştirilmiş suşların aktiviteleri farklı sıcaklık ve enzim denemeleri gerçekleştirilerek denemeye alınmıştır. Bunun sonucunda aktivitenin bakteriyosinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. PZR ve sekans analizleri sonunda seçilen füzantlarda gerçekleştirilen rekombinasyon genetik olarak da doğrulanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Lactobacillus gasseri*, bakteriyosin, genom-shuffling

ABSTRACT**GENOME-SHUFFLING OF *LACTOBACILLUS* FOR
BACTERIOCIN PRODUCTION**

ERTEN, Özlem

PhD in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

January 2013, 157 pages

In this study the improvement of the bacteriocin production by using genome-shuffling method was achieved. Two strains of *Lactobacillus gasseri* (JCM 11657 and JCM 11046) were chosen as the starting populations. They were recombined through genome-shuffling without making any mutations at the beginning. The bacteriocin production capacities of the shuffled and control strains were detected by screening them by disk diffusion technique against the indicator strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002). After only two rounds of genome-shuffling, four strains with improved bacteriocin production capacity were obtained.

The improved strains' activities were tested in different temperatures and in the presence of enzymes and it was found that the activities were caused by bacteriocins. After the PCR and sequence analysis, recombination of the chosen shuffled strains' were proved genetically.

Keywords: *Lactobacillus gasseri*, bacteriocin, genome-shuffling

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Mustafa ATEŞ'e, doktora eğitimim süresince bana her zaman destek veren değerli hocam Prof. Dr. Özer KINIK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın bir kısmını yapmam için bilgi ve laborauvar imkanlarını sunan Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü hocalarından sayın Doç. Dr. Halil BIYIK'a ve Yrd. Doç. Dr. Gamze Başbülbul'e teşekkür ederim. Tez çalışmam için gerekli olan bakterilerden bazılarını temin etmemi sağlayan Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Prof. Dr. Belma ASLIM'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalışmam boyunca 2211 Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında beni maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen canım anneme, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşime; küçük yaşta olmalarına rağmen anlayışlı davranarak çalışmama destek olan biricik kızlarım Derin ve Duru'ya sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi BAP (2009/FEN-018) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ	1
1.1.Laktik Asit Bakterileri	3
1.1.1.Laktobasillerin metabolik potansiyelleri	6
1.1.2.Laktobasillerin fonksiyonel özellikleri	9
1.1.3. <i>Lactobacillus gasseri</i>	25
1.2.Bakteriyosinler	31
1.2.1.Bakteriyosin sentez genetiği	35
1.2.2.Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivite spektrumu	43
1.2.3.Bakteriyosin uygulamaları	44
1.3.Genetik Modifikasyonlar	46
1.3.1.DNA-shuffling	51
1.3.2.Genom-shuffling	52

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.MATERYAL VE METOD	75
2.1.Kullanılan Mikroorganizmalar ve Besi Ortamları	75
2.1.1.Kullanılan mikroorganizmalar	75
2.1.2.Kullanılan besiy ortamları	76
2.2.Antibakteriyal Aktivite Denemeleri	78
2.2.1.Bakteriyal konsantrasyonun ayarlanması	78
2.2.2.Bakteri kültürlerinden süpernatant eldesi	79
2.2.3.Liyofilizasyon	79
2.2.4.Agar-well yöntemi	80
2.2.5.Disk difüzyon yöntemi	81
2.3.Genom-Shuffling	81
2.3.1.Protoplast izolasyonu ve rejenerasyonu	81
2.3.2.Rejenere olan protoplastların füzyon için seçilmesi	84
2.3.3.Protoplast füzyonu	85
2.4.Füzyant Süpernatantlarının Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi	86
2.4.1.Enzim denemeleri	86

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.2.Sıcaklık denemeleri	86
2.5.Füzantların Genetik Analizleri	87
2.5.1.DNA izolasyonu	87
2.5.2.Primer PZR programı seçimi	87
3.BULGULAR	89
3.1. Kültür Süpernatantlarının Antibakteriyal Aktivite Sonuçları	89
3.1.1. Agar-well sonuçları	89
3.1.2. Disk diffüzyon sonuçları	94
3.1.3. Liyofilizasyon sonuçları	94
3.2. Protoplast Formasyonu ve Rejenerasyonu	96
3.2.1. Birinci füzyon için protoplast izolasyonu ve rejenerasyonu	96
3.2.2. İkinci füzyon için protoplast izolasyonu ve rejenerasyonu	99
3.2.3. Üçüncü füzyon için protoplast izolasyonu ve rejenerasyonu	101
3.3 Protoplast Füzyonu	102
3.3.1. Birinci füzyon	102

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3.2. İkinci füzyon	109
3.3.3. Üçüncü füzyon	116
3.4. Füzant Süpernatantlarının Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi ...	121
3.5 Füzantların Genetik Analizleri	122
3.5.1. PZR amplifikasyonu	122
4.TARTIŞMA	124
4.1. Füzyon Öncesinde Antibakteriyal Aktivite İçin Sayım Sonuçları	125
4.2. Protoplast Formasyonu ve Rejenerasyonu	128
4.3. Protoplast Füzyonu	131
4.3.1. Birinci füzyon	133
4.3.2. İkinci füzyon	134
4.3.3. Üçüncü füzyon	135
4.4. Füzant Süpernatantlarının Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi	140
4.5. Füzantların Genetik Analizleri	141
KAYNAKLAR	143
ÖZGEÇMİŞ	157

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Homofermentatif iz yolu	7
1.2. Heterofermentatif iz yolu	8
1.3. Genom-shuffling prosedürü	63
3.1. Birinci füzyon öncesinde protoplastların mikroskopik görünümleri	97
3.2. Rejenere protoplastların mikroskopik görünümleri	98
3.3.2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 füzantlarının gösterdikleri antibakteriyal etki	115
3.4. <i>gaT</i> spesifik primeri ile gerçekleştirilen PZR amplifikasyonu	123
3.5. <i>gaA</i> spesifik primeri ile gerçekleştirilen PZR amplifikasyonu	123

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>gaA</i> ve <i>gaT</i> için PZR amplifikasyon koşulları	88
3.1. İndikatörlere karşı 1.denemede gözlenen etki	90
3.2. Test organizmalarının farklı inkübasyon süresi ve farklı pH'ları gösteren kodları	92
3.3. İndikatörlere karşı 2.denemede gözlenen etki	92
3.4. İndikatörlere karşı 3. denemede gözlenen etki	95
3.5. Zamana göre spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri	96
3.6.Birinci protoplast formasyonunda protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığı tablosu	99
3.7.İkinci protoplast formasyonunda protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığı tablosu	100
3.8.Üçüncü protoplast formasyonunda protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığı tablosu	102
3.9. Birinci füzyonda elde edilen füzantların %0.3 CaCO ₃ içeren MRS agardaki zon çapları	104
3.10. Çizelge-3.9'da gösterilen suşların alındığı petri/ seyreltme sayısı/ mikroskopik görünüm	105

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.11. Birinci füzyondan seçilen füzantların antibakteriyal aktivite sonuçları	106
3.12. Birinci füzyondan seçilen füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktiviteleri	108
3.13. İkinci füzyonda elde edilen füzantların % 0.3 CaCO ₃ içeren MRS agardaki zon çapları	110
3.14. İkinci füzyondan seçilen füzantların antibakteriyal aktiviteleri	112
3.15. İkinci füzyondan seçilen füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktiviteleri	116
3.16. Üçüncü füzyonda elde edilen füzantların %0.3 CaCO ₃ içeren MRS agardaki zon çapları	117
3.17. Üçüncü füzyonda elde edilen füzantların CaCO ₃ içeren MRS agardaki zon çapları	119
3.18. Üçüncü füzyondan seçilen füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktiviteleri	121
3.19. Füzant Süpernatantlarının Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi ..	122

1.GİRİŞ

Laktobasiller memeli ve kuşların gastrointestinal mikroflorasının regülasyonunda ve çeşitli gıdalar ile endüstriyel fermentasyonda önemi bilinen mikroorganizmalardır. Laktobasillerin gıda fermentasyonu ve gastrointestinal (GI) sistem enfeksiyonlarından korunmadaki rolü bilinmektedir. Laktobasiller organik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi çeşitli antimikrobiyal bileşikler de üretirler. Bakteriyosinler bakterisidal etkiye sahip protein yapılı bakteriyel ürünlerdir. Bakteriyosinler laktik asit bakterileri (LAB) gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen ve gıdalarda biyokoruyucular olarak kullanılan antimikrobiyal peptitlerdir. Bakteriyosin üreten suşlar mikrobiyal gıda güvenliğinin geliştirilmesinde koruyucu kültür olarak kullanılabilmekte ve bakteri kontaminasyonunun inhibisyonu yoluyla fermente gıdaların korunmasında önemli rol oynamaktadır (Magnusson, 2003).

Bu araştırmada probiyotik olarak bilinen insan gastrointestinal sistemi kaynaklı bazı *Lactobacillus gasseri* suşlarında genom-shuffling yöntemi kullanılarak bakteriyosin üretim kapasitesinin artırılması planlanmıştır. Genom-shuffling, farklı türdeki mikroorganizmaların çeşitli fenotipik özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan ve başarılı sonuçlar elde edilmesi nedeniyle artan ilginin odağı haline gelen bir yöntemdir. Literatürlerde yer alan çeşitli araştırmalarda genom-shuffling yönteminin Gram + bakteriler, mayalar, küfler ve aktinomisetlerle yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Magnusson, 2003). *Lactobacillus gasseri* de probiyotik özellik gösteren bir bakteri olması ve ürettiği bakteriyosinlerin geniş etki spektrumuna sahip olmasından dolayı bu araştırmada kullanımının uygun olduğu düşünülen bir türdür. Bu araştırmanın amacı bu bakterinin iki farklı suşunun genom-shuffling yöntemi ile rekombine edilmesi ve buna bağlı olarak da bakteriyosin üretim kapasitelerinin artırılmasıdır. Ayrıca *L.gasseri* bakteriyosinlerinin artırılmasına yönelik herhangi bir literatüre de rastlanmadığı için araştırmanın özgün olacağı düşünüldüğü için bu bakterinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Genom-shuffling yönteminde iyi fenotipik özellikler gösteren suşlar başlangıç suşu olarak seçilmekte veya organizmalar belli özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla mutasyona tabi tutulmaktadır. Bu araştırmada başlangıç suşu olarak seçilen iki *Lactobacillus gasseri* suşu da gasserisin bakteriyosininin iki türünü iyi şekilde ürettiği bilinen suşlardır. Her iki suş protoplast eldesi ve tekrarlamalı protoplast füzyonu ile rekombine edilmiş ve her iki bakteriyosini de üreten tek bir füzant elde edilmeye çalışılmıştır.

Son yıllarda tüketicilerin bilinçlenmesi ile gıdalarda kullanılan koruyucu katkı maddelerine alternatif olabilecek çeşitli katkıların elde edilmesi önem kazanmıştır. Ayrıca insan sağlığına faydalı etkilerinden dolayı probiyotik içeren fonksiyonel gıdaların kullanımına ilgi de artmıştır. *Lactobacillus gasseri* bakteriyosinlerinin gıda patojenlerine karşı inhibisyon etkisi göstermesi, bunun yanında *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *influenza* virüsü gibi hastalık etkenlerine karşı etkisinin olması bu bakterinin ve ürettiği bakteriyosinlerin önemini açıklamaktadır. Bu araştırma ile elde edilen bulgular ışığında *Lactobacillus gasseri* bakterisinin probiyotik bakteri olarak kullanımının ticari olarak yaygınlaştırılması hedeflenmiştir.

Laktik asit bakterileri (LAB), bakterilerin varlığının henüz keşfedilmediği dönemlerde dahi fermente ürünlerde faydalanılan bakterilerdir (Magnusson, 2003). LAB pek çok değişik ortamda oldukça yaygın ve sık bulunan mikroorganizmalardır (Franci et al., 2010). LAB besin ögesi bakımından zengin ortamlarda bulunan süt, et ürünleri ve sebzeler gibi gıda ürünlerinde doğal olarak oluşan bakterilerdir (Magnusson, 2003). Bu bakteriler meyve, sebze, tahıl, şarap, süt ve et gibi gıdalarda doğal olarak bulunabilirler (Franci et al., 2010).

Biyokoruma; raf ömrünün uzatılması, nötral maddeler, mikroflora veya bunların antimikrobiyal ürünlerinin eklenmesi yoluyla gıda güvenliğinin artırılması anlamına gelmektedir. Bu bakteriler gıda korumanın ve beslenmenin doğal ve çevreye dost yolu olarak bilinmektedir. Koruma etkisi temel olarak LAB'nin büyüme fazında gerçekleşen pH redüksiyonuna bağlıdır. Patojenik veya çürükçül bakterilerin kimyasal dirençleri ve artan tüketici bilinci gıda korumada alternatif yollar keşfedilmesine sebep olmuştur (Magnusson, 2003).

1.1.Laktik Asit Bakterileri

LAB'nin en önemli üyelerinden olan laktobasiller, ticari öneme sahip fermentasyon ürünlerinin üretilmesinin yanı sıra GI sistem ve diğer mukozal yüzeylerde de yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır (Franci et al., 2010). Taksonomik olarak *Lactobacillus* genusu *Firmicutes* filumunda, *Bacilli* sınıfında *Lactobacillales* ordosunda, *Lactobacillaceae* familyasında yer almaktadır (Lebeer et al., 2008). *Lactobacillaceae* familyası *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* ve *Pediococcus* olmak üzere 3 genusta toplanmıştır. Karbonhidratlardan homofermentatif veya heterofermentatif yolla laktik asit üreten mikroaerofilik veya anaerobik kok ve basil şeklindeki mikroorganizmalar Bu grupta yer almaktadır. (Schleifer et al., 1972).

Lactobacillus genusu gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan türleri kapsayan, Gram (+), katalaz-negatif, düşük G+C içeriğine sahip, anaerobik ve sporsuz bakterilerden oluşmaktadır. Laktobasiller düşük DNA baz kompozisyonuna (32-53% G+C) sahip mikroorganizmalardır. LAB esas metabolizma ürünü olarak laktik asit üreten mikroorganizmalardır (Yebra et al., 2012). 50'den fazla laktobasil temelde şeker metabolizmalarındaki farklılık nedeniyle 3 ana gruba ayrılmıştır. Bu farklılıklar früktoz-1,6-difosfat aldolaz ve fosfoketolaz varlığı veya yokluğundan kaynaklanmaktadır (Edelman, 2005). Bunlardan ilki obligat homofermentatif gruptur ve *L. acidophilus*, *L. helveticus*; *L. delbrueckii* ve *L. salivarius*'u kapsar. İkinci grup fakültatif heterofermentatif gruptur. *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus* ve *L. casei* bu grubun üyesidir. Üçüncü grup ise obligat heterofermentatif gruptur. Bunlar *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. brevis* ve *L. buchneri*'dir (Toit et al., 2001). DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına dayanarak *L. acidophilus* grubu altı homolog gruba ayrılmıştır (Edelman, 2005): *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* ve *L. johnsonii* fenotipik olarak birbirinden ayırması zor karakterlere sahip organizmalardır. *L. acidophilus*, *L. gasseri* ve *L. johnsonii* en çok çalışılmış probiyotik suşlardandır (Toit et al., 2001).

Normalde LAB optimal koşullar altında kolay büyüyen ve laktik asit üreten mikroorganizmalardır (John et al., 2008a). Çeşitli habitatlardan izole edilen laktik asit bakterileri (LAB) bulundukları çevre koşullarına kolaylıkla uyum sağlayabilen bakterilerdir (Makarova et al., 2006). Laktobasiller sindirim sistemini desteklemede önemli rolü olan bakterilerdir. Bu genusa ait türler memeli model sistemlerinde sekresyon olmayan üst gastrik epitelde baskın mikrobiyal popülasyonu, ayrıca alt sindirim sisteminin kolon kısmında ikincil baskın popülasyonları oluşturmaktadır (Elkins et al., 2004).

Sindirim sistemindeki pH, sıcaklık, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli, safra tuzları, anaerobik ortam, bağırsak hareketinin yavaşlaması gibi ortam değişiklikleri mikrobiyal florayı ve bunların stabilitesini etkileyebilmektedir (Yebra et al., 2012). Probiyotik olarak tanımlanan türleri GI sistemdeki normal mikrobiyota üzerindeki pozitif etkileri, patojenlerle rekabete girme özellikleri ve mukozal immuniteye uyum sağlamaları açısından önemlidir (Franci et al., 2010). Sindirim sistemindeki bu kommensalizm, konukçu organizmaya bu bölgeleri patojenlere karşı koruma etkisi ile fayda sağlamaktadır. Bundan dolayı canlı mikroorganizmalar probiyotik adı altında tüketilmekte ve üriner sistem enfeksiyonları, sindirim sistemi hastalıkları gibi hastalıkların önlenmesi veya etkilerinin azaltılmasına katkı sağlamaktadır.

Laktobasiller ilaç sanayiinden başka probiyotik özelliklerinden dolayı gıda sanayiinde de fermente süt ve süt ürünleri başta olmak üzere şarap ve ekşi maya üretiminde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Asidik tabiatlı olmaları ve bakteriyosin üretmeleri bu bakterilerin koruyucu olarak düşünölmelerine neden olmaktadır. Endüstriyel olarak laktobasiller laktik asit üretimi için de önemli kaynaklar olarak bilinmektedirler. Laktobasiller gıdalar ile birlikte rahatlıkla tüketilebilmekte ve patojenite ile ilgilerinin olmadığı bilinmektedir (Elkins et al., 2004).

Laktobasiller bulundukları ortamlarda pek çok farklı karbonhidratı kullanabilme özelliğine sahip mikroorganizmalardır (Franci et al., 2010). Laktobasiller karbonhidratları hızlıca laktik asite dönüştürdükleri ve sınırlı

biyosentetik kapasite gösterdikleri basit bir fermentasyon metabolizmasına sahiptirler (Yebra et al., 2012).

Laktik asit üretiminde besin ögesi takviyesi ve besiyerinin tamponlanması akış işleminde problemlere ve buna bağlı olarak da maliyetin artmasına neden olabilmektedir. Laktik asit gıda, kimya ve kozmetik sanayiinde kullanıldığının yanında, biyodegrade edilebilir çevre dostu plastik olarak bilinen polilaktik asitin (PLA) önemli bir üreticisidir. Ayrıca kimyasal sentez ile sadece rasemik, yani sağa ya da sola çevirici izomerlerin eşit miktarda bulunduğu optik olarak inaktif formdaki laktik asit karışımı üretilmekte, D- veya L-laktik asit formu sadece fermentasyonla elde edilebilmektedir (John et al., 2008a).

Ayrıca, bu bakterileri değişik yöntemler ve stratejiler kullanmak suretiyle genetik olarak değiştirmek mümkündür. Tüm bu özelliklerden dolayı laktobasiller gıda endüstrisi için önemli olan çeşitli bakteriyel metabolit üretimi veya üretilen bileşiklerin miktarlarının artırılması amacıyla genetik mühendisliği çalışmaları için oldukça uygundur. Bu çalışmalarla sağlığa yararlı etkileri olan probiyotik suşların genetik manipülasyonlarla geliştirilmesi veya bu suşlara yeni probiyotik aktivitelerin kazandırılması da mümkün olabilmektedir (Yebra et al., 2012).

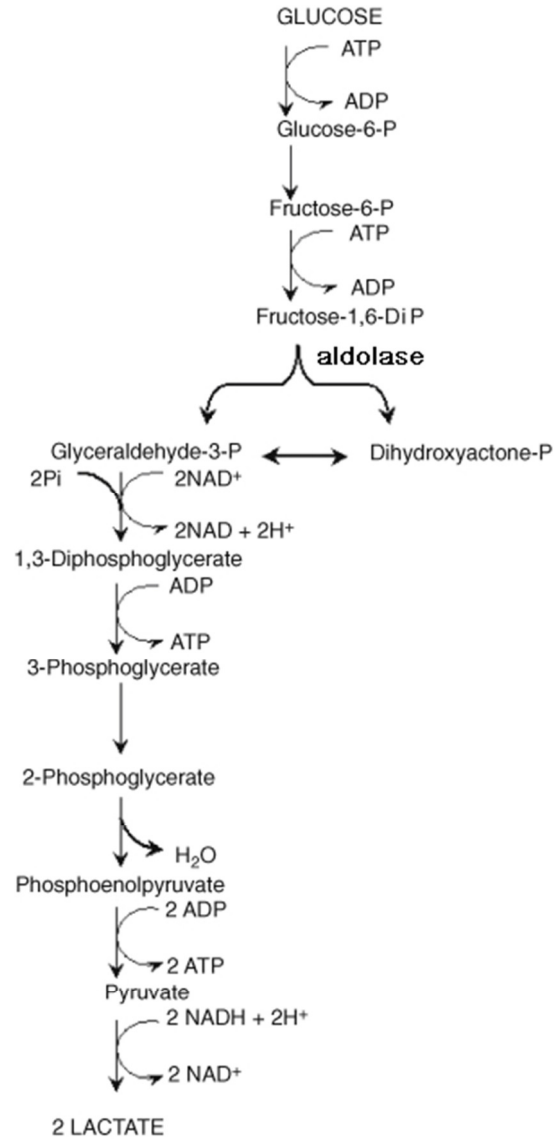
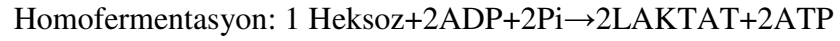
Fermentatif ve ticari bazı LAB'nin tamamlanmış genom sekansları yayımlanmıştır. Bunlar: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus salivarius* ve *Streptococcus thermophilus*'tur. LAB'nin genomik içeriği ile filogenetik analizlerin karşılaştırması yapıldığı zaman evrimde çeşitli gen kayıpları ve kazanımlarının meydana geldiği görülmektedir (Makarova et al., 2006). Türlerin yeniden yapılandırılması ve DNA veya rRNA sekanslarından türetilmiş suşa spesifik problemler *L.acidophilus* grubunda başarılı şekilde kullanılabilmektedir (Toit et al., 2001).

1.1.1.Laktobasillerin metabolik potansiyelleri

Fermentatif mekanizmaları ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmalarından dolayı endüstriyel öneme sahip gıda bileşenlerinin üretilmesi amacıyla LAB'nin şeker metabolizmasının yönü değiştirilebilmektedir. Fermentasyon sırasında monosakkaritler glikoliz (Embden-Mayerhoff yolu) ve benzer yollarla katabolize olmaktadır. Şekerlerin glikolitik katabolizması heksozları fosforilasyon reaksiyonları aracılığıyla gliseraldehit-3P (GADH-3P) ve dihidroksiaseton-P'a hidrolize olan früktoz-1,6-bis-P'a dönüştürür. Daha sonra GADH-3P defosforilasyon ve oksidasyon ile 2 pirüvat oluşumunu ve her bir glikoz molekülü başına 2ATP ve 2NAD⁺'nin 2NADH'a indirgenmesini sağlar. Normal metabolik koşullar altında NADH pirüvatın indirgenmesi için kullanılır. Bazı LAB pirüvattan laktat üretirken (homofermentatif) bazıları laktat, asetat, etanol ve CO₂ üretir (heterofermentatif) (Yebra et al., 2012).

Heterofermentatif türler şeker katabolizmasını pentoz fosfat veya fosfoketolaz yolu olarak bilinen ve GADH-3P ve asetil-P'yi gereksiz kılan yönde değiştirebilmektedir. Böylece GADH-3P glikolizin alt kısmına geçmektedir. Bu metabolik yolda iki NADH molekülü asetil-CoA'dan etanol üreten alkol dehidrogenaz aracılığıyla okside olur. Bundan dolayı heterofermentasyon dengesi bir mol glikoz, bir mol laktat, bir mol etanol, bir mol CO₂ ve net enerji kazanımı olan bir mol ATP şeklindedir. Metabolik mühendisliğinde sıklıkla kullanılan önemli bir strateji glikolizin son basamağında laktat veya etanol gibi doğal proton alıcılarının oluşumunun bloke edilmesidir. Bununla birlikte, H⁺ deposunun harcanması normalde LAB'nin birkaç L-laktat dehidrogenaz (L-LDH) izoenziminin bulunduğunu gösterir ve pek çok LAB genomunda D-laktat birikimini sağlayan alternatif dehidrogenazlar olduğu *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus casei* gibi değişik genomlarda yapılan analizler ile tespit edilmiştir. Glikolizin Pi (ADP ve fruktoz-1,6-bisP tarafından *L.bulgaricus*'ta teşvik edilir), früktoz-1,6-bisP, fosfoenolpirüvat (PEP), ADP, ATP ve NADH/NAD⁺ oranı gibi kendi son ve orta metabolitleri tarafından katı allosterik regülasyona maruz kalması ayrı bir zorluk oluşturmaktadır. Bunun dayanıklılığı ve elastikiyeti etkin bir bakteri gelişimini garantileyecek ve böylece aktivite oranı hücrenin enerji isteğini karşılayacaktır. Ayrıca metabolik yol regülasyonu ile ilişkili olan ve

özellikle allosterik modülasyona duyarlı üç enzim aktivitesi gözlenmiştir. Bunlar: fosfofruktokinaz (PFK), GADH-3P dehidrogenaz ve pirüvat kinazdır. PFK, PEP tarafından ve pirüvat kinaz aktivitesi ise *Lactococcus lactis*'te Pi tarafından inhibe edilir. Ayrıca *L.lactis*'te GADH-3P dehidrogenazın NADH/NAD⁺ oranı ile regüle edilen ve LDH ile gerçekleşen karbon akışı modülasyonunda dikkate değer bir rolü bulunmaktadır (Yebra et al., 2012). Homofermentasyon ve heterofermentasyon iz yolu sırasıyla Şekil-1.1. ve 1.2.'de gösterilmiştir (Magnusson, 2003).



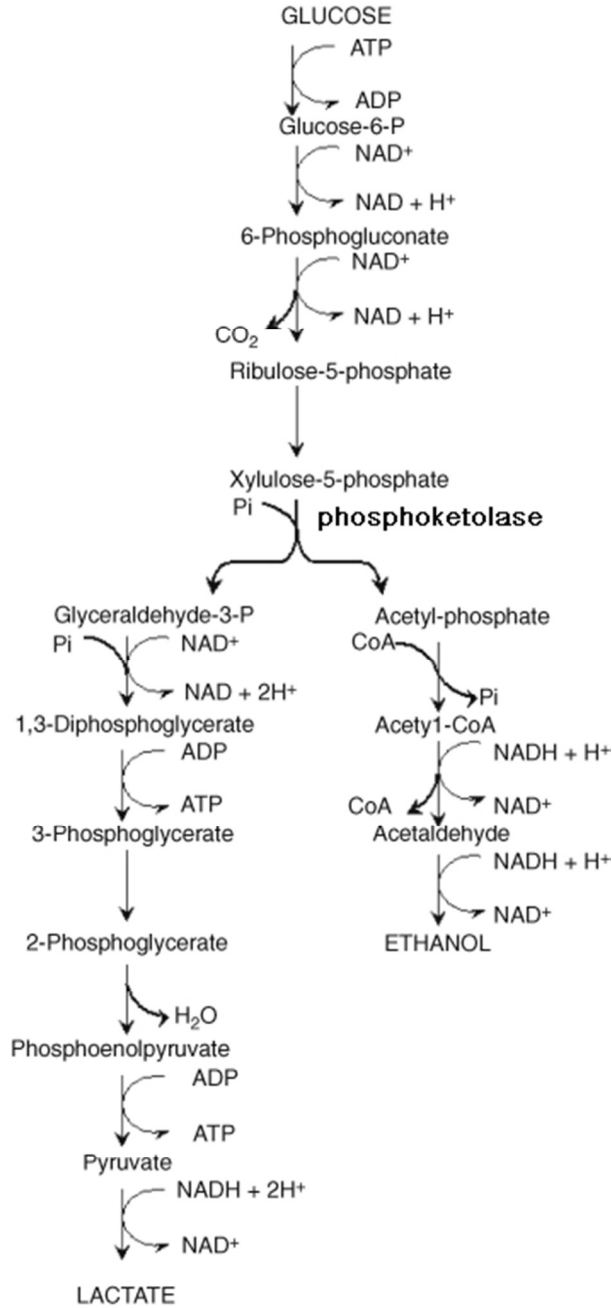
Şekil-1.1: Homofermentatif iz yolu

Heterofermantasyon:

1 Heksoz+1 ADP+Pi→Lactate+Ethanol+CO₂+1 ATP

veya (eksternal e-akseptörü ise)

1 Heksoz+2 ADP+Pi→Lactate+Acetate+CO₂+2 ATP



Şekil-1.2: Heterofermentatif iz yolu

LAB'nin süt ürünleri fermentasyonunda starter kültür olarak kullanımı için uygun bulunması, yüksek oranda alternatif pirüvat metabolizmalarından türemiş

küçük konsantrasyonlardaki uçucu bileşiklerine bağlıdır. Diasetil ve asetoin üretimi de LAB'nde oldukça yaygındır. Bu bileşikler α -asetolaktat sintaz enzimi aracılığıyla pirüvattan elde edilen α -asetolaktatın dekarboksilasyonu ile üretilmektedir. Buna ek olarak, substrat limitasyonunda ve anaerobiyosiste pirüvat-format liyaz enzimi pirüvat ve CoA'dan asetil-CoA üretir. Asetil-CoA NADH'ın oksidasyonunda elektron alıcısı olarak veya ATP eldesi için enerji bileşiği olarak kullanılabildiği için oldukça önemli bir moleküldür. Pirüvat dehidrogenazın enzimatik kompleksi aynı zamanda pirüvat, koenzim A ve NAD⁺'dan asetil-CoA, CO₂ ve NADH üretir. Bu enzim aerobik koşullarda bu lipid sentezi için bir asetil-CoA üreten anabolik enzimdir, ancak anaerobik koşullarda, üretilen fazla NADH'ın rejenerasyonunda NADH oksidazların katabolik fonksiyonunda görev alır. Pirüvat oksiaz pirüvatın asetil-P, CO₂ ve H₂O₂'e dönüşmesinde görev yapar. Bu aktivite karbon kanakları sınırlı olduğu zaman substrat seviyesinde fosforilasyon aracılığı ile ATP eldesinde iş görür (Yebra et al., 2012).

1.1.2.Laktobasillerin fonksiyonel özellikleri

Laktobasiller uygun ortam koşulları sağlandığında faydalı etkiler gösteren bakterilerdir. En iyi etki enterik enfeksiyonlar ve antibiyotik sonrası tedavi aşamalarında gözlenmektedir. IBDE'den (Inflammatory Bowel Disease) korunmada da etkili oldukları bildirilmiştir (Lebeer et al., 2008). Gelişen probiyotik gıda sektöründe insan tüketimi için sunulan gıdalarda LAB'den laktobasiller, ayrıca bifidobakterler ve enterokoklar kullanılabilmektedir.

Genellikle laktobasiller immunostimulatrör (adjuvant) ve immunoregülatör kapasitelerine yönünden araştırılmıştır. Farklı probiyotik laktobasil türlerinin etkileri de farklı olmaktadır. Bu etkiler yüzey molekülleri veya metabolitlerin salgılanma kapasiteleri ve konukçu ile etkileşim durumlarına göre değişiklik göstermektedir. Probiyotik mikroorganizmalarla yapılan moleküler araştırmalar iki temel fikir doğrultusunda yürütülmektedir: Probiyotik suştan en iyi etkinin sağlanabilmesi için ortam koşullarının en iyi şekilde tasarlanması gerekir ki bu da adaptasyon kolaylığı sağlamaktadır. Bir diğer önemli nokta ise kullanılacak suşun

moleküler kriterlerinin iyi belirlenmiş olmasıdır. Probiyotikler için optimal adaptasyonun sağlanması ve sağlığa faydalı etkinin ortaya çıkmasını kolaylaştıracak faktörlerin bir araya getirilmesi gerekmektedir (Lebeer et al., 2008).

İnsan bağırsak sisteminde pek çok türe ait mikroorganizmaların oluşturduğu bir mikrobiyal sistem bulunmaktadır. Burada en yoğun bulunan genuslar *Bacteroides*, *Faecalibacterium* ve *Bifidobacterium*'dur. Laktobasiller çok yoğun oranda bulunmamakla birlikte global bağırsak florasının ve intestinal mukozanın değişik bölgelerindeki etkileşimin dengelenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bu çevrede bazı suşlar sağlığa faydalı etkilerinin bulunması nedeniyle PROBİYOTİK olarak düşünülmektedir. Bunlar, belli sayıda bir araya geldiklerinde sağlık üzerinde yararlı etkiler oluşturan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Yebra et al., 2012). Bu bakteriler gastrik sıvılara dayanıklı olmakta ve safra tuzları varlığında dahi gelişimlerini sürdürebilmektedirler (Bautista-Gallego et al., 2013). Probiyotik suşlar konukçu organizmaya sağladıkları faydalı etkiler nedeniyle önemli mikroorganizmalardır ve bunlar GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsünde yer almaktadırlar. Ancak bu suşların büyük ölçekli endüstriyel üretimler için tüm proses ve depolama süreci boyunca canlılığını koruyabilme özelliğine de sahip olmaları gerekmektedir (Desmond et al., 2004). Fonksiyonel ürünlerde probiyotik suşlara bağlı olarak karşılaşılan problemler genellikle zayıf sıcaklık, tuz ve oksijen toleransı ile ilgilidir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için ortaya atılan yöntemler mikroenkapsülasyon, strese toleranslı suş seçimi, iyi etkileşim içinde olacak besin öğelerinin seçimi ve oksijen geçirgenliği olmayan konteynerlerin kullanılması gibi yöntemlerdir.

Sağlığa faydalı etkilerine bağlı olarak bazı laktobasil türleri süt sanayiinde ve fonksiyonel gıda üretiminde probiyotik olarak kullanılmaktadır. Bu bakteriler fermente süt ürünleri ile sebze ve et ürünleri üretiminde anahtar rolüne sahiptirler (Yebra et al., 2012). GI hastalıkların yanı sıra laktobasiller bakteriyal vajinosisten korunma veya bunun tedavisinde, atopik egzamadan korunmada ve diş çürüklerinden korunmada pozitif etki göstermektedir (Yebra et al., 2012). Antibiyotik tedavisinden sonra intestinal bakterilerin de ortamdan yok olduğu

düşünülürse alerjik semptomların serumda total IgE seviyeleri ile eşlik etmesi olasıdır. Tek suş ile elde edilen probiyotik etkinin iki veya daha fazla suş ile elde edilenden az olduğu bilinmektedir. Sinerjistik suşların total etkileri tek tek uygulanmalarına göre daha büyük olmaktadır (Tsai et al., 2012).

Avrupa Gıda Güvenliği Kuruluşu (EFSA) satış öncesi güvenlik değerlendirmesi için kalifiye güvenlik varsayımları (QPS=Qualified Presumption of Security) adı altında bir sistem belirlemiştir. Bu sistem taksonomik olarak seçilmiş mikroorganizma gruplarına göre oluşturulmuştur ve GRAS statüsünün Avrupa'daki eşdeğeri olarak tanıtılmıştır. Gıdalarla ilişkili olan bazı LAB de QPS statüsünde yer almaktadır. LAB'nin fermentasyon işlemine adaptasyonu, biyosentetik kapasitesi ve spesifik yararlı bileşikler üretme ile metabolik değişkenliği gıda üretimini kolaylaştıran ve nitelikli bir hale getiren bazı önemli özelliklerdir. LAB'nin ürettiği bu bileşikler makronutrientler, mikronutrientler (vitaminler gibi) veya nutrient olmayan maddeler olabilir. LAB'nin vitamin üretimi bilimsel çevrelerce son yıllarda artan ilginin odağı haline gelmiştir. Nutrasötikler üreten LAB ile fermente gıda üretimi son yıllarda yaygınlaşan bir stratejidir. LAB biyosentezine bağlı olarak bazı fermente süt ürünlerinde B grubu vitaminlerinin yüksek seviyelerde olduğu görülmektedir. *L.lactis* ve *S.thermophilus* gibi endüstriyel öneme sahip pek çok LAB folat (vitamin B11) sentezleme yeteneğine sahiptir ve yoğurt starter kültürleri aracılığıyla gerçekleşen folat biyosentezi, üründeki doğal folat seviyesini artırmaktadır. Riboflavin (B2 vitamini) biyosentezinde görev alan genler süt ve tahıl bazlı ürünlerdeki bazı LAB türlerinde tespit edilmiştir. Kobalamin (B12 vitamini) de probiyotik *L.reuteri* suşları tarafından sentezlenen bir başka vitamindir (Capozzi et al., 2012).

□-aminobütirik asit (GABA) antihipertansif, diüretik ve sakinleştirici etkisi gibi fonksiyonel özellikleri nedeniyle önemlidir. *L.brevis* (kimuchi'den izole edilmiştir) ve *L.lactis* (peynirden izole edilmiştir) gibi GABA üreten bazı LAB de bilinmektedir (Wu et al., 2012).

Probiyotik bakteriler ve konjuge linoleik asit (CLA) içeriği geliştirilmiş fonksiyonel gıdalar son yıllarda ilgi odağı haline gelmiştir. CLA linoleik asitin konjuge pozisyonel ve geometrik izomerlerinin karışımıdır ve linoleik asitin

Butyrivibrio fibrisolvens, *L.acidophilus* ve *Propiyonibacterium freudenreichii* subsp.*shermanii* aracılığıyla biyohidrojenasyona uğraması sonucunda oluşmaktadır. CLA'nın besleyici değeri in vitro ve hayvan denemelerinde araştırılmıştır. Hayvan deneme modelinde CLA'nın dominant izomeri olan *cis*-9,*trans*-11-oktadekadienoik asitin antikarsinojen özellik gösterdiği bildirilmiştir. Bir diğer izomer *trans*-10,*cis*-12-oktadekadienoik asit ise farelerde vücut yağını azaltıcı etki göstermiştir. CLA'nın diğer faydalı etkileri antiaterojenik ajan, antidiyabetik ajan, immun sistem modülatörü ve vücut ağırlığını koruyucu özelliğidir. Bir araştırmada laktik kültürlerin steril yağsız süte linoleik asit eklenmesi sonucunda oluşturduları CLA miktarlarına bakıldığı zaman *L. acidophilus*'un maksimum düzeyde CLA ürettiği gözlenmiştir (Xu et al., 2005).

Günümüzde beslenme ve sağlık konularında tüketicilerin bilinçlenmesi ile alışlagelmişin dışında faydalı gıdalara ilgi artmaktadır (Moncheva et al., 2001). Fermantasyonda ham materyal mikroorganizmalar tarafından kabul edilebilir kalitede gıdalara dönüştürülmektedir. Yoğurt gibi geleneksel ürünlerde starter kültür tarafından üretilen laktik asit ürünü patojen bakterilerden korumak amacıyla üretilmektedir. Gıda fermentasyonları büyük ekonomik değeri olan ve insan sağlığını geliştirici ürünlerin üretilmesine katkıda bulunmaktadır (Soomro et al., 2002).

Fonksiyonel gıdalar, nutrasötikler, ilaç içerikli gıdalar ve geliştirilmiş gıdalar; hastalıklardan koruyucu veya hastalıkları tedavi edici özellikteki gıdalar anlamında kullanılmaktadır. Ancak pek çok kişiye göre her gıda protein, enerji, lif veya mikronutrientleri içermesi nedeniyle fonksiyoneldir. Bu yaklaşım yanlıştır. Çünkü bir gıdanın fonksiyonel adını alabilmesi için normal sağlık için gerekli olan bileşenlerin dışında ve daha fazla fayda sağlayan bileşikler içermesi gerekmektedir. Son zamanlarda "vitafoods" terimi sıklıkla duyulmaktadır. Bu terim, zindelik için gıda anlamını taşımaktadır. Bunlar modern, sağlıklı yaşamı önemseyen tüketicilere yönelik hazılanan ve fiziksel veya zihinsel olarak yaşam kalitesini artıran yiyecek ve içeceklere verilen genel bir isimdir (Moncheva et al., 2001).

Fonksiyonel bir gıdada bulunması gereken özellikler:

- Doğal besin öğelerinden türemiş olmalı, kapsül veya toz formunda değil, gıda halinde bulunmalıdır.
- Günlük beslenme programına uygun olarak gün içerisinde rahatlıkla tüketilebilmelidir.
- Sindirildikleri zaman biyolojik savunma mekanizmasını geliştirmek, spesifik hastalıklardan korumak, fiziksel veya mental koşulları kontrol etmek veya yaşlanma karşıtı etki göstermek gibi özel bir fonksiyonları olmalıdır (Moncheva et al., 2001).

Probiyotikler fonksiyonel gıdalar içerisinde önemli bir bölümü oluştururlar. Probiyotik terimi genellikle iki organizmanın birarada kültüre edilmesi ve böylelikle biri tarafından üretilen maddelerin diğerinin gelişmesini teşvik etmesi şeklinde düşünülmektedir. Bu büyüme düzenleyici maddelere de probiyotik denilmektedir. Probiyotik ürünler genellikle süt endüstrisinde uzun zamandır kullanılmalarından ve insan bağırsak sisteminde doğal olarak bulunmalarından dolayı laktobasillerin bağırsakta yer alan türleri ile ilişkilidir. Bunun yanı sıra bifidobakterler de bağırsak sisteminde doğal olarak var oldukları keşfedildikten sonra probiyotik ürünlerde kullanılmaya başlanmıştır. Probiyotiklerden beklenen en önemli rol, intestinal ekosistemde enfeksiyonlardan korunma veya hastalıkları önleme gibi faydalı etkileridir. İnsan sağlığı açısından istenen etkiler ise patojenlerle savaş, anti alerjik etkiler ve diğer immün sistem etkileridir. Probiyotik suşların faydalı etkileri:

- Geliştirilmiş laktoz toleransı
- İntestinal floradaki olumlu etkileri
- Antibiyotik tedavisi sonrasında normal intestinal floranın yeniden kazandırılması
- Gastrointestinal enfeksiyonlara karşı koruma
- *H.pylori* gelişiminin azaltılması
- İmmün sistemin geliştirilmesi
- İltihaplı reaksiyonların azaltılması
- Kolesterolün düşürülmesi

- Anti-karsinojenik etki
- Anti-allerjik etki
- Anti-karyojenik etki
- Kabızlığın giderilmesi
- Mineral emiliminin geliştirilmesi
- Vitamin sentezi
- Antioksidan aktivitesi

Probiyotik bakteri seçerken dikkat edilecek kriterler;

- Mutlaka insan orijinli olmalıdır,
- Patojenik özellik göstermemelidir,
- Teknolojik proseslerde dayanıklı olmalı, canlılığını korumalıdır,
- Gastrik asit ve safra tuzlarına karşı dirençli olmalıdır,
- Bağırsak epitel dokusuna tutunabilmelidir,
- Kısa süreli dahi olsa gastrointestinal sistemde kalabilmelidir,
- Antimikrobiyal maddeler üretebilmelidir,
- İmmun yanıtı modüle edebilmelidir,
- Kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi ve vitamin üretimi gibi metabolik aktiviteleri etkileme gücü olmalıdır.

LAB probiyotik bakterilerin başında yer almaktadır. Bunların gıdalarda kullanımı endüstriyel olarak bunların temin edilebilirliklerine ve hazırlanmış üründe canlılıklarını ne kadar koruyabileceklerine bağlı olarak değişmektedir. Teknolojik kriterler:

- Pahalı olmayan bir ortamda yüksek hücre yoğunluğuna hızlıca ulaşabilmesi gerekir,
- Kültür konsantrasyonu, dondurma, kuru dondurma gibi işlemlere karşı dayanıklı olmalıdır (Moncheva et al., 2001).

Fonksiyonel gıdalar probiyotiklere ek olarak konukçu organizmanın GI mikroflorasında sağlık açısından faydalı belirli değişikliklerin oluşumuna katkı sağlayan fermente bileşenler olarak bilinen prebiyotikleri de içermektedir (Yebra et al., 2012). "Prebiyotikler" GI mikroflora aktivitesinde veya kompozisyonunda

spesifik değişimlere neden olan ve böylelikle konukçu organizmada sağlığa faydalı etkiler oluşturan özel fermente bileşenler olarak tanımlanmaktadır. Bu faydalı etkilerin ortaya çıkabilmesi için prebiyotiklerin de bazı kriterlere sahip olması gerekmektedir. Üst bağırsak sindirimine dayanıklı olmalı, gıda üretim ve depolama aşamalarında stabil kalabilmeli ve bağırsak mikroorganizmaları tarafından fermente edilebilmelidir (Wang et al., 2009). İnülin ve oligofruktoz gıda endüstrisinde, özellikle de süt sanayiinde en çok kullanılan prebiyotik kaynaklarıdır. Probiyotik ve prebiyotikleri birlikte içeren gıdalara "sinbiyotikler" adı verilir. Fermente süt, yoğurt, meyve suyu, peynir, dondurma gibi ürünler sinbiyotikler olarak üretilebilmektedir (Lin, 2012).

İnsanlarda laktobasillerin yararlı birkaç etkisi belirtilmiştir (Yebra et al., 2012). LAB'nin bazı suşları makrofajlar ve dendritik hücreler gibi immunokompetent hücreler aracılığıyla interleukin-12 (IL-12) (p70), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve IL-10 gibi sitokinlerin üretilmesini teşvik etmektedir. Bağışıklığı teşvik edici aktivitelerinin karakteristikleri ve yoğunluğu aynı türe ait farklı suşlarda dahi farklılık gösterebilmekte ve istenen probiyotik özelliklerin tespiti ve uygulamada kullanılabilmesi için geniş çaplı taramaların yapılması gerekmektedir (Sashihara et al., 2007).

IL-12 (p70) T hücelerinin Th1 hücrelerine dönüşümünü teşvik ederken, probiyotik laktobasillerin anti alerjik etkilerinin araştırılmasında önemli bir veri olarak kullanılabilir. LAB'nin de içinde bulunduğu gram pozitif bakterilerdeki peptidoglukan ve lipoteikoik asit gibi hücre bileşenlerinin IL-12 (p70) üretimini teşvik ettikleri bilinmektedir. Daha önce de belirtildiği üzere hücrelerdeki değişen peptidoglukan miktarı IL-12 (p70)'in suşa bağlı üretiminin teşvik edilmesinden sorumludur. Bu bileşenler STAT sinyal yolunu immunokompetent hücrelerin yüzeyinde ekspres edilen Toll benzeri reseptörler aracılığı ile aktive etmektedir. Bu da nükleer faktör kappanın transkripsiyonunu teşvik eder ve IL-12 ve TNF- α gibi çeşitli sitokinlerin üretilmesine neden olur (Sashihara et al., 2007).

Mikroorganizmalar genellikle N-asetilmuramidaz, N-asetilglukozamidaz, N-asetilmuramil-L-alanin amidaz ve peptidazlar gibi otolisinleri (autolysins)

 retilirler. Enzimler hücre duvarı içinde yer alır ve sadece sitoplazmik maddeler ile enzimleri dışarı salmakla kalmaz, aynı zamanda fermente gıdaların aroma bileşiklerini de olu turular. Ancak büyüme fazında peptidoglukan degradasyonu yoluyla hücre proliferasyonuna da sebep olurlar (Sashihara et al., 2007).

1.1.2.1.Probiyotik olarak laktik asit bakterileri

Probiyotiklerin kullanılması BAKTER YOTERAP  olarak adlandır labilmektedir. İnsan GI sistemindeki faydalı bakteri oranı %85 ve zararlı olanların oranı ise %15 olduğunda optimum sağlık koşulları sağlanmış olur. Bu da ağızda ba lar. İki türdeki bakteriler arasındaki dengenin sağlanması doğal bir döngü iken biyoteknoloji ile bu döngü faydalı bakteriler yararına de i tirilebilmektedir.

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar;

- *Lactobacillus acidophilus*
- *L.casei*
- *L.casei* subsp.*rhamnosus*
- *L.delbrueckii* subsp.*bulgaricus*
- *L.fermentum*
- *L.reuteri*
- *Lactococcus lactis* subsp.*lactis*
- *L.lactis* subsp.*cremoris*
- *Bifidobacterium bifidum*
- *B.infantis*
- *B.longum*
- *B.adolescentis*
- *B.breve*
- *Streptococcus salivaris* subsp.*thermophilus*
- *Enterococcus faecalis*
- *E.faecium*
- *Saccharomyces boulardii* (Soomro et al., 2002).

İnsan probiyotiği olarak kullanılan suşlar;

Obligat homofermentatifler

- *L.acid.A1*
- *L.crispatusA2*
- *L.amylovarusA3*
- *L.gallinarumA4*
- *L.gasseriB1*
- *L.johnsoniiB2*
- *L.helveticus*
- *L.delbrueckii subsp.bulgaricus*
- *L.salivarius subsp.salivarius*

Fakültatif heterofermentatifler

- *L.casei*
- *L. paracasei subsp.paracasei*
- *L. paracasei subsp. tolerans*
- *L.plantarum*
- *L.rhamnosus*

Obligat heterofermentatifler

- *L.fermentum*
- *L.reuteri*'dir (Sanders et al., 2001).

Laktobasilleri de içeren bir probiyotik karışımlar ülseratif kolit gibi bağırsak hastalıklarının daha hafif geçirilmesine ve semptomların azalmasına neden olmaktadır. *L.rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* B12 ve oligofruktoz ile zenginleştirilmiş inülinin birarada bulunduğu sinbiyotik bir fonksiyonel gıdanın bazı kolon kanserli hastalarda kolorektal kanser markerlarını değiştirdiği gözlenmiştir (Yebra et al., 2002). *Lactobacillus rhamnosus*, *L.acidophilus* ve *L.bulgaricus* tek başlarına veya çeşitli kombinasyonlar halinde GI sistemde bulunduklarında akut diyare riskinin azaldığı ve antibiyotikle birleşmiş diyarenin önlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Yebra et al., 2002). Pek çok LAB'nin son ürünü sadece gıdadaki mikrobiyal kalitenin artırılması ile değil, üründeki

canlı probiyotik preparasyon ile antitümör etkisinin sağlanması ile de sağlığa katkıda bulunmaktadır (Soomro et al., 2002).

Probiyotik bakterilerin sağlığı korumadaki etkileri temelde üç mekanizmaya bağlıdır:

A.Mikroorganizma-mikroorganizma etkileşimleri (Lebeer et al., 2008)

Probiyotikler konukçu oldukları organizmaya besin öğeleri için rekabet, antimikrobiyal bileşiklerin üretimi (laktik asit, bakteriyosinler, H_2O_2 gibi), konukçu epitel yüzeylerinde tutunma için patojenlerle rekabet etme ve bakteri hücresi ile konukçu hücresi arası iletişim ile mikroçevrenin modifiye edilmesi yoluyla faydalı etkiler sağlamaktadır. Probiyotiklerin bağırsak epiteli ile etkileşiminde probiyotik etkinin gösterileceği hedef doku özellikle laktobasiller tarafından epitel hücrelerin bariyer ve metabolik fonksiyonlarını etkileyerek modifiye edilmektedir. Epitel bariyerinin probiyotik laktobasillerce korunması laktobasillerin ilgili bölgeye sıkıca bağlanmaları sonucunda mukus salgısının artması, sitoprotektif ısı şok proteinlerinin regülasyonu ve epitel hücrelerin apoptosisinin engellenmesi yoluyla gelişmektedir (Yebra et al., 2002).

1. Besin öğeleri için rekabet
2. Antimikrobiyal maddelerin üretimi
 - i. Laktik asit
 - ii. Bakteriyosinler
 - iii. H_2O_2
3. Yer değiştirme teorisi
4. Bakteriyel hücre-hücre iletişimi
 - i. Türler arası iletişim
 - ii. Tür içi iletişim
 - iii. Alemler arası iletişim

B.Bağırsak epiteli ile faydalı etkileşim

1. Metabolik etkileşimler
2. Epitel bariyer fonksiyonunun korunması
 - i. Hücre yüzey faktörleri
 - ii. Salgılanan proteinler
 - iii. Çözünebilen proteinler
 - iv. Metillenmemiş CpG DNA

- v. Çeşitli probiyotik özellikler ve çeşitli sinyal yolları
- 3. İmmunomodülatör etkileşimler
 - a. Değişik hücre tiplerinin biraraya gelmesi
 - i. Laktobasilerin makrofajlara spesifik etkisi
 - ii. Laktobasilerin DC'lere spesifik etkisi
 - iii. Laktobasilerin regülatör T hücrelerine spesifik etkisi
 - b. PRR (pattern recognition receptors)'ler
 - i. TLR ve NLR sinyalleme
 - ii. DC-SIGN sinyalleme
 - c. PRR'ler için *Lactobacillus* ligandları
 - i. LTA
 - ii. Hücre yüzey proteinleri
 - iii. EPS'ler
 - iv. PG
 - v. Metillenmemiş CpG DNA
- C. İmmunomodülatör etkileşimler (Lebeer et al., 2008)

LAB'nin çok uzun yıllardan beri kullanılmasının verdiği güven ile sağlığa faydalı etkilerinin keşfedilmesi bir araya gelince probiyotik LAB önemli bir alternatif haline gelmiştir. Kurutma, dondurarak kurutma, soğukta depolama, modifiye atmosferde depolama ve sıcaklık uygulamaları fiziksel gıda koruma yöntemlerindendir. Asetik, laktik, propiyonik, sorbik ve benzoik asit gibi organik asitler de gıda katkıları olarak koruma amaçlı kullanılabilir. Sorbik ve benzoik asitin başta antifungal aktivite olmak üzere geniş spektrumlu aktivitesi bulunmaktadır. Natamisin ise *Streptomyces natalensis* tarafından üretilen ve genellikle sert peynirlerin yüzeylerinde kullanılan maya ve küfe karşı etki gösteren bir antibiyotiktir (Yebra et al., 2002).

LAB asidofiluslu süt, yayıkaltı ayranı, sert ve yumuşak peynirler, yoğurt gibi ürünlerde starter kültür olarak veya canlı mikrobiyal katkıları olarak kullanılmaktadır (Magnusson, J., 2003).

GI sistemde bazı laktobasiller mikrobiyal popülasyonun dengelenmesinde antagonistik bileşikleri sentezleyerek patojenlerin çoğalmasını engellemek yoluyla

önemli katkıda bulunurlar (Yebra et al., 2002). Probiyotik bakteriler çeşitli antimikrobiyal maddeler üreterek bağırsağın bütününde faydalı etkilerin sağlanmasında rol oynarlar. Bu maddeler genellikle düşük molekül ağırlığına sahip asitler, alkoller, CO₂, diasetil, H₂O₂ ve diğer metabolitlerdir. Bu metabolitler bakteriyosin, siderofor ve benzoik asittir. Bu bileşikler patojenler de dahil olmak üzere pek çok mikroorganizma üzerinde etki göstermektedir (Nitisinprasert et al., 2000).

L.helveticus, *L.acidophilus* ve *L.gasseri*'nin probiyotik potansiyellerinin ve terapötik etkili madde üretiminin yanı sıra damar daralmasına neden olan polipeptitlerden olan anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitör aktivitesi bulunan biyoaktif peptitler üretme potansiyeline sahip oldukları bildirilmiştir (Turková et al., 2012).

Bir araştırmada laktobasil ve bifidobakterlerin klinik çalışmalar ve hayvan denemeleri sonuçlarına göre doğuştan var olan ve sonradan edinilen immün yanıtı destekledikleri bildirilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmada ağızdan alınan *Lactobacillus rhamnosus*GG (LGG) ve *L.gasseri* TMC0356'nın grip enfekteli fare modeli üzerinde solunum enfeksiyonlarına karşı etkileri incelenmiştir. Deney hayvanlarının bu bakterileri ağızdan alımını takiben akciğerlerindeki virüs sayısı azalmıştır (Kawase et al., 2010). Uzun süre LGG lave edilmiş süt tüketen çocuklarda solunum yolu enfeksiyonlarına yakalanma oranı %17 daha azdır (Hatakka et al., 2001).

Helicobacter pylori spiral yapıda, gram-negatif ve flagellalı bir bakteridir. Bu bakteri midedeki amonyum ve CO₂'i katalizleyen güçlü bir üreaz salgılamaktadır. *H.pylori* fazla asidik koşullarda amonyum üretiminden dolayı canlılığını sürdürebilmektedir. Bu bakteri insan midesini enfekte etmekte ve kronik enflamasyonlar ile ülsera neden olmaktadır. *H. pylori* aynı zamanda mide kanseri için de önemli bir risk faktörüdür. Probiyotikler *H.pylori* enfeksiyonlarında antibiyotik tedavilerine göre güvenli ve basit alternatifler olarak düşünülmektedir. Aynı zamanda laktik asitin de *H.pylori* gelişimini in vitro koşullarda inhibe ettiği bildirilmiştir (Kimura, 2004). Ağızdan alınan laktobasillerin *H.pylori*'yi tamamen ortadan kaldırdığı kanıtlanmıştır (Aiba et al.,

1998). *Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21); gastrik sıvıya dayanıklılık, asidik koşullarda proliferasyon gerçekleştirebilme, gastrik epitel hücrelere adezyon ve ön fermentasyon sırasında *H.pylori*'yi baskılayabilme açısından *H.pylori* enfeksiyonlarının önlenmesinde uygun bir bakteri olarak kabul edilmiştir. Üç laktobasil suşu: LG21, *Lactobacillus salivarius* WB1004 ve *Lactobacillus gasseri* No.6 *H.pylori* gelişimini ön fermentasyonda tamamen baskılamıştır. LG21'içeren yoğurt tüketimi sonucunda GI hastalıklara neden olan *H.pylori*'nin etkilerinin azaldığı tespit edilmiştir (Kimura, 2004).

1.1.2.2.Laktik asit üretimi

Laktik asit fermente gıdalarda düşük pH oluşturması, gıda patojenlerinin inhibisyonunu sağlaması ve gıdaya aroma katması açılarından uzun zamandır gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Laktik asit gıda, ilaç, tekstil, deri ve kimya endüstrilerinde özel ticari bir yere sahip olması nedeniyle önemli bir organik asittir (John et al., 2010). Gıda katkı maddesi olarak kullanılan laktik asit GRAS statüsünde yer almaktadır (Yu et al., 2008). Laktik asit üretiminin artırılması amacıyla pek çok araştırma yapılmakta ve en ekonomik ve etkili üretim sistemi geliştirilmeye çalışılmaktadır (John et al., 2010). Geleneksel uygulamalar dışında laktik asit doğaya dost ve biyodegrade olabilen bir plastik olan polilaktik asit (PLA) gibi organik kimyasalların hammaddesini oluşturmasından dolayı da önem kazanmaktadır (Wang et al., 2007; John et al., 2007a; 2007b; 2007c). PLA gıda paketleme, tarımsal plastik tabakaların üretimi ve çöp torbalarının üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Yu et al., 2008).

Laktik asit şarap yapımında pH kontrolünde kullanılmaktadır. Süt endüstrisinde de peynir üretiminde; kalsiyum, sodyum, çinko, potasyum, demir vs. tuzları ile birlikte ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde de kullanım alanı bulmaktadır. Propiyonik asit, asetik asit, akrilik asit vs. gibi değişik organik asitler için hammadde olarak kullanılmaktadır. Teknik seviyedeki laktik asit deri sanayiinde de tabaklamada, polilaktikasitin üretilmesinde öncü molekül olmasından dolayı önemlidir. Kimyasal sentezle sadece rasemik karışımı elde

edilebilmektedir. Fermentasyonla ise biyolojik olarak aktif L+ veya D- veya DL laktik asit üretilmektedir (Charteris et al., 2001).

Laktobasiller genellikle optimal koşullar altında büyüme ve laktik asit üretme yeteneğine sahip optimal bakterilerdir (John et al., 2008a). Laktik asit petrokimya artıklarının kimyasal hidrolizi veya fermentasyonun biyoteknolojik metodlarla uygulanması yoluyla sentezlenebilmektedir. Laktik asitin biyoteknolojik üretiminin kimyasal senteze göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar; düşük substrat maliyeti, düşük üretim sıcaklıkları ve enerji tasarrufunun sağlanmasıdır. Laktik asit üretebilen en önemli endüstriyel mikroorganizmalar *Lactobacillus* ve *Rhizopus*'tur (Tanaka et al., 2001). *Lactobacillus* grubu bakteriler yüksek üretim kapasiteleri, hızlı üreme yetenekleri, laktik asiti L- ve D-optik izomerlerinin seçimi ve genetik mühendisliği yaklaşımlarının uygulanabilirliği açılarından endüstriyel laktik asit üretimi için oldukça uygun bakterilerdir (John et al., 2008a; Tanaka et al., 2001).

Tüm laktik asit fermentasyon yöntemleri içerisinde bakteriyel üretim en fazla kullanılan yöntemdir. Bu da laktik asit üreten bakterilerin biyoteknolojik ve biyokimyasal yöntemlere optimize edilmesini gerektirmektedir. İlk uygulanan biyoteknolojik denemeler laktik asit üreticilerinin üretim kapasiteleri ve ürün miktarının artırılması amacıyla genetik olarak modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmekteydi. Bunun için klasik suş geliştirme yöntemlerinden olan etil metil sülfonat, MNNG/NTG (*N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidin), UV radyasyon uygulamaları ve sekans elemanlarının eklenmesinden faydalanılmıştır (Hotchkiss et al., 1980).

Laktik asit fermentasyonu ürün inhibisyonlu biyokonversiyona tipik bir örnektir. Çözünmemiş formdaki laktik asit birikimi hücre gelişimini ve üretimini inhibe etmektedir. $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , NaOH veya NH_4OH eklenmesi laktik asiti nötralize etmekte ve endüstriyel üretimde çözünmemiş laktik asit birikiminden kaynaklanan olumsuz etkilerin minimal hale getirilmesinde katkı sağlamaktadır. Ancak fermentasyon sırasında laktik asitin nötralize edilmesi nötralize edici katyonların eklenmesi ve çözünmemiş laktik asitin oluşan tuzlarından rejenere

edilmesi amacıyla bazı ek işlemlere gerek duyulacağı için dezavantaj oluşturmaktadır (Wang et al., 2007).

LAB'nin esas metaboliti laktik asittir ve bu da LAB'nin büyüme ortamlarının pH değişimlerinden sorumludur. Zayıf asitin çözünmeyen formu intraselüler pH'a bağlı olarak hücre membranından difüze olur, hücre içinde çözünür ve H⁺ iyonları salarak sitoplazmayı aside eder. pH etkisinden başka moleküllerin çözünmemiş hali bakteriyosize neden olan elektrokimyasal proton yıkılması seviyesinde antimikrobiyal etkiye aracı olur. Etki daha çok asit çözünmemiş durumda iken ve asitin pKa değerinin altında gerçekleşmektedir.

Heterofermentatif LAB fazla miktarda asetik ve çok az miktarda da propiyonik asit üretir. Her iki asitin de pKa değerleri belli pH'ta çözünmemiş asit oranı yüksek olduğu için laktik asite göre yüksektir. Laktik asite benzer şekilde asetik ve propiyonik asit hücre membranı ile etkileşime girerek elektrokimyasal proton seviyesini nötralize eder. Propiyonik asit fungal gelişimi önlerken, asetik asit amino asit alımını engeller. MRS'deki sodyum asetatın da böyle bir etkisi vardır (Magnusson, 2003).

L- ve D- laktik asit üretiminden sorumlu enzimler NAD'a bağımlı L-laktat dehidrogenaz (L-nLDHs) ve NAD'a bağımlı D-laktat dehidrogenaz (D-nLDHs)'dir ve bunlar sırasıyla *IdhL* ve *IdhD* aracılığı ile kodlanmaktadır. L-laktik asiti D-laktik asite dönüştüren laktat rasemaz sadece birkaç DL-tipi laktobasilde tespit edilmiştir (*L.curvatus*, *L.paracasei*, *L.plantarum* WCFSI ve *L.sakei* 23k) (Zheng et al., 2012a).

Pek çok LAB tarafından üretilen laktik asit L-laktat ve D-laktat izomerlerinin rasemik bir karışımıdır. D-laktat insanlar tarafından metabolize edilmezken, L-laktat gıda biyoteknoloji uygulamalarında, ilaç ve biyopolimer endüstrilerinde kullanılan en önemli izomerdir. LAB suşlarının bir veya birkaç *ldh* geninden etkilenmiş olarak elde edilmeye çalışıldığı pek çok araştırma bulunmaktadır, böylelikle fermentasyonda rasemik olmayan laktik asit üretimi sağlanmaya çalışılmaktadır. Örneğin *L.casei* BL23 suşu genetik, fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. LDL aktivitesiyle ilgili

proteinleri kodlayan beş gen belirlenmiştir. Bu genlerin mutant suşları bu bakterideki L- ve D-laktat formasyonundaki her *ldh* geninin geliştiğini göstermiştir. *ldh1* geni L-laktatın esas sentezinden sorumlu olan L-LDH'ı, *hicD* ise D-laktatın esas sentezinden sorumlu olan dihidroksiizokaproat dehidrogenazı (dihydroxyisocaproate) kodlar. Ayrıca Patnaik et al. (2002); Yasuda et al. (2008) ve John et al. (2008a)'a göre laktik asit üretimi klasik suş geliştirme metodları ile tüm genom yaklaşımının birarada kullanılması sonucunda da artırılabilmiştir (Yebra et al., 2012).

1.1.2.3.Diğer son ürünler

Pek çok LAB oksijen varlığında üretilmesini sağlayan flavoprotein oksidaz üretir (ve NADH peroksidaz). H_2O_2 , LAB katalaz üretmiyorsa, aerobik koşullarda ortamda birikir. Bu madde bakteriler üzerinde okside edici özellik gösterir ve hücrenin temel yapısını bozarak işlev görür. Ancak H_2O_2 'in varlığı inhibisyon sebebi değildir; süt, tükürük gibi doğal ortamlarda bulunan laktoperoksidaz ve tiyosiyanat etki göstermesine neden olmaktadır. Laktoperoksidaz-tiyosiyanat-peroksidaz sistemi H_2O_2 ve tiyosiyanatın laktoperoksidaz ile katalizlenerek reaksiyona girmesine neden olur. Ara ürün olarak açığa çıkan hipotiyosiyanat mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Bu sistem sütte bulunduğu için LAB süte eklendiği zaman H_2O_2 de eklenmektedir (Magnusson, 2003).

Diasetil ve asetoin fermente gıdalarda gıda katkı maddesi olarak kullanılan yağimsı aroma veren bileşenlerdendir (Yebra et al., 2012). LAB'nin tüm generaları sitrat fermentasyonu ile diasetil (2,3-bütandiyol) üretir (Magnusson, 2003). Fermentasyonla diasetil ve asetoin üretimi için pek çok metabolik mühendisliği yaklaşımı LAB'den *L.lactis* modelinde geliştirilmiştir (Yebra et al., 2012).

Mannitol ve sorbitol tatlandırıcı etkilerinden ve düşük kalorileri içeriklerinden dolayı gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Doğada bazı bitkilerde bulunan mannitol ve bazı meyve ve sebzelerde bulunan sorbitol aynı zamanda bakteri ve mayalar tarafından da üretilmektedir. Pek çok şeker alkolünün

endüstriyel olarak eldesi oldukça karmaşık ve zahmetli prosesler gerektirmektedir. Biyoteknolojik yöntemlerle bu maddelerin mikroorganizmalar aracılığıyla elde edilmesi ekonomik kazanımlar sağlamaktadır (Yebra et al., 2012).

Ekzopolisakkaritler (EPS) süt endüstrisinde önemli yere sahip polisakkaritlerdir. Fermente gıdaların yapısının geliştirilmesinde önemli rol oynarlar. Aynı zamanda fonksiyonel gıdalar için gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. GI sistemde prebiyotik gibi davrandıkları ve immun sistemi güçlendirdikleri de belirtilmiştir (Yebra et al., 2012). LAB tarafından üretilen ekzopolisakkaritler yer değiştiren stabilizerler olma olasılığına sahiptirler. Yapılan araştırmalarda EPS biyosentezinin potansiyel kontrol faktörünün polimer yapılandırmada gerekli olan şeker nükleotidlerinin kullanılabilirliğine bağlı olduğu belirtilmiştir (Welman et al., 2003).

1.1.3. *Lactobacillus gasseri*

LAB'nden *L.acidophilus* ticari süt ürünlerinde katkı olarak kullanılmakta ve bu bakterilerin gıdalar ile alınması insan sağlığı açısından faydalı etkiler ortaya çıkarmaktadır (Honda et al., 2012). *L.acidophilus* NCFM pek çok amino asiti, vitamini, kofaktörü sentezleyebilen ve çok sayıda transport sistemi ile amino asitler, peptitler ile peptidaz ve proteaz kodlayan genler için rekabet edebilme özelliği gösterebilen bakterilerdir. Ayrıca *L.acidophilus* genomu rafinoz, fruktooligoakkaritler (FOS) gibi mono-, di- ve polisakkaritleri içeren çeşitli şekerleri kullanabilme özelliğini gösteren karbonhidrat transportu ve mekanizması ile ilgili bir dizi proteini kodlamaktadır. Pek çok araştırmacıya göre bu suşun basit şekerlerin yanı sıra kompleks karbonhidratları da degrade etmesi bağırsağın alt kısımlarında varlığını sürdürebilmesi için adaptasyonunun bir göstergesi olmaktadır (Lebeer et al., 2008).

Genellikle insan bağırsağında bulunan *L.gasseri* ve *L.acidophilus* grubu 16S rRNA sekans homolojisine ve hücre duvarı kompozisyonuna dayanılarak 6 alt gruba ayrılmıştır. Pek çok *Lactobacillus acidophilus* bakteriyosin üretme kapasitesine sahiptir ve laktasin F, laktobin A, amilovorin L471, asidosin B,

gasserisin A ve gasserisin T olarak bilinen bu bakteriyosinler benzer primer sekanslara sahiptir. Lantibiyotikler (lantiyonin gibi modifiye amino asit kalıntıları içeren bakteriyosinler) veya aynı yapıdaki bakteriyosinler LAB'nin *L.acidophilus* grubunda tespit edilmemiştir (Kawai et al., 2001). *L.gasseri* insan GI sisteminde bulunan *L.acidophilus* grubunun B1 alt grubunda yer alan majör homofermentatif bakteridir. *L.gasseri* ATCC33323'ün genomik DNA'sının tam sekansı US DOE Joint Genome Institute'de (JGI) Genom Projesi ile belirlenmiştir (Honda et al., 2012).

Seçilmiş laktobasillerin genom sekanslaması ile bu bakterilerin karakteristikleri hakkında geniş bilgiye sahip olunmuştur. 2006 yılında *L.gasseri* ATCC 33323'ün genomu sekanslanmış ve pek çok laktobasilin genomu da açığa çıkmıştır (Oh et al., 2005). *L.gasseri* hakkında elde edilen bilgiler ışığında karbonhidrat alımı ve metabolizması ile ilgili bir dizi genin bulunduğu söylenebilmektedir. Bir araştırmada *L.gasseri* ATCC 33323'in tek PTS taşıyıcı fonksiyonelliği gen yıkımları, biyoinformatik, tamamlayıcı karbonhidrat kullanımı denemeleri ve transkript ekspresyon profilleri kullanılarak karakterize edilmeye çalışılmıştır. *L.gasseri* ATCC 33323 ve *L.gasseri* ATCC 33323 EI (D-glikoz ve D-maltoz) her iki suşu tarafından da kullanılan karbonhidrat hücre içine PTS olmayan bir mekanizma ile taşınabilmektedir. *L.gasseri* genomu kabul edilebilen sınırlı glikoz spesifitesine sahip iki permeaz kodlamaktadır. *L.gasseri*'deki PTS taşıyıcılarının önemi doğal tiplerde karbonhidrattan faydalanma profillerine dayalıdır. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda *L.acidophilus*, *L.gaseri* ve *L.johnsonii*'nin taranan 13 türe göre daha fazla PTS taşıyıcıya sahip olduğu gözlenmiştir. Bu da GI sistemde daha fazla canlı kalabilmek için ortaya çıkan bir durumdur (Franci et al., 2010). *L.gasseri*'nin fonksiyonel genomik düzeyindeki karakterizasyonu iyi yapılmıştır ve genetik manipülasyon için uygulanabilecek yöntemler mevcuttur (Stoecker et al., 2011).

Bakteriyosinler antibiyotiklerin değişik türleridir. Zararlı bakterilerde mutasyon ile direnç oluşturmaz ve toksik değildirler. İntestinal enzimlere yüksek oranda dayanıklıdır ve zararlı bakteriler ile *Candida* türlerini inhibe etme özellikleri vardır. Kolon kanserinde esas etken zararlı bakteri oranının fazla olmasıdır. Pek çok zararlı bakteri genetik kodunu jenerasyonlar arasında aktarma

yoluyla mutasyon oluşturma ve antibiyotik direnci kazanma kapasitesine sahiptir. Bu problem özellikle *L.gasseri* ile giderilebilmektedir.

En etkili bakteriyosin bebek dışkısından izole edilen *L.gasseri* L39 tarafından üretilen gasserisin A'dır. Bu bakteriyosin saflaştırılarak yapısal geni klonlanmış ve sekans analizi gerçekleştirilmiştir (*gaaA*). Gasserisin A, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyal etkiye sahip bir bakteriyosindir. Tüm primer yapısı göz önüne alınacak olursa gasserisin A sınıf 2 bakteriyosinlerdendir (N- ve C-terminal amino asitleri bağlanmıştir) (Kawai et al., 2001).

Yeni bir araştırmada *L.gasseri* aşı vektörü olarak kullanılmış, fare modelinin antraks koruyucu antijeni eksprese eden *L.gasseri* ile antrakstan tamamen korunduğu gözlenmiştir. İnsan mikrobiyotasındaki yaygın konumu, iyi karakterize edilmiş genomu ve aşı konusundaki başarılı başlangıç araştırmaları düşünülecek olursa *L.gasseri*'nin oral aşı vektörü olarak kullanımında dikkat çekici bir aday olduğu gerçeğini ortaya çıkmaktadır. Aşı oral vektörü olarak kullanım için optimal etki ve güvenlikle *L.gasseri* ve konukçu immün sistemi arasındaki etkileşimin tamamen aydınlatılması gerekmektedir (Stoeker et al., 2011).

GI sistemde canlı kalabilen ve epitel hücrelere diğerlerine göre daha iyi tutunabilen *L.gasseri* ADH'nin ağızdan alınması bağırsak sistemi hastalıklarında belirgin iyileşmeye neden olmuştur (Altermann et al., 2003).

Probiyotiklerin *H.pylori*'nin kontrolünde antibakteriyal kemoterapi olarak kullanımı son yıllarda başarı ile sonuçlanan bir diğer araştırma alanıdır. Günümüze kadar uzanan sistematik derlemelerde probiyotiklerin *H.pylori*'ye karşı uygulanan l tedaviye ek olarak kullanımlarından bahsedilmekte ancak antibakteriyal kemoterapiden söz edilmemektedir. Ek tedavilerin *H.pylori* sayısında azalmaya katkıda bulunmanın yanı sıra l tedavinin yan etkilerini azalttığına dair kanıtlar da bulunmaktadır. *L.gasseri* OLL2716 *H.pylori*'nin mideye kolonizasyonunu ve gastrik mukoza enflamasyonunu azalttığı kanıtlanmıştır. Bu araştırmada *L.gasseri* OLL2716 içeren ayranların tüketilmesi sonunda bu bakterinin enfekte hastaların gastrik mukozasına kolonize olduğu

tespit edilmiştir. DL-laktik asit üreten ve *L.gasseri* OLL2716'ı da kapsayan laktobasiller spektrofotometre kullanılarak incelenmiş ve bu bakterinin ürettiği DL-laktik asit miktarı 1.4 g/litre olarak bildirilmiştir. Yaklaşık 200 adet LAB'nin analizleriyle karşılaştırıldığında bu suşun en iyi asit oluşturma yeteneğine sahip suş olduğu kanıtlanmıştır (Fujimura et al., 2012).

Pek çok laktobasil *H.pylori*, tetanoz, enterotoksijenik *E.coli*, SARS'la (Severe Acute Respiratory Syndrome) ilgili koronavirüs, rotavirüs, *Brucella abortis* ve insan pappillomavirüs gibi enfeksiyon ajanlarına karşı antijen dağıtıcı araçlar olarak bildirilmiştir. Laktobasillerin aşı vektörü olarak kullanımının artan ilginin odağı haline gelmesinin yanı sıra laktobasillerin değişik türleri ve hatta alt türleri konukçunun immun sistemi ile ilişkili olduğu kesindir. Aşı üretiminde yapılacak olan bir suşu her yönüyle iyi karakterize etmek ve genetik olarak modifiye ederek uygulama için kullanılabilir hale getirmektir (Stoeker et al., 2011).

Doğal suş ile genetik modifiye *L.gasseri* canlılığını koruyabilmekte ancak kolonizasyonu sağlayamamaktadır. Optimal dozda canlı, oral yoldan alınan bakteri bazlı aşılarla bakterinin mide ortamındaki asidik sıvı ve safra tuzlarından etkilenmeden ince bağırsağa geçebilmesi, GI sistemde tutunabilmesi gerekmektedir (Stoeker et al., 2011).

Yapılan bir araştırmada sadece *L.gasseri* starter kültür kullanılarak üretilen peynir başarısız olmuştur, çünkü bu bakterinin asidifikasyon kabiliyeti düşüktür. *L.acidophilus* grubundaki bakteriler proteolitik aktivite bakımından önemsiz kabul edilmektedir, aynı zamanda büyüme ve gelişme için gerekli olan serbest esansiyel amino asitlerce zayıftırlar. Bu nedenle iyi bir proteolitik aktivite gösteren *S.thermophilus* ile birlikte kullanılması sadece başlangıç asidifikasyonu için değil probiyotik suşların aktivitesi ve gelişimi için gereklidir (Rogelj et al., 2006).

Her biri farklı sitokin salgılayan T hiper tip 1 (Th1), Th2 ve Th17 hücreleri gibi efektör CD4+T hücrelerin çeşitli ateşli enflamatuvar hastalıklarla ilişkisi bilinmektedir. Yapılan bir araştırmada insan dışkısından izole edilen probiyotik bir bakteri olan *L.gasseri* OLL2809'un (LG2809) ve RNA'sının allerjik yanıtı ve

farelerde CD4+T hücre proliferasyonunu baskıladığı tespit edilmiştir. Bu etkiler görünür şekilde MyD88'e bağlı sinyal yolu ile ortaya çıkmakta ve anti-oksidan tedavisi ile ortadan kalkmaktadır. Aynı çalışmada DTH yanıtın da in vivo şartlarda baskılandığı bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre T hücreleri proliferasyonunun RNA tarafından baskılanmasının probiyotik bakterilerin enflamasyon yanıtı oluşturmada kullandıkları bir mekanizma olduğu söylenebilir. Yani CD4+T hücrelerinden kaynaklanan hastalıkların tedavisinde LG2809 ve RNA'sı etkin rol oynayabilmektedir (Yoshida et al., 2011).

Bir başka araştırmaya göre *L. gasseri* OLL2809'in 6 saat inkübasyon sonrasındaki otolizi 18 saate göre çok daha fazla olmuştur. Yine bu bakterinin otolizinin nötral pH'ta daha fazla gerçekleştiği bildirilmiştir. Buna göre bakteri fermentasyonunda veya ısıtma işlemi sırasında kültür ortamının pH'ı bakterinin otolizi aracılığıyla yüksek oranda IL-12 (p70) üretimin teşvik etmektedir. Logaritmik fazda IL-12 üretimi düşük olmaktadır. Fermentasyonda LAB kendi ürettikleri organik asitler tarafından inhibe olmamaları açısından nötral pH'larda kültüre edilmektedirler. Otolizin engellenmesi açısından kültürün pH'ının en azından durağan faza geçilene kadar asidik kalması gerekmektedir (Sashihara et al., 2007).

Bir araştırmada *L.gasseri* OLL2809'un endometriyosis üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hastaların yaşam kalitesini etkileyen ağrı unsuru tetkik edilmiş ve bu bakteriyi içeren tabletler hastalara verilmiştir. Sonuçta hiçbir yan etki tespit edilmeden olumlu sonuçlara ulaşılmıştır (Itoh et al., 2011).

L.gasseri TMC0356 sağlıklı yetişkin bağırsağından izole edilmiştir. Bu bakteri enflamasyon yanıtı oluşturmada insan enterositlerine tutunma özelliği göstermektedir. *L.rhamnosus* GG ve *L.gasseri* TMC0356 kombinasyonu hayvan ve insan klinik denemelerinde nasal alerjik semptomları azaltmakta ve hatta bazı vakalarda dindirmektedir. Bu araştırmada bu bakterilerin PP hücrelerindeki immün yanıtı etkisi incelenmiştir (Harata et al., 2009).

Et ürünleri için esansiyel bileşiklerden olan sodyum klorid ve sodyum nitrite karşı *L.gasseri* oldukça hassastır. Bu nedenle et ürünlerinde bu bakterinin

kullanımı zordur. Bu araştırmada UV radyasyon uygulaması ile *L.gasseri* JCM 1131'in sodyum klorid ve sodyum nitrite dayanıklı mutantları elde edilmiş ve bu mutantların et ürünlerinde starter kültür olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Arihara et al., 2000).

Canlı hücrelerle kıyaslanacak olursa inaktif probiyotik hücrelerin endüstriyel üretim ve tüketici kullanımı açısından avantajlı olabileceği söylenebilmektedir. Daha uzun süre depolama, değişik üretim sistemlerini kullanabilme gibi avantajlar öne çıkmaktadır. Yapılan bir araştırmaya göre, sıcaklıkla inhibe edilmiş *L.gasseri* TMC0356, MRS'de kültüre edilmiş canlı TMC0356'a göre belirgin düzeyde daha fazla IL-12 üretmektedir. Bu bakterinin iki farklı ortamda (MRS ve FG) kültüre edildiği zaman morfolojik yapılarının da farklı olduğu gözlenmiştir. Buna göre kültür ortamı kompozisyonu TMC0356'nın immunoregülatör etkilerini hücresel morfolojideki değişikliklerle modifiye edebilmektedir. Bu iki ortamın yeast pepton ve meat extract amino asit kompozisyonları farklı olduğu için hücre duvarı kompozisyonu da değişikliğe uğramıştır (Miyazawa et al., 2011).

Canlı probiyotiklerin oral yolla alımından sonra anahtar kriter bağırsakta kolonize olabilme yeteneğidir. İnaktif probiyotik hücrelerin de çeşitli hayvan ve hücre denemelerinden sonra konukçu organizmada gözlenebilir sağlık etkileri ortaya çıkardığı bildirilmiştir (Kawase et al., 2012).

Fare modelinde 70°C'de 30 dk ve 90°C'de 5 dk ısıtılma tabi tutulmuş *L.gasseri* TMC0356'nın canlı olanlara göre grip virüsünün etkilerinden ne kadar korunduğu araştırılmıştır. Sonuçta ısıtılma işlemiyle inaktive olan suşlarla ağızdan beslenen farelerin akciğerlerindeki virüs titresinin canlı bakteriyle beslenenlere göre daha az olduğu açıklanmıştır. Bu da grip virüsüne karşı hücresel komponentlerin metabolitler veya canlı bakterinin aktiviteleri kadar iyi koruma sağladığını göstermektedir. Ayrıca bir başka araştırmada ısıtılma işlemiyle inaktivasyonun N-asetilmuramidaz enzimine karşı stabiliteyi artırdığını ve bu bakterinin makrofajları aktive etmesi yeteneğini ve daha fazla IL-12 üretim yeteneğini geliştirdiği bildirilmiştir (Kawase et al., 2012).

Enteropatojenik *E.coli* (EPEC) enfeksiyonu diyare, ateş veya çocuklarda ve yaşlılarda ölümlere neden olan bakterilerdir. Tedavide kullanılan antibiyotikler bakterilerde direnç kazanımına neden olmaktadır. Probiyotikler antibiyotiklere alternatif olarak düşünülen organizmalardır. Koruyucu etkiler genus veya türe spesifik olmamakla beraber suşa spesifiktir. EPEC ile enfekte edilen farelerde ileri düzeyde enfeksiyonlarda 3. günün sonunda ölüm gerçekleşirken hafif şiddetteki enfeksiyonlarda iyileşme gözlenmiştir (Yoda et al., 2012). Yapılan bir başka araştırmada ise *L.gasseri* G2055'i anti obezite etkisinden bahsedilmektedir (Kadooka et al., 2012). Bu araştırmada gasserisin A'nın süt kremasındaki etkileri araştırılmıştır. Bakteriyosin yüksek oranda hidrofobik özellik gösterdiği için toksik *Staphylococcus aureus* gelişimini engellemiş ve mastitisin tedavisini gerçekleştirmiştir (Saito, T.).

1.2.Bakteriyosinler

Mikroorganizmaların biyokimyasal kapasiteleri pek çok farklı izolattan bilinmeyen yeni pek çok bileşik elde edilebilecek kadar muazzamdır. Bakteriler, aktinomisetler, funguslar ve mayalar faydalı bileşikler için bitmek bilmeyen birer kaynak oluşturmaktadırlar. Çeşitli kimyasallar, tarımsal aktif bileşikler, enzimler ve biyofarmatikler biyosentez veya biyokonversiyon teknikleri kullanılarak mikrobiyal biyoteknolojiye dayalı üretilen bileşiklerdir. Endüstriyel mikrobiyoloji araştırmalarında esas hedeflenen yeni mikrobiyal metabolitlerin keşfidir (Moncheva et al., 2001).

Primer metabolitler pek çok canlı sisteminde yaşamsal faaliyetlerin sürdürülmesi için gerekli olan, esansiyel ve biyokimyasal yollarla sentezlenen ara ürünler olarak bilinirler. Primer metabolitler enerji transdüksiyonu veya hücre yapısı için gerekli olan materyallerin üretimi, onarım mekanizmalarının düzgün çalışabilmesinin sağlanması ve üreme fonksiyonları için gereklidir. Genel olarak bu metabolitler esansiyel amino asitler, D-riboz gibi şekerler ve adenosin trifosfat (ATP) nükleotidleridir. Bunları değişime uğratabilecek enzimler primer metabolizma için oldukça önemli bileşenlerdir (Moncheva et al., 2001).

Primer metabolitler yaşamsal faaliyetler için esansiyel olmakla birlikte, sekonder metabolitler büyüme ve üreme için esansiyel özellik göstermemektedirler. Bunlar düşük molekül ağırlığına sahip olan ve gelişme evresinden sonra büyük ölçeklerde birikim yapan materyallerdir. Her bir sekonder metabolit sadece birkaç organizma tarafından oluşturulur. Bunların oluşumları çevresel faktörlere bağlıdır. Bazılarının yapısı birbiriyle çok yakından ilişkilidir. Bazı organizmalar sekonder metabolit olarak değişik sınıftaki metabolitleri üretirler. Sekonder metabolitlerin biyosentezinin regülasyonu primer metabolitlerinkinden oldukça farklıdır. Sekonder metabolitlerin üretici organizmadaki fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (Moncheva et al., 2001). Sekonder metabolitlere örnek olarak alkaloidler, poliketidler, terpenler, ribozomal olmayan oligopeptidler ve alışlagelmişin dışındaki pek çok yol ile sentezlenen ürünler verilebilir (Moncheva et al., 2001).

LAB de gıda sanayiinde koruyucu amaçla kullanılan pek çok antimikrobiyal madde üretmektedir. Bazı örneklerde inhibisyon etkisi H_2O_2 , diasetil ve organik asitler gibi son ürünlerden kaynaklanmaktadır. Bakterisidal etki ise bakteriyosin üretimi sonucunda ortaya çıkar. LAB'nin bakteriyosinleri pek çok araştırmanın konusu olmuş ve hem bilimsel hem de endüstriyel alanlarda ilgi odağı haline gelmiştir (Moncheva et al., 2001).

Ribozomdan sentezlenen antimikrobiyal peptitler memeliler, kuşlar, böcekler, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi pek çok organizmada bulunmaktadır. Antimikrobiyal peptit grubu geniş dağılım göstermekle birlikte genellikle ortak bazı özellikleri bulunmaktadır; bir hidrofobik ve bir hidrofilik son, 20-50 amino asit büyüklük ve katyonik özellikler bunlardan bazılarıdır. LAB'nin ribozomda sentezlenen antimikrobiyal bileşiklerine bakteriyosin denir (Magnusson, 2003).

GI sistem; kolisin, (bakteri, fungi ve virüslere karşı etkili, sisteince zengin aktif proteinlerden oluşan) defensin, 8bakteri hücre membranını lize eden antimikrobiyal peptitlerden olan) sekropin ve (kurbağa derisinden izole edilen antimikrobiyal bir peptit olan) magainin gibi pek çok antimikrobiyal peptit içermektedir. Bunlar düşük molekül ağırlığına sahip, katyonik ve amfifilik, yani suda çözünen ve çözünmeyen fonksiyonel grupları birlikte içeren moleküllerdir.

Bu moleküller agregasyona meyillidir ve konukçu organizmaya faydalı etkiler sağlamaktadır (Naidu et al., 1999).

Bakteriyosinler bakteriler tarafından salgılanan ve antibiyotik aktivitesine sahip proteinlerdir. Yakın ilişkili oldukları bakterilere karşı dar spektrumlu etki aralığına sahiptirler (Kawai et al., 2009). Bakteriyosinler genel olarak katyonik (lisil ve arjinil artıklarını fazla miktarda içerirler), amfipatik ve 12-45 amino asit içeren moleküllerdir. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptitler olarak tanımlanmaktadır (Moncheva et al., 2001). Bunlar protein yapılı antimikrobiyal bileşiklerin alt grubu olarak belirtilmekte ve yakın ilişkideki bakterileri öldürme gücüne sahip olmaktadır.

Bakteriyosinler aktivite, etki türü, moleküler ağırlık, genetik orijin ve biyokimyasal özellikler bakımından çeşitlilik göstermektedirler. Bu maddeler spontan olarak veya indüklenerek üretilmektedir. Pek çok bakteriyosinin genetik determinantları plazmitte, pek azının ise kromozomda kodludur. Bakteriyosinlerin salınımı için LAB'nin dış membranında bulunan deterjana dirençli fosfolipaz A varlığına ve bakteriyosin salınım proteinlerinin ifade edilmesine ve aktivitesine ihtiyaç vardır. Antimikrobiyal ajanlar türe spesifiktir. LAB'nin bakteriyosinleri 5 grupta toplanmıştır:

Sınıf 1: Lantibiyotikler

Sınıf 2: Küçük, ısıya dayanıklı, lantibiyotik olmayanlar

2a: Güçlü antilisteriyal aktiviteye sahip, pediosin benzeri bakteriyosinler

2b: İki-peptid bakteriyosinleri

2c: Non-lantibiyotik bakteriyosinler

Sınıf 3: Büyük, ısıya dayanıksız bakteriyosinler

Sınıf 4: Tanımlanmamış lipid, protein ve karbonhidrat karışımı içeren bakteriyosinler (Moncheva et al., 2001).

Sınıf 5: Dairesel bakteriyosinler

5a: Enterosin AS-48 grubu: Sirkülarin A, Uberolisin

5b: Gasserisin A grubu: Asidosin B, Reuterisin 6, Bütirivibriyosin AR10, Karnosiklin A, Subtilisin A (Kawai et al., 2004b; Maqueda et al., 2008).

Antimikrobiyal peptitler primer yapılarına göre sınıflandırılmışlardır. Sınıf 1 küçük (<5kDa), lantiyonin halkaları taşıyan posttransiyonel olarak modifiye olmuş bakteriyosinlerdir. Sınıf 1 bakteriyosinleri intramoleküler tiyoeter (oksijenin kükürt ile yer değiştirdiği eter analogu; sülfür eter) halkaları oluşturma özelliğine sahip (metil) lantiyonin kalıntıları içerir. İntramoleküler halka yapısının bulunması lantibiyotiklerin karakteristik bir özelliğidir. Bu peptitler stabil olmayan porlar oluştururlar ve geniş bir aktivite spektrumuna sahiptirler.

Sınıf 2 bakteriyosinleri modifiye olmayan (disülfid köprüleri hariç), katyonik, ısıya dayanıklı ve <10kDa moleküler ağırlığa sahip bakteriyosinlerdir (class 2c hariç). Sınıf 2a güçlü antilisterial aktivite gösterir, Sınıf 2b bakteriyal iki peptit komplementlerinin aktivitesine bağlı çalışır, Sınıf 2c ise geri kalan non-lantibiyotik bakterileri içerir. Bunlar por oluşturarak membran geçirgenliğini artırabilirler.

Sınıf 3 grup ise ısıda bozunabilen ve 30kDa kadar büyüklüğe sahip sec-bağımlı yol ile salgılanan proteinlerdir. Sınıf 1 ve 2'de AMP'ler sekresyon sırasında üretilir ve bu da otoindükleyicilerle aynı şekilde gerçekleşmektedir. Genelde lantibiyotiklerin öncü sekansı aynı zamanda quorum sensing sistemi ile otoregüle edilen gen tarafından kodlanan spesifik öncü peptidaz ile ortadan kaldırılmaktadır. Sınıf 2 AMP'ler hedef hücredeki por formasyonundan ve buna bağlı olarak gelişen inhibisyon etkisinden kaynaklanmaktadır (Dirixa et al., 2004).

Sınıf 4 grup, lipidler ve karbonhidratlar ile kompleks molekülleri içeren ve fazla araştırma yapılmamış bir gruptur. Son yıllarda dairesel bakteriyosinlerden oluşan class 5 de sınıflandırmaya dahil edilmiştir. Bunların N- ve C- terminalleri kovalent olarak bağlıdır. Bunlar bakteriyosinlerin primer yapılarına, biyokimyasal karakteristiklerine ve genetik düzenlemelerine göre iki ana gruba ayrılmaktadır: Bir grup ilk tanımlanan enterosin AS-48 (*Enterococcus faecalis* subsp.*liquefaciens*) ailesine aittir (1994). Bu gruba sirkülarin A (*Clostridium beijerinckii* ATCC25752) ve uberolisine (*Streptococcus uberis*) de girmektedir (Kawai et al., 2004b). Diğer grup ise asidosin B, reuterisin 6 (primer yapısı gasserisin A ile %100 benzerdir), bütirivibriyosin AR10, karnosiklin A'yı (*Carnobacterium maltaromaticum* UAL307) da içeren, ikinci olarak bulunan

(1988) gasserisin A ailesidir. *Bacillus subtilis*'ten izole edilen lantibiyotik benzeri subtilosin A da class 4 bakteriyosinler içerisinde yer almaktadır. Gasserisin A ailesine ait bakteriyosinler çeşitli bakteri türlerinden izole edilebilmektedir ve bu da genetik elementlerin transfer edilebilirliğini düşündürmektedir (Kawai et al., 2009).

Sınıf 2 bakteriyosinleri ile yapılan geniş çaplı araştırmaların sonucunda bu grup iki alt gruba ayrılmıştır. Sınıf 2a, yani *Listeria* aktif peptitler en çok araştırılan ve gıda patojenlerinden olan *Listeria monocytogenes*'in güçlü inhibitörü olan gruptur. Bu grup antilisteriyal etkisinden dolayı gıdalarda biyokoruyucu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu alt grubu üreten üyeler *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus*'tur. Antilisteriyal bakteriyosinler genellikle peptidin N-terminal bölgesinde göze çarpan yüksek oranda amino asit sekans homolojisine sahiptirler (38-55% benzerlik). İkinci alt grup olan Sınıf 2b ise aktivitesi iki peptidin komplementer aktivitesine bağlı olan ve birkaç örneği çalışılmış bakteriyosinleri içermektedir (Moncheva et al., 2001).

LAB'nin en iyi bilinen bakteriyosinleri gram pozitif (*Clostridia* ve *Listeria*) ve gram negatif (*Salmonella* ve *Shigella*) bakterilere karşı etkili olan nisin ve reuterindir (Naidu et al., 1999).

Tüm bu bakteriyosinojenik aktivitelerin hücresel bileşenler arası etkileşimlerden veya geliştirildikleri besi ortamından kaynaklandığı tespit edilmiştir. LAB bakteriyosinlerinden en çok çalışılanlar Sınıf 1 ve 2'e ait olanlardır. Çünkü bunlar etkileri oldukça güçlü olan ve endüstriyel uygulamalarda rahatlıkla kullanılabilen bakteriyosinlerdir. Bu iki sınıfın üyeleri aslında birbirlerinden oldukça farklıdır (Moncheva et al., 2001).

1.2.1.Bakteriyosin sentez genetiği

Sınıf 2 bakteriyosinleri, özellikle de 2a grubu LAB'nin esas alt grup bakteriyosinlerinden oluşmaktadır. Sayıca fazla olmalarının yanında potansiyel uygulamalardaki kullanılabilirlikleri nedeniyle de dikkat çekmektedirler. Bakteriyosin üretimi genellikle plazmid kaynaklı olarak düşünülse de bazı sınıf 2

bakteriyosinlerini kodlayan genlerin kromozom fragmentleri üzerinde yer aldığı bildirilmiştir. Tüm bakteriyosinler N-terminal öncü sekansı ile sentezlenmekte ve çift-glisin tip öncüler sadece sınıf 2 bakteriyosinlerinde bulunmaktadır (Moncheva et al., 2001).

Katyonik peptit bakteriyosinlerin sentezi, ekstraselüler antimikrobiyal aktivite üretimi için gerekli olan temel fonksiyonları kodlayan dört farklı genin yapısına dayalıdır. Bu dört gen:

1. Bakteriyosinin pre-formunu kodlayan yapısal gen
2. İmmunite geni
3. Özel bir ABC-taşıyıcıyı kodlayan gen
4. Yardımcı proteini kodlayan gendir.

Bu dört temel gen bir veya iki operon tarafından kontrol edilir. Bunlara ek olarak, regülatör genlerin de class 2 bakteriyosinlerinin genetik kararlılıkları ile ilgili oldukları tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bir mikroorganizmadan pek çok bakteriyosinin üretiminin mümkün olduğunu ortaya çıkarmıştır. Örneğin *Carnobacterium piscicola* biri plazmid ile kodlanan ve diğeri ise kromozom kaynaklı iki farklı bakteriyosin üretmektedir. Bakteriyosin salgılama sistemi plazmid üzerinde bakteriyosin geninin yanında yer almaktadır ve bu sistem kromozomda kodlanan bakteriyosinler için de aynıdır (Moncheva et al., 2001).

Lactobacillus gasseri LA39 ve *Lactobacillus gasseri* LA 158 geniş spektrumlu gasserisin A(GA) ve T(GT)'yi yüksek oranda üretmektedir (Toba et al., 1991; Kawai et al., 1994, 1997, 2000, 2006; Itoh et al., 1995). Gasserisin A'nın primer kimyasal yapısı belirlenmiş ve bu bakteriyosinin N- ve C- terminal amino asitlerinden bağlı, dairesel bir yapıda olduğu görülmüştür (Kawai et al., 2004a).

Gasserisin A, 58 amino asit kalıntısı içeren; 5,654 Da büyüklüğünde ve *gaaA* yapısal geninin etrafındaki *gaa* operonundan kodlanan dairesel bir bakteriyosindir. Gasserisin A, yapısal geni olan *gaaA*'nın klonlanması ile sekanslanmıştır (Kawai et al., 2004a). Gasserisin T ise *L.gasseri* suşlarının ürettiği

primer bakteriyosin olarak düşünülen; GatA ve GatX'i içeren, iki komponentli bir bakteriyosindir (Arakawa et al., 2009a). LA158'in bakteriyosini olan GT kromozomal *gat* operonu üzerinde kodlanan hidrofobik *GatA* ve *GatX* moleküllerini içermektedir (Kawai et al., 2000). Bu bakteriyosin tamamen *L.johnsonii* VPI11088'in bakteriyosini olan laktasin F ve *L.gasseri* LF221'de üretilen asidosin ile homologdur. GT'nin antibakteriyal aktivitesi hedef hücrenin sitoplazmik membranında por oluşumuna neden olmak şeklindedir. Her iki bakteriyosin de saflaştırılmış, karakterize edilmiştir ve primer yapıları kimyasal sekanslama ve yapısal genlerin klonlanması ile tespit edilmiştir. Buna göre gasserisin A iki D-alanin kalıntısına sahip dairesel bir peptittir ve gasserisin T ise laktasin F familyasına aittir (Kawai et al., 2000; 2004a; 2006; Arakawa et al., 2008).

Yapılan bir araştırmada bakteri kültürü içinde yer alan metal katyonlarının bakteriyosin üretimine etkileri incelenmiştir. Ancak bunun da suşa spesifik bir etki olduğu gözlenmiştir. Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} gibi metal katyonlarının MRS broth konsantrasyonları artırıldığında bakteriyosin üretim kapasitesinin azaldığı gözlenmiştir. Ancak suda çözünmemesi nedeniyle $CaCO_3$ 'ün eklenmesi MRS brohtaki bakteriyosin üretim miktarından farklı bir durum ortaya çıkarmamıştır. Trisodyum sitrat (TSC) kullanımı sonucunda bu madde ile metal katyonları arasında şelat meydana gelmekte ve GT üretimi belirgin derecede artış göstermektedir (Arakawa et al. 2009b).

GA LA39'un eksponansiyel büyüme evresinde üretilmektedir (12-24 saat). Bundan başka, hidrofobik GA moleküllerinin yağsız süt bazlı ortamlarda süt proteinleri ile birlikte ters hidrofobik agregasyona girerek inaktive olabildiği de bildirilmiştir. Bu inaktivasyon, yüzey aktif maddelerin ortamda bulunması ile oluşmamaktadır (MRS broth'taki Tween-80 gibi). Diğer yandan süt bileşenlerinin inhibisyonu sonucunda GT aktivitesi gözlenmemiştir (Arakawa et al., 2009a). Proteaz pepton konsantrasyonu bakteriyosin üretiminde kritik faktör olarak tespit edilmiştir. LA39 kültürünün pH'ı %0.2 proteaz pepton içeren RSM (Reconstitue Skim Milk) ortamında 4.5'un altına düşmektedir. Bu durumda gasserisin A üretimi (maksimum 210 AU/ml) ise %0.5 proteaz pepton içeren RSM ortamında

gözlenmiştir. Gasserisin A PP-RSM kültür süpernatantı ters faz kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır (Arakawa et al., 2008).

L.gasseri SBT2055 gasserisin T ile benzer özellikte bir bakteriyosin üretmektedir. Lantibiyotik grubu bakteriyosinler LAB'nde görülmemektedir. Gasserisin A'nın molekül ağırlığı kütle spektrometrisi ile tespit edilmiştir (5,652 kDa). Bu moleküler ağırlık SDS-PAGE ile 3,800 olarak tespit edilmiştir. Yüksek oranda hidrofobik olan bu saflaştırılmış bakteriyosin lisilendopeptidaz ile parçalandıktan sonra bu ürünün N-terminal amino asit sekansını belirlenmiş ve gasserisin A'nın yapısal geni ters genetik ile klonlanmıştır. *gaA* geninin (DDBJ, EMBL ve Gen Bankası veri tabanı numarası AB007043) 9.286 kDa moleküler ağırlığına sahip 91 amino asitlik bir proteini kodladığı bildirilmiştir (Kawai et al., 1998b). Saflaştırılmış gasserisin A lisilendopeptidaz ve 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenil-merkapt)-3 Hindol ile parçalanmış, triptofanil bağları ayrılmış ve serbest kalan peptitler N-terminal sekanslama ile sekanslanmıştır. Gasserisin A'nın tüm amino asit kalıntıları bu yöntemle tanımlanmış ve elde edilen amino asit sekanslarının yapısal gen *gaA*'nıninkiler ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Kütle spektrometresi analizine göre molekül ağırlığı 5.652 olan gasserisin A'nın, H₂O elemine edildikten sonra elde edilen ağırlığı da amino asit sekansı ile uyumludur (Kawai et al. 2004b).

Reuterisin 6 gasserisin A'ya benzeyen bir dairesel bakteriyosindir. *L.reuteri* gaz oluşturan, heterofermentatif bir LAB'dir ve bazı suşlarının reuterin ve reuterisin gibi bakteriyosin ürettiği bilinmektedir. 1991 yılında gasserisin A ile benzer, *B.cereus* suşlarını inhibe eden, dar spektrumlu, Tween 80'e güçlü afinite gösteren reuterisin 6, Tween-80 çıkarılmış MRS difüzyat brotta izole edilmiştir. Amino asit sekans benzerliklerine rağmen reuterisin 6 ve gasserisin A'nın etki spektralleri farklıdır. *L.reuteri* LA6'nın bakteriyosin geni kromozomda yer almaktadır ve LAB'nden *L.acidophilus* grup suşları arasında pediyosin AcH, kurvasin A, sakasin A'den farklı olarak tanımlanmış ilk örnektir. *L.gasseri* ve *L.reuteri* arasında gen transferi olduğu ve her iki suşun da aynı 2 aylık bebek dışkılarından izole edildiği söylenmektedir (Kawai et al. 2004b). Reuterisin 6 (*L.reuteri*) ve asidosin B (*L.acidophilus*) gasserisin A ile amino asit sekansları

açısından neredeyse aynıdır. Tanımlanan dairesel bakteriyosinlerin primer sekansları ve immuniteden sorumlu genlerinin farklı olduğu bildirilmiştir.

Gasserisin A'nın reuterisin 6 (%100) ve asidosin B (%98)'ye olan yüksek amino asit sekans benzerliği ilgili bakteriyosin genleri arasındaki horizontal gen transferlerinin hareketli elementler aracılığı ile gerçekleştiğini düşündürmektedir. Ancak asidosin B'nin genlerinin pCV461 olarak adlandırılan plazmitte kodlu olduğu bildirilmiştir. Pek çok laktobasil suşu bir veya daha fazla çeşitli büyüklüklerde plazmite sahiptir ve bazı laktobasil plazmitlerinin bakteriyosin üreten genleri içerdikleri bilinmektedir (Ito et al. 2009).

Gasserisin A üretiminden sorumlu olan *gaA* genleri *L.gasseri* LA39'un doğal plazmidinde bulunmaktadır. Yedi *gaa* geni gasserisin A'nın yapısal geninin, *gaa*, primer oluşumunda identifiye edilmiştir. *gaA* kromozomda kodlu olarak bilinmektedir. Ancak, bazı *L.gasseri* suşlarındaki plazmid varlığı incelendiğinde ve bazı plazmidlerin nükleotid sekansları açığa çıkarıldığında, *gaA* genlerinin *L.gasseri* LA39'un tanımlanmamış bir plazmidinde yerleştiği/saptandığı olasılığı araştırılmıştır. LA39'un plazmid içeriğinin detaylı incelenmesi sonucunda büyük bir plazmidin varlığı keşfedilmiştir. *gaaA* probu plazmide hibridize olmuştur. Yani *gaaA* ve diğer *gaa* genleri kromozomda değil plazmidde bulunmaktadır (Ito et al. 2009).

Bir araştırmada LA39'dan pLgLA39 olarak adlandırılan 33.3-kb'lık bir plazmid dizayn edilmiştir. *gaa* genleri bu plazmid üzerinde bulunmaktadır. PlGla39 konjugatif transfer için bir dizi gen taşımaktadır ve bir diğer *L.gasseri* suşuna geçtiği gözlenmiştir. *L.reuteri* LA6 da pLgLA39'la hemen hemen aynı bir plazmite sahiptir. Gasserisin A üretiminin *gaa* genlerini taşıyan plazmidin stabilitesini artırdığı tespit edilmiştir (Ito et al., 2009). Reuterisin 6'nın da primer amino asit sekansı, moleküler ağırlığı, dairesel bakteriyosin yapısı gasserisin A ile tıpatıp aynıdır. Fakat gasserisin A aynı ortamda *L.reuteri* LA6'yı inhibe ederken; *L.reuteri* LA6'nın LA39'u inhibe etmediği gözlenmiştir. D- ve L- amino asit kompozisyon analizlerine göre gasserisin A ve reuterisin 6'daki 18 Ala kalıntısında sırasıyla iki ve bir D-Ala bulunmaktadır. Buna göre D-alanin

içeriklerine göre bakteriyosinlerin etki şekillerinin ve sekonder yapılarının değişiklik gösterdiği söylenebilmektedir (Kawai et al., 2004a).

GA ve GT de ısıya dayanıklı bakteriyosinlerdir (121°C'de 10 dk). Bunlar ayrıca pH'a toleranslıdır (pH 2-12) ve *B.cereus*, *L.monocytogenes* ve *S.aureus* gibi gıda patojenlerine karşı güçlü bakterisidal etki göstermektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı her iki bakteriyosin de diğer antimikrobiyal ajanlar ile birlikte iyi birer biyokoruyucu olmaya adaydırlar. Bu teknoloji 'hurdle teknoloji' olarak adlandırılmakta ve engelleri aşma, üstesinden gelme anlamında kullanılmaktadır. Buna göre pek çok koruyucu setleri antimikrobiyal spektrumun artırılması amacıyla birarada kullanılmakta ve özellikle diğer koruyuculara karşı direnç gösteren grup mikroorganizmalar üzerinde kontrolün sağlanması açısından olumlu sonuçlar vermektedir. Gram negatiflerin dış membranını destabilize eden sitrik asit, EDTA, laktoferrin gibi etkili antimikrobiyal maddelerle LAB bakteriyosinleri bir arada kullanıldığı zaman etkinin arttığı bildirilmiştir (Arakawa et al., 2009a).

Gıda koruyucusu olarak kullanılan glisin de bakteriyal hücre duvarı peptidoglukan biyosentezini inhibe ettiği için LAB bakteriyosinleri ile birlikte kullanılmaya adayıdır (Arakawa et al., 2009a). Glisin peptidoglukanın bazı basamaklarına girebilmektedir. Glisin etkisinin değişik bölgelerde gerçekleşmesi organizmalara göre farklılık göstermektedir. Tüm türlerde gözlenen glisin etkisi peptidoglukanda çapraz bağlanmanın ve alanin artıklarının glisinle yer değiştirdiği UDP öncüleri sentezinin 20-40% azalması şeklindedir. Glisin L-alanin veya D-alanin analogu gibi davranabilmektedir. Glisinin morfolojik etkileri penisilinin etkisine benzemekte ve hücre yapısının oluşumu gecikmektedir. Bu da glisinin etki yerinin hücre duvarı olduğunu göstermektedir. L-alanin glisinle yer değiştirmektedir. Morfolojik etkiler tüm suşlarda aynıdır. Glisinin hücre duvarına yerleşmesi ile sadece L-alanin %50 oranında azalmakla kalmayıp D-alanin de %30 oranında azalmaktadır (Hammes et al., 1973). Glisin gram+ ve gram-'lere karşı nötral pH'ta da etkilidir (Arakawa et al., 2009a).

GA ve GT nötral pH'ta etki göstermeleri nedeniyle sadece asidik pH'larda etki gösteren nisin A'dan üstün görülmektedir. Genellikle enterosin AS-48

dışındaki LAB bakteriyosinleri gram negatiflere karşı etkisizdir (Arakawa et al., 2009a).

Pre-peptid olarak bilinen ve iki glisin içeren öncü sekans bakteriyosin pre-formunu kodlayan bakteriyosin yapısal geni olarak bilinmektedir. Bunun görevi:

- Üretici organizmanın içindeyken biyolojik olarak aktif kalabilmesi için bakteriyosini korumak,
- Taşıyıcı sistem için sinyal tanıyıcı özellik göstermektir.

Çift-glisin içeren öncü 14-30 artık içeren uzunluklarda olabilir. Çift-glisin içeren öncü içinde bulunan elementler korunmuş hidrofobik anhidrofilik kalıntıları, korunmuş kalıntılar arasında tanımlanmış olan uzaklıklar aracılığıyla ayıran C-terminalinde yer alan iki glisin kalıntısını içerir. Öncüde yer alan korunmuş kalıntılarda sadece -2 pozisyonundaki glisin tamamen korunmuştur. Birçok bakteriyosin iki peptid içerir. Her iki peptitin de çift-glisin öncüleri vardır ve aynı operondaki bağımsız genler tarafından kodlanırlar. Bu peptitler tek peptitli bakteriyosinlerden yapısal olarak ayırt edilemezler, ancak her iki peptit de aktivite için gereklidir. Genelde bakteriyosinler sec-bağımsız evrensel ABC-transporter sistemi tarafından salgılanmasına rağmen, bazı bakteriyosinlerin çift-glisin öncü sekanslarının olmadığı, ancak bunların N-terminal öncü sekansı ile sentezlendikleri bildirilmiştir. Bu da bakteriyosinlerin iki farklı yol aracılığı ile salgılanabildiğini göstermektedir (Moncheva et al., 2001).

Bakteriyosinler kolonize olan peptitler gibi hareket edebilmekte ve var olan mikroflora ile probiyotik gibi rekabete girebilmektedirler. Bunlar öldürücü peptitler, direkt patojenleri elemine eden maddeler veya sinyal peptitleri gibi fonksiyon gösterebilmektedirler (Dobson et al., 2012).

Bakteriyosin üreticisi organizmalar ürettikleri bakteriyosine karşı kendilerini korumak amacıyla bir koruma mekanizması geliştirmişlerdir. Bu sistem immunité olarak bilinmektedir. Her bir bakteriyosin kendisi ile birlikte ifade edilen immunité ile ilgili özel bir proteine sahiptir. Çalışılan tüm bakteriyosin operonlarında potansiyel immunité genleri bakteriyosin yapısal genlerinin yanında ve down-stream tespit edilmiştir. Ekstraselüler bakteriyosin sentezlenirken özel

bir salgılama sistemine ihtiyaç olmasına rağmen, immunité proteini fonksiyonel olarak transport ve proses yokluğunda ekspres edilmektedir. İmmunité proteinleri küçük, 51-150 amino asit içerebilen proteinlerdir. Bunlar arasındaki benzerlik ise bazı bakteriyosinler arasındaki benzerlikle kıyaslanacak olursa şaşırtıcı derecede azdır. Bakteriyosinler arasındaki benzerliğin olmaması (Sakacin A ve Curvacin A) bakteriyosinler ve bunların immunité proteinleri arasında direkt etkileşimin bulunmaması ile ilgili olabilmektedir (Moncheva et al., 2001).

Pek çok bakteriyosinde çift-glisin öncüsü olarak bilinen ve N-terminal ucu içeren bir pre-form içinde sentezlenir (Moncheva et al., 2001). Son yıllarda proteaz pepton kullanmak suretiyle yağsız süt ortamında ve peyniraltı suyunda LA39 suşlarının bakteriyosin ürettiği gözlenmiştir. Bu da düşük maliyetli ve güvenli bir biyokoruma yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Arakawa et al., 2008). Genellikle bakteriyosin üreticileri kendi bakteriyosinlerinden korunmak için protein veya peptit sentezlerler. ABC taşıyıcıları, genelde yardımcı proteinler olarak adlandırılırlar, aynı kökten gelen bir bakteriyosin taşıyıcı ve üretici hücrenin dışını istila etmiş olan bakteriyosin moleküllerini dışarı pompalayarak rezistansı korurlar. Pek çok bakteriyosin üreticisi kendi ürettikleri bakteriyosinin etkisini yok edecek spesifik immunité proteinleri (peptitler) üretir. Genellikle immunité proteinleri primer yapıları açısından değişkenlik göstermektedir. *Gaal* gibi bazı küçük peptitler dairesel bakteriyosinlerde immunitéyi destekleyici etki göstermektedirler (Kawai et al., 2009).

Bakteriyosinogenik LAB plazmid kaybı veya transkripsiyon kaynaklı inaktivasyon sonucunda bakteriyosin üretme yeteneklerini kaybedebilmektedirler. Son yıllarda bazı bakteriyosinlerin transkripsiyonel olarak regülasyonunun mümkün olduğu ve indüksiyon faktörü olmadan (IF) bakteriyosin üretiminin mümkün olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Prokaryotik organizmaların sensör enformasyonlarını protein familyaları üzerinden gerçekleştirdikleri ve bunun iki bileşenli regülatör sistemi ortaya çıkardığı bildirilmiştir. İki bileşenli regülatör sistemin genetik elemanları yani response regülatör (RR) geni ve histidin protein kinaz (HPK) geni bakteriyosin üretimi ile ilgili görülmektedir. Class 2a bakteriyosinlerin regülatör sistemleri hedef genlerin transkripsiyonunu indüklemek için gerekli olan sinyal olarak IF, HPK ve RR içerir. Class 2a

bakteriyosinlerindeki IF'ler prepeptit olarak çift-glisinli öncü ile sentezlenen küçük, ısıya dayanıklı, katyoik ve hidrofobik peptitlerdir. Üçlü komponent regülatör sistem (IF, HPK ve RR) class 2 bakteriyosinlerinin sentezinden sorumlu olarak bilinmektedir. Bu sistemde IF hücrel yoğunluk sinyali görevi görmektedir. LAB için çevresel faktörlerin IF ve HPK bağlanmasını veya RR aktivasyonu için gerekli fosforilasyon dengesini etkilediği düşünülmektedir (Moncheva et al., 2001).

1.2.2.Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivite spektrumu

Bakteriyosinler taksonomik olarak üretici suş ile yakın ilişkili olan türlere karşı etki gösterirler. Bunların dar spektrumlu etkilerinin olması biyokoruyucular olarak kullanılmalarını sınırlandırmaktadır. Ancak bu durum sadece hedef mikroorganizmanın etkilenmesi anlamını taşıdığı için avantajlı sayılabilmektedir. LAB bakteriyosinleri Gram+ mikroorganizmalar üzerinde etkilidir (Moncheva et al., 2001).

Bir araştırmada gasserisin A pIL235-P32 ekspresyon vektörü ve *gaa* genleri kullanılarak üretilmiştir. Ancak hiçbir rekombinantta bakteriyosin aktivitesine rastlanmamıştır. Yedi *gaa* genini başka bir vektöre klonlama denemesi başarılı sonuçlanmıştır. Bu sonuçlara göre *gaaB* ve/veya *gaaC*'nin her birinin promotörü aktif gasserisin A ekspresyonunda rol oynamıştır. Oluşan yaklaşık 100 doğal dairesel protein ve peptit insanlar dışında bakteriler, bitkiler ve hayvanlarda bulunmaktadır. Dairesel yapı sıcaklık, pH ve proteolitik degradasyona karşı stabiliteyi korumaktadır ve dairesel mekanizma için enzimleri ve bunların yardımcı proteinlerini açıklamaktadır (Kawai et al., 2009).

Gasserisin A üretimi MRS brothta erken durağan fazda maksimum düzeyde olmakta (12-24 saat) (640 AU/ml) ve 40 saat inkübasyon sonunda yarı yarıya azalmaktadır. Bir başka modifiye besiyeri olan DO-MRS brotta ise maksimum üretim miktarı geç durağan fazda 120 AU/ml kadar olmakta ve 60 saat sonunda yarıya düşmektedir. MRS ve DO-MRS brotlar için optimal üretim aralıkları sırasıyla 18 saat ve 36 saattir (Kawai et al., 2000). Maksimum bakteriosin üretimi

%1-2 glikoz veya ksiloz içeren MRS broth'ta 25°C'de pH 6.5'ta logaritmik fazın bitimi ile durağan fazın başlangıcında elde edilmiştir (Nowroozi et al., 2004).

Bakteriyosin tespiti genellikle araştırmacıların iyi bir tarama yöntemi olarak düşündükleri agar-well difüzyon metodu kullanılarak yapılmaktadır. Ayrıca 96 kuyucuklu mikrotitre plakaları kullanılarak da kuyucuklar içerisindeki bulanıklığın değerlendirilmesi sonucunda bakteriyosin aktivitesi tayin edilebilmektedir. Plakaların mikrotitre okuyucu ile değerlendirilmesi kuyucuklar içerisindeki bakteri yığınının dibe çökmesi nedeniyle mümkün olmamaktadır (Kawai et al., 1997).

1.2.3.Bakteriyosin uygulamaları

LAB tarafından ham gıda maddelerinin türevlerine transformasyonu sırasında antimikrobiyal maddelerin üretilmesi ve ortam pH'ının düşürülmesi gıda sanayiinde koruyucu önlemlerin başında gelen ve yüzyıllardan beri kullanılan yöntemlerdendir. Son yıllarda biyokoruyucular özellikle süt, et, sebze, balık, pastahane ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Moncheva et al., 2001). Günümüzde tüketiciler gıdalarda kullanılan sentetik koruyuculardan uzak durmaya çalışmaktadır. Bu sorunun alternatif bir çözümü ise çok uzun yıllardan beri herhangi bir yan etkisi görülmemiş olan antimikrobiyal maddelerin kullanımıdır (Soomro et al., 2002).

Günümüzde nisin A peynir üretiminde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında *L.monocytogenes* kontrolü için et ürünlerinde *Pediococci* ve bunların bakteriyosinleri; ayrıca *L.sakei* tarafından üretilen sakasin A da kıyma ve sosislerde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bakteriyosinlerin uygulamalarındaki sınırlar bazı nedenlere dayanmaktadır:

- Pek çok bakteriyosinde bulunan dar spektrum aralığı,
- Suşlardaki zayıf bakteriyosin üretimi,
- Yapı ve fonksiyon hakkındaki yetersiz bilgi,
- Bakteriyosinlerin insan sindirim sistemi florasında oluşturacağı etkilerin tam olarak aydınlatılmamış olması,

- Gıda maddesi içinde bakteriyosinlerin nasıl davranacağını bilinememesi (Moncheva et al., 2001).

Biyokoruyucuların gıdalar içinde yer alması stratejileri starter kültür olarak antimikrobiyal aktivitesi kanıtlanmış LAB'nin kullanımı, biyokoruyucu preparatlarının daha önceden hazırlanmış fermente ürünler içinde kullanılması, veya yarı saflaştırılmış, saflaştırılmış veya kimyasal olarak sentezlenmiş bakteriyosinlerin kullanılması şeklinde olmaktadır. Günümüzde biyokoruyucuların, gıdalarda kullanımına izin verilen kimyasallarla veya gıda yüzeylerine temas eden yeni jenerasyon termal olmayan sistemler ile birlikte kullanılması ilgi uyandıran bir konu haline gelmiştir (Moncheva et al., 2001).

Fermente ürünlerde bakteriyosin üreten suşların sınırlı etkinliği birkaç faktör ile açıklanabilir. Bunlar:

- Düşük üretim,
- Regülatör sistemler,
- Genetik destabilite,
- Hedef bakterilerin direnç kazanmasıdır.

Bakteriyosin araştırmalarındaki son trend, çeşitli LAB suşlarının heterolog bakteriyosin ekspresyonunun teşvik edilmesi bu tür engellerin üstesinden gelinmesini sağlayacak önemli yöntemler haline gelmiştir. Yeni konukçularda class 2 bakteriyosinlerinin klonlanması ve ekspresyonu bakteriyosinlerin fazla salgılanmasını, yani bakteriyosin regülasyon sistemlerinin üstesinden gelinmesini sağlar. Gıdalarda kullanımı uygun görülen pek çok LAB suşu, spesifik gıda sistemleri ile ilgili karakteristiklerine göre, tanımlanmış bakteriyosinler için konukçu olarak kullanılmak üzere seçilebilir. Bundan dolayı bakteriyosin üreten LAB suşları bakteriyosin üretimi ile ilgili problemten kurtulmak ve kolonizasyonu kolaylaştırmak için her tür gıdaya adapte edilebilmelidir. Her biri spesifik hedef aralığına sahip birden fazla bakteriyosin üretebilen LAB geliştirmek için heterolog ekspresyonun kullanılması gıdalardaki LAB'nin antimikrobiyal etkinliğinin artırılmasına yönelik ilginin artmasını açıklamaktadır. Bu da bakteriyosin üreten suşları istenmeyen organizmalara karşı aktif hale

getirecek ve hedef bakterilerin bakteriyosin direnci kazanması riskini azaltacaktır (Moncheva et al., 2001).

1.3.Genetik Modifikasyonlar

Kompleks ekosistemlerin analiz edilmesi için bakteriyolojik ve biyokimyasal yöntemlerin bir arada kullanılması pek çok avantaj sağlamaktadır. Bu teknolojiler probiyotik ve intestinal mikroorganizmaların analizini kolaylaştırmaktadır (Moncheva et al., 2001).

Probiyotik laktobasiller için son yıllarda kullanılan moleküler teknikler ile bu bakterilerin adaptasyon ve probiyotik özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır. Genom düzeyindeki çalışmalar laktobasiller arası karşılaştırma yapılmasına ve ortak veya özgün olan sekansların ortaya çıkarılmasına, böylelikle bu suşların evolüsyonu ve özelliklerinin genetik temeli aydınlatılabilmektedir. Genomlar ayrıca bir referans suşun DNA gen çipleri (mikroarray) kullanılarak karşılaştırılabilmektedir (CGH=Kooperatif Genomik Hibridizasyon). Buna örnek olarak *L.plantarum* ile yapılan bir çalışmada 20 suş arasında karşılaştırma yapıldığı araştırma verilebilir. Sonuçta temel farkın profajlar ve ek sekans elementleri gibi transfer edilebilen bölgelerden ve aynı zamanda plantarisin bakteriyosininin, ribozomal olmayan peptitlerin veya EPS'lerin üretiminin kodlanmasının engellendiği diğer bölgelerden kaynaklandığı bildirilmiştir. Yüksek oranda suşa spesifik varyasyonlarla şeker metabolizmasının teşvik edildiği ve çevresel adaptasyonun gerçekleştiği 600-kb bölgede karşılaşılmıştır. Genom sekanslarının elde edilebilmesi fonksiyonel çalışmalarla birarada yürütülmelidir. Geniş çaplı karşılaştırmalar için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler laktobasillerin değişik gen ekspresyonları için uygulanmaktadır. Bunlardan bazıları; mikroarraylerle genom düzeyinde RNA profillerinin karşılaştırılması, protein profillerinin iki boyutlu diferansiyel jel elektroforezi ile karşılaştırma, promotor prob kütüphanesi kullanarak in vivo ekspresyon teknolojisi (IVET), diferansiyel görüntülü PCR (DD-PCR) kullanılmasıdır (Leeber et al., 2008).

Metabolomiks substrat, ürün ve hücrel metabolizmanın ara ürünlerinin istenen koşullarda kütle spektroskopisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) ile birlikte kromatografik olarak profillenmesine olanak sağlar. Metabolitlerin profilleri hücrenin metabolik statüsünü göstermektedir, böylelikle genetik ve çevresel etkilere bağlı olarak gerçekleşen fizyolojik değişimler hakkında bilgi toplanmış olur (Jang et al., 2011).

Mikrobiyal hücrelerin tasarlanması endüstriyel olarak değerli bileşiklerin üretimi konusunda biyoteknolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir. Bu ürünler çok çeşitli olmakla birlikte kimya, gıda, biyoyakıt, ilaç gibi sanayilerde geniş uygulama alanları bulabilmektedir (Gong et al., 2009).

İyileştirme, genetik varyasyon ve fenotipik seleksiyonun sürekli bir prosesidir. Seçilmiş bir popülasyonun rekombinasyonu yeni mutant kombinasyonları oluşturularak popülasyonun genetik çeşitliliğinin artırılmasını, böylelikle popülasyon üyelerinin performanslarının artırılmasının sağlar (Zhang et al., 2002).

Doğal evrim, genetik çeşitliliğin ve fonksiyonel seleksiyonun tekrarlanan prosesidir. Evrim mühendisliği ise hem genetik çeşitliliğin ve hem de fonksiyonel seleksiyonun laboratuvarında kontrollü şekilde gerçekleştirilmesidir. Bu yaklaşım yapı-fonksiyon ilişkisine değil, doğanın tasarladığı algoritmaya bağlıdır. Genetik olarak çeşitlendirilmiş büyük popülasyonlar oluşturulur ve istenen özellik açısından taranır (del Cardayré, 2005).

Genetik çeşitlilik doğada, horizontal gen transferi ve eşleşme yoluyla rekombinasyon popülasyondaki yararlı genetik bilginin açıklanmasını ve sağlamlaştırılmasını kolaylaştırır. Popülasyon bireyleri arasındaki rekombinasyon bireylerin birleştirilmiş yararlı mutasyonları ve zaman içinde ayrılmış zararlı mutasyonları ile tüm popülasyonun genetik potansiyelinin evrim sürecinde kullanılmasını sağlamaktadır. Yani rekombinasyon bilgi alış-verişini kolaylaştırmaktadır. Rekombinasyon yokluğunda ise bu faydalar kaybolmaktadır. Ayrıca zararlı mutasyonlar zaman içinde birikerek faydalı mutasyonları

baskılayabilmektedir. Rekombinasyon yokluğunda evrim yavaş ve etkinliği az olmaktadır (del Cardayré, 2005).

Biyokatalistin, yani bir substratı değerli bir ürüne dönüştürebilen ideal hücrenin hızlı ve yüksek yoğunlukta büyümesi, minimal koşullarda canlılığını sürdürebilmesi, ucuz bir substratı kullanabilmesi ve yüksek oranda ürün salgılayabilmesi ve en az düzeyde yan ürün üretmesi beklenmektedir¹. Biyokatalistlerin en önemli avantajı diğerlerinin yanısıra multistep reaksiyonları gerçekleştirebilmeleridir (Craik et al., 2003).

Rastgele mutasyon ve seleksiyon metodları pek çok endüstriyel suşun geliştirilmesinde önemli rol oynar ancak bu metodlar tam olarak açıklanamamış ve tüm genoma dağılmış genler ile gerçekleştirildiği için zorluklar yaşanmaktadır. Bu nedenle genetik mühendisliğinin suş geliştirmede direkt olarak uygulanması bazı problemlere neden olmaktadır ve endüstriyel suş geliştirme için optimal genetik konfigürasyon oluşturmak için kombinasyonel yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (Stephanopoulos, 2002).

Kombinasyonel yaklaşımlarda ilgili fenotip açısından en iyi olarak belirlenen hücreler genotipik olarak farklı koleksiyonlardan seçilerek kütüphaneler oluşturulur. Bu kütüphaneler rastgele mutasyonlar, mutasyon döngüleri vs. ile oluşturulabilir (Stephanopoulos, 2002).

Kombinasyonel yaklaşımların başarısı başlangıç varyantların doğru seçimi, genetik rekombinasyon prosesinin etkinliği ve seleksiyon metodunun doğruluğuna bağlıdır. Genom-shuffling prensip olarak pek çok üretim yol izi ve fenotipinde kullanılabilir (Stephanopoulos, 2002).

Endüstriyel mikroorganizmaların geliştirilmesinde rastgele mutageneze dayalı klasik suş geliştirme (CSI) ve tarama yöntemleri temel olarak kullanılmaktadır. Bu stratejinin uzun zamana dayanan tarihi halen suş geliştirmede ilgi çekici yöntem olarak yer almasını sağlar. Buna rağmen klasik suş geliştirme yöntemi nedeniyle özellikle kompleks fenotiplerde oldukça zaman alıcı yöntemlerdir (Gong et al., 2009).

Geçtiğimiz 17 yılda suş geliştirmedeki ilerleme ile metabolik mühendisliği odak haline gelmiştir. Bu strateji mikroorganizmaların hedeflenmiş genetik manüplasyonlarında modern genetik araçlardan yararlanma şeklinde ortaya çıkmıştır. Metabolik mühendisliğinde yararlanılan yöntemler istenen fenotipi belirginleştirmek için gerekli olan hedef genetik değişimleri belirgin şekilde ortaya çıkarır (Gong et al., 2009).

Metabolik mühendisliğinin kullanılması ile ortaya çıkan başarıya rağmen, bu yaklaşımın uygulanmasında genotip-fenotip ilişkisinin detaylı olarak açıklanamaması önemli bir sorun olmuştur. Bu nedenle suşların metabolik mühendisliği ile geliştirilmesi yaklaşımında genellikle *E.coli*, *S.cerevisiae* ve *B.subtilis* gibi iyi karakterize edilmiş konukçular kullanılmaktadır. Pek çok deneysel ve sayısal verinin de yardımı ile metabolik mühendisliği global ölçekli bir strateji olma yolunda ilerlemektedir. Metabolik mühendisliği sistemi ve sistem biyoteknolojisi metabolik mühendisliğinin bir üst basamağı sayılabilmekte ve mikroorganizmaların biyoproseslerdeki performansının geliştirilmesinde kullanılmaktadırlar (Gong et al., 2009).

Tüm genom mühendisliği yaklaşımı yabani türlerde fenotip inşa etme alanında avantaj sunmaktadır. Doğal evaluasyon temeline dayanan evaluasyonel mühendislik terimi istenen fenotipin tekrarlayan varyasyon döngülerini ve seleksiyonunu açıklayan bir prosestir. Evaluasyon mühendisliği doğanın varyasyon ve seleksiyon prensibine dayanır. Bu yaklaşımda mutasyonla gerçekleşen genetik çeşitlilik ve rekombinasyonun ve sonrasında geniş popülasyonların sürekli evaluasyonunun, hücrenin uyarlanabilir mutasyonlara karşı doğasında bulunan kapasitesine bağlı olarak pek çok jenerasyonda gerçekleştirilmesi öngörülmür. Bu yöntem pek çok endüstriyel mikroorganizma ve proseste başarı ile uygulanmaktadır (Gong et al., 2009).

Laboratuvarda kontrollü mutagenез ve seleksiyonun kullanılması istenilen doğrultuda proteinin değiştirilmesine olanak sağlar. Protein değiştirilmesine yönelik sistematik yaklaşımlar 1970'lerden beri kullanılmaktadır. Bir proteinin substrat belirsizliği proteinin yeni spesifiteler kazanmasına olanak sağlamaktadır. Tüm organizmalar bu substrat belirsizliğinden evrimsel olarak faydalanmıştır.

Yönlendirilmiş protein evolüsyonu (YPE), protein mutantlarının oluşturulması ve istenilen özelliklerin seçimi amacıyla kullanılan çeşitli tekniklerin genel bir adıdır. Son otuz yıldır, YPE protein mühendisliğinde güçlü bir teknoloji platformu haline gelmiştir. Bu teknoloji moleküler biyoteknoloji yöntemlerinin tarama-eleme yöntemleri ile birleştirilmesinin avantajlarını sağlar. Bu metotlar deneysel prosesleri basitleştirmekte ve istenen özellik açısından geliştirilmiş mutantların identifikasyonunu kolaylaştırmaktadır. Gelişmiş rekombinant DNA teknolojileri hızlı üreme ve/veya yüksek seviyede protein üretimi için uygun bir konukçuya tek yapısal gen veya genlerin transferine olanak sağlamaktadır. Bundan başka error-prone PCR gibi metodlarla mutagenizasyon oranının kontrolü ve proteinlerin sistematik delasyonu veya eklenmesi sağlanmaktadır. Ek olarak site directed, site saturation mutagenesi ve sentetik oligonükleotidler, lokalize amino asit çeşitliliğini genişletmede kullanılabilir. Mutant süşun fonksiyonel komplementasyonu uygulanabilirliğine bağlı olarak hassas enstrümanların geliştirilmesi ve pek çok kimyasal ve biyolojik analizin geniş çapta, örneğin istenen özellikler açısından, eliminasyonuna ve seçimine olanak sağlayan mükemmel bir şanstır. Gen varyantları için DNA sekans bilgisinin hızlı bir şekilde elde edilebilmesi sadece protein sekansı ile fonksiyonu ilişkisinin anlaşılmasında değil, aynı zamanda belirli bir proteinin değiştirilebilmesi için gerekli olan en iyi stratejinin seçilebilmesinde kolaylık sağlar (Yuan et al., 2005).

YPE’nda en çok ilgiyi çeken stratejiler sıralı olarak veya rekombinasyonla seçilen basıncın uygulanması sırasında yavaş yavaş mutasyonların biriktirilmesidir. Bu durum mutantların jenerasyon sonunda kütüphanede biriktirilmesi ve bu kütüphanelerin istenen özellikler açısından etkin şekilde taraması ve sonrasında bu işlemin önceki taramada iyi sonuç veren mutantlar ile tekrar edilmesine dayanır (Yuan et al., 2005).

Protein dizaynında temel hedef yeni veya geliştirilmiş fonksiyonların kazandırılmasıdır. İki strateji bu amaçla kullanılmaktadır. İlki; istenen özelliğe sahip varyantların deneysel olarak araştırılmasını öngören yönlendirilmiş evolüsyondur. İkincisi ise proteinlerin modifiye edildiği, belli yapısal değişimlerin sonuçlarını anlamaya yönelik dizaynlardır (Yuan et al., 2005).

1.3.1.DNA-shuffling

1994'te Stemmer DNA-shuffling tekniğini tanıtmıştır. DNA-shuffling DNA fragmentleri popülasyonunun üretilmesi anlamına gelir. Shuffling reaksiyon prosedürü genetik çeşitliliği sağlanmış başlangıç popülasyonunun tüm permutasyon ve kombinasyonlarını içeren, yeni genlerden oluşan kütüphanesi ile yapılır. Örneğin bir gen popülasyonu fonksiyonel iyileştirmeyi etkileyen 10 rastgele mutasyon içeriyorsa, bu mutasyonun shuffling ile oluşturulabilecek $2^{10}=1024$ olası kombinasyonu bulunmaktadır. Klasik yöntemlerden farklı olarak shuffling sonunda elde edilen yeni türler kullanılan tüm ebeveynlere ait genetik materyale sahiptir. Bu shuffled kütüphaneler genellikle ebeveynlerine göre gelişmiş fonksiyonlara sahip olan yeni genler içermektedir. Çünkü kütüphane fonksiyon üzerinde zararlı veya etkisiz olan rastgele mutasyon kütüphanesi değildir, yüksek fonksiyonel kombinasyonel mutantları içeren kütüphanedir ve geliştirilmiş genler bunlar arasından küçük bir kısım örnekte tarama yapılarak tanımlanabilmektedir. Rekombinasyon aynı zamanda genetik çeşitliliğin, birbirine bağlı mutasyonlarla seçilen popülasyonda daha yaygın hale gelmesini sağlamaktadır. Yararlı mutasyonlar eksponensiyal anlamda kombine olmaktadır. Örneğin 3 round rekombinasyon gerçekleştiyse birikim $2^3=8$ mutasyon etkisinde olacaktır. Sonuç olarak rekombinasyon yararlı mutasyonların zararlı mutasyonlardan ayrılmasına ve rastgele mutagenезle yok olmasının engellenmesine olanak sağlamaktadır (del Cardayré, 2005).

DNA-shuffling'de esas hedef tekrarlanan mutasyon ve taramalarla aktivitedeki iyileştirilmenin biriktirilmesidir. Bunun başarısı kütüphanenin çeşitliliğine, istenen özelliğin tespit edileceği yöntemin anlamlılığına, kütüphane büyüklüğüne bağlıdır. Kütüphane çeşitliliği mutagenез veya rekombinasyonla sağlanır. Bunun için genellikle kütüphaneler rastgele nokta mutasyonları ile (erroe-phone PCR) veya başlangıç sekansın site directed mutagenезi ile sağlanır. Bu kütüphaneler taranır ve sonraki mutasyon için en uygun olan varyant seçilir. Çünkü faydalı mutasyonların sıklığı ve hasar yaratan mutasyonlarla ilişkisi zayıf olduğu için faydalı mutasyonlar her mutagenез döngüsüne eklenmektedir (Yuan et al., 2005).

1.3.2.Genom-shuffling

Tüm hücre biyokatalistleri endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Fermentasyona dayanan proseslerde mikroorganizmaların sıcaklık, pH ve çözügene karşı duyarlılıkları sonucunda düşük üretim sağlanır. Endüstriyel üretim için kompleks sisteme sahip mikroorganizmaların modifikasyonunda tek gen alterasyonu kullanılabilir, ancak bir organizmayı tüm genom seviyesinde geliştirmek daha fazla ilgi uyandıran bir konudur (Yuan et al., 2005).

Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin değerli metabolitlerinden en yüksek düzeyde faydalanılması amacıyla ticari olarak üretimine yönelik yaklaşımlar son yıllarda biyoteknolojinin en önemli odağı haline gelmiştir. Biyokatalistleri istenen fenotiplerin açığa çıkarılması amacıyla manipüle etmek klasik ve modern suş geliştirme yöntemlerinin birleştirilmesi ile mümkün olmaktadır (Yuan et al., 2005).

Klasik suş geliştirme çalışmaları, mutasyon veya genetik rekombinasyon ile genetik çeşitlilik oluşturulduktan sonra tekrarlamalı döngüler gerçekleştirilmesi ve sonrasında seleksiyon ve tarama ile yürütülür. Tipik mutagenез bir popülasyona ait genetik materyalin bilinen mutajenlerle muamelesi ile yapılır ve sonuçta bazlarda zincir kırılması, transversion, ekleme, kayıp veya yer değiştirme ile rastgele DNA hasarı meydana getirilir. Sonraki basamak mutagenезden sonra kurtulanları popülasyondan ayırmak için zengin besiyerine aktarmak ve istenen özellik için seleksiyon veya tarama ile eleme gerçekleştirmektir. Proses maksimum özelliğe ulaşılan kadar geliştirilmiş suşlar üzerinden devam ettirilir. Bu yaklaşımın sekonder metabolit üretiminde kullanımı oldukça yaygındır (Stephanopoulos). Kullanılacak mikroorganizmanın biyosentetik yolu veya metabolizması hakkındaki bilginin az olması metabolik tasarlama yöntemlerinde sınırlar ortaya çıkarmaktadır (Yuan et al., 2005). Rasyonel ve hedeflenmiş fermentasyon tasarlamanın başarısına rağmen tüm hücre fenotiplerinin doğal bileşikler olması ve limit oluşturan genlerin ayrıştırılmasındaki zorluklar nedeniyle endüstriyel organizmalar için klasik geliştirme tercih edilmektedir (del

Cardayré, 2005). Bu gibi sorunların üstesinden genom-shuffling yönteminin kullanılması ile kolaylıkla gelinmiştir.

Son yıllarda fenotipin geliştirilmesi için uygulanan yöntemlerden bir tanesi de genom-shuffling yöntemidir. Bu ve benzeri metodlar doğadaki gibi istenen fenotiplerin seçilmesi veya ortaya çıkarılması amacıyla bir popülasyondaki genetik çeşitliliğin meydana getirilmesi temeline dayanmaktadır. Genom-shuffling teknolojisi kombine mühendisliğe katkı sağlayan ve ilk olarak 2002 yılında Stemmer grup tarafından ortaya atılan bir yöntemdir (Zhang et al., 2002). Bu grup suş geliştirme çalışmalarını DNA shuffling ve direkt evalüasyon yoluyla gerçekleştiren bir araştırma grubudur. DNA-shuffling teknolojisi, seçilmiş mutant gen havuzlarının rastgele fragmentasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile in vitro homolog rekombinasyonun sağlanması amacıyla geliştirilmiştir. Benzer bir teknoloji olarak genom-shuffling geliştirilmiştir. Genom-shuffling DNA-shuffling ile gerçekleşen multi-parental çaprazlamanın avantajını klasik geliştirme ile ilişkili tüm genomların rekombinasyonu ile birleştirmektedir (Gong et al., 2009). Bir bakteri popülasyonundaki genomik rekombinasyonların yeni suşların kombinasyonel kütüphanelerinin oluşturulmasında etkili olduğu belirtilmiştir. Bu yeni suşların çoğu seçilen fenotipte önemli gelişme göstermiştir (Leja et al., 2011). DNA-shuffling'e benzer bir yöntem olan genom-shuffling genom sekans bilgisine gerek olmaksızın tüm genomda değişik pozisyonlardaki simultane değişikliklerin gerçekleşmesine olanak sağlar. Bu teknikle konjugasyonel genetik materyal transferi gibi yöntemlere nazaran gen transferi ve rekombinasyon sıklığı tüm genomun füzyonuna bağlı olarak artar (Petri et al., 2004).

Biyolojik kaynaklı kimyasal maddeler, yakıt ve materyal üretiminin kimyasal kaynaklı proseslere karşı güçlü birer alternatifi haline gelmiştir. Bu nedenle çoklu kompleks fenotiplerin tekli üretici suş haline getirilmesi gerekmektedir. Genom-shuffling klasik mutasyon tekniklerinin veya kemostat zenginleştirmelerinin kullanılması ile genetik çeşitliliğin sağlanması, sonrasında mutantların RPF uygulamasından sonra istenen fenotipin ortaya çıkarılması ile gerçekleştirilir. RPF her jenerasyonda çoklu parental rekombinasyona olanak sağlar. Başlangıç suşunda yararlı olarak nitelendirilen mutasyon

gerçekleştirildikten sonra, füzyona bağlı olarak, altyapıda meydana getirilen mutasyonların sinerjistik etkisi ile popülasyonda var olan tüm faydalı özellikleri, deneysel olarak tüm olası kombinasyonları gerçekleştirmeye gerek olmaksızın, değişime uğrattılır. Sonuç olarak, genetik çeşitlilik yaratılması, protoplast füzyonunun teşvik edilmesi ve istenen suşların seçimi için geniş anlamda taramalar yapılması genom-shuffling yönteminin gelecekte suş geliştirmede önemli rol üstleneceğini göstermektedir (Gong et al., 2009).

Genom-shuffling, istenen büyüme oranı, istenen metabolit miktarı ve substrat kullanımı açısından suşların iyileştirilmesine olanak sağlar. Genom-shuffling’te faydalı mutasyon gerçekleştirildikten sonra, mutant popülasyonların protoplastları arasında tekrarlamalı protoplast füzyonu gerçekleştirilir ve başlangıçta çoklu ebeveyn olduğu için popülasyonlarda yer alan tüm iyi özelliklerin, deneysel olarak, tüm olası kombinasyonlarının oluşturulmasına gerek kalmamaktadır. Aynı şekilde zararlı mutasyonlar da elenmiş olmaktadır (Yuan et al., 2005).

Endüstriyel açıdan değerli metabolitleri üreten mikrobiyal hücreler biyoteknolojik araştırmaların odağını oluşturmaktadır. Bu teknolojilerin hedefi metabolit üreten mikroorganizmaların geliştirilmesi ile bu metabolitlerin kimya, gıda, ilaç ve biyoyakıt endüstrilerinde kullanılmasını sağlamaktır. Bu amaçla genellikle klasik suş geliştirme metodları kullanılır. Bu teknik ardarda gerçekleştirilen rastgele mutasyonlar ve eleme prosedürlerine dayanmaktadır. İlgili mikroorganizmalar rastgele mutantlardan oluşmuş çeşit kütüphanesi oluşturmak üzere mutasyona uğrattılır. Tarama ve eleme, geliştirilmiş fenotipe sahip özgün suşun seçimine olanak sağlar. Ancak, bu metod zaman alıcı ve zahmetlidir (Leja et al., 2011). Buna karşılık genom-shuffling endüstriyel suş geliştirmede daha iyi bir yöntem olarak karşımıza çıkar. Bu teknik, DNA-shuffling’te gerçekleştirildiği gibi, multi-parental çaprazlamayı ve rekombinasyonu artıran, normalde protoplast füzyonu veya konvansiyonel geliştirme ile ilgili olan, tüm genomun rekombinasyonu avantajı ile birleştirmektedir. Bundan başka, genom-shuffling seçilmiş farklı popülasyonlar arası rekombinasyonu kolaylaştırarak yönlendirilmiş evölüasyonu hızlandırmaktadır. Genom-shuffling geliştirilmiş suşlardaki genomik çeşitlilik

döngüsü ve eleme işlemleri ile yapılan klasik suş geliştirmeye çok benzemektedir. İki teknik arasındaki temel fark, CSI'nin tam tersine genom-shuffling'in geliştirilmiş tüm popülasyonların değiştiği ve evrim geçirdiği bir proses olmasıdır. Ayrıca genom-shuffling sadece genetik yapısı çözümlenmiş mikroorganizmalarla sınırlı değildir. Günümüzde genom-shuffling istenen fenotipteki suşların gelişimi açısından en etkin yöntemlerden biri olarak değerlendirilmektedir. Metabolit üretiminden sorumlu olan değişik genlerin birkaç genom-shuffling döngüsü ile rekombinasyonunun sağlanması ile istenen fenotip elde edilebilmektedir (Leja et al., 2011).

Günümüzde genom-shuffling endüstriyel öneme sahip mikrobiyal fenotiplerin hızlı şekilde iyileştirilmesi amacıyla başarılı şekilde uygulanabilen etkili bir tüm hücre mühendisliği yaklaşımıdır. Genom-shuffling teknolojisindeki gelişme 2002 yılından günümüze kadar pek çok araştırma makalesinde yer almıştır (Gong et al., 2009).

Genom-shuffling neredeyse 30 yıla yakın bir süredir kullanılan protoplast füzyonunu temel alan bir suş geliştirme teknolojisidir. Protoplast füzyonu ile fenotipik özelliklerin iyileştirilmesi yöntemi 1970'lerden beri uygulanmaktadır. Farklı türlere ait protoplastlar başarılı bir şekilde füzyona uğratılabilmekte ve hücre mühendisliğinde oldukça geniş uygulama alanı bulmaktadır. Diğer genetik manüplasyon tekniklerinden farklı olarak, tüm protoplast genomunun füzyonu ile yüksek sıklıkta rekombinasyon gerçekleştirilebilmektedir. Yapılan pek çok araştırmanın sonuçlarına göre protoplast füzyonu ile elde edilen füzantların ebeveyn suşlarına oranla daha hızlı ve daha fazla miktarda metabolit üretimi gerçekleştirdiği saptanmıştır (Gong et al., 2009).

Klasik protoplast füzyonu, farklı genetik özelliklere sahip iki hücre arasında füzyon gerçekleştirilerek, her iki ebeveynin genetik özelliklerinin kombinasyonuna sahip stabil bir rekombinant elde etme amacına yönelik bir prosestir. Protoplast füzyonunda jenerasyon başına sadece iki ebeveynden rekombinasyon meydana gelir. Genom-shuffling'de ise her jenerasyonda çoklu ebeveynler arasında rekombinasyon gerçekleşir ve birkaç kez tekrarlamalı (recursive protoplast fusion) genom füzyonu döngüsü oluşturulur. Böylelikle elde edilen geliştirilmiş suş,

başlangıçtaki çoklu ebeveynlerin genetik özelliklerinin geliştirilmiş haline sahip olur. Buna bağlı olarak da kompleks soyun genetik çeşitliliği oldukça yüksek şekilde artırılmış olur ve yüksek performanslı suş elde etme olasılığı önemli ölçüde artar.

Klasik suş geliştirme yöntemleri (CSI) ile kıyaslandığı zama genom-shuffling pek çok avantaja sahiptir. İlk olarak fenotipik iyileştirmede genom-shuffling etkinliği mutagenез ve protoplast füzyonu gibi klasik suş geliştirme yöntemlerine göre daha fazladır. Rastgele mutajenik üretimde tek bir suş başlangıç suşu olarak seçilir, her döngüden iyi performans gösteren geliştirilmiş mutant popülasyonları identifiye edilir. Mikroorganizma evalüasyonu yavaştır ve zaman alıcı bir yöntemdir. Bu prosesin eksiklikleri, bilginin popülasyon ile paylaşılmasını sağlayan evolüasyon ile giderilebilmektedir. Seçilmiş bir popülasyonla eşleştirme yeni mutant kombinasyonlar aracılığı ile genetik çeşitliliğin genişletilmesini sağlar. Genom-shuffling iki veya daha fazla çok yakın ilişkili veya alem düzeyinde farklılık gösteren organizmaların karakteristik özelliklerinin karıştırılmasını sağlayan yeni bir perspektiftir. Genom-shuffling'in bir roundunun maliyeti klask mutajenik geliştirmenin bir döngüsününkine eşittir (Verma et al., 2011).

Genom-shuffling ile protoplast füzyonuna göre daha fazla hibrid suş eldesi mümkündür. Tekrarlamalı protoplast füzyonu ile pozitif fenotipe sahip popülasyonun bilgiyi paylaşması garantilenir. Böylelikle çoklu ebeveynin pozitif özelliğinin geliştirildiği iyileştirilmiş, istenen fenotipe sahip suş kısa bir süre zarfında elde edilmiş olunur. İki füzyon döngüsü sonunda 20 yılda gerçekleşen CSI sonucuna ulaşılması mümkün olmaktadır (Zang et al, 2002). Yani genom-shuffling'in anahtar avantajı popülasyonun genetik çeşitliliğinin yeni jenerasyonda artırılmasıdır (Gong et al., 2009).

Genlerin in vitro rekombinasyonu rutinken (<10kb), bu işlem tüm genom için uygun değildir (>>1 Mb). Rekombinasyonu etkileyen in vivo metodlar doğal mekanizmalara dayalı ve düşük rekombinasyon etkinliğine sahip mekanizmalardır (<10⁻⁵). Farklı hücrelerden gelen yararlı mutasyonlar bir türün uzaktan ilişkili suşları arasındaki tekil çaprazlama sonucunda azalacaktır. Örneğin; her biri 10

farklı mutasyonu olan iki hücre çaprazlanırsa son rekombinantın halen 10 mutasyonu olacaktır ancak 5 mutasyonu her bir dizgiden gelecektir. Genom-shuffling ile bu limitasyon engellenmekte ve pek çok ebeveyninden gelen mutasyonlara sahip kompleks bir soy oluşturulması mümkün olmaktadır (del Cardayré, 2005).

Genellikle rejenere hücrelerin %10'u ikili rekombinantlardan oluşur, yani herhangi iki ebeveynin genetik bilgisine sahiptirler, ancak pek azı üç veya daha fazla ebeveynin genetik bilgisine sahiptir. Rejenere protoplastların tekrarlamalı füzyonu her bir roundda %10 rekombinantın birbiri ile veya değişik ebeveynlerle rekombine olmasını sağlar, böylelikle tekrarlamalı füzyonlardan rejenere olan bir popülasyonda herhangi 4 ebeveyninden gelen genetik bilgiyi içeren ve genom-shuffled kütüphanesini temsil eden ancak >%2 oranında hücre bulunabilmektedir (del Cardayré, 2005).

İkinci olarak, genom-shuffling genetik geçmişi ve altyapısı kesin olarak bilinen mikroorganizmalar ile sınırlı değildir. Gen rekombinasyon teknolojisi çoklu ebeveynler arası rekombinasyonu sağlamasına rağmen, tüm mikrobiyal genomu değil, DNA fragmentlerini hedef alır. Bununla birlikte hücresel fenotip global gen ekspresyon seviyelerini, metabolik talebi, kaynağa ulaşabilme ve hücresel stresleri görünür hale getirir. İdeal hücrenin profili oldukça az anlaşılabilmiş, çoğunlukla hiç bilinmeyen ve genomda geniş alana dağılmış çok sayıda genin ekspresyonuna bağlıdır. Bu nedenle suşları spesifik bir geni kontrol ederek direkt genetik manüplasyonla iyileştirmeye çalışmak zordur. Bunun yanında genom-shuffling tüm genomun geniş bir perspektifle tasarlandığı bir stratejidir ve genetik geçmişi bilinmeyen mikroorganizmalara da rahatlıkla uygulanabilir. Mikrobiyal suşların geliştirilmesinde kullanılan genetik mühendisliği metodlarından farklı olarak genom-shuffling, genom elastikiyetine dayalı olarak gerçekleşen, genoma tamamen dağılmış anlık değişimlere neden olmakta ve bunun için genom sekans verilerine veya network bilgisine ihtiyaç duyulmamaktadır (Gong et al., 2009).

Diğer moleküler yetiştirme yöntemleri ile kıyaslamaya devam edecek olursak, genom-shuffling'in popülerleşmesi oldukça kolaydır. Uygulamada fazla

pahalı materyale ihtiyaç yoktur. Yani pek çok laboratuvarıda uygulanabilecek bir yöntemdir. Yine genom-shuffling yöntemiyle elde edilen shuffled suşlar, yani füzantlar genetik olarak modifiye edilmiş organizmalardan sayılmaktadır (Gong et al., 2009).

1.3.2.1.Genom-shuffling'in temeli

Geliştirilmiş suşların elde edilmesinde faydalanan bir diğer yöntem de protoplast füzyonudur. Protoplastlar, enzim uygulaması ile hücre duvarı uzaklaştırılmış hücrelerdir (Moncheva et al., 2001). Protoplast füzyonu 1970'lerden beri ökaryotik ve prokaryotik pek çok hücrenin fenotipik özelliklerinin modifiye edilmesinde kullanılmaktadır. Farklı türlerin ve hatta farklı familyalara ait bireylerin protoplastları dahi başarılı şekilde füzyona uğratılabilmektedir. Bu da, bu tekniğin hücre mühendisliğinde yaygın kullanım alanı olduğunu kanıtlar. Diğer genetik manüplasyon tekniklerine nazaran tüm protoplast genomunun füzyonu ile yüksek rekombinasyon sıklığı elde edilmektedir. Bu nedenle, genetik maniplasyon kaynaklı pek çok teknoloji zaman içerisinde geliştirilmişken protoplast füzyonu fenotipin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaya devam edilmiştir. Genom-shuffling protoplast füzyonu temeline dayanmasına rağmen oldukça farklı bir yöntemdir. Klasik protoplast füzyonunda farklı genetik özelliklere sahip iki hücre arasında füzyon gerçekleştirilmektedir. Böylelikle her iki ebeveynin genetik özelliklerinin birleşimine sahip stabil bir rekombinant elde edilmektedir. Bu işlemde, her bir jenerasyon için sadece iki ebeveynden rekombinasyon sağlanır. Bundan farklı olarak genom-shuffling her bir jenerasyonda çoklu ebeveynler arası rekombinasyona olanak sağlar ve birkaç kez genom füzyonu oluşturulur. Sonuçta, ikiden fazla başlangıç ebeveyn hücresinden genetik özelliği geliştirilmiş suş elde edilir (Leja et al., 2011).

Protoplast füzyonu için öncelikle hücre duvarının parçalanması gerekmektedir. Pek çok enzim bu amaçla kullanılabilir (bakterilerde lizozim, mutanolisin, bitki hücrelerinde selüloz, pektinaz, fungal organizmalarda glukanaaz ve kitinaz içeren enzimler gibi). Protoplast füzyon geniş anlamda iki kategoride incelenebilir:

1.Spontan Füzyon:

İzolasyon sırasında protoplast kendiliğinden füzyona uğrayabilir. Enzim muamelesi sırasında birleşen hücrelerin protoplastları plazmadezmatalar aracılığı ile çok çekirdekli protoplast oluşturmak üzere füzyon geçirir.

2.İndüklenen Füzyon:

Değişik kaynaklardan izole edilen serbest protoplastların füzyon indükleyici kimyasallar aracılığı ile oluşturulmasıdır. Normalde izole edilen protoplastlar füzyon oluşturmaz, çünkü bunlar plazma membranının dış kısmında negatif yüke sahiptirler (-10mV'tan -30 Mv'a kadar). Aynı yükler birbirini itekler ve birleşme gerçekleşmez. Bu türde füzyon için elektronegativiteyi azaltacak kimyasal ajanlara gereksinim vardır. Bu türdeki füzyon 3 farklı şekilde gerçekleştirilebilir:

a.Mekanik füzyon:

İzole edilen protoplastlar mikroskop altında mikromanipülatör veya perfüzyon mikropipeti kullanılarak çok yakın fiziksel temas ettirilerek gerçekleştirilir (Verma et al., 2011).

b.Kemofüzyon:

Sodyum nitrat, polietilen glikol (PEG), kalsiyum iyonları gibi kimyasallar kullanılarak gerçekleştirilen füzyon türüdür. Kimyasal füzojenler izole edilmiş protoplastların birbirine adezyonunu ve sıkı şekilde kenetlenmesini teşvik eder (Verma et al., 2011).

c.Elektrofüzyon:

Son yıllarda kullanılan ve hafif elektriksel uyarımlarla protoplastların füzyonunun teşvik edilmesini amaçlayan yöntemdir. İki cam kapiller mikroelektrod protoplast ile temas edecek şekilde yerleştirilir. Düşük akımlı elektrik verilerek (10Kvm^{-1}) protoplast süspansiyonunda dielektroforetik dipol jenerasyonu oluşturulur. Bu da protoplast zincirlerinin düzenlenmesine neden olur. Elektrofüzyon kontrolü kolay ve füzyon sıklığını %100'e kadar çıkarabilen bir yöntemdir (Verma et al., 2011).

Bir teoriye göre protoplastlar birbirlerine yakın hale gelince membranın elektrostatik potansiyelindeki değişimler füzyon oluşumunu teşvik etmektedir. Füzyon sonrasında membran stabilize olur ve yüzey potansiyeli eski haline döner. Bir başka teoriye göre; protoplastlar sıkıca bağlanır eksternal füzojenler intramembran proteinleri ve glikoproteinlerinde bozulmaya neden olur. Bu da membran akışkanlığını artırır ve bitişik membranların birleşmesini teşvik ederek lipid moleküllerinin birbirine karışacağı bir bölge oluşturur. Protoplastların taşıdığı negatif yük intramembran fosfat gruplarına bağlıdır. Ca^{++} iyonları plazma membranının zeta potansiyelini azaltır ve protoplastlar füzyona uğrar. PEG'ün yüksek molekül ağırlıklı polimeri (1000-6000) protoplastları birleştiren bir moleküler köprü olarak iş görür. Protoplast füzyonu protoplastlar arasındaki mesafenin 10A veya daha az olması durumunda gerçekleşmektedir. PEG'ün suya yüksek afinitesi lokal membran dehidrasyonuna neden olabilir ve füzyon indüklenebilir (Verma et al., 2011).

Protoplastlar lizise karşı sukroz gibi bir osmotik stabilize edici ajan içeren ortamda stabilize edilmelidirler. Protoplast füzyon oranı seyrek. Güçlü negatif PEG protoplastların agregasyonunu ve füzyonun DNA değiş tokuşu ile gerçekleşmesini sağlar. Füzyon sonrasında hücre duvarının rejenere olması sağlanır. Yeni jenerasyon soyda bir dizi rekombinant yer almaktadır. Protoplast füzyonu şu durumlarda kullanılabilir:

- İntraspesifik rekombinasyon sıklığı çok düşük olan suşlarda,
- İnterspesifik hibridizasyon ile modifiye metabolitleri sentezleyen yeni organizmalar elde etmek için,
- DNA klonlama denemelerinde protoplast transformasyonu veya transfeksiyonunda.

Bu yaklaşım değişik türlerin genetik bilgilerinin in vivo ortamda birleştirilmesi ve yeni modifiye ürünlerin eldesi amacıyla başarılı şekilde kullanılabilmektedir (Moncheva et al., 2001).

1.3.2.2.Genom-shuffling prosedürleri

1.Parental kütüphane oluşturulması:

Genom-shuffling işlemine başlamadan önce, ebeveyn suş kütüphanesi oluşturulmalıdır. Başlangıç suşu öncelikle pek çok genotip oluşturabilmeli ve sonra ilgili suşlar ebeveyn kütüphanesinden toplanarak tekrarlamalı protoplast füzyonu (RPF) için hazırlanmalıdır. Parental kütüphanede fenotip çeşitliliği yaratmak parental suş seçiminde başlıca kuraldır, çünkü bir sonraki basamakta gerçekleştirilecek RPF parent suşun genotipine bağlıdır. Eğer parent suş seçimi iyi yapılmazsa istenen fenotip elde edilemeyecektir. İstenen suşlar PF için parental kütüphanede biriktirilmelidir. Bu yöntemin can alıcı noktası ebeveyn suş seçimidir. Eğer uygun suş seçilmezse istenen fenotip de elde edilemez. Genom-shuffling'in sonraki basamağı protoplast füzyonudur. Hücreler lizozim veya benzer enzimler içeren bir tampon içerisinde süspanse edilerek protoplast eldesi sağlanır ve santrifüjleme yoluyla toplanır. Daha sonra mutantlardan elde edilen eşit miktarda protoplast karıştırılır. Rejenere protoplastlardan oluşan suşlar havuzda toplanır ve ikinci füzyon döngüsünde başlangıç suşu olarak kullanılmak üzere saklanır (Leja et al., 2011).

Diyabetten korunmada etkili ve güvenli bir gıda katkısı olan hidroksisitrik asit (HCA) üretiminin artırılmasına yönelik olarak genom-shuffling uygulanan bir araştırmada geniş kapsamlı HCA üretimi 2. round füzyon sonunda durmuştur (Hida et al., 2007). Yani başlangıç popülasyon çeşitliliği fazla olan veya superior performanslı orijinal suşların genom-shuffling için seçilerek kullanılması gerekmektedir (Gong et al., 2009).

Genom-shuffling teknolojisi çok çeşitli mikroorganizmaların geliştirilmesinde yaygın şekilde kullanılan bir teknoloji olmasına rağmen parental kütüphane oluşturmada kullanılan yöntemler mutasyon ve direkt seleksiyon gibi klasik yöntemlerdir. Mutasyon genom-shuffling için çeşitli popülasyonlar oluşturmada temel yöntemdir. Bu yöntemde başlangıç suşu kimyasal veya fiziksel mutajen kullanılmak suretiyle, bir veya birkaç mutasyon döngüsüne maruz bırakılır. Temelde 3 farklı mutajen; ethyl methanesulfonate, N-metyl-N''-nitro-N-nitrosoguanidine ve ultraviyole radyasyon kullanılmaktadır (Leja et al., 2011).

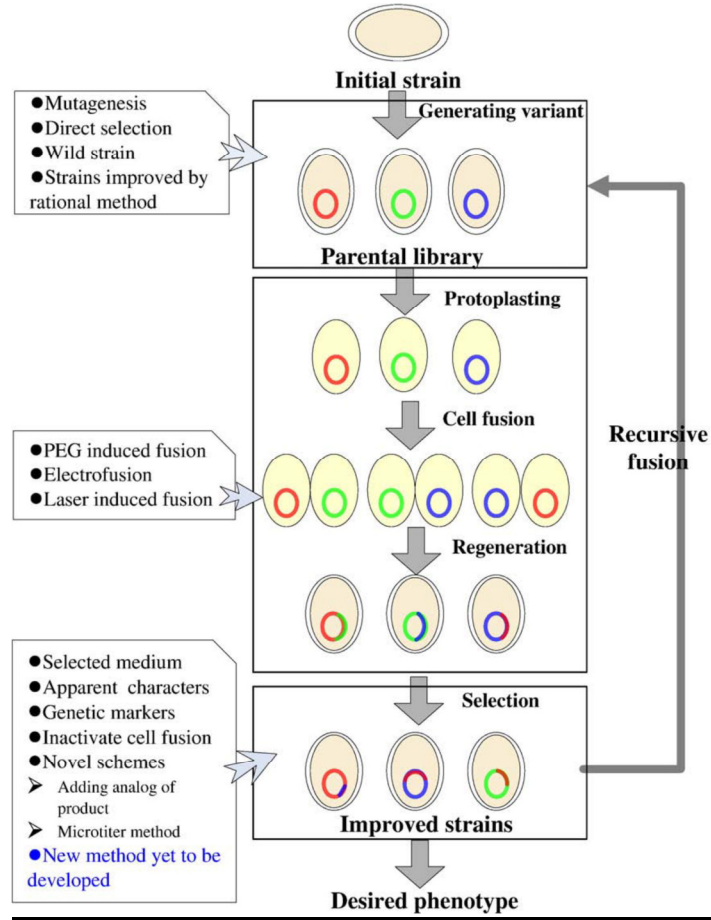
Genetik çeşitlilik yaratmak için kullanılacak kombinasyonel metod parental kütüphane hazırlanırken uygulanmalıdır. Bundan başka parental havuz oluşturmak için suş seçimindeki standartlar üretim kapasitesi ve çevresel etkilere tolerans gibi hedef fenotipe odaklı olmalıdır. Suşların büyüme kapasiteleri de oldukça önemlidir, çünkü yüksek üretim kapasitesine veya çevresel etkilere toleranslı suşların büyüme karakteri bozulabilir. Bu nedenle orijinal suş kompleks jenerasyonun büyüme karakterini teşvik edici olmalıdır. Ek olarak rasyonel metodlarla geliştirilmiş suşlar da genom-shuffling için başlangıç suşu olabilirler. Rasyonel metodlarla tasarlanmış suşlar parental suşların seleksiyon kapsamını genişleterek genom-shuffling manüplasyonundan sonra istenen fenotipin elde edilmesinde avantaj sağlayabilirler (Gong et al., 2009).

2. Tekrarlamalı Protoplast Füzyonu:

Bakteri hücreleri arasındaki rekombinasyonu etkileyen pek çok araç bulunmasına rağmen protoplast füzyonu yüksek gen transfer sıklığı ve rekombinasyon etkinliği ile sonuçlanan bir yöntemdir. Ancak protoplast füzyonu ile çoklu ebeveyn hücreler arasında rekombinasyon etkinliği oldukça düşüktür. Bu problem protoplast füzyonuna dayalı bir yöntem olan genom-shuffling uygulanması ile giderilmiştir. Yöntemde parental hücrelere ait protoplastlar karıştırılır, füzyon gerçekleştirilir ve rejenerasyon sağlanır. Rejenerasyon protoplastlardan alınan suşlardan havuz oluşturulur ve ikinci füzyon döngüsü için başlangıç suşları olarak kullanılırlar. Aynı şekilde protoplast oluşturma, füzyon ve rejenerasyon işlemleri füzantlar ile de gerçekleştirilir. Bu işlemler istenen özelliğin artış miktarına göre birkaç kez tekrarlanabilir (Gong et al., 2009). Günümüzde kimyasal ajanlar veya elektrik sinyalleri kullanılarak füzyon gerçekleştirilebilmektedir (Şekil-1.3).

3. İstenen fenotipin seçilmesi:

İstenen fenotipik özellik RPF sonrasında elde edilen popülasyondan tarama yöntemi ile elde edilmektedir. Bu en kritik basamaktır. Halen seleksiyon metodolojisinde bazı zorluklar ortaya çıkmaktadır. Bu da genom-shuffling yönteminin en önemli problemidir (Gong et al., 2009).



Şekil-1.3: Genom-shuffling prosedürü

Yeni meydana gelen soydaki suşların toleransının artışı selektif besiyerleri ile belirlenebilmekte ve suşlar seçilebilmekteyken, metabolit üretimindeki artışı gerçekleştiren yeni popülasyondan fenotipin tespiti zor olmaktadır. İyileştirilmiş suşun aranması için kullanılan klasik metodlar hidroliz zonu, inhibisyon zonu gibi agarlı besiyerinde belirlenen zonlarla ölçülmektedir (Gong et al., 2009).

Bununla birlikte, selektif marker olarak kullanılabilecek çok fazla fenotip de bulunmamaktadır. Rekombinantın elenmesini ve identifikasyonunu kolaylaştırmak için shuffling kütüphanesi oluşturulurken genetik markerlar kullanılmakta idi. Oksotrofik suşlar genom-shuffling metodu ile rekombine edilmiş Gram- suşların araştırılmasında kullanılmıştır. Oksotrof gibi genetik markerlar suşun fizyolojisini ve metabolizmasını etkileyebilmekte ve performansı düşük, doğuştan kusurlu yavru üretimine neden olmaktadır. Ayrıca ebeveyne genetik marker eklenmesi operasyon süresini uzatmaktadır. Bu nedenle genom-

shuffling prosesinde etkin elemanın yapılabileceği metodun iyi tespit edilmesi gerekmektedir (Gong et al., 2009).

Son yıllarda geliştirilmiş olan bir başka metod, inaktive edilmiş parental protoplast füzyonu da uygulanmaktadır. Bu işlemde, protoplastlar ısı veya UV radyasyon etkisi ile inaktive edilmektedir (Zhao et al., 2008). Teorik olarak belli bir yöntemle yapılan inaktivasyon kromozomun aynı bölgesinde hasara neden olmaktadır. Eğer birkaç parental protoplast aynı yöntemle inaktive edilirse, hücrenin rejenerasyonu oldukça zor olmaktadır. Ancak, kromozomun değişik bölgelerinde meydana gelen öldürücü hasar tamamlayıcı olmakta ve fizyolojik aktiviteye sahip füzyon hücresi seçilebilmektedir. Çoklu ebeveyn protoplastlarının inaktivasyonu rekombinantların elenme etkinliğinin artmasını sağlar (Gong et al., 2009).

Son yıllarda istenen suşların izolasyonu için özgün bazı yöntemler geliştirilmiştir. Ürünün benzerinin eklenmesi yüksek miktarda ürün üreten suşun izolasyonunda oldukça etkili bir yoldur. Örneğin HCA analogu olan bir antibiyotik olan trans-epoksi aso nitrik asit (EAA), HCA taranmasında kullanılmıştır (Hida et al., 2007). EAA füzyonu gerçekleşmemiş protoplastlardan rejenere olmuş olanların inhibisyonunu sağlamış ve shuffled suşların selektif olarak tespit edilmesini kolaylaştırmıştır (Gong et al., 2009).

Normalde LAB optimal koşullar altında kolay büyüyen ve laktik asit üreten mikroorganizmalardır. LAB genellikle büyüme ve gelişmeleri için vitaminler, amino asitler vs. gibi kompleks besin ihtiyacı olan mikroorganizmalardır. Laktik asit üretiminde besin ögesi takviyesi ve besiyerinin tamponlanması akış prosesinde problemlere ve buna bağlı olarak da maliyetin artmasına neden olabilmektedir. Laktik asit gıda, kimya, kozmetik sanayiinde de kullanıldığı gibi, önemli bir PLA üreticisidir. Kimyasal sentez ile sadece rasemik laktik asit karışımı üretilebilmektedir. L-laktik asit üretimi için nişasta içeren tarım artıklarına dayalı katı substrat fermentasyonu proseslerinde başarı elde edilmiştir. Nişastalı biyokütlenin amilolitik ve laktik asit üretici özelliklere sahip bakterilerce direkt dönüştürülmesi iki basamaklı işlemi ortadan kaldıracak ve ekonomik kazanç sağlayacaktır (John et al., 2008a).

Rekombinant DNA meydana getirilerek gerçekleştirilen genetik mühendisliği yaklaşımlarının suş geliştirmedeki direkt rolü ve önemi bilinmekle birlikte, çoklu ve geniş bir bölgeye dağılmış genler ile kontrol edilen savunma mekanizması düşünüldüğü zaman klasik mutagenезin tek yol olduğu söylenebilir. Düşük pH, organizmaların zor koşul istekleri ve yüksek substrat konsantrasyonu gibi zorlayıcı etkiler klasik mutasyon ile büyük ölçüde giderilebilmektedir. Yapılan bir araştırmada düşük pH'a dayanıklı mutant *L.delbrueckii* nitröz asit mutasyonu ile elde edilmiş ve amilaz üreticisi *B.amyloliquefaciens* ile genom-shuffling uygulanarak düşük pH'ta büyüeyebilen ve nişastayı direkt L-laktik asite dönüştürebilen bir füzant elde edilmiştir. Bu yöntemde laktik asit miktarı kolorimetik metod ile ve azalan şeker miktarı ise dinitrosalisik asit yöntemi ile tespit edilmiştir. Başlangıç inokulum miktarı kompleks substratların parçalanmasında gerekli olan enzimlerin üretimi açısından temel faktör olması nedeniyle ilk sırada yer almakla beraber, yeast extract ve pepton konsantrasyonunda laktik asit üretimini önemli ölçüde artırmıştır. Laktik asit birikimi mikroorganizmanın büyümesi için gerekli olan yeterli amino asit sağlaması açısından pepton konsantrasyonundaki artışla direkt ilişkilidir. İki round genom-shuffling sonunda substrat ihtiyacının azaltıldığı, buna karşılık laktik asit üretiminin arttığı görülmüştür. *L.delbrueckii* mutantına *Bacillus*'tan gelen nişasta parçalayıcı enzim geni aktarılmıştır. Yabani tipte amilaz geni yokken füzantta gözlenmiştir (John et al., 2008a).

Genom-shuffling etkinliği füzyondan sonra rejenere olan protoplastların ve yine füzyondan sonra elde edilen diploid ya da mutiploid hücreler arasındaki heterojen kromozom rekombinasyonuna ve sonuçta sadece bir genom içeren doğru prototrofların ayırımına bağlıdır. Patnaik (2002)'e göre popülasyonların başarılı şekilde geliştirilmesi, başarılı genom-shuffling'e bağlıdır (John et al., 2008a).

Tarımsal, askeri, evsel ve endüstriyel alanlardan çevreye binlerce insan kaynaklı kimyasal salınmaktadır. Bu kimyasalların biyodegradasyonu mümkün olmamaktadır, çünkü toprak ve sudaki bakterilerin bu tür kompakt bileşikleri metabolize ürünlere dönüştürmeleri için gereken metabolik yolları dizayn etmek için yeterli zamanları yoktur. İnsan kaynaklı bir pestisit olan pentaklorofenol

(PCP) ilk kez 1936 yılında tespit edilmiştir. PCP degradasyonu *Sphingobium chlorophenolicum* tarafından maksimum düzeyde yapılmaktadır. Bir çalışmada PCP'nin *Sphingobium chlorophenolicum* ile biyodegradasyonunun genom shuffling (nitrozoguanidin ile mutasyon gerçekleştirilmiştir) kullanılarak artırılması hedeflenmiştir. Sadece 3 round füzyon sonunda degradasyon seviyesinin 10 kata kadar arttığı belirtilmiştir. 0.6mM CPP varlığında başlangıç suşlar gelişemezken, genom-shuffling sonrasında elde edilen shuffled suşlarda 6-8 mM PCP varlığında petride üreme görülmüştür (Dai et al., 2004).

Bir araştırmada antikanser ajanı olan epotilonları yüksek miktarda üreten bir suşun fazla sayıda mutantının geliştirilmesinde ilk eleme için basit bir mikrotitre metodu geliştirilmiştir. Yöntemde 96-kuyucuklu mikrotitre plakalarında gerçekleştirilen mikro kültürasyon sonucunda mikrotitre okuyucu ile sonuçlar değerlendirilmiştir. Rejenerasyon petrisinde görünen füzantlar ikiyeşerli paralel olacak şekilde 96 kuyucuğa inoküle edilmiştir: Biri epotilon verimi sağlamak için, diğeri ise mutantın korunması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Kültür sonrası, epotilon üreten kolonilerin bulunduğu kuyucuklar mikrotitre spektrofotometresi ile ölçülerek tespit edilmiştir. Yüksek absorpsiyon değerine sahip mutantlar plakadan kolayca tespit edilmiş ve miktar ölçümünde daha sonra kullanılacak mutantları oluşturmuştur. Böylelikle yüksek üretim yapan suşların genom-shuffling ile tespiti kolaylaştırmış olmuştur (Gong et al., 2009).

Geniş çaplı eleme prosedürünün geliştirilmesi, istenen fenotipin artışında önemli başarı elde edilmesi için kaçınılmazdır. Yine son yıllarda sıvı kromatografisi, kütle spektrometrisi, floresan aktiflemeli hücre sınıflandırması (FACS) ve robotik minyatürizasyon bu amaçla kullanılmaktadır. Tetraherz time-domain spektroskopisi, microchamber array chip de biyoteknolojinin darboğaza girmiş problemini çözmede yararlı görülmüştür. Tetrahertz ayırmacılı time-domain spektroskopisi (THz-DTDS) ile de hücrelerin spektroskopik araştırmalarının THz bandında gerçekleştirilmesine olanak vermiştir (Gong et al., 2009).

Ökaryotlarda tekrarlanan sekanslar adaptasyon prosesinde daha önemli rol oynar. Ökaryotik genomların %50'den fazlası değiştirilmiş elementler

içermektedir ve bunlar rekombinasyon noktası olarak iş görebilmekte ve genom-shuffling için etkili bir mekanizma oluşturmaktadır. Aynı yolla, ökaryotik genlerin intron-ekson organizasyonu, protein sahaları genetik rekombinasyon yoluyla protein evriminde hareketli modüller olarak fonksiyon gösteren ekson-shuffling yöntemini kolaylaştırmaktadır (Petri et al., 2004).

Bir genomun esnekliği geliştirilebilirliği ve çevreye adaptasyonu açısından çok önemlidir. Genler ve hatta tüm operonlar intraselüler ve ekstraselüler horizontal gen transferi ile aktarılabilirler. Aynı ortamda yaşayan farklı türdeki bakteriler çevresel streslere dayanabilmek açısından oldukça esnek genoma sahip olmakla birlikte horizontal gen transferine de yatkın türlerdir (Petri et al., 2004).

Genomların esnekliğinin yanında ilgili metabolik ağ sağlamlık açısından bazı kurallara bağlıdır. Network stabilizasyonu için en temel kural, pathway koordinasyonu ve kontrolü ile korunan intraselüler metabolit konsantrasyonların dengesinin sağlanmasıdır. Belli bir bileşiğin yüksek miktarda üretimi intraselüler akışı alarma geçirerek ve dengeyi bozabilir. Her metabolik network herhangi bir eksternal sinyale yanıt olarak dengeye geri dönmek ister (Petri et al., 2004).

Her metabolik mühendisliği yaklaşımında iki farklı esneklik seviyesini çalışmalıdır: Genetik manipülasyon metabolik networkun spesifik kurallara göre kontrol edilebildiği esnek genomik çevrede yapılmalıdır ve istenen fenotipin optimal performansı gösterebilmesi için çevreye kolay adapte olabilmesi evrimsel tasarım stratejilerinde genomik esnekliğin kullanımı ile gerçekleştirilmelidir. Örneğin *Mycoplasma* veya *Chlamydia* genusları veya *Helicobacter pylori* gibi yaşam ortamları gen transferi açısından sınırlandırılmış türler de çevresel streslerle başa çıkmak zorundadır. Bu durumda geniş tekrarlanan kromozomal sekanslar adaptasyonu teşvik etmek için intragenomik rekombinasyonu kolaylaştırmaktadır. Nokta mutasyonları organizmanın performansını sınırlandırmayan ve yüksek endojen mutasyon oranı gözlenmesinde önemli rol oynayabilen yöntemlerden sayılmaktadır (Petri et al., 2004).

1.3.2.3.Fenotip mühendisliğinde genom-shuffling uygulamaları

Genom-shuffling sadece iyileştirilmiş suş elde etmede değil, aynı zamanda çeşitli mikroorganizmaların kompleks regülatör ve metabolik networkleri hakkında veri ve bilgi kaynağı olmaktadır. Bu teknolojiye ürün artırılmasında, suşların toleransının geliştirilmesinde ve substrat kullanımının geliştirilmesinde yararlanılmaktadır (Gong et al., 2009).

1.Hücresel fenotipin geliştirilmesi:

Genom-shuffling endüstriyel açıdan önemli mikrobiyal fenotiplerin hızlı şekilde geliştirildiği etkili bir tüm hücre mühendisliğidir. Günümüzde genom-shuffling'in endüstriyel mikroorganizmalara uygulanmasının temel amacı biyo-ürün artışı sağlamak, çevreye karşı toleransı artırmak ve substrattan maksimum düzeyde faydalanılmasını sağlamaktır (Gong et al., 2009).

a. Üründe artış sağlanması:

Mikroorganizmalar antibiyotik, antitümör bileşikler, immunosüpresanlar, antiviral, antiparazitik ajanlar ve enzim inaktivasyonunu sağlayan bileşikler gibi pek çok biyo-ürünün kaynağıdır. Endüstriyel mikroorganizmaların üretimlerinin artırılması klasik rastgele mutasyondan rasyonel metodlara kadar değişen farklı yöntemlerle yapılmaya çalışılmaktadır. Bunun yanında, artırılan ürünün pek çok özelliği kompleks fenotiptir ve genetik seviyesinde çoklu koordine değişimlere bağlıdır. Klasik yaklaşımlarla çoklu poligenik fenotiplerin tasarlanması, istenen fenotipin başarılı şekilde elde edilmesi için geniş kombinasyonel kütüphanelerin taranması ile gerçekleşebilmektedir. Üstelik, rasyonel yöntemlerin kullanılması kompleks fenotiplerin tasarlanmasında özellikle sekonder metabolitlerde, çoklu genlerin manipülasyonuna bağlıdır. Genom-shuffling teknolojisi kompleks fenotiplerin manüplasyonunda başarılı bir yöntem olarak belirtilmiştir (Gong et al., 2009).

b. Suş toleransının artırılması:

Çevresel tolerans kompleks ve zor anlaşılabilir bir fenotiptir. Bu değişken özellikler ürünlere, substratlara, yan ürünlere ve sıcaklık, pH, solvent gibi prosesin koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Pek çok tolerans fenotipi genomda

dağılmış genlere bağlı olarak poligeniktir. Her istenen fenotipin fenotip-genotip korelasyonu ve bunun birbiri ile etkileşimi zahmetli ve çok hassas işlemlerdir. Bu nedenle fenotipik toleransın klasik yöntemlerle değiştirilmesi göz korkutucu bir konu olmuştur. Diğer yandan, tüm genomun tasarlanması yaklaşımı, karakterize edilmemiş mikroorganizmaların stres toleranslarının artırılmasında pek çok avantaj sağlamaktadır. Genom-shuffling laktobasillerde asit ve glikoz toleransının artırılması, *Candida krusei*'de asetik asit toleransının artırılması, *Streptomyces pristinaespiralis*'te pristinamisin toleransının artırılması ve *Sacc. cerevisiae*'de termotolerans ve etanol toleransının artırılması amaçları ile kullanılmıştır (Gong et al., 2009). Genom-shuffling ile ürünlere ve substratlara karşı tolerans önemli ölçüde artırılabilmiştir.

c.Substrat alımının artırılması:

Fenotip mühendisliğinde substratın etkin şekilde kullanılması istenen bir özelliktir. Substrat alımının geliştirilmesi aynı zamanda kontaminasyon degradasyonunun faydalı hale getirilmesini sağlar. Biyolojik sistemler kendileri için kompleks substratları basit moleküllere dönüştürerek çevresel kontaminasyonun biyodegradasyonuna olanak sağlarlar. Doğadan izole edilen suşlarda degradasyon oranı düşük ve yavaştır. Bu nedenle mikroorganizmalar makromoleküllü substratları degrade etme yeteneğine sahip olmaya ihtiyaç duyarlar (Gong et al., 2009).

2. İstenen fenotipe ait bilginin temin edilmesi:

Suşların iyileştirilmesinin yanısıra genom-shuffling metabolik network ve regülasyonu anlamamızı sağlar. Genom-shuffling, DNA-shuffling'e benzer tekrarlamalı genetik rekombinasyonun kullanılarak tüm genomda değişik pozisyonlarda bulunan simultane değişimlerin oluşması avantajını sağlar. Genetik özelliklerin çoklu başlangıç suşlardan faydalanılarak rekombinasyonu genom-shuffling prosesine komplementer olmaktadır. Shuffling denemelerinde geliştirilen fenotipler değişmiş network regülasyonu, yeniden dengelenmiş akış, değişmiş transport mekanizmaları ve substratın kullanımının artışında değişim göstermektedirler. İstenen fenotipe etki eden genetik faktörler tasarlanmış suşun analizler sonucu değerlendirilmesi ile belirlenebilir. Üretime bağlı değişimlere neden olan genetik varyasyonların bilgisi tasarlanmış fenotipin analizi ile

mümkün olur. Günümüzde birkaç yıl öncesinde tespit edilen genom sekanslamanın yaygınlaşması, transkripsiyonel profillemeye, genetik özelliklerin haritalanması, akış analizi yöntemleri ve biyoinformatik yaklaşımlar, -omics' yaklaşımları tanımlıye edilmiş suşların analizini kolaylaştırmaktadır. Buna bağılı olarak iyileştirilmiş fenotiplerin analizinin ters metabolik mühendisliğinde değerli bir veri olacağı düşünölebilir (Gong et al., 2009).

Birbirinden farklı genlerin manöplasyonunda genom-shuffling kolay ve güvenilir bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. LAB'nin çevresel etkilere karşı toleransı pek çok gen tarafından etkilenmekte ve kontrol edilmektedir (John et al., 2010). Düşük pH gibi bakteri fizyolojisini etkileyen çevresel streslerin etkileri henüz kesin olarak bilinmemektedir. Biyokimyasal, proteomik ve genetik analizler LAB'nin düşük pH'a yanıtının pek çok gen ve enzim aracılığı ile komplike mekanizmalarca kontrol edildiğini göstermektedir (Patnaik et al., 2002).

Tüm genoma shuffling uygulaması pek çok kombinasyon oluşmasını sağlar. İstenen karakteristik özelliğın kesin kombinasyonu füzantlara göre değışiklik gösterir. En uygun füzant suş istenen karakteristik özellikleri maksimum sayıda gösteren suştur. Geliştirilmiş füzantlar arasında uygun suş seçiminin iyi yapılması gerekir. RPF yeni jenerasyonlarda istenen özelliklerin biraraya gelme olasılığını artırmaktadır. Pek çok araştırmaya göre iki veya üç RPF döngüsü sonunda en iyi suşlar elde edilmiştir (John et al., 2010).

1.3.2.4.Bakteriyal genomlarda laktik asit üretimi için shuffling stratejileri

Endüstriyel olarak istenen özelliklere sahip ideal hücrenin hızlı şekilde ve yüksek yoğunlukta büyümesi, durgun fazda bile canlılığını maksimum seviyede koruyabilmesi, ucuz bir substratı kullanması, ilgi odağı olan bir metabolit üretebilmesi gerekmektedir (John et al., 2010).

Genom-shuffling'in etkinliğı, jenerasyon ve protoplast füzyonunun, füzyondan sonra protoplastların tespit edilmesinin, füzyondan sonra elde edilen

diploid veya multiploid hücrelerdeki heterojen kromozomların rekombinasyonunun ve yalnız bir genoma sahip prototrofların ayrılabilmesinin bir fonksiyonudur (John et al., 2010).

Modern teknikler füzantların doğasının ve genetik kompleksitesinin araştırılmasında kolaylık sağlamaktadır. Rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA analizi parental hücre ve füzant arasındaki genetik ilişkinin açıklanmasında kullanılabilir (John et al., 2010).

Genom-shuffling teknoloji ürünü olan suşlar genetik modifiye organizmalar (GMO) olarak düşünülmemektedir. Çünkü bunlar GMO'lara göre en az karakterize edilmiştir. Bu da bu suşların risk oluşturma kapasitelerinin düşük olduğu anlamına gelmektedir. Ancak bu suşların endüstride kullanılmadan önce gerekli risk analizlerinin çok iyi yapılması gerekmektedir (John et al., 2010).

Gram+ bakterilerde hücre duvarı kalın, çok katmanlı peptitlerle örülmüş peptidoglukan (PG), taikoik asit ve polisakkaritler ve bazı türlerde proteinlerin dış tabakasını saran parakristalin tabakası (S katmanı) gibi yapılardan oluşmaktadır. Bu moleküler yapılar bakteriyi tür ve suşa spesifik özellikler ile korumaktadır. Genom sekans projesi, moleküler yöntemler, genomik esaslı metodlar gibi yeni teknikler laktobasillerin fonksiyonel araştırmalarda kullanılabilmesi için gereken adaptasyon ve probiyotik faktörlerin oluşturulmasına katkı sağlamaktadır (Lebeer et al., 2008).

Laktobasiller için birkaç tane kullanılabilir gen ekspresyon sistemi geliştirilmiştir. Kontrollü ekspresyon için kullanılan vektörler temelde bakteriyosin üretimini teşvik eden genler ve promotorlara, şeker kullanım genlerine ve stres rezistansına dayalıdır. Ayrıca spesifik ekspresyon vektörleri kullanılan LAB tarafından üretilen proteinler büyük ölçüde kıvrılmış, targeted ve bazen geri kazanılmış olacaktır.

Genetik manipülasyon bir organizmanın var olan probiyotik özelliklerinin geliştirilmesine veya bir organizmaya probiyotik özellikler yüklenmesine olanak sağlamaktadır. Bir probiyotiğin aktivite mekanizması organizmaların spesifik ve

hedeflenen probiyotik haline dönüştürülmesine olanak sağlamaktadır. Genetik modifiye organizmalara karşı tüketiciler direnç gösterse dahi yakın gelecekte GMO probiyotik ürünlerin kronik hastalıkları önlemedeki etkileri ve potansiyel klinik uygulamalarındaki kolaylık nedeniyle daha kabul edilebilir hale gelecektir. Kolitten korunma amacıyla intestinal mukozada sitokinin IL-10'u dağıtmak için genetik modifiye *Lactococcus lactis*'i kullanılmıştır. Böylelikle probiyotiklerin biyoaktif kimyasallar üretmesi amacıyla dizayn edilebileceği gösterilmiştir (Nagpal et al., 2012).

Kimyasal veya genetik modifikasyonlarla bakteriyosinlerin değiştirilmesi aktivite ve stabilite açısından iyileştirilmiş yeni biyolojik peptitlerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Tek-kalıntı yer değiştirmesi ile gerçekleştirilen sekans modifikasyonlarının doğal bakteriyosinlere göre inhibitör aktivitesinin azaltılması ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Moncheva et al., 2001). Ancak bu durumun genome-shuffling gibi başarılı uygulamaların bakteriyosinlerin üretim miktarlarının artırılması amacıyla kullanılması ile giderilebileceği düşünülmektedir.

L-laktik asit üretimi için nişasta içeren tarım artıklarına dayalı katı substrat fermentasyonu proseslerinde başarı elde edilmiştir. Nişastalı biyokütlenin amilolitik ve laktik asit üretici özelliklere sahip bakterilerce direkt dönüştürülmesi iki basamaklı işlemi ortadan kaldıracak ve ekonomik kazanç sağlayacaktır. Rekombinant DNA meydana getirilerek gerçekleştirilen genetik mühendisliği yaklaşımlarının suş geliştirmedeki direkt rolü ve önemi bilinmekle birlikte, çoklu ve geniş bir bölgeye dağılmış genler ile kontrol edilen savunma mekanizması düşünüldüğü zaman klasik mutagenезin tek yol olduğu söylenebilir. Düşük pH, organizmaların zor koşul istekleri ve yüksek substrat konsantrasyonu gibi zorlayıcı etkiler klasik mutasyon ile büyük ölçüde giderilebilmektedir. Düşük pH 'a dayanıklı mutant *L.delbrueckii* nitröz asit mutasyonu ile elde edilmiş ve amilaz üreticisi *B.amyloliquefaciens* ile genom-shuffling uygulanarak düşük pH'ta büyüeyebilen ve nişastayı direct L-laktik asite dönüştürebilen bir füzant elde edilmiştir. Başlangıç inokulum miktarı kompleks substratların parçalamasında gerekli olan enzimlerin üretimi açısından temel faktör olması nedeniyle ilk sırada yer almakla beraber, yeast ekstrakt ve pepton konsantrasyonu da laktik asit

üretimi önemli ölçüde artırmıştır. Laktik asit birikimi mikroorganizmanın büyümesi için gerekli olan yeterli amino asit sağlaması açısından pepton konsantrasyonundaki artışla direkt ilişkilidir. İki round genom-shuffling sonunda substrat ihtiyacının azaltıldığı, buna karşılık laktik asit üretiminin artırıldığı görülmüştür. *L.delbrueckii* mutantına *Bacillus*'tan gelen nişasta parçalayan enzim geni aktarılmıştır. Yabani tipte amilaz geni yokken füzantta gözlenmiştir. Genom shuffling etkinliği füzyondan sonra rejenere olan protoplastların ve yine füzyondan sonra elde edilen diploid ya da mutiploid hücreler arasındaki heterojen kromozom rekombinasyonuna ve sonuçta sadece bir genom içeren doğru prototrofların ayırımına bağlıdır. Patnaik (2002)'e göre popülasyonların başarılı şekilde geliştirilmesi başarılı genom shuffling'e bağlıdır. LAB genellikle büyüme ve gelişmeleri için vitaminler, amino asitler vs. gibi kompleks besin ihtiyacı olan mikroorganizmalardır (John et al., 2008a).

Genetik mühendisliğinin süt endüstrisinde faydalı olabilmesi, süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılan LAB'nin genetik modifikasyonu ile gerçekleştirilebilmektedir. Geçtiğimiz 20 yılda laktokoklar en fazla araştırma yapılan LAB'lerinden olmakla birlikte, günümüzde insan sindirim sisteminde yer alan laktobasiller ve bifidobakterler de çeşitli araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. LAB ile ilgili kromozomal genetik çalışmaları da hız kazanan konular arasındadır. Bu suşlardan pek çoğunun fiziksel ve genetik haritası ortaya çıkarılmıştır. PCR kullanılarak 16s ve 23s rRNA genlerinin büyük alanlarının sekanslanması (RAPD-PCR) ve genomik restriksiyon desenlerini ortaya çıkarmak için darbeli saha jel elektroforezi (PFGE) kullanımı suş tanımlama ve sınıflandırmada sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir. Tüm bunlar probiyotiklerin klinik denemelerde kullanımı ve GI sistemdeki etkilerinin incelenebilmesi açısından oldukça önemli gelişmelerdir (Soomro et al., 2002).

Suş tasarlamada en önemli hedef doğal olarak üretilen ürünün volümetrik olarak üretiminin artırılmasıdır, yani belli bir zaman içinde ürün hacminde meydana gelen artışın belirlenmesidir. Pek çok doğal suş sekonder metabolitleri oldukça az miktarda üretmektedir (10-100 mg/L), ancak geliştirilmiş endüstriyel suşlarda bu üretim artırılmıştır (10g/L) (del Cardayré, 2005).

Genom-shuffling yeni biyoteknolojik ürün ortaya çıkarma fikrinden optimize edilmiş, son ürün oluşana kadarki tüm prosedürü içeren ve endüstride zaman sıkıntısını ortadan kaldırmaya yarayan bir tekniktir. Patnaik ve Zhang bu yöntemi kullanarak endüstriyel öneme sahip iki tür mikroorganizmanın kısa süre içinde geliştirilmesini sağlamışlardır. *Streptomyces fradiae*'nin tilozin üretim miktarı ve *Lactobacillus*'un düşük pH'ta laktik asit üretim miktarı önemli ölçüde artırılmıştır (Petri et al., 2004).

2. MATERYAL METOD

2.1. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Besi Ortamları

2.1.1. Kullanılan mikroorganizmalar

2.1.1.1. Kullanılan test bakterileri

G1: *Lactobacillus gasseri* NRRL B-4240

G2: *Lactobacillus gasseri* NRRL B-14168

G3: *Lactobacillus gasseri* ATCC 9857

G4: *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992

5: *Lactobacillus gasseri* JCM 11046 (LA158)

6: *Lactobacillus gasseri* JCM 11657 (LA39)

2.1.1.2. Kullanılan indikatör mikroorganizmalar

LBB: *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus* (NRRL B-548)

Lactobacillus delbrueckii subsp.*bulgaricus* (JCM 1002)

Bacillus cereus ATCC10876

Enterococcus faecalis ATCC29212

Staphylococcus aureus ATCC6538

Salmonella typhimurium ATCC14028

2.1.1.3. Kullanılan bakteri boyama yöntemleri

Araştırmada kullanılan test bakterileri, indikatör suşlar, protoplastlar, rejenere olmuş protoplastlar ve füzantların mikroskopik incelemelerinde basit boyama, gram boyama ve negatif boyama teknikleri kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan besi ortamları

FTS (Fizyolojik Tuzlu Su): 1000ml saf su içerisine %0.85 NaCl eklenerek hazırlanmış ve tüplere 9'ar ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

BHI Broth-Agar (Brain Hearth Infusion Broth-Agar): Difco'nun hazır besi ortamı kullanılmıştır. Hazır besi ortamından 35 g tartılarak 1000ml saf su ile karıştırılmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra 55°C'ye soğutularak petrilere dökülmüştür. Besi ortamı bileşimi (1000ml için):

Brain heart, infusion from (solids).....	6.0 g
Peptic digest of animal tissue	6.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Dextrose	3.0 g
Pancreatic digest of jelatin	14.5 g
Disodium phosphate	2.5 g

NYG Broth-Agar (Nutrient Yeast Glikoz Broth-Agar): Merck'in hazır Nutrient brot besiyerine %0.3 yeast extract ve %0.5 glikoz ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazır besi ortamından 62.5 g tartılmış, %0.3 yeast extract ve %0.5 glikoz ilave edilerek 1000ml saf su ile karıştırılmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra 55°C'ye soğutularak petrilere dökülmüştür. Hazır besi ortamı bileşimi (1000ml için):

Peptone from meat	5,0 g
Meat extract	3,0 g

MRS Broth-Agar (Man de Rogosa Sharpe Broth-Agar): Merck'in hazır besiyeri kullanılmıştır. Hazır besi ortamından 52.2 g tartılarak 1000ml saf su ile karıştırılmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra 55°C'ye soğutularak petrilere dökülmüştür. Besi ortamı bileşimi (1000ml için):

Peptone from casein	10,0 g
Meat extract	8,0 g

Yeast extract	4,0 g
D(+) Glucose	20,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
Tween 80	1,0 g
di-Ammonium hydrogen citrate	2,0 g
Sodium acetate	5,0 g
MgSO ₄	0,2 g
MnSO ₄	0,04 g

TS Broth-Agar (Tryptic Soy Broth-Agar): Merck'in hazır besiyeri kullanılmıştır. Hazır besi ortamından 30 g tartılarak 1000ml saf su ile karıştırılmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra 55°C'ye soğutularak petrilere dökülmüştür. Besi ortamı bileşimi (1000ml için):

Peptone from casein	17,0 g
Peptone from soymeal	3,0 g
D(+) Glucose	2,5 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g

MH Broth-Agar (Müller Hilton Broth-Agar): Merck'in hazır besiyeri kullanılmıştır. Hazır besi ortamından 21 g tartılarak 1000ml saf su ile karıştırılmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra 55°C'ye soğutularak petrilere dökülmüştür. Besi ortamı bileşimi (1000ml için):

Meat infusion	2,0 g
Casein hydrolysate	17,5 g
Starch	1,5 g

RM Agar (Regeneration Medium Agar): Tween-80 çıkarılmış MRS baz içine eklenen sukroz, jelatin ve agar belli bir sıcaklığa kadar ısıtılarak karıştırılmış ve erimesi sağlanmıştır. Karışım otoklavlanmış, CaCl₂ ve MgCl₂ ise steril filtreden geçirildikten sonra 55°C'ye soğutulmuş olan besiyeri karışımına eklenmiştir. Besi ortamı bileşimi (1000ml için):

Tween 80 çıkarılmış MRS agar,
 20 mM MgCl₂,
 %2.5 jelatin,
 0.5 M süktroz,
 %0.5 BSA (steril ve sıcaklıkla inaktive edilmiş BSA).

LPB (Lactobacillus Protoplast Buffer): Tampon bileşimi (1000ml için):

10mM Tris-HCl, pH 6.8,
 20 mM CaCl₂
 0.5 M süktroz

2.2. Antibakteriyal Aktivite Denemeleri

2.2.1. Bakteriyal konsantrasyonun ayarlanması

2.2.1.1. Spektrofotometrik ölçüm

Cary 50 Bio UV-Visible spektrofotometresi ile 560 nm dalga boyunda ölçülen absorbans ile bakteri konsantrasyonları ayarlanmıştır. Bunun için bakteri kültürünün içinde geliştirildiği ortamdan (sıvı besi ortamı, tampon, su, vs.) yaklaşık 2-3 ml kadar spektrofotometrenin kuvars küvetine konarak cihaza yerleştirilmiş ve 560 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Sıfır ayar butonu ile sıfırlama yapıldıktan sonra vortex ile iyice karıştırılmış bakteri kültürlerinden alınan 2-3 ml örnek kuvars küvetlere konmuş ve 560 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülerek kaydedilmiştir.

2.2.1.2. Koloni sayım yöntemi

Çalışmada kullanılan indikatör mikroorganizmalar ile test organizmaları için klasik sayım yöntemleri kullanılmıştır. Buna göre ml'deki koloni sayısı belirlenecek her bir mikroorganizma için aktif kültürden alınan 1 ml örnek 9 ml FTS içerisine aktarılmış ve vortexle iyice karıştırılmıştır. Bu karışımdan alınan 1ml örnek tekrar 9 ml FTS içerisine aktarılmış ve bu işleme 10⁻⁷. seyreltmeye

kadar devam edilmiştir. Daha sonra FTS ile yapılmış olan 10^{-7} ., 10^{-6} ., 10^{-5} . ve 10^{-4} . seyreltmelerinden alınan 100'er µl örnek *Lactobacillus* için MRS agar petrilere, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* için NYG agar, TSA ve MH agar petrilere inoküle edilmiş ve L-bageti ile yayma plaka ekim gerçekleştirilmiştir. *Lactobacillus* için 37°C'de %0.5 CO₂ içeren inkübatörde (Sanyo CO₂ Incubator MCO 17 AIC), *Bacillus cereus* için 30°C'deki, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* için ise 37°C'deki inkübatörde 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Her örneğin her bir seyreltmesi için iki paralel olacak şekilde ekim yapılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir petride gelişen koloniler sayılmış ve paralel ekim petrilерinin sayım sonuçlarının ortalaması alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.2.2. Bakteri kültürlerinden süpernatant eldesi

Test bakterilerinden süpernatant eldesi Toba et al. (1991)'a göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre G1, G2, G3 ve G4 suşlarının 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 18, 24, 48, 72 veya 96 saatlik inkübasyonları sonunda elde edilen kültürler ile LA158 ve LA39 suşlarının 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 18 ve 24 saatlik inkübasyonları sonunda elde edilen kültürler +4°C'de 650xg (2460 rpm)'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantın pH'ı 1M NaOH'ten yeterli miktarda eklemek suretiyle 6.8'e ayarlanmıştır. pH ayarlamasından sonra süpernatant 0.22µm por çapına sahip membran filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Steril ve NaOH ile pH'ı ayarlanmış süpernatantların yarısı liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve diğer yarısı da steril eppendorf tüpleri içerisinde -20°C'de stoklanmıştır.

2.2.3. Liyofilizasyon

Liyofilizasyon işlemi liyofilizatörde (Edwards E2M2 67148) Itoh et al. (1995)'a göre gerçekleştirilmiştir. 2.2.2.'de belirtilen şekilde hazırlanan süpernatantlar, taban yüzeyinin geniş tutulması ve daha etkin bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmesi amacıyla; 250ml'lik erlenler içerisinde, ağzı stretch film ile kapatılıp üzerinde ince delikler açılarak cihazın haznesine yerleştirilmiştir.

Cihazın haznesine yerleştirilen örneklerin tamamen kuruması sağlanmıştır. Liyofilizasyon tamamlandıktan sonra her bir örnek üzerine 4 ml MRS broth eklenerek örneğin brot içerisinde tamamen erimesi sağlanmıştır. Örnekler 0.22µm por çapına sahip membran filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Steril liyofilize süpernatantlar steril eppendorf tüpleri içerisinde -20°C’de stoklanmıştır. Liyofilizasyon süresi yaklaşık 60 saat olarak tespit edilmiştir.

2.2.4. Agar kuyucuk yöntemi

2.2.4.1.Besi ortamına indikatör mikroorganizmanın inokülasyonu

Steril %0.7 agarlı besi ortamı 50°C’ye kadar soğutulduktan sonra, 1 gecelik aktif kültürlerin FTS ile yapılan 10^{-1} .seyreltmesinden 0.25ml (250µl) besi ortamına eklenerek karıştırılmıştır. Petrilere dökülen besi ortamı katılaştıktan sonra steril mantar delici ile 5mm çapında kuyucuklar açılarak her bir kuyucuğa 50 µl süpernatant eklenmiş ve *Lactobacillus bulgaricus* 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde, *Bacillus cereus* 30°C’deki inkübatörde, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* ve *Staphylococcus aureus* ise 37°C’deki inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda inkübatörden çıkartılan besi ortamları her bir kuyucuğun etrafında oluşan berrak zon çapının mm olarak ölçümü ile değerlendirilmiştir.

2.2.4.2.Besi ortamı yüzeyine indikatör mikroorganizmanın inokülasyonu

Bu yöntemde indikatör mikroorganizmanın bir gecelik aktif kültüründen FTS içerisinde gerçekleştirilen 10^{-1} ., 10^{-2} ., 10^{-3} . ve 10^{-4} . seyreltmelerinden alınan 100µl örnek katılan %0.7 agarlı besi ortamı üzerine (L-baget) drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Kuyucuk açma işlemi ile diğer işlemler 2.2.4.1.’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.3.Besi ortamı yüzeyine indikatör mikroorganizmanın öze ile inokülasyonu

Bu yöntemde indikatör mikroorganizmanın bir gecelik aktif kültüründen FTS ile hazırlanan çeşitli seyreltmelerinden alınan bir öze dolusu aktif kültür besisi ortamı yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde yayılarak 1 saat kuruması beklenmiştir.

2.2.5. Disk diffüzyon yöntemi

Bu yöntemde indikatör mikroorganizmanın bir gecelik aktif kültüründen FTS içerisinde gerçekleştirilen 10^{-1} ., 10^{-2} ., 10^{-3} . ve 10^{-4} . seyreltmelerinden alınan 100µl örnek, katılaştıran %1.5 agarlı besisi ortamı üzerine (L-bağı) drigalski spatülü ile yayma plaka yöntemine göre inoküle edilmiştir. Petriler kültürün agara nüfuz etmesi için oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Steril alüminyum folyo üzerine ölçümü yapılacak test bakterileri veya füzant süpernatantları ile liyofilize süpernatantlarının sayısı kadar disk (13mm çapına sahip Schleicher& Schüll Antibiotica-Testblättchen 2668/2) yerleştirilmiştir. Diskler üzerine 100'er µl süpernatant örneği aktarılmış ve diskler steril pens ile petriler üzerine yerleştirilmiştir. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.3. Genom-Shuffling

2.3.1. Protoplast izolasyonu ve rejenerasyonu

2.3.1.1.Protoplast izolasyonu için kültür konsantrasyonunun ayarlanması yöntem-1

Başlangıç bakteri konsantrasyonu 2.2.1.1. ve 2.2.1.2.'de belirtildiği gibi spektrofotometrik ölçümler ve koloni sayım yöntemleri ile ayarlanmıştır. Buna göre laktobasil hücreleri MRS brot içinde 24 saat 37°C'de 50 ml'lik kapaklı tüpte büyütülmüştür. Daha sonra 30 ml %1.2 glisin içeren, ön ısıtma yapılmış MRS

broth içerisine 24 saatlik aktif kültürlerden %10 oranında inokülasyon yapılmıştır. Bu kültürler 37°C'deki CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmış ve kültürün konsantrasyon artışına bağlı olarak belirli aralıklarla spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Hücreler 37°C'de 560 nm dalga boyunda absorbans değeri 0.7 olana dek (1x10⁷ kob/ml) büyütülmüştür. Ölçümlerde cihazın sıfır ayarı kültür inoküle edilmemiş MRS broth ile gerçekleştirilmiştir.

2.3.1.2.Protoplast izolasyonu için kültür konsantrasyonunun ayarlanması yöntem-2

Bu yöntemde 2.3.1.1.'den farklı olarak, 24 saatlik kültürlerden 2.2.1.2.'de belirtildiği gibi koloni sayımı yapılmış ve kültürler +4°C'de, 3000 rpm'de, 20 dk. santrifüjü edilerek pellet elde edilmiştir. Pellet LPB ile seyreltilmiş ve bu süspansiyondan belli miktarlarda alınarak spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. 560 nm dalga boyunda gerçekleştirilen absorbans ölçümleri sonucunda pellet süspansiyonunun konsantrasyonu 0.7-1.2 absorbans olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu yönteme göre cihazın sıfırlanması LPB ile gerçekleştirilmiştir.

2.3.1.3.Protoplast izolasyon prosedürü

Protoplast izolasyonu ve rejenerasyonu bazı modifikasyonlar yapılarak Coccinelli et al. (1986); Morelli et al. (1987) ve Patnaik et al. (2002)'a göre gerçekleştirilmiştir. Protoplast jenerasyonu, protoplast formasyonu ve protoplast rejenerasyonu olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Bunun için bakteri konsantrasyonu ayarlanmış kültürler veya 2.3.1.2.'e göre hazırlanan pellet süspansiyonları buzda soğutulmuş, 4500xg'de 10 dk. santrifüjü edilmiş ve 4°C'deki steril destile su ile yıkanmıştır. Hücreler içinde 10mg/ml lizozim (AppliChem, 8DO10196) ve 30g/ml mutanolisin (Sigma, M9901, *Streptomyces globisporus*'tan elde edilmiş)bulunan 4ml laktobasil protoplast tamponu (LPB) içinde tekrar süspanse hale getirilmiş ve 2 saat 37°C'de hafif çalkalama hızında muamele edilmiştir.

Protoplast formasyonu 37°C'de 2 saat inkübasyon sonunda ışık mikroskobu ile gözlenmiştir. Sonrasında protoplastlar 4500xg'de santrifüjlenmiş, 4 ml LPB'de tekrar süspanse edilmiş, aynı tampon ile seyreltildikten sonra rejenerasyon gerçekleşmesi için RM agara ekim yapılmıştır (Patnaik et al.,2002).

2.3.1.4.Protoplast rejenerasyon prosedürü

2.3.1.3.'e göre hazırlanan protoplastlar RM agarda 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 2-3 gün inkübasyon sonunda kontrol edilmiştir. Osmotik olarak dirençli hücreler protoplastların destile su ile seyreltildikten sonra MRS agara ekilmesi ile belirlenmiştir. Protoplast formasyon sıklığı ve rejenerasyon sıklığı Yu et al. (2008)'a göre hesaplanmıştır.

Bundan sonra rejenere olmuş protoplastların RM agardan alınması gerekmektedir. Rejenere olan protoplastlar karakterizasyon için çeşitli analizlere tabi tutularak sonraki denemelerde kullanılmak üzere seçilmiştir (Patnaik et al., 2002).

Protoplast formasyon sıklığı hesaplama formülü:

$$\text{Protoplast formasyon} = \frac{\text{RM agardaki koloni sayısı (kob/ml)} - \text{Osmotik dirençli hücre sayısı (kob/ml)}}{\text{RM agardaki koloni sayısı (kob/ml)}}$$

Rejenerasyon sıklığı hesaplama formülü:

$$\% \text{ Rejenerasyon} = \frac{\text{RM agardaki koloni sayısı (kob/ml)} - \text{Osmotik dirençli hücre sayısı (kob/ml)}}{\text{Başlangıç hücre sayısı (kob/ml)}}$$

2.3.2. Rejenere olan protoplastların füzyon için seçilmesi

2.3.2.1. Rejenere olan protoplastların CaCO_3 içeren MRS agardaki zon çapları

Rejenere olan protoplastların CaCO_3 içeren MRS agar besiyerinde laktik asit oluşturma kapasiteleri açısından değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir (John et al., 2008a). Bunun için MRS agar besi ortamı hazırlanırken %0.3 ve %1.5 oranında CaCO_3 ilave edilmiştir. Besi ortamı 121°C 'de 15 dk sterilize edildikten sonra, petrilere aktarılırken manyetik karıştırıcı kullanılmak suretiyle karıştırılarak homojen bir CaCO_3 dağılımı sağlanmıştır. Katılaştıran besi ortamları, ekimi yapılan kültürlerdeki kolonilerin laktik asit oluşumu açısından incelenmeleri amacıyla kullanılmıştır. RM agarda rejenere olan protoplastlar öze yardımıyla alınarak MRS brotta 18-24 saat inkübe edilmiş ve bu kültürlerden seri dilüsyonlar yapılarak CaCO_3 içeren MRS agara yayma ekim yöntemi ile aktarılmıştır. 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 48 saatlik inkübasyon sonunda koloniler etrafında oluşan berrak zon büyüklüklerine göre değerlendirme yapılmıştır.

2.3.2.2. CaCO_3 içeren MRS agardan seçilen kolonilerin antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi

Bu denemelerde indikatör olarak *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002)'un 10^{-1} seyreltmesi kullanılmıştır. Bu bakteri için 2.2.1.1.'e göre yapılan ölçümlerde, 560 nm dalga boyundaki absorbansı 10^0 için 2.8470, 10^{-1} için 0.7604, 10^{-2} için 0.0786, 10^{-3} için 0.0077 ve 10^{-4} için ise 0.0024 olarak belirlenmiştir. 2.2.1.2.'ye göre yapılan koloni sayım sonuçları ise 145×10^6 'dır.

JCM 1002 indikatörü ile 2.2.5.'e göre petrilere ekim gerçekleştirilmiş ve 2.3.2.1.'e göre seçilen kolonilerin 24 saatlik aktif kültürlerinden çapı 13mm olan disklerle 100µl aktararak disk difüzyon denemesi yapılmıştır. Kullanılan kültürler 2.2.2'ye göre santrifüjlenerek $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmış ve deneme sonunda iyi zon

veren kültürlerle ait süpernatantlarda pH ayarlaması yapılarak yarısı steril filtreden geçirilmiş, yarısı da liyofilize edilmiştir.

2.3.2.3. Seçilen kolonilerden elde edilen süpernatantların antibakteriyal aktivite ölçümleri

2.3.2.2.'de belirtilen yöntemle indikatöre karşı iyi zon veren aktif kültürlerden 2.2.2.'ye göre elde edilen süpernatantlar ile 2.2.3.'e göre elde edilen liyofilize süpernatantların indikatöre karşı aktiviteleri oluşturduları zon çapına bağlı olarak değerlendirilmiştir. Denemeler 2.2.5.'e göre gerçekleştirilmiş ve çapı 13mm olan diskler kullanılmıştır.

2.3.3. Protoplast füzyonu

Protoplast füzyonu Patnaik et al. (2002)'a göre gerçekleştirilmiştir. Protoplast preparatları arasında füzyon oluşturulması için her bir popülasyondan eşit miktarda alınarak karıştırılmış ve karışım 4500Xg'de 10 dk santrifüjlenerek 50µl LPB içinde tekrar süspanse edilmiştir. Bu süspanسیون içine LPB içinde 9 volüm %60'lık PEG 6000 eklenip karıştırılmış ve 6 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerine 5 ml LPB eklenerek santrifüjlenmiş ve LPB ile tekrar yıkanarak 100µl LPB içinde süspanse edilmiştir. Sonrasında seri dilüsyonlar halinde RM agarda ekimleri yapılarak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bırakılmıştır. RM agardan alınan ve iyileştirilmiş özelliklere sahip oldukları düşünülen suşlar bir sonraki füzyonu gerçekleştirmek üzere stoklanmıştır. Bu suşlar füzyant havuzunu oluşturmuştur (F1-F2). Protoplastların oluşumu, füzyonu ve rejenerasyonu, rejenere hücre havuzundaki hücreler inokulum olarak kullanılmak üzere üç kez tekrarlanmıştır. Non-shuffled kontroller de aynı prosedürde PEG kullanılmadan yapılmıştır (Patnaik et al., 2002). Non-shuffled kontrol suşu (A+T) RM agara yapılan seri ekimlerden 10⁻² seyreltme petrisinden seçilen bir koloninin MRS brot içerisinde 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 18 saat inkübasyona bırakılması ile elde edilmiştir. Aktif kültür %20 gliserol içeren kriyojenik tüplere aktararak daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

2.4. Füzanıt Süpernatantlarının Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.4.1. Enzim denemeleri

Füzanıtların karakteristik özelliklerinin belirlenmesine yönelik denemeler bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir (Karaoğlu vd., 2003; Oh et al., 2000). Bu denemelerde süpernatantın protein yapılı olup olmadığının tespiti için Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nden temin edilen tripsin enziminden yararlanılmıştır. Füzanıt süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin füzanıtın ürettiği H₂O₂'den kaynaklanmadığının kesinleşmesi amacıyla ise katalaz enzimi kullanılmıştır (Sigma C-9322). Enzimlerle muamelede final enzim konsantrasyonu 0.1 mg/ml olacak şekilde ayarlanmış ve örnekler 37°C'de 1 saat tutulmuştur. Sonrasında hemen 65°C'deki su banyosunda 35 dk ısıtıl işlem gerçekleştirilmiş ve örnek içerisindeki enzimlerin inaktivasyonu sağlanmıştır. Soğutulan örnekler 2.3.2.2.'de belirtilen indikatöre karşı antibakteriyal aktivite açısından 2.2.5.'e göre incelenmiştir (Oh et al., 2000).

2.4.2.Sıcaklık denemeleri

Sıcaklık denemeleri de Karaoğlu et al. (2003)'na göre gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde incelenecek süpernatantlardan 100 µl 60, 70, 80, 90°C'lerde 10 dk ve 100°C'de 10, 30 ve 60 dk su banyosunda bekletilmiştir. Sonrasında hemen soğutulan örnekler 2.3.2.2.'de belirtilen indikatöre karşı antibakteriyal aktivite açısından 2.2.5.'e göre incelenmiştir.

2.5. Füzanıtların Genetik Analizleri

2.5.1DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için LA39, LA158, 2-6, 2-20, 2-41, 2-45, 3-B2, 3-B3, 3-C1 ve 3-C6 örnekleri kullanılmıştır. DNA izolasyonu Instagene Matrix (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için; katı besi ortamında 48 saat

geliştirilen kültürlerden birer koloni seçilmiş ve 1ml steril dH₂O içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenizat 1-2 dk 10000 rpm hızda santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve manyetik karıştırıcıda karıştırılmakta olan Instagene Matrix'ten 200µl eklenerek 56°C'da 15-30dk bekletilmiştir. Süre sonunda 10dk yüksek hızda vortex ile karıştırılan örnekler 8 dk 96-100°C'de bekletilmiş, sonrasında ise 10 sn yüksek hızda vortex ile karıştırılmıştır. 10000rpm'de 2-3 dk santrifüj yapıldıktan sonra örneğin üst fazından 2µl alınarak PZR analizi için kullanılmıştır. Gerekli örnek alındıktan sonra tüpler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.5.2. Primer PZR programı seçimi

PZR analizi için *gaA* ve *gaT*'ye spesifik primerler (Sentromer) kullanılmıştır. PZR analizi için kullanılacak örneklerin 2.5.1.'de anlatıldığı şekilde DNA izolasyonları yapılmış ve üst fazdan 20µl PZR reaksiyonu için 2µl DNA örneği alınmıştır. *gaA* spesifik primer ile gerçekleştirilecek PZR reaksiyonu için 250µl, ve *gaT* spesifik primer ile gerçekleştirilecek PZR reaksiyonu için 250µl olmak üzere iki farklı karışım hazırlanmıştır. PZR reaksiyonu için hazırlanan karışımın formülü ve primerler aşağıdaki gibidir:

Primerler:

Gasserisin A:

Beklenen uzunluk 102 bp

gaA-515 (Forward) T_m 49·2°C GAC CAC AGC GAA CAT T

gaA-616 (Reverse) T_m 49·2°C AAT GAG GCA CCA GAA G

Gasserisin T:

Beklenen uzunluk 126 bp

gaT-950 (Forward) T_m 61·4°C GGA GTA GGT GGA GCG ACA GT

gaT-1075 (Reverse) T_m 59·4°C TCC ACC AGT AGC TGC CGT TA

Liyofilize haldeki primerler prospektüse göre sulandırılarak ana stok primer çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stoktan hazırlanan ve PZR reaksiyonunda

kullanılacak olan ikinci stok çözelti için 2µl primer ve 8µl dH₂O karışımı kullanılmıştır. PZR karışım formülü:

DNA	:	2µl
PZR Tampon (10X + KCl + MgCl ₂):		2µl
MgCl ₂ (25mM)	:	1.6µl
d NTP (10mM)	:	0.4µl
Primer (F) (20pmol)	:	0.4µl
Primer (R) (20pmol)	:	0.4µl
Taq polimeraz (5U/ µl)	:	0.16µl
d H ₂ O	:	14.4µl

PZR ürünlerinden 5µl alınarak üzerine 2 µl 6X yükleme tamponu (%0.05 Xylene cyanol, %50 gliserol, 0.1M EDTA, ddH₂O) eklenmiştir ve örnekler 1XTE (100 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA - pH 8 içerir, 10X olacak şekilde 1 litre olarak bulunur, 1X olarak kullanılır) tampon içerisinde hazırlanan %1'lik %1 safe view içeren agaroz jelde 80 Voltta 35 dk yürütülmüştür. Baz büyüklüğü tespiti için 100 bp'lık marker kullanılmıştır. Süre sonunda jel UV ışığı üzerinde incelenmiştir.

PZR ürünleri Majhenič et al. (2003)'ın belirttiği koşullar sağlanarak PZR analizine alınmıştır. Gerekli koşullar Çizelge 2-1'de belirtilmiştir ve her PZR analizi için 35 döngü sağlanmıştır.

Çizelge-2.1: *gaA* ve *gaT* için PZR amplifikasyon koşulları

	<i>gaA</i>	<i>gaT</i>
Başlangıç basamağı	94°C/3dk	94°C/3dk
Denatürasyon	94°C/1dk	94°C/1dk
Bağlanma	45°C/30sn	58°C/30sn
Uzama	72°C/30sn	72°C/30sn

3. BULGULAR

3.1. Kültür Süpernatantlarının Antibakteriyal Aktivite Sonuçları

3.1.1. Agar-well sonuçları

Test bakterileri olan G1, G2, G3, G4, A ve T suşlarının indikatör organizmalar olan *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhumirium* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a karşı etki spektrumları agar-well yöntemi kullanılarak 3 farklı deneme ile tespit edilmiştir. Birinci denemede ve ikinci denemelerde G1, G2, G3 ve G4 suşlarının *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella typhumirium*'a karşı etkisi incelenmiş; üçüncü denemede ise *Lactobacillus gasseri* LA158 (gasserisin T üreticisi) ve *Lactobacillus gasseri* LA39 (gasserisin A üreticisi)'un *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a karşı etkisi incelenmiştir.

3.1.1.1. Birinci deneme sonuçları

1.Denemede G1, G2, G3 ve G4 suşlarının süpernatantları 2.2.2.'e göre hazırlanmış ve dört farklı bakteriye karşı 2.2.4.1.'e göre agar-well yöntemi kullanılarak antibakteriyal aktivite açısından denemeye alınmıştır. Bu denemede G1, G2, G3 ve G4 suşlarının 24 saatlik kültürlerinden elde edilen süpernatantlar kullanılan dört farklı indikatörün bir gecelik aktif kültürlerinin 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltmelerinden inokülasyon yapılan petrilere açılan kuyucuklara 50'şer µl olarak aktarılmıştır. G3 ve G4 kültür süpernatantları indikatörlere karşı inhibisyon zonu oluşturmamış, bu nedenle bu iki test bakterisinin 48 saatlik aktif kültürlerinden elde edilen süpernatantları da denemeye alınmıştır. Sonuçlar incelenmiş ve indikatör bakterilerin 10^{-2} seyreltme kültürlerinde elde edilen inhibisyon zonları daha belirgin olduğu için bu seyreltmeye göre değerlendirme yapılmıştır.

Kullanılan indikatör organizmaların aktif kültürlerinin sayıları koloni sayım yöntemine göre belirlenmiştir. Başlangıç sayılarının tespiti, indikatör bakterilere karşı süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları arasında karşılaştırma yapılabilmesi açısından önemlidir. Bir gecelik aktif indikatör kültürleri için sayılar; *Bacillus cereus* için 1×10^5 kob/ml, *Enterococcus faecalis* için 2×10^6 kob/ml, *Staphylococcus aureus* için $1,7 \times 10^6$ ve *Salmonella typhimurium* için ise $7,5 \times 10^5$ kob/ml'dir. Test organizmalarının aktif kültürlerinin sayıları ise *Lactobacillus gasseri* 4240 (G1) için $2,1 \times 10^7$ kob/ml, *Lactobacillus gasseri* 14168 (G2) için 2×10^6 kob/ml, *Lactobacillus gasseri* 9857 (G3) için 24 saatlik aktif kültürdeki bakteri sayısı $1,2 \times 10^8$ ve 48 saatlik aktif kültürdeki bakteri sayısı $1,4 \times 10^7$ kob/ml, *Lactobacillus gasseri* 19992 (G4) için 24 saatlik aktif kültürdeki bakteri sayısı $1,1 \times 10^8$ ve 48 saatlik aktif kültürdeki bakteri sayısı $1,5 \times 10^7$ kob/ml'dir. Deneme sonunda indikatörlere karşı gözlenen etki düzeyleri kuyucuklar etrafında oluşan zon çapı büyüklüğüne bağlı olarak -, +, ++ ve +++ etki düzeylerine göre değerlendirilmiş ve Çizelge-3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge-3.1: İndikatörlere karşı 1.denemede gözlenen etki

Suş adı	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
G1	-	-	++	—
G2	-	-	+	—
G3-24	-	-	—	—
G3-48	-	-	+++	—
G4-24	-	-	—	—
G4-48	-	-	+	—

G1, G2, G3 ve G4 kültür süpernatantlarının *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı kullanıldığı denemelerde *Bacillus cereus*'ta daha belirgin düzeyde olmak üzere, kuyucuklar etrafında yoğun şekilde bakteri üremesi gözlenmiştir. Bu nedenle zon oluşumu tespit edilememiştir.

İndikatör olarak *Enterococcus faecalis*'e karşı G1, G2, G3 ve G4 kültür süpernatantlarının kullanıldığı denemelerde ise; G1 süpernatantında ++; G2 süpernatantında + düzeyinde inhibisyon zonu gözlenmiş, ancak G3 ve G4 süpernatantlarında zon görülmemiştir. Bu iki suşun 48 saatlik kültürlerinden elde edilen süpernatantlar ile yapılan denemede ise 48 saatlik G4 kültür süpernatantında +; 48 saatlik G3 kültürsüpernatantında ise +++ büyüklüğünde inhibisyon zonu elde edilmiştir. *Salmonella typhimurium* kullanılarak gerçekleştirilen denemelerin hiçbirinde zon gözlenmemiştir.

3.1.1.2. İkinci deneme sonuçları

2.denemede G1, G2, G3 ve G4 test bakterilerinin farklı inkübasyon süreleri sonunda elde edilen süpernatantlarının farklı pH değerlerinde indikatör bakterilerle karşı nasıl etki göstereceği incelenmiştir. G1, G2, G3 ve G4 test bakterilerinin 18, 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyonları sonunda elde edilen süpernatantlar sırasıyla 3; 5 ve 6.8 pH'a ayarlanarak *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus*'un bir gecelik aktif kültürlerinden elde edilen 10^{-2} seyreltmelerine karşı 2.2.4.1.'e göre agar-well yöntemi kullanılarak antibakteriyal aktivite açısından test edilmiştir. *Bacillus cereus*, 1. denemede kuyucuklar etrafında yoğun bakteri üremesi göstermesi nedeniyle indikatör olarak kullanılmamıştır. Çizelge-3.2'de G1, G2, G3 ve G4 test bakterilerinin 18, 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyonları sonunda elde edilen süpernatantlarının 3; 5 ve 6.8 pH'a ayarlanması ile ilgili kodlamaya yer verilmektedir.

Test organizmalarının sırasıyla 18, 24, 48, 72 ve 96 saatlik kültürlerindeki bakteri sayıları; *Lactobacillus gasseri* 4240 (G1) $2,5 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $6,4 \times 10^7$, $9,6 \times 10^7$, $5,5 \times 10^6$ kob/ml, *Lactobacillus gasseri* 14168 (G2) $1,8 \times 10^8$, $6,5 \times 10^7$, $5,9 \times 10^7$, $4,9 \times 10^6$, $3,3 \times 10^6$ kob/ml, *Lactobacillus gasseri* 9857 (G3) 2×10^8 , $1,2 \times 10^8$, $7,2 \times 10^7$, $1,3 \times 10^7$, $6,8 \times 10^6$ kob/ml, *Lactobacillus gasseri* 19992 (G4) $1,5 \times 10^8$, $8,4 \times 10^7$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^7$, 9×10^6 kob/ml'dir. İndikatör bakterilerin bir gecelik aktif kültürlerindeki bakteri sayıları *Enterococcus faecalis* için $1,2 \times 10^8$ ve *Staphylococcus aureus* için 8×10^7 kob/ml olarak tespit edilmiştir. Bu denemede indikatörlere karşı tespit edilen inhibisyon zonu büyüklükleri Çizelge-3.3'te gösterilmektedir.

Çizelge-3.2: Test organizmalarının farklı inkübasyon süreleri ve farklı pH'ları gösteren kodları

İnkübasyon süresi	pH	G1	G2	G3	G4
18 saat	3	111	211	311	411
	5	112	212	312	412
	6.8	113	213	313	413
24 saat	3	121	221	321	421
	5	122	222	322	422
	6.8	123	223	323	423
48 saat	3	131	231	331	431
	5	132	232	332	432
	6.8	133	233	333	433
72 saat	3	141	241	341	441
	5	142	242	342	442
	6.8	143	243	343	443
96 saat	3	151	251	351	451
	5	152	251	352	452
	6.8	153	253	353	453

Çizelge-3.3: İndikatörlere karşı 2.denemede gözlenen etki

Suş adı	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
121	++	-
141	++	-
151	+++	-
211	+++	-
221	+++	-
241	++	-
251	+++	-
311	++	-
331	-	-
341	++	-
351	+++	-
422	++	-
431	-	-
441	++	-
451	++	-

Buna göre; *Enterococcus faecalis*'te 121, 141, 241, 311, 341, 422, 441 ve 451 numaralı süpernatantlarda ++ düzeyinde; 151, 211, 221, 251 ve 351 numaralı süpernatantlarda ise +++ düzeyinde zon gözlenmiştir. *Staphylococcus aureus*'ta ise kuyucuklar etrefinde bakteri gelişimi gözlenmiş, ancak zon görülmemiştir.

3.1.1.3.Üçüncü deneme sonuçları

3.1.1.2.'de yapılan denemede test bakterilerinin farklı pH değerlerindeki etkileri incelenmiş, ancak pH'ı 3'e ayarlanmış olan süpernatantların dışındakilerde inhibisyon zonu gözlenmemiştir. pH'ı 3'e ayarlanan süpernatantlardaki etkinin organik asitlerden kaynaklandığı düşünülerek, süpernatantların pH'larının 6.8'de tutulmasına ve böylelikle organik asitler nedeniyle oluşacak inhibisyon etkisinin elenmesine karar verilmiştir. Bu denemede 3.1.1.2.'de kullanılan ve farklı inkübasyon süreleri sonunda elde edilen G1, G2, G3 ve G4 kültür süpernatantlarından (18, 24, 48, 72 ve 96 saatlik kültürler) pH'ı 6.8'e ayarlanmış olanlar (113, 213, 313, 413, 123, 223, 323, 423, 133, 233, 333, 433, 143, 243, 343, 443, 153, 253, 353, 453, 553) ile iyi birer bakteriyosin üreticisi olarak bilinen *Lactobacillus gasseri* JCM 11046 (gasserisin T üreticisi) ve *Lactobacillus gasseri* JCM 11657 (gasserisin A üreticisi) suşlarının 18, 24 ve 48 saatlik kültürlerinden elde edilen ve pH'ı 6.8'e ayarlanmış süpernatantları test edilmiştir. Bu denemede kullanılan tüm süpernatantlar indikatör bakteriler *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002 ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL B-548'un bir gecelik aktif kültürlerinin 10^{-2} . seyreltmesine karşı test edilmiştir.

LA158 (T) ve LA39 (A) suşlarının 18, 24 ve 48 saatlik kültürlerindeki bakteri sayıları LA158 için sırasıyla $1,2 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$ ve 1×10^8 kob/ml ve LA39 için sırasıyla $1,5 \times 10^8$, $7,9 \times 10^7$ ve $9,2 \times 10^7$ kob/ml olarak tespit edilmiştir. İndikatör olarak kullanılan JCM 1002 ve NRRL B-548'in bir gecelik aktif kültürdeki bakteri sayıları sırası ile $1,7 \times 10^8$ ve $1,6 \times 10^8$ kob/ml'dir.

Bu denemede indikatör bakterilere karşı test edilen süpernatantlardan elde edilen inhibisyon zonu değerleri Çizelge-3.4'te gösterilmiştir. Buna göre; JCM 1002'e karşı 2.2.4.1.'ye göre soft MRS agarda yapılan denemede zon oluşumu

gözlenmemiş, 2.2.4.2.'ye göre yayma ekim yöntemi uygulandığında ise G1, G2, G3, G4, LA158=T (direkt ekim), LA39=A (direkt ekim), 24T, 24A ve 18A süpernatantlarında +++ düzeyinde etki gözlenmiştir. NRRL B-548 indikatöründe ise yayma ekim ile tüm kuyucuklarda ++ düzeyinde zon oluşumu görülmüştür.

3.1.2. Disk difüzyon sonuçları

2.2.5.'e göre gerçekleştirilen disk difüzyon denemeleri yalnızca JCM 1002 ve NRRL B-548 indikatörlerine karşı gerçekleştirilen antibakteriyal etki denemelerinde kullanılmış ve yapılan testlerden daha düzgün inhibisyon zonu elde edilmesinden dolayı araştırmanın devamında bu yöntemin kullanılması uygun görülmüştür. 3.1.1.2. ve 3.1.1.3.'e göre hazırlanan süpernatantlar bu denemede de kullanılmıştır. İndikatörlerin bir gecelik aktif kültürlerindeki bakteri sayıları ise 3.1.1.3.'te belirtildiği şekildedir. Test edilen süpernatantların indikatör bakterilere karşı etkileri Çizelge-3.4'te gösterilmiştir.

Buna göre JCM 1002'e karşı MRS agarda disk difüzyon tekniği kullanılarak yapılan denemede G1, G2, G3, G4, A (direkt ekim), T (direkt ekim), 24T, 24A ve 18A kültür süpernatantlarının aşılandığı diskler etrafında +++ düzeyinde zon oluşumu gözlenmiştir. NRRL B-548 ile yapılan disk difüzyon denemesinde ise tüm örneklerle ait diskler etrafında ++ düzeyinde zon oluşmuştur. Önceki denemelere nazaran daha düzgün zon oluşumu gözlemlendiği için zon çapının değerlendirilmesinin daha kolay ve güvenilir olduğu düşünülmektedir. 3.1.1.2.'de elde edilen ve bu denemede de kullanılan pH'ı 6.8'e ayarlanmış süpernatantlardan sadece 24 saatlik kültür süpernatantlarında (123, 223, 323 ve 423 numaralı süpernatantlar) yayma ve disk difüzyon yöntemlerinde etki gözlenmiştir.

3.1.3. Liyofilizasyon sonuçları

3.1.1.2. ve 3.1.1.3.'te belirtilen şekilde kültürdeki bakteri sayıları tespit edilerek hazırlanan G1, G2, G3, G4, T ve A suşlarının 18, 24 ve 48 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen kültür süpernatantlarının yarısı liyofilize edilerek JCM 1002 ve NRRL-548 inikatörlerine karşı 2.2.5.'e göre antibakteriyal

aktivite açısından incelenmiştir. Süpernatantların indikatörlere karşı gösterdikleri etki düzeyleri Çizelge-3.4'te gösterilmiştir.

Örnek süpernatantların liyofilize edilerek JCM 1002'e karşı etkilerinin incelendiği bu denemede bir gecelik aktif indikatör kültürlerinin 10^{-2} . seyreltmelerinin inoküle edildiği petrilerde G1, 24A ve 24T'nin liyofilize süpernatantlarının zon çapları sırasıyla 15.0, 16.5 ve 16.5 mm olarak ölçülmüştür. NRRL B-548'e karşı yapılan denemede ise en iyi sonuç sırasıyla 14.5, 15.0 ve 15.0 mm olmak üzere liyofilize G1, G4 ve 24T süpernatantlarından alınmıştır.

Çizelge-3.4: İndikatörlere karşı 3. denemede gözlenen etki

Yöntem	Agar-well/ Soft agar	Agar-well/ yayma	Agar-well/ yayma	Disk difüzyon	Disk difüzyon	Liyofilize örnekler Disk difüzyon(mm)	
Suş adı	JCM 1002	JCM 1002	NRRL 548	JCM 1002	NRRL 548	JCM 1002	NRRL 548
A direkt	-	+++	++	+++	++	-	-
T direkt	-	+++	++	+++	++	-	-
18 A	-	+++	++	+++	++	-	-
18 T	-	-	++	-	++	-	-
24 A	-	+++	++	+++	++	16.5	-
24 T	-	+++	++	+++	++	16.5	15.0
48 A	-	-	++	-	++	-	-
48 T	-	-	++	-	++	-	-
123	-	+++	++	+++	++	15.0	14.5
223	-	+++	++	+++	++	-	-
323	-	+++	++	+++	++	-	-
423	-	+++	++	+++	++	-	15.0

Denemelerde 13mm çapına sahip diskler kullanılmıştır.

Araştırmada yararlanılan literatürlerde *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002)'un LA39 ve LA158'in temel indikatörü olarak belirtilmesinden ve denemelerdeki sonuçların literatür sonuçlarıyla gösterdiği

benzerlikten dolayı araştırmanın devamında test bakterileri olarak *Lactobacillus gasseri* LA39 (JCM 11657) ve *Lactobacillus gasseri* LA158 (JCM 11046)'ın ve indikatör olarak da *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002)'un kullanılması uygun görülmüştür.

3.2. Protoplast Formasyonu ve Rejenerasyonu

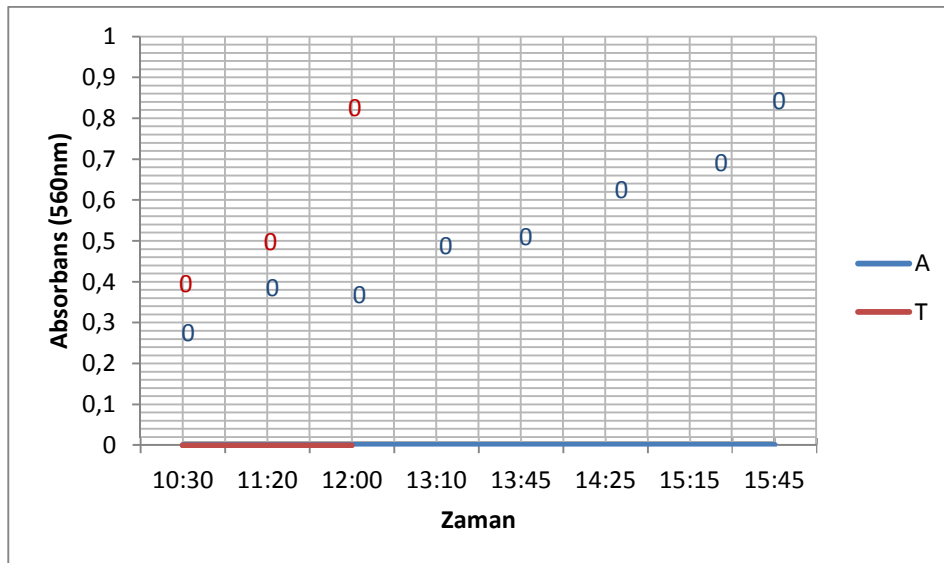
3.2.1. Birinci füzyon için protoplast izolasyonu ve rejenerasyonu

Birinci füzyonda A ve T suşları başlangıç suşlar olarak kullanılmış ve her iki suşun protoplastları elde edildikten sonra aralarında füzyon gerçekleştirilmiştir (AxT).

3.2.1.1. Protoplast eldesi için başlangıç hücre sayım sonuçları

A ve T suşlarının 24 saatlik aktif kültüründen 2.3.1.1.'e göre gerçekleştirilen %10'luk inokülasyondan sonra kültürler %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de; T için 6 saat 15 dk ve A için ise 2 saat 30 dk inkübe edilmiştir. 2.2.1.2.'ye göre tespit edilen ve zamana göre ölçülen spektrofotometrik değişim Çizelge-3.5'te verilmiştir.

Çizelge-3.5: Zamana göre spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri



Kullanılan bu yöntemin yaklaşık 6 saat gibi bir zaman kaybına yol açacağı düşünülerek çalışmanın bundan sonraki aşamalarında 2.3.1.2.'de belirtilen yöntem ile protoplastı hazırlanacak kültürlerin başlangıç sayıları belli bir spektral aralığa (1.0-1.3) ayarlanmıştır. 2.2.1.2.'ye göre bulunan değerler A ve T için sırasıyla 1×10^7 ve $1,5 \times 10^7$ kob/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerler 2.2.1.1.'e göre 560 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ile karşılaştırılmıştır. Protoplastı izole edilecek olan A ve T bakterilerinin protoplast izolasyonunda kullanılacak pelletlerinin konsantrasyonları 560 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerine göre A için 1.20 iken, T için 1.28 'dir. Konsantrasyonu ayarlanan A ve T kültürleri protoplast eldesi için kullanılmıştır.

3.2.1.2. Protoplast izolasyon sonuçları

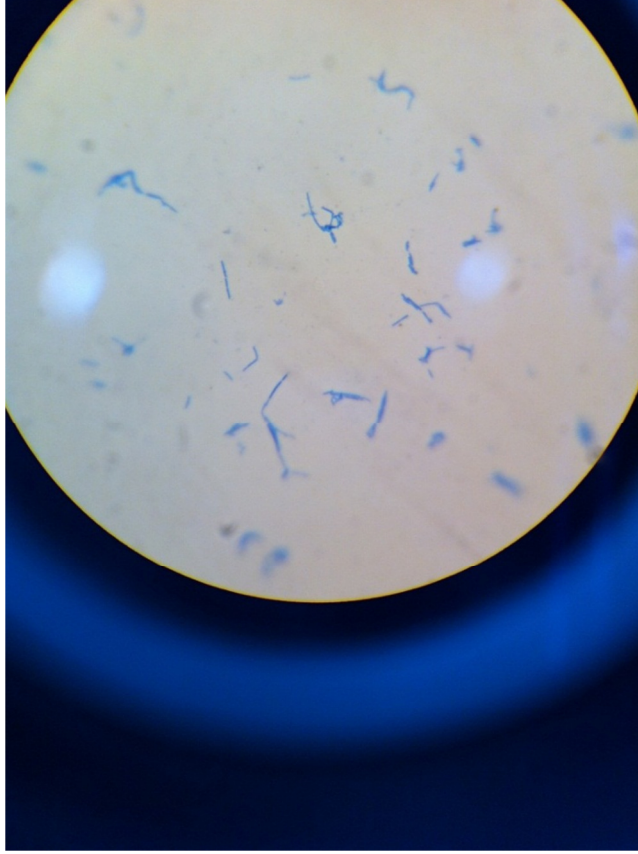
2.3.1.2.'de belirtilen şekilde başlangıç sayıları ayarlanan A ve T kültürlerden elde edilen pelletlerden 2.3.1.3.'de belirtilen yöntemle göre protoplast izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen protoplastların mikroskopik görünümü incelenmiş ve Şekil-3.1'de gösterilmiştir.



Şekil-3.1: Birinci füzyon öncesinde protoplastların mikroskopik görünümü

3.2.1.3. Rejenere protoplast sayım sonuçları

2.3.1.4.'e göre gerçekleştirilen rejenerasyondan sonra rejenere olan protoplastların 2.1.1.3.'e göre boyamaları yapılmış ve Şekil-3.2'de gösterilmiştir.



Şekil-3.2: Rejenere protoplastların mikroskopik görünümü

Yöntemde kullanılan kültürlerden elde edilen protoplastların 2.2.1.2.'ye göre RM agarda gerçekleştirilen inkübasyonları sonucunda elde edilen sayım sonuçları sırasıyla A ve T kültürleri için $2,1 \times 10^6$ ve $1,8 \times 10^6$ kob/ml'dir. Aynı kültürlerle ait protoplastların osmotik olarak dirençli olanların tespiti amacıyla MRS agarda 2.2.1.2.'ye göre yapılan inkübasyon sonuçları ise A ve T için sırasıyla $1,9 \times 10^5$ ve $8,1 \times 10^3$ 'dir.

3.2.1.4. Protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığının hesaplanması

Protoplast formasyon sıklığı ve rejenerasyon sıklığı 2.3.1.4.'e göre hesaplanmıştır. Protoplast formasyon sıklığı; RM agardaki koloni sayısından osmotik olarak dirençli kolonilerin sayısının çıkartılması sonucunda elde edilen değerin RM agardaki koloni sayısına bölünmesi ile hesaplanmaktadır. Rejenerasyon sıklığının hesaplanması için ise RM agardaki koloni sayısından osmotik dirençli kolonilerin çıkartılması ve sonucun başlangıçtaki koloni sayısına bölünmesi gerekmektedir.

Çizelge-3.6: Birinci protoplast formasyonunda protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığı tablosu

Denemede kullanılan test organizmaları	Başlangıç koloni sayısı (kob/ml) (C)	RMA'daki koloni sayısı (kob/ml) (A)	MRS agardaki osmotik dirençli koloni sayısı (kob/ml) (B)	Protoplast formasyon sıklığı (A-B/A)	Rejenerasyon sıklığı (A-B/C)
A	1×10^7	$2,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$1,04 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-1}$
T	$1,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$	$8,1 \times 10^3$	$5,44 \times 10^{-1}$	$1,1 \times 10^{-1}$

3.2.2. İkinci füzyon için protoplast izolasyonu ve rejenerasyonu

İkinci füzyonda başlangıç suşu olarak kullanılan F1, yani 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K ve 1-3B suşlarının kendi aralarında füzyon gerçekleştirilmiştir. Buna göre 1. Grup: 1Bx3B, 2.Grup: 1Bx2K, 3.Grup: 1Bx3K ve 4.Grup: 3Bx3K'nın füzyonundan meydana gelmiştir.

3.2.2.1. Protoplast eldesi için başlangıç hücre sayım sonuçları

F1 havuzunu oluşturan ve ikinci füzyonda başlangıç suşları olarak kullanılacak olan 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K, ve 1-3B suşların konsantrasyon ayarlaması 2.3.1.2.'ye göre gerçekleştirmiştir. Bu suşların 2.2.1.2.'ye göre yapılan

başlangıç koloni sayımları 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K, ve 1-3B için sırasıyla 1×10^7 , 1×10^7 , $1,2 \times 10^7$, $1,4 \times 10^7$ ve $5,5 \times 10^6$ kob/ml olarak tespit edilmiştir.

3.2.2.2. Protoplast izolasyonu sonuçları

2.3.1.2.'de belirtilen şekilde başlangıç sayıları ayarlanan 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K, ve 1-3B kültür pelletlerinden 2.3.1.3.'de belirtilen yöntemle göre protoplast izolasyonu yapılmıştır.

3.2.2.3. Rejenere protoplast sayım sonuçları

2.3.1.4.'e göre gerçekleştirilen rejenerasyondan sonra rejenere olan protoplastların 2.1.1.3.'e göre boyamaları yapılmış ve incelenmiştir.

Yöntemde kullanılan 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K, ve 1-3B kültürlerinden elde edilen protoplastların 2.2.1.2.'ye göre RMA'da gerçekleştirilen inkübasyon sonuçları sırasıyla $2,9 \times 10^8$, 3×10^5 , $2,5 \times 10^6$, $2,8 \times 10^8$ ve $2,9 \times 10^6$ kob/ml'dir. Aynı kültürlerle ait protoplastların osmotik olarak dirençli olanlarının tespiti amacıyla 2.2.1.2.'ye göre MRS agarda yapılan inkübasyon sonuçları ise sırasıyla 1×10^4 , 2×10^5 , 2×10^4 , 1×10^4 ve 5×10^3 kob/ml'dir.

3.2.2.4. Protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığının hesaplanması

Protoplast formasyon sıklığı ve rejenerasyon sıklığı 2.3.1.4.'e göre hesaplanmıştır. Buna göre tespit edilen değerler Çizelge-3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge-3.7: İkinci protoplast formasyonunda protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığı tablosu

Denemede kullanılan test organizmaları	Başlangıç koloni sayısı (kob/ml) (C)	RMA'daki koloni sayısı (kob/ml) (A)	MRS agardaki osmotik dirençli koloni sayısı (kob/ml) (B)	Protoplast formas-yon sıklığı (A-B/A)	Rej. sıklığı (A-B/C)
1-1B	1×10^7	$2,9 \times 10^8$	1×10^4	$9,9 \times 10^{-1}$	$2,66 \times 10^{-1}$
1-2K	1×10^7	3×10^6	2×10^5	$9,3 \times 10^{-1}$	$2,72 \times 10^{-1}$
1-2B	$1,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	2×10^4	$9,9 \times 10^{-1}$	$2,11 \times 10^{-1}$
1-3K	$1,4 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$	1×10^4	$9,9 \times 10^{-1}$	$1,97 \times 10^{-1}$
1-3B	$5,5 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	5×10^3	$9,9 \times 10^{-1}$	$3,42 \times 10^{-1}$

3.2.3. Üçüncü füzyon için protoplast izolasyonu ve rejenerasyonu

Üçüncü füzyonda başlangıç suşu olarak kullanılan F2, yani 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 suşlarının kendi aralarında füzyon gerçekleştirilmiştir. Buna göre 1. Grup: 2-6x2-20, 2.Grup: 2-6x2-41, 3.Grup: 2-6x2-45 ve 4.Grup: 2-20x2-41, 5.Grup: 2-20x2-45 ve 6.Grup: 2-41x2-45'in füzyonundan meydana gelmiştir.

3.2.3.1. Protoplast eldesi için başlangıç hücre sayım sonuçları

F2 havuzunu oluşturan ve üçüncü füzyonda başlangıç suşları olarak kullanılacak olan 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 suşların konsantrasyon ayarlaması 2.3.1.2.'ye göre gerçekleştirmiştir. 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 için 2.2.1.1. ve 2.2.1.2.'e göre yapılan başlangıç ölçüm değeri sırasıyla $2.3662 (4,7 \times 10^7 \text{ kob/ml})$, $1.5206 (3,3 \times 10^7 \text{ kob/ml})$, $1.8976 (3 \times 10^6 \text{ kob/ml})$ ve $1.6540 (3,9 \times 10^6 \text{ kob/ml})$ olarak tespit edilmiştir.

3.2.3.2. Protoplast izolasyonu sonuçları

2.3.1.2.'de belirtilen şekilde başlangıç sayıları ayarlanan 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 kültür pelletlerinden 2.3.1.3.'de belirtilen yöntemle göre protoplast izolasyonu yapılmıştır.

3.2.3.3. Rejenere protoplast sayım sonuçları

Yöntemde kullanılan 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 kültürlerinden elde edilen protoplastların 2.2.1.2.'ye göre RMA'da gerçekleştirilen ekim sonuçları sırasıyla $2,9 \times 10^6$, $2,6 \times 10^6$, $2,5 \times 10^5$ ve $23 \times 10^6 \text{ kob/ml}$ 'dir. Aynı kültürlerle ait protoplastların osmotik olarak dirençli olanların tespiti amacıyla MRS agarda yapılan ekim sonuçları ise 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 için sırasıyla $2,5 \times 10^2$, $1,3 \times 10^5$, $2,5 \times 10^3$ ve $4,5 \times 10^3 \text{ kob/ml}$ olarak belirlenmiştir.

3.2.3.4. Protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığının hesaplanması

Protoplast formasyon sıklığı ve rejenerasyon sıklığı 2.3.1.4.'e göre hesaplanmıştır. Buna göre tespit edilen değerler Çizelge-3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge-3.8: Üçüncü protoplast formasyonunda protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığı tablosu

Denemede kullanılan test organizmaları	Başlangıç koloni sayısı (kob/ml) (C)	RMA'daki koloni sayısı (kob/ml) (A)	MRS agardaki osmotik dirençli koloni sayısı (kob/ml) (B)	Protoplast formasyon sıklığı (A-B/A)	Rejenerasyon sıklığı (A-B/C)
2-6	$4,7 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^3$	$9,9 \times 10^{-1}$	$0,61 \times 10^{-1}$
2-20	$3,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	$9,5 \times 10^{-1}$	$0,74 \times 10^{-1}$
2-41	3×10^6	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^3$	$9,9 \times 10^{-1}$	$0,8 \times 10^{-1}$
2-45	$3,9 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$4,5 \times 10^3$	$9,9 \times 10^{-1}$	$5,9 \times 10^{-1}$

3.3 Protoplast Füzyonu

Protoplast füzyonu 2.3.3.'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna göre her bir füzyon sonunda elde edilen füzantlar arasından geliştirilmiş özelliklere sahip olanların seçimi füzantların CaCO_3 içeren MRS agardaki zon çapları ve füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktivite özellikleri dikkate alınarak yapılmıştır.

3.3.1. Birinci füzyon

3.3.1.1. Birinci füzyonda elde edilen füzantların CaCO_3 içeren MRS agardaki zon çapları

2.3.2.1'e göre gerçekleştirilen ekimler sonucunda % 1.5 CaCO_3 içeren MRS agar ortamında belirgin zon gözlenmemiştir. Bu nedenle %0.3 CaCO_3 içeren MRS agardaki zon çapları dikkate alınmıştır. Koloni büyüklüğüne göre değişiklik

göstermekle birlikte koloniler ve etrafında beliren berrak zonların çapları Çizelge-3.9'da ve seçilen kolonilerin ait oldukları petriler ile 2.1.1.3.e göre belirlenen mikroskopik özellikleri Çizelge-3.10'da verilmiştir. Bu değerlendirme seçilen suşların mikroskopik görünümünün belirlenmesi amacıyla yapılmış ancak sonraki basamaklarda tekrar edilmesine gerek duyulmamıştır.

2.3.3.'e göre hazırlanan ve 3.2.1.1.'de sayıları verilen non-shuffled kontrol stokları (A+T) ile başlangıç A ve T stoklarından %1 oranında MRS brotha inokülasyon yapılarak 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyonları sağlanmış ve kontrol olarak bu aktif kültürlerden CaCO₃ içeren MRS agara seri seyreltmelerden ekim yapılmıştır. Herhangi bir aktivite değerlendirmesi yapılmayacağı için bu basamakta kültürlerin başlangıç sayılarının hesaplanmasına gerek duyulmamıştır.

Birinci füzyon öncesinde CaCO₃ içeren MRS agarda başlangıç suşları olan A ve T ve non-shuffled A+T kontrolünün oluşturdukları zon çapları 0.6, 0.5 ve 0.6 mm olarak tespit edilmiştir. Rejenere olan protoplast petrilerinden CaCO₃ içeren MRS agarda gelişerek zon oluşturan kolonilerden 1-3, 1-9, 1-15'in zon çapları 0.6 mm, 1-10, 1-14 ve 1-35'in zon çapları 0.7 mm, 1-17'nin zon çapı 0.8mm, 1-25'nin zon çapı 0.9 mm, 1-1-B, 1-37 ve 1-39'un zon çapları 1.0 mm, 1-2K ve 1-12'nin zon çapları 1.1. mm, 11-21 ve 1-44'nin zon çapları 1.2 mm, 1-41'nin zon çapı 1.3 mm, 1-43'ün zon çapı 1.4 mm, 1-3K ve 1-2B'nin zon çapları 1.5 mm ve 1-3B'nin zon çapı 2.5 mm olarak belirlenmiştir. 0.6 mm'den küçük zon oluşturan koloniler değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Değerlendirmeye alınan bu kolonilerin mikroskopik görünümleri de incelenmiş ve üç farklı basil formu tespit edilmiştir. Bunlardan 1-3, 1-12, 1-15, 1-25 ve 1-35 kokobasil görünümünde; 1-10, 1-17, 1-21, 1-37, 1-39, 1-41, 1-43, 1-44, 1-2K, 1-3K ve 1-3B kısa basil görünümünde; 1-9, 1-14, 1-31, 1-1B ve 1-2B ise uzun basil görünümündedir.

Çizelge-3.9: Birinci füzyonda elde edilen füzantların %0.3 CaCO₃ içeren MRS agardaki zon çapları (mm) (Koloni+berrak zon)

Suş adı	Zon çapı (mm)
A+T Kontrol	0.6
A	0.6
T	0.5
1-3	0.6
1-10	0.7
1-3B	2.5
1-3K	1.5
1-2B	1.5
1-2K	1.1
1-1B	1
1-35	0.7
1-25	0.9
1-12	1.1
1-15	0.6
1-21	1.2
1-31	0.6
1-44	1.2
1-37	1
1-41	1.3
1-14	0.7
1-17	0.8
1-43	1.4
1-39	1
1-9	0.6

Çizelge-3.10: Çizelge-3.9'da gösterilen suşların alındığı petri/ seyreltme sayısı/mikroskopik görünüm

Suş adı	Alındığı petri	Mikroskopik görünüm
A+T Kontrol	RMA 10^{-2}	Kısa ve uzun basil görünümü
A	MRS agar 10^{-6}	Kısa basil görünümü
T	MRS agar 10^{-6}	Kısa zincir şeklinde basil görünümü
1-3	RMA 10^{-2} küçük koloni	Zincirler halinde kokobasil görünümü
1-10	RMA 10^{-1} küçük koloni	Kısa basil görünümü
1-3B	RMA 10^{-3} büyük koloni	Kısa basil görünümü
1-3K	RMA 10^{-3} küçük koloni	Kısa basil görünümü
1-2B	RMA 10^{-2} büyük koloni	Uzun kalın basil görünümü
1-2K	RMA 10^{-2} küçük koloni	Kısa kalın basil görünümü
1-1B	RMA 10^{-1} büyük koloni	Uzun ince basil görünümü
1-35	RMA 10^{-2} büyük koloni	Kokobasil görünümü
1-25	RMA 10^{-2} küçük koloni	Kalın kokobasil görünümü
1-12	RMA 10^{-1} küçük koloni	Kokobasil görünümü
1-15	RMA 10^{-1} büyük koloni	Kokobasil görünümü
1-21	RMA 10^{-2} küçük koloni	Kısa kalın basil görünümü
1-31	RMA 10^{-2} büyük koloni	Uzun kalın basil görünümü
1-44	RMA 10^{-3} büyük koloni	Kısa basil zincirleri görünümü
1-37	RMA 10^{-2} büyük koloni	Kısa kalın zincir halinde basil görünümü
1-41	RMA 10^{-3} büyük koloni	Kısa kalın basil görünümü
1-14	RMA 10^{-1} büyük koloni	Uzun zincirler halinde basil görünümü
1-17	RMA 10^{-1} büyük koloni	Kısa kalın basil grupları görünümü
1-43	RMA 10^{-3} büyük koloni	Kısa kalın basil görünümü
1-39	RMA 10^{-3} küçük koloni	Kısa kalın basil görünümü
1-9	RMA 10^{-3} büyük koloni	Uzun zincirler halinde basil görünümü

3.3.1.2. Birinci füzuyondan seçilen füzantların antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi (laktik asit denemesi)

2.3.2.2.'ye göre gerçekleştirilen denemede elde edilen sonuçlar ve kolonilerin 24 saatlik inkübasyondan sonra 2.2.1.1.'e göre ölçülen değerleri Çizelge-3.11'deki gibidir. İndikatör olarak kullanılan JCM 1002'nin konsantrasyonu 2.3.2.2.'ye göre ayarlanmıştır. A+T kontrol ve A ve T kontrol kültürleri ise 3.3.1.1.'e göre hazırlanmıştır. Bu sonuçlara göre 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K, 1-3B, 1-37, 1-41, 1-43 ve 1-44 kolonileri seçilerek süpernatant aktiviteleri açısından incelenmiştir.

Çizelge-3.11: Birinci füzuyondan seçilen füzantların antibakteriyal aktivite sonuçları (mm)

Suş adı	A ₅₆₀ değeri	Zon çapı (mm)
A+T Kontrol	2.1780	16.0
A	2.1625	15.0
T	2.3877	14.5
1-3	2. 3498	14.0
1-10	2.3218	14.0
1-3B	1.9363	16.0
1-3K	2.2919	17.0
1-2B	1.9382	16.0
1-2K	2.2601	16.5
1-1B	2.0952	17.0
1-35	2.0421	14.5
1-25	2.3005	15.0
1-12	2.4001	14.5
1-15	2.4184	15.0
1-21	2.2747	15.0
1-31	1.9632	15.0
1-44	2.0519	18.0
1-37	2.0255	17.0
1-41	2.0134	18.0
1-14	2.0142	14.0
1-17	1.9713	14.0
1-43	1.9477	18.0
1-39	2.300	15.0
1-9	2.0092	14.0

Ø13mm çapında disk kullanılmıştır.

Rejenere olabilen protoplastlar arasından seçilen bu kolonilerden MRS broth içinde 24 saat geliştirilerek elde edilen aktif kültürler, test organizmalarının antibakteriyal etki gösterdiği *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a karşı ($A_{560}=2.8470$) disk difüzyon tekniği kullanılarak denemeye alınmışlardır. Kültürler önce Ø13mm çapındaki diskler üzerine direkt aktarılmış ve sonrasında kültür süpernatantları ve kültür liyofilize süpernatantları hazırlanarak etki denemeleri gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kültürlerin 560 nm dalga boyunda ölçülen absorpsiyonları A+T Kontrol, A, T, 1-3, 1-10, 1-3B, 1-3K, 1-2B, 1-2K, 1-1B, 1-35, 1-25, 1-12, 1-15, 1-21, 1-31, 1-44, 1-37, 1-41, 1-14, 1-17, 1-43, 1-39 ve 1-9 için sırasıyla 2.1780, 2.1625, 2.3877, 2.3498, 2.3218, 1.9363, 2.2919, 1.9382, 2.2601, 2.0952, 2.0421, 2.3005, 2.4001, 2.4184, 2.2747, 1.9632, 2.0519, 2.0255, 2.0134, 2.0142, 1.9713, 1.9477, 2.300 ve 2.0092'dir. Bu kültürlerin *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a karşı oluşturdukları zon çapları (mm) ise sırasıyla 16.0, 15.0, 14.5, 14.0, 14.0, 16.0, 17.0, 16.0, 16.5, 17.0, 14.5, 15.0, 14.5, 15.0, 15.0, 15.0, 18.0, 17.0, 18.0, 14.0, 14.0, 18.0, 15.0 ve 14.0 olarak ölçülmüştür.

3.3.1.3. Birinci füzyondan seçilen füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktivite sonuçları

2.3.2.3.'e göre yapılan denemede indikatör olarak kullanılan JCM 1002'nin konsantrasyonu 2.3.2.2.'ye göre ayarlanmıştır. Denemede kullanılan ve 3.3.1.2.'de elde edilen aktif A+T kontrol ve A ve T kontrol kültürleri ile 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K, 1-3B, 1-37, 1-41, 1-43 ve 1-44 kültürlerinin süpernatant (SN) ve liyofilize süpernatantları (LSN) ise 2.2.2. ve 2.2.3.'e göre hazırlanmıştır. Süpernatantların başlangıç pH'ları ile sterilizasyon öncesi son pH'ları ve deneme sonunda elde edilen zon çapları (mm) Çizelge-3.12'deki gibidir.

Zon çapları dikkate alınarak antibakteriyal etki düzeylerinin iyi olduğu düşünülen kültürlerden süpernatant ve liyofilize süpernatantlar hazırlanmıştır. Süpernatant hazırlamadan önce ölçülen başlangıç pH değerleri Tablo-12'de gösterildiği gibidir. A+T, A, T, F1-1B, F1-2K, F1-2B, F1-3K, F1-3B, 1-37, 1-41, 1-43 ve 1-44 'ün başlangıç pH değerleri sırasıyla 4.33, 4.26, 4.41, 4.21, 4.39, 4.35, 4.22, 4.40, 4.16, 4.22, 4.38 ve 4.12; son pH değerleri ise sırasıyla 6.92, 6.81,

6.73, 6.95, 6.88, 6.79, 6.74, 6.85, 6.77, 6.91, 6.90 ve 6.92'dir. Kültür süpernatantlarının zon çapları (mm) sırasıyla 15.5, 15.0, 14.0, 17.0, 16.5, 16.0, 17.0, 16.0, 15.0, 15.5, 15.0 ve 15.0 mm.; liyofilize kültür süpernatantlarının zon çapları ise sırasıyla 17.0, 18.0, 17.0, 19.0, 19.0, 18.0, 18.5, 19.0, 15.5, 15.5, 16.0 ve 15.0 mm. olarak belirlenmiştir.

Çizelge-3.12: Birinci füzyondan seçilen füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktiviteleri

Suş adı	A ₅₆₀ değeri	Başlangıç pH	Son pH	Süpernatant (mm)	Liyofilize Süpernatant (mm)
A+T	2.1780	4.33	6.92	15.5	17.0
A	2.1625	4.26	6.81	15.0	18.0
T	2.3877	4.41	6.73	14.0	17.0
F1-1B	2.0952	4.21	6.95	17.0	19.0
F1-2K	2.2601	4.39	6.88	16.5	19.0
F1-2B	1.9382	4.35	6.79	16.0	18.0
F1-3K	2.2919	4.22	6.74	17.0	18.5
F1-3B	1.9363	4.40	6.85	16.0	19.0
1-37	2.0255	4.16	6.77	15.0	15.5
1-41	2.0134	4.22	6.91	15.5	15.5
1-43	1.9477	4.38	6.90	15.0	16.0
1-44	2.0519	4.12	6.92	15.0	15.0

Ø13mm çapında disk kullanılmıştır.

Alınan sonuçlara göre 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K ve 1-3B suşlarının aktivitelerinin daha fazla olmasından dolayı, bu suşların ikinci füzyonu gerçekleştirmek üzere protoplast formasyonunda başlangıç füzantları olarak kullanılmalarına karar verilmiştir. Buna göre 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K ve 1-3B suşları F1 havuzunu oluşturmaktadır.

3.3.2. İkinci füzyon

3.3.2.1. İkinci füzyonda elde edilen füzantların CaCO_3 içeren MRS agardaki zon çapları

2.3.2.1'e göre gerçekleştirilen ekimler sonucunda % 0.3 CaCO_3 içeren MRS agardaki zon çapları dikkate alınmıştır. Koloni büyüklüğüne göre değişiklik göstermekle birlikte koloniler etrafında beliren berrak zon çapları Çizelge-3.13'te verilmiştir. Non-shuffled kontrol suşları, A ve T kontrol suşları 3.3.1.1.'de belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

F1 füzantları arasında 4 farklı füzyon gerçekleştirilerek oluşturulan tekrarlamalı protoplast füzyonu ile F2 füzantları seçilmiştir. İkinci füzyonda gerçekleştirilen 4 farklı grup füzyondan 1. grupta 1Bx3B, 2. grupta 1Bx2K, 3. grupta 1Bx3K ve 4. grupta 3Bx3K arasında füzyon gerçekleştirilmiştir. 1. rejenere olan protoplast petrilerinden CaCO_3 içeren MRS agarda gelişerek zon oluşturan kolonilerden 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 ve 2-5 1.grupta; 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14, 2-15, 2-16, 2-17, 2-18, 2-19, 2-20, 2-21, 2-22, 2-23, 2-24, 2-25 ve 2-26 2.grupta; 2-27, 2-28, 2-29, 2-30, 2-31, 2-32, 2-33, 2-34, 2-35, 2-36, 2-37, 2-38, 2-39, 2-40 ve 2-41 3.grupta; 2-42, 2-43, 2-44, 2-45, 2-46, 2-47, 2-48, 2-49, 2-50, 2-51, 2-52, 2-53, 2-54, 2-55 ve 2-56 ise 4.grupta yer almaktadır.

Birinci füzyon öncesinde CaCO_3 içeren MRS agarda başlangıç suşları olan A ve T ve non-shuffled A+T kontrolünün oluşturdukları zon çapları 0.6, 0.5 ve 0.6 mm olarak tespit edilmiştir. 2-2, 2-7, 2-8, 2-14, 2-16, 2-19, 2-32, 2-40 ve 2-49'un zon çapları 0.4 mm., 2-13, 2-21, 2-35 ve 2-46'nın zon çapları 0.5 mm., 2-1, 2-9, 2-15, 2-24, 2-28, 2-29, 2-34, 2-37, 2-42 ve 2-53'ün zon çapları 0.6 mm., 2-10, 2-27 ve 2-50'nin zon çapları 0.7 mm., 2-3, 2-18, 2-44 ve 2-47'nin zon çapları 0.8 mm., 2-5, 2-23, 2-30, 2-38 ve 2-39'un zon çapları 0.9 mm., 2-4, 2-17, 2-55 ve 2-56'nın zon çapları 1.0 mm., 2-11'in zon çapı 1.1 mm., 2-36 ve 2-43'ün zon çapı 1.2 mm., 2-12'nin zon çapı 1.3 mm., 2-31'in zon çapı 1.4 mm., 2-25'in zon çapı 1.5 mm., 2-33, 2-51 ve 2-54'ün zon çapları 1.6 mm., 2-26'nın zon çapı 1.7 mm., 2-22 ve 2-52'nin zon çapları 1.8 mm., 2-48'in zon çapı 1.9 mm., 2-45'in zon çapı

2.7 mm., 2-6'nın zon çapı 2.8 mm., 2-41'in zon çapı 3.0 mm. ve 2-20'nin zon çapı ise 3.1 mm.'dir.

Çizelge-3.13: İkinci füzyonda elde edilen füzantların % 0.3 CaCO₃ içeren MRS agardaki zon çapları (mm) (Koloni+berrak zon)

Suş adı	1.Grup(1BX3B)	2.Grup(1BX2K)	3.Grup(1BX3K)	4.grup(3BX3K)	Zon çapı (mm)
A+T Kontrol					0.6
A					0.6
T					0.5
2-1	X				0.6
2-2	X				0.4
2-3	X				0.8
2-4	X				1.0
2-5	X				0.9
2-6		X			2.8
2-7		X			0.4
2-8		X			0.4
2-9		X			0.6
2-10		X			0.7
2-11		X			1.1
2-12		X			1.3
2-13		X			0.5
2-14		X			0.4
2-15		X			0.6
2-16		X			0.4
2-17		X			1.0
2-18		X			0.8
2-19		X			0.4
2-20		X			3.1
2-21		X			0.5
2-22		X			1.8
2-23		X			0.9
2-24		X			0.6
2-25		X			1.5
2-26		X			1.7
2-27			X		0.7
2-28			X		0.6
2-29			X		0.6
2-30			X		0.9
2-31			X		1.4
2-32			X		0.4
2-33			X		1.6
2-34			X		0.6
2-35			X		0.5
2-36			X		1.2

Suşı adı	1.Grup(1BX3B)	2.Grup(1BX2K)	3.Grup(1BX3K)	4.grup(3BX3K)	Zon çapı (mm)
2-37			X		0.6
2-38			X		0.9
2-39			X		0.9
2-40			X		0.4
2-41			X		3.0
2-42				X	0.6
2-43				X	1.2
2-44				X	0.8
2-45				X	2.7
2-46				X	0.5
2-47				X	0.8
2-48				X	1.9
2-49				X	0.4
2-50				X	0.7
2-51				X	1.6
2-52				X	1.8
2-53				X	0.6
2-54				X	1.6
2-55				X	1.0
2-56				X	1.0

3.3.2.2. İkinci füzyondan seçilen füzantların antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi (laktik asit denemesi)

2.3.2.2.'ye göre gerçekleştirilen denemede elde edilen sonuçlar Çizelge-3.14'teki gibidir. İndikatör olarak kullanılan JCM 1002'nin konsantrasyonu 2.3.2.2.'ye göre ayarlanmıştır. A+T kontrol ve A ve T kontrolleri ise 3.3.1.1.'e göre hazırlanmıştır. Deneme sonunda alınan sonuçlara göre 2-6, 2-11, 2-12, 2-20, 2-22, 2-25, 2-26, 2-31, 2-33, 2-36, 2-41, 2-43, 2-45, 2-48, 2-51 ve 2-52 numaralı kültürler seçilerek süpernatant elde etmek üzere hazırlanmıştır.

Rejenere olabilen protoplastlar arasından seçilen bu kolonilerden MRS brot içinde 24 saat geliştirilerek elde edilen aktif kültürler, test organizmalarının antibakteriyal etki gösterdiği *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a karşı ($A_{560}=2.8470$) disk difüzyon tekniği kullanılarak denemeye alınmışlardır. Kültürler önce diskler üzerine direkt aktarılmış ve sonrasında süpernatantları ve liyofilize süpernatantları hazırlanarak etki denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge-3.14: İkinci füzyondan seçilen füzantların antibakteriyal aktiviteleri

Suş adı	A ₅₆₀ değeri	10 ⁻¹ 'deki Zon çapı (mm)
A+T Kontrol	2.1291	15.5
A	2.1012	15.0
T	2.2034	14.5
2-1	-	15.0
2-2	-	16.0
2-3	-	15.5
2-4	-	15.0
2-5	-	16.5
2-6	1.8932	17.0
2-7	-	16.0
2-8	-	16.5
2-9	-	16.0
2-10	-	15.0
2-11	1.8316	16.5
2-12	1.9346	18.0
2-13	-	16.0
12-4	-	15.0
2-15	-	15.5
2-16	-	15.0
2-17	-	16.0
2-18	-	15.0
2-19	-	16.0
2-20	1.8830	18.0
2-21	-	15.0
2-22	1.9056	20.0
22-3	-	16.0
2-24	-	15.0
2-25	1.8862	17.0
2-26	1.9275	20.0

Suş adı	A ₅₆₀ değeri	10 ⁻¹ 'deki Zon çapı (mm)
2-27	-	15.0
2-28	-	15.5
2-29	-	15.5
2-30	-	15.0
2-31	1.8735	17.0
2-32	-	15.0
2-33	1.8243	17.0
2-34	-	15.0
2-35	-	15.0
2-36	1.8497	17.0
2-37	-	16.0
2-38	-	15.0
2-39	-	16.0
2-40	-	15.0
2-41	1.8137	18.0
2-42	-	15.0
2-43	1.9343	17.5
2-44	-	16.0
2-45	1.8347	17.0
2-46	-	15.0
2-47	-	15.0
2-48	1.8113	16.5
2-49	-	15.0
2-50	-	16.0
2-51	1.7646	15.0
2-52	1.7577	16.5
2-53	-	16.0
2-54	1.8234	15.0
2-55	-	15.0
2-56	-	15.0

Ø13mm çapında disk kullanılmıştır.

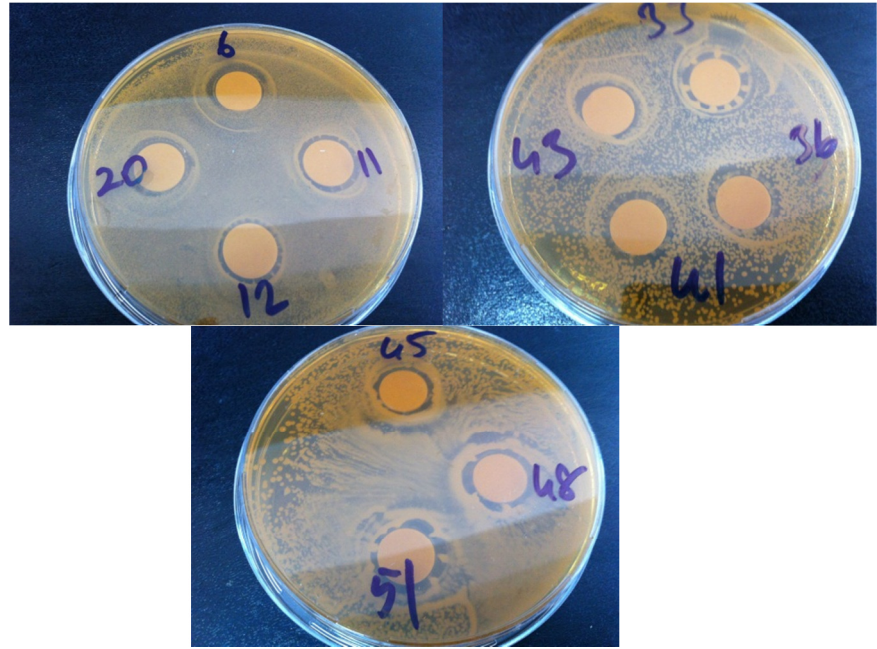
Kullanılan kültürlerin 560 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri A+T Kontrol, A, T, 2-6, 2-11, 2-12, 2-20, 2-22, 2-25, 2-26, 2-31, 2-33, 2-36, 2-41, 2-43, 2-45, 2-48, 2-51, 2-52 ve 2-54 için sırasıyla 2.1291, 2.1012, 2.2034, 1.8932, 1.8316, 1.9346, 1.8830, 1.9056, 1.8862, 1.9275, 1.8735, 1.8243, 1.8497, 1.8137, 1.9343, 1.8347, 1.8113, 1.7646, 1.7577 ve 1.8234'dir. Bu suşların indikatöre karşı gösterdikleri etki düzeyleri ise sırasıyla 15.5, 15.0, 14.5, 17.0, 16.5, 18.0, 18.0, 20.0, 17.0, 20.0, 17.0, 17.0, 17.0, 18.0, 17.5, 17.0, 16.5, 15.0, 16.5 ve 15.0 mm olarak belirlenmiştir.

3.3.2.3. İkinci füzyondan seçilen füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktivite sonuçları

2.3.2.3.'e göre yapılan denemede indikatör olarak kullanılan JCM 1002'nin konsantrasyonu 2.3.2.2.'ye göre ayarlanmıştır. Denemede kullanılan ve 3.3.1.2.'de elde edilen aktif A+T kontrol ve A ve T kontrol kültürleri ile 2-6, 2-11, 2-12, 2-20, 2-22, 2-25, 2-26, 2-31, 2-33, 2-36, 2-41, 2-43, 2-45, 2-48 ve 2-52 numaralı kültürlerin süpernatant ve liyofilize süpernatantları ise 2.2.2. ve 2.2.3.'e göre hazırlanmıştır. Süpernatantların başlangıç pH'ları ile sterilizasyon öncesi son pH'ları ve deneme sonunda elde edilen zon çapları (mm) Çizelge-3.15'teki gibidir. Alınan sonuçlara göre 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 suşları F2 havuzunu oluşturmakta ve bir sonraki protoplast eldesi ve füzyonu için başlangıç suşlarını oluşturmaktadırlar. Şekil-3.3, füzant suşlarının indikatör JCM 1002'e karşı antibakteriyal aktivitelerini göstermektedir.

Zon çapları dikkate alınarak antibakteriyal etki düzeylerinin iyi olduğu düşünülen kültürlerden süpernatant ve liyofilize süpernatantlar hazırlanmıştır. Süpernatant hazırlamadan önce ölçülen başlangıç pH değerleri Tablo-11'de gösterildiği gibidir. Başlangıç pH değerleri A+T, A, T, 2-6, 2-11, 2-12, 2-20, 2-22, 2-25, 2-26, 2-31, 2-33, 2-36, 2-41, 2-43, 2-45, 2-48 ve 2-52 için sırasıyla 4.38, 4.16, 4.52, 4.46, 4.64, 4.43, 4.51, 4.37, 4.20, 4.29, 4.45, 4.05, 4.30, 4.42, 4.14, 4.50, 4.23 ve 4.32 iken; son pH değerleri sırasıyla 6.82, 6.78, 6.91, 6.74, 6.80, 6.69, 6.77, 6.85, 6.83, 6.72, 6.76, 6.89, 6.70, 6.98, 6.76, 6.86, 6.74, ve 6.71 olarak belirlenmiştir.

Şekil-3.3: 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 füzantlarının gösterdikleri antibakteriyal etki



Kültür süpernatantlarının L-baget ile yayma (A) ekim yöntemi kullanılarak indikatöre karşı incelendiği denemelerde elde edilen sonuçlar sırasıyla 15.0, 15.0, 14.0, 17.0, 15.0, 17.0, 16.0, 15.0, 18.0, 16.0, 16.0, 20.0, 16.0, 16.0, 16.0, 19.0, 15.0 ve 15.0 iken; öze ile yayma (B) ekim yöntemi kullanılarak indikatöre karşı incelendiği denemelerde A+T, 2-6, 2-26, 2-31, 2-36, 2-41 ve 2-43'te zon oluşumu gözlenmezken A, T, 2-11, 2-12, 2-20, 2-22, 2-25, 2-33, 2-45, 2-48 ve 2-52 için sırasıyla 15.0, 16.0, 16.0, 16.0, 19.0, 15.0, 15.0, 15.0, 15.0 ve 15.0 mm'dir. Liyofilize süpernatantların L-baget ile yayma (A) ekim yöntemi kullanılarak indikatöre karşı incelendiği denemelerde elde edilen sonuçlar sırasıyla 16.0, 16.5, 16.0, 18.0, 16.0, 16.0, 20.0, 16.0, 16.0, 16.0, 16.0, 16.0, 20.0, 16.0, 17.0, 16.0 ve 15.0 mm iken; öze ile yayma (B) ekim yöntemi kullanılarak indikatöre karşı incelendiği denemelerde A+T, 2-12, 2-33, 2-36 ve 2-41'de zon gözlenmemiş, A, T, 2-6, 2-11, 2-20, 2-22, 2-25, 2-26, 2-31, 2-45, 2-48'in her biri için 15.0 mm, 2-43 ve 2-52 için ise 16.0 mm olarak belirlenmiştir.

Çizelge-3.15: İkinci füzyondan seçilen füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktiviteleri

Suş adı	A ₅₆₀ değeri	Başlangıç pH	Son pH	Süper-natant 10 ⁻¹ A(mm)	Süper-natant 10 ⁻¹ B(mm)	Liyofilize Süpernatant 10 ⁻¹ A(mm)	Liyofilize Süpernatant 10 ⁻¹ B(mm)
A+T	2.1291	4.38	6.82	15.0	-	16.0	-
A	2.1012	4.16	6.78	15.0	15.0	16.5	15.0
T	2.2034	4.52	6.91	14.0	16.0	16.0	15.0
2-6	1.8932	4.46	6.74	17.0	-	18.0	15.0
2-11	1.8316	4.64	6.80	15.0	16.0	16.0	15.0
2-12	1.9346	4.43	6.69	17.0	16.0	16.0	-
2-20	1.8830	4.51	6.77	16.0	19.0	20.0	15.0
2-22	1.9056	4.37	6.85	15.0	15.0	16.0	15.0
2-25	1.8862	4.20	6.83	18.0	15.0	16.0	15.0
2-26	1.9275	4.29	6.72	16.0	-	16.0	15.0
2-31	1.8735	4.45	6.76	16.0	-	16.0	15.0
2-33	1.8243	4.05	6.89	20.0	15.0	16.0	-
2-36	1.8497	4.30	6.70	16.0	-	16.0	-
2-41	1.8137	4.42	6.98	16.0	-	20.0	-
2-43	1.9343	4.14	6.76	16.0	-	16.0	16.0
2-45	1.8347	4.50	6.86	19.0	15.0	17.0	15.0
2-48	1.8113	4.23	6.74	15.0	15.0	16.0	15.0
2-52	1.7577	4.32	6.71	15.0	15.0	15.0	16.0

A: Yayma yöntemi ile ekim; B: Öze ile ekim

Ø13mm diskler kullanılmıştır

3.3.3. Üçüncü füzyon

3.3.3.1. Üçüncü füzyonda elde edilen füzantların CaCO₃ içeren MRS agardaki zon çapları

2.3.2.1'e göre gerçekleştirilen ekimler sonucunda % 0.3 CaCO₃ içeren MRS agardaki zon çapları dikkate alınmıştır. Koloni büyüklüğüne göre değişiklik göstermekle birlikte koloniler etrafında beliren berrak zon çapları Çizelge-3.16'da verilmiştir. Non-shuffled kontrol suşları, A ve T kontrol suşları 3.3.1.1.'de belirtilen şekilde hazırlanmıştır. 1. grup petrilerinden bu denemede iyi sonuç alınamadığı için değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Çizelge-3.16: Üçüncü füzyonda elde edilen füzantların %0.3 CaCO₃ içeren MRS agardaki zon çapları (mm)(Koloni+berrak zon)

Suş adı	1.Grup (2-6x2-20)	2.Grup (2-6x2-41)	3.Grup (2-6x2-45)	4.grup (2-20x2-41)	5.Grup (2-20x2-45)	6.Grup (2-41x2-45)	Zon çapı (mm.)
A+T Kontrol							0.6
A							0.6
T							0.5
3-1		X					0.9
3-2		X					1.1
3-3		X					1.3
3-4		X					0.6
3-5		X					0.8
3-6		X					1.6
3-7			X				1.6
3-8			X				0.7
3-9			X				1.0
3-10			X				0.6
3-11			X				0.6
3-12			X				1.8
3-13				X			1.6
3-14				X			1.1
3-15				X			1.0
3-16				X			0.5
3-17				X			0.6
3-18				X			1.7
3-19					X		0.4
3-20					X		0.6
3-21					X		1.6
3-22					X		1.0
3-23					X		1.2
3-24					X		1.1
3-25						X	0.5
3-26						X	1.2
3-27						X	1.4
3-28						X	1.0
3-29						X	0.7
3-30						X	0.7

F2 füzantları arasında 6 farklı füzyon gerçekleştirilerek oluşturulan tekrarlamalı protoplast füzyonu ile F3 füzantları seçilmiştir. Üçüncü füzyonda gerçekleştirilen 6 farklı grup füzyondan 1. grupta 2-6x2-20, 2. grupta 2-6x2-41 , 3. grupta 2-6x2-45, 4. grupta 2-20x2-41, 5. grupta 2-20x2-45 ve 6. grupta 2-41x2-45 arasında füzyon gerçekleştirilmiştir. Rejenere olan protoplast petrilerinden CaCO₃

içeren MRS agarda gelişerek zon oluşturan kolonilerden 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5 ve 3-6 2. grupta; 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11 ve 3-12 3. grupta; 3-13, 3-14, 3-15, 3-16, 3-17 ve 3-18 4. grupta; 3-19, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23 ve 3-24 5.grupta; 3-25, 3-26, 3-27, 3-28, 3-29 ve 3-30 ise 6.grupta yer almaktadır.

Birinci füzyon öncesinde CaCO_3 içeren MRS agarda başlangıç suşları olan A ve T ve non-shuffled A+T kontrolünün oluşturdukları zon çapları 0.6, 0.5 ve 0.6 cm olarak tespit edilmiştir. Rejenere olan protoplast petrillerinden CaCO_3 içeren MRS agarda gelişerek zon oluşturan kolonilerden 3-19'un zon çapı 0.4 mm, 3-16 ve 3-25'in zon çapları 0.5 mm, 3-4, 3-10, 3-11, 3-17 ve 3-20'nin zon çapları 0.6 mm, 3-8, 3-29 ve 3-30'un zon çapları 0.7 mm, 3-5'in zon çapı 0.8 mm, 3-1'in zon çapı 0.9 mm, 3-9, 3-15, 3-22 ve 3-28'in zon çapları 1.0 mm, 3-2, 3-14 ve 3-24'ün zon çapları 1.1 mm, 3-3, 3-23 ve 3-26'nın zon çapları 1.2 mm, 3-27'nin zon çapı 1.4 mm, 3-6, 3-7, 3-13 ve 3-21'in zon çapları 1.6 mm, 3-12 ve 3-18'in zon çapları 1.7 mm'dir.

3.3.3.2 Üçüncü füzyonda elde edilen füzantların CaCO_3 içeren MRS agardaki zon çapları nin belirlenmesi (laktik asit denemesi)

2.3.2.2.'ye göre gerçekleştirilen denemede elde edilen sonuçlar Çizelge-3.17'deki gibidir. İndikatör olarak kullanılan JCM 1002'nin konsantrasyonu 2.3.2.2.'ye göre ayarlanmıştır. A+T kontrol ve A ve T kontrol kültürleri ise 3.3.1.1.'e göre hazırlanmıştır. Buna göre 3-1, 3-2, 3-3, 3-6, 3-7, 3-12, 3-16, 3-18, 3-21, 3-26 numaralı kültürler daha iyi sonuç vermiştir.

Rejenere olabilen protoplastlar arasından seçilen bu kolonilerden MRS broth içinde 18 saat geliştirilerek elde edilen aktif kültürler, test organizmalarının antibakteriyal etki gösterdiği *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a karşı ($A_{560}=2.8470$) disk difüzyon tekniği kullanılarak denemeye alınmışlardır. Kültürlerden 100'er µl önce diskler üzerine direkt aktarılmış ve sonrasında süpernatantları ve liyofilize süpernatantları hazırlanarak etki denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge-3.17: Üçüncü füzyonda elde edilen füzantların CaCO_3 içeren MRS agardaki zon çapları (mm)

Suş adı	A_{560} değeri	Zon çapı (mm)
A+T Kontrol	2.019	15.0
A	2.1509	15.0
T	2.2925	14.5
3-1	2.2574	16.0
3-2	2.2333	17.0
3-3	2.2889	17.0
3-4	2.2754	15.0
3-5	2.2781	15.5
3-6	2.0569	18.0
3-7	2.2752	17.0
3-8	2.2421	16.0
3-9	2.2924	15.5
3-10	2.2750	15.5
3-11	2.2788	16.0
3-12	2.2521	17.5
3-13	2.2528	15.0
3-14	2.2782	16.0
3-15	2.2970	16.0
3-16	2.2694	17.0
3-17	2.2894	16.0
3-18	2.2801	17.0
3-19	2.3083	15.0
3-20	2.2289	15.5
3-21	2.3190	16.5
3-22	2.2924	16.0
3-23	2.2887	15.5
3-24	2.2975	15.5
3-25	2.1558	15.5
3-26	2.1027	16.5
3-27	2.1393	16.0
3-28	2.1580	15.0
3-29	2.1401	16.0
3-30	2.0458	15.0

Ø13mm çapında diskler kullanılmıştır

Kullanılan kültürlerin 560 nm dalga boyundaki absorbanları A+T Kontrol, A, T, 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12, 3-13, 3-14, 3-15, 3-16, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, 3-24, 3-25, 3-26, 3-27, 3-28, 3-29 ve 3-30 için sırasıyla 2.019, 2.1509, 2.2925, 2.2574, 2.2333, 2.2889, 2.2754, 2.2781, 2.0569, 2.2752, 2.2421, 2.2924, 2.2750, 2.2788, 2.2521, 2.2528, 2.2782, 2.2970, 2.2694, 2.2894, 2.2801, 2.3083, 2.2289, 2.3190, 2.2924, 2.2887, 2.2975, 2.1558, 2.1027, 2.1393, 2.1580, 2.1401 ve 2.0458'dir. Bu kültürlerin *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a karşı oluşturdukları zon çapları (mm.) ise sırasıyla 15.0, 15.0, 14.5, 16.0, 17.0, 17.0, 15.0, 15.5, 18.0, 17.0, 16.0, 15.5, 15.5, 16.0, 17.5, 15.0, 16.0, 16.0, 17.0, 16.0, 17.0, 15.0, 15.5, 16.5, 16.0, 15.5, 15.5, 15.5, 16.5, 16.0, 15.0, 16.0 ve 15.0'tir.

3.3.3.3. Üçüncü füzyondan seçilen füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktivite sonuçları

2.3.2.3.'e göre yapılan denemede indikatör olarak kullanılan JCM 1002'nin konsantrasyonu 2.3.2.2.'ye göre ayarlanmıştır. Denemede kullanılan ve 3.3.1.2.'de elde edilen aktif A+T kontrol ve A ve T kontrol kültürleri ile 3-1, 3-2, 3-3, 3-6, 3-7, 3-12, 3-16, 3-18, 3-21, 3-26 kültürlerinin süpernatant ve liyofilize süpernatantları ise 2.2.2. ve 2.2.3.'e göre hazırlanmıştır. Süpernatantların başlangıç pH'ları ile sterilizasyon öncesi son pH'ları ve deneme sonunda elde edilen zon çapları (mm) Çizelge-3.18'deki gibidir.

Zon çapları dikkate alınarak antibakteriyal etki düzeylerinin iyi olduğu düşünülen kültürlerden süpernatant ve liyofilize süpernatantlar hazırlanmıştır. Süpernatant hazırlamadan önce ölçülen başlangıç pH değerleri Tablo-18'de gösterildiği gibidir. Başlangıç pH değerleri A+T kontrol ve A ve T kontrol kültürleri ile 3-1, 3-2, 3-3, 3-6, 3-7, 3-12, 3-16, 3-18, 3-21 ve 3-26 için sırasıyla 4.28, 4.22, 4.54, 4.40, 4.43, 4.48, 4.64, 4.41, 4.45, 4.46, 4.41, 4.61 ve 4.77 iken son pH değerleri sırasıyla 6.78, 6.95, 6.80, 6.76, 6.92, 6.78, 6.91, 6.94, 6.75, 6.88, 6.70, 6.77 ve 6.75'tir. Kültür süpernatantlarının indikatöre karşı gösterdiği etki düzeyi sırasıyla 15.0, 15.0, 14.0, 15.0, 17.0, 17.5, 16.5, 18.0, 16.0, 15.0, 16.0, 15.0 ve 15 mm iken; liyofilize süpernatantların etki değerleri sırasıyla 17.0, 18.0, 17.0,

16.0, 20.0, 21.0, 17.0, 18.0, 17.0, 15.5, 17.0, 15.5 ve 15.0 mm olarak belirlenmiştir.

Çizelge-3.18: Üçüncü füzyondan seçilen füzant süpernatantlarının antibakteriyal aktiviteleri (mm)

Suş adı	A ₅₆₀ değeri	Başlangıç pH	Son pH	Süpernatant 10 ⁻¹ A(mm)	Liyofilize Süpernatant 10 ⁻¹ A(mm)
A+T	2.019	4.28	6.78	15.0	17.0
A	2.1509	4.22	6.95	15.0	18.0
T	2.2925	4.54	6.80	14.0	17.0
3-1	2.2574	4.40	6.76	15.0	16.0
3-2	2.2333	4.43	6.92	17.0	20.0
3-3	2.2889	4.48	6.78	17.5	21.0
3-6	2.0569	4.64	6.91	16.5	17.0
3-7	2.2752	4.41	6.94	18.0	18.0
3-12	2.2521	4.45	6.75	16.0	17.0
3-16	2.2694	4.46	6.88	15.0	15.5
3-18	2.2801	4.41	6.70	16.0	17.0
3-21	2.3190	4.61	6.77	15.0	15.5
3-26	2.1027	4.77	6.75	15.0	15.0

13 mm diskler kullanılmıştır.

3.4. Füzant Süpernatantlarının Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada gerçekleştirilen füzyonlar sonunda antibakteriyal aktivite açısından en iyi sonuç verdiği düşünülen suşların gösterdikleri antibakteriyal etkinin bakteriyosin kaynaklı olup olmadığının kontrolü gerekmektedir. Bunun dışında aktivitenin bakteriyosin kaynaklı olduğunun tespit edilmesi halinde, bu bakteriyosinin gasserisinin taşıdığı özelliklere sahip olup olmadığının araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla ikinci füzyon ürünü 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 füzantları ile üçüncü füzyon ürünü 3-2, 3-3, 3-7 ve 3-12 füzantlarında 2.4.1'e göre enzim

denemeleri ve 2.4.2.'ye göre sıcaklık denemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge-3.19'da gösterilmektedir.

Çizelge-3.19: Füzan Süpernatantlarının Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi

	2-6	2-20	2-41	2-45	3-2	3-3	3-7	3-12
Tripsin	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+
60°C 10 dk	+	+	-	+	+	+	+	+
70°C 10 dk	+	+	+	+	+	+	+	+
80°C 10 dk	+	+	+	+	+	+	+	+
90°C 10 dk	+	+	+	+	+	+	+	+
100°C 10 dk	+	+	+	+	+	+	+	+
100°C 30 dk	+	+	+	+	+	+	+	+
100°C 60 dk	+	+	+	+	+	+	+	+
121°C 15 dk	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥

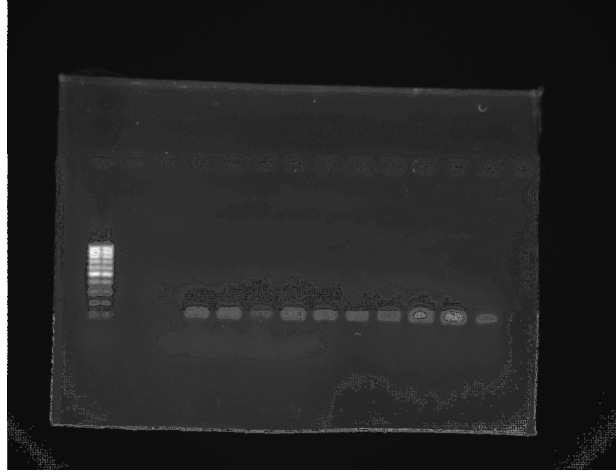
3.5 Füzanların Genetik Analizleri

Çalışmanın sonunda geliştirilmiş özelliklere sahip oldukları düşünülen bazı füzanlarda genetik seviyede beklenen değişimlerin gerçekleşip gerçekleşmediğinin araştırılması amacıyla PZR ve sekans analizleri yapılmıştır.

3.5.1. PZR amplifikasyonu

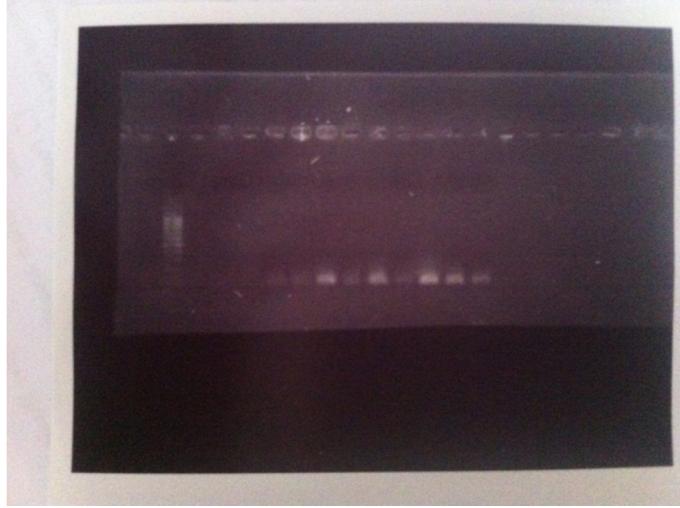
Füzanların parental yapısının tespitinde PZR analizi başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Gasserisin T ve A'ya spesifik primerlerin, orijinal LA39 (A) ve LA158 (T) suşlarının DNA'sı ve füzanların DNA'sı ile muamelesi sonucunda her iki primer için beklenen baz büyüklüğü seviyesinde ürün gözlenmiştir. *Lactobacillus gasseri* LA39 ve LA158 parent suşları, gasserisin A ve gasserisin T üretiminden sorumlu genleri (sırasıyla *gaA* ve *gaT*) taşımaktadır. Füzanlar da spesifik *gaA* geni (102 bp) ve spesifik *gaT* geni (126 bp) taşımaktadırlar (Şekil-3.4.; Şekil-3.5.). Bundan dolayı ileride yapılacak çalışmalarda ampikonların sekans analizlerinin yapılması uygun görülmüştür.

Şekil-3.4: *gaT* spesifik primeri ile gerçekleştirilen PZR amplifikasyonu



Kuyucuklar sırasıyla; 1. marker (100 bp); 2. Boş; 3. Negatif kontrol; 4. LA158(T); 5. LA39 (A); 6. 2-6; 7. 2-20; 8. 2-41; 9. 2-45; 10. 3-B2; 11. 3-B3; 12. 3-C1; 13. 3-C6

Şekil-3.5: *gaA* spesifik primeri ile gerçekleştirilen PZR amplifikasyonu



Kuyucuklar sırasıyla; 1. marker (100 bp); 2. Boş; 3. Negatif kontrol; 4. LA158(T); 5. LA39 (A); 6. 2-6; 7. 2-20; 8. 2-41; 9. 2-45; 10. 3-B2; 11. 3-B3; 12. 3-C1; 13. 3-C6

4. TARTIŞMA

Laktik asit bakterileri pek çok araştırmaya konu olmuş bakterilerdendir. Bunlar endüstriyel laktik asit üretimi, çeşitli malzemelerin üretilmesi (PLA gibi), gıdalarda tat, aroma ve yapının oluşması, gıda patojenlerinin inhibisyonu, gıdaların korunması, insan sağlığına faydalı probiyotik fonksiyonel gıdaların üretilmesi ve bunun gibi pek çok alanda oldukça önemli bakterilerdir. Günümüzde laktik asit bakterilerinin bu olumlu özelliklerinin geliştirilmesi ve bu bakteriler kullanılarak üretilen gıdaların endüstriyel anlamda yaygınlaşması ön plana çıkmaktadır. Özellikle tüketicilerin bilinçlenmesine bağlı olarak gıda koruyucu maddelerine alternatif olabilecek bakteriyosin uygulamaları önem kazanmaktadır.

Laktobasiller pek çok bakteriyosini üretebilen bakterilerdir. Bu bakterilerin bakteriyosinleri güvenli olarak tanımlanmakta ve bazılarının gıda koruyucuları olarak kullanımlarına izin verilmektedir. Bağırsak probiyotiği olarak bilinen *Lactobacillus gasseri*'nin laktik asit bakterileri içerisinde bakteriyosini en fazla üreten türlerden olduğu bilinmektedir. Bu bakterinin farklı suşlarının ürettiği farklı bakteriyosinlerin etki spektrumları geniştir. Bu bakteriyosinlerin ticari olarak kullanımlarına dair henüz bir girişim bulunmamaktadır. Bu nedenle *Lactobacillus gasseri* suşları tez araştırmasında test bakterileri olarak kullanılmıştır.

Laktik asit bakterileri bakteriyosinlerinin üretim kapasitelerinin artırılması pek çok araştırmaya konu olmuştur. Bu amaçla farklı yöntemler kullanılarak araştırmalar gerçekleştirilmiştir, ancak genom-shuffling yöntemi kullanılarak bakteriyosin üretim kapasitelerinin artırılmasına yönelik yapılan bir araştırma bulunmamaktadır.

Genom-shuffling protoplast füzyonu temeline dayalı olmakla birlikte işlem prosedürü farklılık gösteren ve protoplast füzyonuna göre daha başarılı olarak görülen bir yöntemdir. Yöntem, her tür mikroorganizmada kolaylıkla uygulanabilir olması, kısa zamanada sonuç vermesi ve ekonomik açıdan avantaj sağlaması nedeniyle değerli görülmektedir.

Genom-shuffling yönteminin laktobasillerde uygulanabilirliğinin kanıtlandığı birkaç çalışma bulunmaktadır (Patnaik et al., 2002; Wang et al., 2007; Yu et al., 2008). Ancak bu araştırmalarda laktobasillerin asit toleranslarının artırılması ve laktik asit üretim kapasitelerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bakteriyosin üretim kapasitelerinin artırılmasına yönelik olarak gerçekleştirilen genom-shuffling uygulaması bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez araştırması konusu ile bir ilk olmaktadır. Elde edilen bulgulara göre araştırmanın bakteriyosin üretim kapasitelerinin artırılması açısından başarı ile sonuçlandığı ve ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

4.1. Füzyon Öncesinde Antibakteriyal Aktivite İçin Sayım Sonuçları

Araştırmada değişik kültür koleksiyonlarından temin edilen altı farklı tip tür *Lactobacillus gasseri* suşu kullanılmıştır. Bu test bakterilerinin farklı indikatörlere karşı etki spektrumunun belirlenmesi araştırmanın esas kısmında gerçekleştirilecek olan genom-shuffling yönteminde etkin bir tarama-eleme prosedürünün gerçekleştirilebilmesi açısından önem taşımaktadır.

Bu amaçla gerçekleştirilen birinci denemede G1, G2, G3 ve G4 suşları *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella typhimurium* olmak üzere dört farklı indikatör suşa karşı, agar-well yöntemi ile antibakteriyal etki açısından denemeye alınmıştır. İndikatör suşlar ile test bakterilerinin sayıları 3.1.1.1.'de verilmiş olup, indikatör suşların bir gecelik aktif kültürlerindeki bakteri sayıları *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella typhimurium* için sırasıyla için 10^5 , 10^6 , 10^6 ve 10^5 düzeyinde; test bakterilerinden G1, G2'nin 24 saatlik kültürlerindeki bakteri sayıları sırasıyla 10^7 ve 10^6 ; G3 ve G4'ün 24 ve 48 saatlik kültürlerindeki bakteri sayıları ise sırasıyla 10^8 , 10^7 ve 10^8 , 10^7 düzeyindedir. Test bakterilerinin kültür süpernatantlarının elde edildiği aktif kültürler ile indikatör bakterilerin bir gecelik aktif kültürlerinin bakteri sayılarının tespit edilmesi, test bakterilerinin antibakteriyal aktiviteleri arasında kıyaslama yapılabilmesi açısından önemlidir. Araştırmanın devamında kullanılacak olan test bakterilerinin doğru şekilde seçilmesi, gerçekleştirilecek olan genom-shuffling'in etkinliği açısından en

önemli basamağı oluşturmaktadır. Bu nedenle kullanılan tüm test bakterileri ve indikatör bakteriler için aktif kültürlerin içerdiği bakteri sayıları belirlenmiştir. Kültürlerdeki bakteri sayılarının standardizasyonu test bakterilerinin antibakteriyal etki düzeylerinin doğru şekilde değerlendirilebilmesi açısından kolaylık sağlamaktadır.

İkinci denemelerde G1,G2, G3 ve G4 suşlarının 18, 24, 48, 72 ve 96 saatlik kültür süpernatantlarının her biri sırasıyla 3, 5 ve 6.8 pH'a ayarlanmış ve denemeler *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*'e karşı agar-well yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İndikatör suşların bir gecelik aktif kültürlerinin bakteri sayıları ile test bakterilerinin farklı inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kültürlerinin bakteri sayıları 3.1.1.2.'de verilmiş olup, indikatör suşlar için 10^7 ve 10^8 düzeyinde; test bakterilerinden G1'in tüm örnekleri için sırasıyla 10^8 , 10^8 , 10^7 , 10^7 ve 10^6 ; G2'nin tüm örnekleri için sırasıyla 10^8 , 10^7 , 10^7 , 10^6 ve 10^6 ; G3'ün tüm örnekleri için sırasıyla 10^8 , 10^8 , 10^7 , 10^7 ve 10^6 ; G4'ün tüm örnekleri için sırasıyla 10^8 , 10^7 , 10^8 , 10^7 ve 10^6 olarak tespit edilmiştir.

Denemelerde kullanılan indikatör suşlardan *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'ta kuyucuklar etrafında yoğun şekilde bakteri gelişimi gözlenmiştir, geniş ve düzgün zon oluşumları gözlenmiştir. Örnek süpernatantlarının kuyucuk etrafındaki besi ortamına difüzyonu gerçekleştikten sonra bu bölgede *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* gelişimini teşvik ettiği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlar ile literatürlerde verilenler arasında *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı antibakteriyal etki açısından bazı farklar tespit edilmiştir. Örneğin; Charteris et al. (2001) *Lactobacillus gasseri* 9857 (G3)'nin *Bacillus cereus* (ATCC 9139) ve *Enterococcus faecalis* (EF1)'i inhibe ettiği bildirilmiştir. Itoh et al. (1995), Arakawa et al. (2009a), Kawai et al. (2004b) ve Nakamura et al. (2012)'a göre *Lactobacillus gasseri* LA39 JCM (11657) *Bacillus cereus* (JCM 2152, IFO 13494, IFO 13690), *Staphylococcus aureus* (JCM 2151) ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002) ve *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör etki göstermektedir. Arakawa et al. (2008) ve Kawai et al. (2001) *Lactobacillus gasseri* LA39 (JCM 11657) ve

Lactobacillus gasseri LA158 (JCM 11046)'in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002)'e karşı inhibitör etki gösterdiğini bildirmiştir. Elde edilen sonuçlar *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002)'a karşı tespit edilen antibakteriyal etki açısından literatürlerle tamamen uyumludur.

Araştırma sonuçlarına göre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*'a karşı literatürlerde bildirilen antibakteriyal etkinin tespit edilememesinin, literatürlerde bahsi geçen indikatör suşların kullanılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kullanılan tüm test bakterilerinin 24 saatlik kültür süpernatantları ile liyofilize süpernatantlarının *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002)'a karşı iyi düzeyde antibakteriyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Üçüncü denemede *Lactobacillus gasseri* JCM 11046 (gasserisin T üreticisi) ve *Lactobacillus gasseri* JCM 11657 (gasserisin A üreticisi) suşları süpernatantları ve 2. denemede kullanılan bazı süpernatantlar denemeye alınmıştır. İndikatör olarak *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002 ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL B-548'in bir gecelik aktif kültürleri kullanılmıştır. İndikatör suşlar ile test bakterilerinin aktif kültürlerinin bakteri sayıları 3.1.1.3.'te verilmiş olup, bu sayı indikatör suşlar ve JCM 11657 ile JCM 11046 için 10^8 düzeyindedir.

2.2.4.1.'de belirtilen şekilde besi ortamına indikatör mikroorganizmanın inokülasyonu yoluyla gerçekleştirilen agar-well yönteminde alınan sonuçlar yeterli görülmemiştir. Bu yöntemle yapılan denemelerde belirlenen zon çapları indikatör yüzeye yayılarak yapıldığında alınan zon çaplarından farklı olmuştur. Örneğin başlangıç sayım sonuçlarının aynı olmasından dolayı 2. ve 3. denemeler arasında karşılaştırma yapıldığında; 2.denemede etki gösteren kültür süpernatantlarının pH 3'e ait oldukları (121, 141, 151, 211, 221, 241, 251, 311, 331, 341, 351, 431, 441 ve 451), yalnızca 422 numaralı süpernatantın pH 5'e ait olduğu görülmektedir. Ancak 3.denemede kullanılan süpernatantlar pH 6.8'e ayarlanmıştır ve etkinin besi ortamı yüzeyine yayma ekim yöntemi uygulandığında daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Soft agar besi ortamı kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde JCM 1002'de herhangi bir zon oluşumu

gözlenmezken MRS agar üzerine yayma ekim yapıldığında 18 T, 48 A ve 48 T süpernatantları dışındakilerde etki +++ düzeyinde gerçekleşmiştir. Bu üç süpernatantta etki gözlenmemesinden dolayı 24 saatlik kültür süpernatantlarının daha etkili olduğu düşünülmüştür. NRRL-548 için de benzer sonuçlar alınmış ancak etki düzeyi ++'de sınırlı kalmıştır. Disk difüzyon tekniğine göre gerçekleştirilen ekimlerde de yukarıda adı geçen üç süpernatant dışındakilerde JCM 1002 için +++ düzeyinde etki ve NRRL-548 için ise ++ düzeyinde etki gözlenmiştir. Önceki denemelere nazaran daha düzgün zon oluşumu gözleendiği için zon çapının değerlendirilmesinin daha kolay ve güvenilir olduğu düşünülmektedir.

4.2. Protoplast Formasyonu ve Rejenerasyonu

3.3.1.1.'de tespit edilen sayılarda ayarlanmış olan A ve T suşları protoplast izolasyonu prosedürüne uygun koşullar sağlanarak işleme alınmıştır. Her füzyondan önce aynı işlem tekrarlanmış ve her seferinde başarılı bir protoplast izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Protoplast izolasyonunun etkinliği ilgili literatürlerde de belirtildiği gibi mikroskopik inceleme ile tespit edilmiştir. Laktobasillerin protoplast formasyonunda kullanılan mutanolisin en etkili olduğu dönem bakterinin logaritmik gelişim fazı ile erken stasyoner fazı arasındaki dönemdir (Hong-Ki et al., 1991). Bu çalışmada da protoplastı elde edilecek suşlar 18-24 saatlik inkübasyondan sonra işleme alınmıştır. Protoplast izolasyonunda laktobasiller için kullanılan lizozim ve mutanolisin enzim miktarları sabit olup, enzimle muamele süreleri suşa bağlı olarak değişmektedir. Kullanılan mutanolisin ve lizozim konsantrasyonlarının protoplast formasyon sıklığı ve rejenerasyon sıklığını değiştirecek önemli parametreler olduğu Yu et al. (2008) tarafından belirtilmiştir. Daha önceki çalışmalarda genom-shuffling uygulamalarında *Lactobacillus gasseri* suşları kullanılmadığı ve bu suşlardan protoplast izolasyonu gerçekleştirilmediği için çalışmamızdaki enzimle muamele süreleri suşlara göre optimize edilmiştir. Literatürlere göre bu süreler *Lactobacillus rhamnosus* için 1 saat olmakla birlikte (Yu et al., 2008), *Lactobacillus delbrueckii* için 1 saat 30 dk olarak belirlenmiştir.

(John et al., 2008a). Kullanılan altı farklı *Lactobacillus gasseri* suşu için 2 saatlik enzimle muamele, iyi bir protoplast izolasyonu için yeterli görülmüştür.

Liteatürlerde belirtildiği şekilde protoplast oluşumunun ve rejenerasyonun etkinliğinin tespit edilebilmesi amacıyla protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığının hesaplanması gerekmektedir (Yu et al., 2008). Protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığının yüksek olması etkin bir genom-shuffling'in temelini oluşturmaktadır. Kullanılan mutanolisin ve lizozim konsantrasyonlarının bu dereceyi değiştirecek önemli parametreler olduğu Yu et al. (2008) tarafından belirtilmiştir. Araştırmada kullanılan enzim miktarları literatürlerle uyumludur. Protoplast formasyonu osmotik kırılabilirliğe bağlı olarak hesaplanmaktadır. Osmotik basınç stabilizeri olarak kullanılan sukroz, protoplastların iç ve dış basıncını dengede tutmakta ve protoplast kırılabilirliğinin azaltılmasında faydalı olmaktadır (Zhao et al., 2004).

Bu araştırmada gerçekleştirilen 3 farklı füzyonda kullanılan her bir başlangıç suşu için protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklıkları hesaplanmıştır. Buna göre birinci füzyonda kullanılan parent suşların protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığı ortalaması sırası ile 3.24×10^{-1} ve 1.45×10^{-1} 'dir. İkinci füzyonda kullanılan suşların protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığı ortalaması sırası ile 9.78×10^{-1} ve 2.57×10^{-1} 'dir. Üçüncü füzyonda kullanılan suşların protoplast formasyon ve rejenerasyon sıklığı ortalaması sırası ile 9.8×10^{-1} ve 2.01×10^{-1} 'dir. Elde edilen bu sonuçlara göre birinci füzyonda protoplast formasyon oranının düşük olduğu, ancak diğer 2 füzyonda bu oranın %98 olduğu görülmektedir. Birinci füzyon dışındakilerde hücrelerin tamamına yakın bir kısmı protoplasta dönüşmüştür. Protoplast formasyon sıklığının her bir örnek için % 93-99 oranında olması başarılı bir protoplast formasyonu yapıldığını göstermektedir. Ayrıca protoplastların LPB (Lactobacillus Protoplast Buffer) içerisinde korunması için gerekli olan pH derecesinin 6.8 olması gerektiği de bu araştırma ile kanıtlanmaktadır. Daha önce literatürlerde yer alan LPB pH dereceleri 6.8 olarak belirtilmiştir. Patnaik et al. (2002)'ın yaptığı araştırmada pH 8'e ayarlanan LPB'nin protoplastların stabilitelerinin korunması için yeterli olduğu bildirilmiş, ancak bu çalışmada pH 6.8'in daha uygun olduğu tespit edilmiştir.

Birinci füzyondaki rejenerasyon oranı da % 14.5 gibi bir değerle diğerlerine göre daha düşük düzeyde kalmıştır (ikinci füzyon rejenerasyon oranı %25 ve üçüncü füzyon rejenerasyon oranı %20). Ancak bu düşük değerlere rağmen birinci füzyonda elde edilen füzantlar parent suşlara göre bakteriyosin kapasitesi açısından oldukça iyidir. Protoplast formasyonu ve rejenerasyon oranlarının yüksek olması daha etkin bir füzyon oluşumu için gerekli görülmektedir. Ancak bu araştırmada birinci füzyon öncesi bu değerler düşük olmasına rağmen iyi füzant eldesi sağlanabilmiştir.

Mikroskobik olarak protoplastların incelenmesi amacıyla negatif boyama yapılan protoplast preparatları hazırlanmıştır. Bu preparatlarda gözlenen protoplastlarda hücre duvarının olmadığı, hücrenin basil şeklinden çıkarak düzgün olmayan dairesel bir form kazandığı ve nükleusun hücre içerisinde gözlenebildiği tespit edilmiştir (Şekil-3.1).

Protoplastların rejenerasyonu stabilitelerinin sağlanması açısından gerekli bir adım olmakla birlikte RM agarda yapılan seri ekimler ile gerçekleştirilmektedir. RM agarda yapılan ekimlerden sonra literatürlere göre 3-5 gün olan rejenerasyon süresi (Patnaik et al., 2002) bu araştırmada kullanılan test organizmaları için 2 gün olarak belirlenmiştir. Rejenerasyon sonrasında oluşan kolonilerin agar üzerindeki görünüşleri farklılaşmaktadır. Koloniler önceki görünüşlerine göre daha büyük koloni çapına sahip olmakta, daha şeffaf ve yassı koloniler oluşmaktadır. Bu durum Connel et al., (1988) tarafından da belirtilmiştir. *Lactobacillus gasseri*, *L.reuteri* ve *L.salivarius*'ta ayrı ayrı gerçekleştirilen protoplast formasyonu ve rejenerasyonu sonrasında elde edilen yeni koloni görüntülerinin parent hücrelere göre daha büyük olduğu açıklanmıştır. Mikroskobik görünüşlerine bakılacak olursa basil formunu tekrar kazanan rejenere protoplastların önceki görünüşlerine kıyasla zincir oluşturma eğiliminde oldukları tespit edilmiştir (Şekil-3.2). Benzer sonuçlar *L.reuteri*'nin protoplast ve spheroplast oluşumunun incelendiği literatürde de verilmiştir. *L.reuteri*'nin protoplast ve spheroplast oluşumları elektron mikroskobu ile gözlemlenmiş ve protoplast oluşumunu takip eden spheroplast oluşumunda ince bir hücre duvarı meydana geldiği, oluşan yeni hücre duvarı ile bu hücrelerin birbirlerine eklenerek zincir oluşturma özelliğinde olduğu belirtilmiştir (Connell et al., 1988).

4.3. Protoplast Füzyonu

Protoplast oluşumu ve rejenerasyondan sonra gerçekleştirilen basamak rejenere olan hücreler arasından istenen özellikler açısından en iyi olanların seçilmesidir. Bu basamak genom-shuffling etkinliğinin iyi olması için gerçekleştirilen en önemli basamaktır. Burada doğru hücrelerin seçilebilmesi tarama eleme prosedürünün etkinliğine bağlıdır ve tüm sonucu etkileyebilmektedir. Bu nedenle füzyon öncesinde hangi hücrelerin füzyonda kullanılacağını iyi tespit edilmesi gerekmektedir.

Genom-shuffling yönteminde istenen fenotipik özelliklerin geliştirilmesinde en önemli basamak istenen özelliği en iyi şekilde taşıyan parent suş veya suşların seçilmesidir. Tek bir suş kullanılarak genom-shuffling uygulaması yapıldığında var olan özelliğin daha da iyiye taşınabilmesi amacıyla farklı popülasyonlar oluşturulması ve bunlar içerisinde daha gelişmiş olan suşların başlangıç suşları olarak seçilmesi gerekmektedir. Bu amaçla pek çok literatürde nitrosoguanidin (NTG), nitröz asit gibi kimyasal mutajenler veya UV radyasyonu gibi fiziksel mutajenler kullanılmış; mutasyon sonrasında canlı kalabilen suşlar içerisinde gelişmiş özelliklerin taraması yapılarak başlangıç suşlarına karar verilmiştir (Patnaik et al., 2002; Zhang et al., 2002; Wang et al, 2007; Yu et al., 2008; Lv et al, 2012).

İyileştirilmesi istenen fenotipik özelliği iyi olduğu bilinen suşlar arasında genom-shuffling uygulandığı durumlarda tekrar mutasyon oluşturmaya gerek kalmamakta; zaten başlangıçta iyi olan fenotipik özellik ard arda gerçekleştirilen tekrarlamalı protoplast füzyonu sayesinde füzantlarda birikerek artmaktadır. John et al. (2008a); Young-Bae et al. (1997); Hong-Ki et al. (1991); Sukmarini et al., (2009) ve Attallah et al. (2007)'ın yaptığı araştırmalarda başlangıç suşları mutasyona uğratılmamıştır. Bu araştırmada da başlangıç suşları olarak seçilen *Lactobacillus gasseri* LA39 (JCM 11657) ve *Lactobacillus gasseri* LA158 (JCM 11046)'ın sırasıyla iyi birer gasserisin A ve gasserisin T üreticisi oldukları bilinmektedir ve füzantların bakteriyosin üretimindeki değişimi indikatör olarak seçilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (JCM 1002)'a karşı yapılan denemelerle belirlenmiştir.

Literatürlerde de özellikle belirtildiği üzere protoplast füzyonundan sonra iyileştirilmiş özelliklere sahip füzantların etkin şekilde seçilebilmesi için uygulanacak tarama-eleme prosedürünün doğru seçilmiş olması gerekmektedir. Özellikle sekonder metabolitler için uygulanan tarama-eleme metodlarının az olması etkin bir seçim yapılmasında zorluklar meydana getirmektedir. Sekonder metabolitlerin miktarındaki değişikliklerin tespitinde genellikle standart selektif besi ortamına dayalı tarama ve eleme prosedürleri gerçekleştirilmektedir (Patnaik et al., 2002; Zhang et al., 2002; Yu et al., 2008; Lv et al, 2012).

Bu araştırmada tarama eleme prosedüründe yararlanılan yöntem rejenere hücrelerin %0.3 ve %1.5 CaCO_3 içeren MRS agarda oluşturdukları zon çaplarının ölçülmesine dayanmaktadır (Yu et al., 2008; John et al., 2008a, 2008b). Aralarında füzyon gerçekleştirilen suşların, füzyondan önceki kapasitelerine bağlı olarak çeşitli özellikler açısından gelişme göstermesi beklenmektedir. Bu doğrultuda laktik asit üretim kapasitelerinin de artması beklenmektedir. Bu konuda yapılan bazı araştırmalar da bulunmaktadır (John et al., 2008a; Wang et al., 2007; Yu et al., 2008). Başlangıç suşlara göre laktik asit üretim kapasitesi en iyi olan hücreler CaCO_3 içeren MRS agarda iyi zon oluşturmaktadır. Bu zon çapı koloni büyüklüğüne bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte seçilen suşlardaki antibakteriyal etkinin de artış gösterdiği saptanmıştır. %1.5 CaCO_3 içeren MRS agarda zon tespiti mümkün olmamakla birlikte Çizelge-3.9, 3.13 ve 3.16'da da görüldüğü üzere %0.3 CaCO_3 içeren MRS agardaki zon çapları başlangıç suşlarına göre belirgin düzeyde artış göstermiştir. Buna göre başlangıç suşlarının oluşturduğu zon çaplarına yakın sonuç verenler elenmiş ve daha iyi oldukları düşünülen koloniler asit oluşturma yeteneklerinin incelenmesi amacıyla seçilmişlerdir.

4.3.1. Birinci füzyon

Birinci füzyon öncesinde başlangıç suşları olan A ve T ve non-shuffled A+T kontrol suşları aktive edilerek %0.3 CaCO₃ içeren MRS agarda geliştirilmişlerdir. 48 saat sonunda CaCO₃ petrillerinde oluşan koloniler etrafındaki berrak zon büyüklükleri koloninin asit oluşturabilme yeteneği hakkında bilgi vermektedir. Buna göre birinci füzyon sonrasında rejenere protoplast popülasyonlarından 21 adet koloni seçilmiş ve bunlardan 1-3B, 1-3K, 1-2B, 1-2K, 1-1B, 1-12, 1-21, 1-44, 1-37, 1-41, 1-43 ve 1-39 numaralı kolonilerde zon çapının 1.0'dan büyük olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 1-3B, 1-3K ve 1-2B suşlarındaki zon çapları, 0.6 mm zon çapına sahip olan non-shuffled suş ile kıyaslandığında, füzyon sonrası asit oluşturma kapasitelerinin belirgin düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Suşların mikroskopik görüntüleri incelenecek olursa iyi etki gösteren kolonilerden 1-3B, 1-3K, 1-2K, 1-21, 1-37, 1-39, 1-41, 1-43, 1-44'ün kısa basil; 1-12'nin kokobasil ve 1-1B'nin ise uzun basil görünümünde olduğu tespit edilebilir.

Antibakteriyal etki denemesinde 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K, 1-3B, 1-37, 1-41, 1-43 ve 1-44 suşları indikatöre karşı 16.0 mm ve üzerinde bir zon oluşturmuşlardır. Bu suşlara göre elde edilen değerler sırasıyla 17.0, 16.5, 16.0, 17.0, 16.0, 17.0, 18.0, 18.0, 18.0 mm'dir. Kontrol kültürün etki zonu da 16.0 mm'dir.

Elde edilen değerlere göre 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K ve 1-3B suşlarının direkt kültür kullanılarak gerçekleştirilen antibakteriyal aktivite denemelerinde elde edilen sonuçları ile pH'ı 6.8'e ayarlanmış süpernatantları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerinde elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir. Süpernatantların liyofilize edilmesinden sonra elde edilen sonuçlar ise belirgin düzeyde artmıştır. 1-37, 1-41, 1-43 ve 1-44 suşlarının direkt kültür kullanılarak gerçekleştirilen antibakteriyal aktivite denemelerinde elde edilen sonuçları ile pH'ı 6.8'e ayarlanmış süpernatantları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerinde elde edilen sonuçlar farklılık göstermektedir. Bu örneklerde zon çapı süpernatant ve liyofilize süpernatant denemelerinde azalmıştır. 1-37 ve 1-44 suşlarının

başlangıç pH değerlerinin A ve T kontrol suşları veya A+T non-shuffled suşuna göre düşük olduğu görülmektedir. Bu suşlar pH ayarlaması yapılmadan yüksek aktivite göstermekte, pH ayarlamasından sonra ise aktiviteleri azalmaktadır. 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K ve 1-3B suşlarının başlangıç pH'ları nispeten daha fazla olmakla birlikte bu suşlarda pH ayarlaması yapıldıktan sonra da aktivite değişmemiş; liyofilizasyondan sonra ise daha fazla artmıştır.

Lactobacillus gasseri homofermentatif özellik gösteren bir bakteridir. Bu nedenle aerobik ortam koşulları dışında H_2O_2 üretmez ve fermentasyon ürünü olarak da sadece laktik asit üretir. Bu bilgiler ışığında süpernatant pH'ı 6.8'e ayarlanmış olan 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K ve 1-3B kültürlerindeki aktivitenin laktik asit oluşumundan kaynaklanmadığı, etkinin bakteriyosin vb. bileşiklerden kaynaklandığı; 1-37, 1-41, 1-43 ve 1-44 suşlarında ise aktivitenin ağırlıklı olarak laktik asit kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Suşların inkübasyonunda sadece %5 CO_2 içeren inkübatör kullanıldığı ve aerobik inkübasyon yapılmadığından dolayı H_2O_2 'nin aktiviteye etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Bu sonuçlara göre 1-1B, 1-2K, 1-2B, 1-3K ve 1-3B suşlarının F1 havuzunda yer almaları uygun görülmüştür.

4.3.2. İkinci füzyon

F1 füzanları arasında 4 farklı füzyon gerçekleştirilerek oluşturulan tekrarlamalı protoplast füzyonu ile F2 füzanları seçilmiştir. İkinci füzyon sonrasında rejenere protoplast popülasyonlarından 17 adet koloni seçilmiş ve bunlardan 2-6, 2-11, 2-12, 2-20, 2-22, 2-25, 2-26, 2-32, 2-33, 2-36, 2-41, 2-43, 2-45, 2-48, 2-51, 2-52 ve 2-54 numaralı kolonilerde zon çapının 1.0 mm'den büyük olduğu; özellikle 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 numaralı kolonilerdeki zon çapının ise 2.0 mm'den büyük olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 suşlarındaki zon çapları, 0.6 mm zon çapına sahip olan non-shuffled suş ile kıyaslandığında füzyon sonrası asit oluşturma kapasitelerinin belirgin düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Antibakteriyal etki denemesinde 2-6, 2-11, 2-12, 2-20, 2-22, 2-25, 2-26, 2-31, 2-33, 2-36, 2-41, 2-43, 2-45, 2-48, 2-52 ve 2-54 numaralı kültürlerin indikatör

suşa karşı oluşturdıkları zon çapları incelenmiş ve 2-51 ve 2-54 numaralı kültürlerde 15.0mm ve bunların dışındakilerde 16.0mm'nin üzerinde zon oluşumu gözlenmiştir. Bu suşlara göre elde edilen değerler sırasıyla 17.0, 16.5, 18.0, 18.0, 20.0, 17.0, 20.0, 17.0, 17.0, 17.0, 18.0, 17.5, 17.0, 16.5, 16.5 mm'dir. Kontrol kültürün inhibisyon zonu da 15.5 mm'dir.

Elde edilen değerlere göre 2-6, 2-11, 2-12, 2-20, 2-22, 2-25, 2-26, 2-31, 2-33, 2-36, 2-41, 2-43, 2-45, 2-48 ve 2-52 suşlarının direkt kültür kullanılarak gerçekleştirilen antibakteriyal aktivite denemelerinde elde edilen sonuçları ile pH'ı 6.8'e ayarlanmış süpernatantları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerinde elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir. Süpernatantların liyofilize edilmesinden sonra elde edilen sonuçlar 2-6, 2-20 ve 2-41'de belirgin düzeyde artarken, 2-45'de sabit kalmış ve diğer süpernatantlarda değerlerin azaldığı görülmüştür. Özellikle 2-33 ve 2-43 numaralı kültürlerin başlangıç pH'larının kontrol kültürlerinkinden düşük olduğu, ancak süpernatantın pH ayarlaması yapıldığında aktivitenin düşük düzeyde kaldığı tespit edilmiştir. 2-6, 2-20 ve 2-41'de başlangıç pH değerlerinin A ve T kontrol suşları veya A+T non-shuffled suşunun başlangıç pH'ına yakın değerlerde olması ve pH'ı ayarlanan liyofilize süpernatant aktivitesinde artış görülmesi aktivitenin laktik asit artış miktarına göre değil, laktik asit dışındaki metabolitlere bağlı olarak artmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlara göre 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 suşlarının F2 havuzunda yer almaları uygun görülmüştür.

4.3.3. Üçüncü füzyon

F2 füzantları arasında 6 farklı füzyon gerçekleştirilerek oluşturulan tekrarlamalı protoplast füzyonu ile F3 füzantları seçilmiştir. Üçüncü füzyon sonrasında rejenere protoplast popülasyonlarından 30 adet koloni seçilmiş ve bunlardan 3-2, 3-3, 3-6, 3-7, 3-12, 3-13, 3-14, 3-18, 3-21, 3-23, 3-24, 3-26 ve 3-27 numaralı kolonilerde zon çapının 1.0 mm'den büyük olduğu; özellikle 3-6, 3-7, 3-12, 3-13, 3-18 ve 3-21 numaralı kolonilerdeki zon çapının ise 1.6mm ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu suşlardaki zon çapları, 0.6 mm zon çapına sahip olan non-shuffled suş ile kıyaslandığında füzyon sonrası asit oluşturma kapasitelerinin belirgin düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Antibakteriyal etki denemesinde 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12, 3-13, 3-14, 3-15, 3-16, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, 3-24, 3-25, 3-26, 3-27, 3-28, 3-29 ve 3-30 numaralı kültürlerin indikatöre karşı oluşturdukları zon çapları incelenmiş ve 3-1, 3-2, 3-3, 3-6, 3-7, 3-8, 3-11, 3-12, 3-14, 3-15, 3-16, 3-17, 3-18, 3-21, 3-22, 3-26, 3-27 ve 3-29'da 16mm'nin üzerinde zon oluşumu gözlenmiştir. Bu suşlara göre elde edilen değerler sırasıyla 16.0, 17.0, 17.0, 18.0, 17.0, 16.0, 16.0, 17.5, 16.0, 16.0, 17.0, 16.0, 17.0, 16.5, 16.0, 16.5, 16.0 ve 16.0mm'dir. Kontrol kültürün etki zonu da 15.0 mm'dir.

Elde edilen değerlere göre 3-1, 3-2, 3-3, 3-6, 3-7, 3-12, 3-16, 3-18, 3-21 ve 3-26 suşlarının direkt kültür kullanılarak gerçekleştirilen antibakteriyal aktivite denemelerinde elde edilen sonuçları ile pH'ı 6.8'e ayarlanmış süpernatantları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerinde elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir. Süpernatantların liyofilize edilmesinden sonra elde edilen sonuçlar 3-2, 3-3 ve 3-7'de belirgin düzeyde artarken, 3-1 ve 3-18'de sabit kalmış ve diğer süpernatantlarda değerlerin azaldığı görülmüştür. Kullanılan tüm kültürlerin başlangıç pH'larının kontrol kültürlerinkine yakın olmakla birlikte süpernatantın pH ayarlaması yapıldığında yalnız 3-2, 3-3 ve 3-7'de aktivitenin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre 3-2, 3-3 ve 3-7 suşlarının F3 havuzunda yer almaları uygun görülmüştür.

Yapılan 3 füzyon denemesinde elde edilen sonuçlara göre birinci füzyonda A+T ile F1-1B, F1-2K, F1-2B, F1-3K ve F1-3B suşları arasındaki zon çapı farkı sırasıyla 2, 2, 1, 1.5 ve 2 mm olarak belirlenmiştir. İkinci füzyonda A+T ile 2-6, 2-20, 2-41 ve 2-45 suşları arasındaki zon çapı farkı sırasıyla 2, 4, 4 ve 1 mm olarak belirlenmiştir. Üçüncü füzyonda ise 3-2, 3-3 ve 3-7 suşları arasındaki zon çapı farkı sırasıyla 3, 4 ve 1 mm olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre birinci füzyonda seçilen füzantların liyofilize süpernatant aktivitelerinin kontrol suşunun liyofilize süpernatant aktivitesine göre artış gösterdiği görülmüş ve ilk füzyonun başarılı olduğu düşünülmüştür. Bundan sonra gerçekleştirilen ikinci füzyonda kontrol suşu ve füzant liyofilize süpernatantları arasındaki zon çapı farkları birinci füzyondakinden daha fazla olmakla birlikte özellikle 2-20 ve 2-41 numaralı füzantlarda en iyi seviye gözlenmiştir. Üçüncü füzyondan elde edilen değerlerde

ise 3-2 ve 3-3 füzantlarının bakteriyosin aktivitelerinin daha iyi olduğu, ancak ikinci füzyona göre fazla artış göstermediği tespit edilmiştir.

Bulgulara göre *Lactobacillus gasseri* LA39 ve LA158 suşları aktivitelerinin 3 round genom-shuffling sonunda yükselebileceği maksimum düzeye ulaştığına karar verilmiş ve 4. protoplast füzyonu yapılmamıştır. Bu araştırmanın sonucunda *Lactobacillus gasseri* LA39 ve LA158 suşlarında 2 round füzyonun genom-shuffling ile bakteriyosin aktivitesinin artırılması için yeterli olduğu tespit edilmiştir.

Benzer sonuçlar çeşitli literatürlerde de gösterilmiştir. Genom-shuffling yöntemi çeşitli mikroorganizmaların farklı etkenlere karşı toleranslarının veya endüstriyel öneme sahip bileşiklerin üretim kapasitelerinin artırılması amacıyla yaygın olarak kullanılan başarılı bir yöntem olarak bilinmektedir. Bu yöntemde klasik suş geliştirme metodlarına göre daha kısa zamanda beklenen sonuçlara ulaşmakta, düşük maliyetli ve alem düzeyinde farklılık gösteren mikroorganizmalar arasında dahi gerçekleştirilebilme özelliğinden dolayı ise uygulamada pek çok kolaylık sağlamaktadır.

Genom-shuffling uygulamalarının başarılı sonuçları çeşitli literatürlerde bildirilmiştir. Örneğin Patnaik et al. (2002) bazı laktobasil türlerinin asit koşullarına dayanıklılığının artırılması amacıyla 5 round füzyon gerçekleştirmiş ve düşük pH'ta canlılığını koruyabilen füzantlar elde etmiştir. Benzer şekilde *Lactobacillus rhamnosus*'un düşük pH ve glikoza dayanıklılığı artırılmış, volümetrik olarak laktik asit üretim kapasitesi de geliştirilmiştir (Wang et al., 2007; Yu et al., 2008). John et al. (2008b) *Lactobacillus debrueckii*'nin nitroz asit ile mutasyonu sonucunda daha fazla laktik asit üreten ve düşük pH'a daha dayanıklı mutantlar elde etmiştir. Bir araştırmaya göre 3 round füzyon sonunda D-laktik asit üretim miktarı artırılmış *Sporolactobacillus inulinus* ATCC 15538 mutanı elde edilmiştir (Zheng et al., 2010). Shi et al. (2009) 3 round füzyon sonunda etanol üretim kapasitesi, etanol toleransı ve sıcaklığa toleransı artırılmış *Saccharomyces cerevisiae* mutanı elde etmiştir. Bir başka araştırmaya göre 3 round füzyon *Streptomyces* sp. U121'den hidroksisitrik asit üretim kapasitesi artırılmış mutanı elde edilmiştir (Hida et al., 2007). *Corynebacteria*

glutamicum'dan glutamik asit üretiminin artırıldığı (Zheng et al., 2012b); ksiloz ve glikozu fermente ederek yüksek oranda etanol üreten *Saccharomyces cerevisiae* mutantının elde edildiği (Jingping et al., 2012); *Acinetobacter johnsonii*'den düşük sıcaklıkta alkalofilik lipaz üretiminin artırıldığı çalışmalar da dikkat çekmektedir (Wang et al., 2012). Farklı bir araştırmaya göre *Pichia stipitis*'in hardwood spent sulphite liquor (HW SSL)'e toleransının geliştirildiği (Bajwa et al., 2010) bildirilmiştir. *Corynebacteria glutamicum*'dan glutamik asitin ve termotoleransın artırılması 3 round GS sonunda gerçekleştirilmiştir (Zheng et al., 2012b). Asetik asit toleransının artırılması için *Candida krusei*'de 4 round füzyon uygulanmıştır (Wei et al., 2008). *Saccharomyces cerevisiae* CHY1011 ve *Saccharomyces bayanus* KCCM12633'nun nitrozoganidinle mutasyonu sonunda gerçekleştirilen protoplast füzyonu ile biyoetanol üretimi artırılmıştır (Choi et al., 2010). Fitaz üretiminin artırılması amacıyla *Aspergillus niger* CFR 335 ve *Aspergillus ficuum* SGA 01 arasında PF gerçekleştirilmiştir (Gunashree et al., 2010). Yapılan bir araştırmada *Lactobacillus pentosus* ve *Lactobacillus rhamnosus* arasında L-laktik asiti iyi üreten mutantların eldesi için genom-shuffling gerçekleştirilmiştir. Glikoz ve ksilozdan D- ve L-laktik asit üretebilme yeteneğine sahip olan *L.pentosus* D-ldh geni taşımakta, sadece glikozdan L-laktik asit üretebilme yeteneğine sahip olan *L.rhamnosus* ise D-ldh bu geni taşımamaktadır. Füzyantlarda bu genin tespiti ile etkin bir füzyon gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Sukmarini et al., 2009). Bir başka araştırmada *Streptococcus lactis*'in rennin üreten iki suşu (*S.lactis*T6 and *S.lactis*T4) protoplast füzyon ile rekombine edilmiş ve proteolitik aktiviteye bağlı olarak rennin üretim miktarının arttığı bildirilmiştir (Attallah et al., 2007). Asetik asit bakterilerinden etanol üretiminin artırılması için 3 round füzyonun gerçekleştirildiği (Arihara et al., 2000) ve *Clostridium acetobutylicum* CICC 8012'den iki round füzyon sonunda aseton-bütanol-etanol üretiminin artırıldığı da bildirilmiştir (Gao et al., 2012).

Genom-shuffling yöntemi ile farklı sekonder metabolitlerin üretim kapasitelerinin artırılmasına yönelik olarak yapılan araştırmalarda oldukça iyi sonuçlar alınmıştır. Örneğin; genom-shuffling'i ilk uygulayan grupta yer alan Zhang et al. (2002)'in yaptığı bir araştırmada *Streptomyces fradiae*'nin tilozin üretim kapasitesi artırılmıştır. Bu sonuca ulaşmak için klasik suş geliştirme yöntemleri ile yaklaşık 20 yıl gibi bir süre gerekirken 2 round genom-shuffling ile

aynı sonuca ulaşıldığı bildirilmiştir. Dai et al. (2004)'e göre 3 round füzyon sonunda pentaklorofenol (PCP)'ü iyi derecede parçalayan ve yüksek oranda PCP içeren ortamda canlılığını sürdürebilen *Sphingobium chlorophenolicum* füzantları elde edilmiştir. *Streptomyces pristinaespiralis*'ten 4 round füzyon sonrasında pristinamisin üretimi artırılmıştır (Xu et al., 2008). *Bacillus amyloliquefaciens*'in 2 round füzyonundan sonra antimikrobiyal bir polipeptid olan surfaktin üretimi artmıştır (Zhao et al., 2012). *Streptomyces gramineus*'un ϵ -Poli-L-Lisin üretimi artırılmıştır (Li et al., 2012). *Nocardia* sp. ALAA 2000'dan ayamisin üretimi artırılmıştır (El-Gendy et al., 2011). *Aureobasidium pullulans*'tan suda çözünen ekstraselüler bir polisakkarit olan pullulanın üretim kapasitesi artırılmıştır (Kang et al., 2011). Genom-shuffling ile *Tubercularia* sp. TF5'te yeni bileşiklerin keşfine olanak sağlanmıştır (Wang et al., 2010). *Propionibacterium shermanii*'de vitamin B12 üretimi artırılmıştır (Zhang et al., 2010). *Penicillium decumbens* JU-A10'dan selülaz üretiminin artırılması başarı ile sonuçlanmıştır (Jin et al., 2009). *Nodulisporium sylviform*'dan antikanser bir bileşiği olan taksol 4 round füzyon sonunda elde edilmiştir (Zhao et al., 2008). *Saccharopolyspora spinosa* ve *Streptomyces avermitilis* arasında intergenerik füzyon meydana getirilmiş ve spinosad üretim miktarı artırılmıştır (Wang et al., 2009). *Clostridium diolis* DSM 15410'un gliserolden çeşitli plastik malzemelerin hammaddesi olan 1,3-Propandiol üretiminin artırılması 4 round füzyon sonunda gerçekleştirilmiştir (Otte et al., 2009). Hidroksisitrik asit gıda katkısı olarak kullanılan ve bitkilerden elde edilen bir asittir ve *Streptomyces* sp. U121'nin az olan HCA üretiminin genom-shuffling ile artışı sağlanmıştır (Yamada et al., 2007). *Streptomyces gilvosporeus*'tan natamisin üretimi 2 round füzyon sonrasında artmıştır (Luo et al., 2012). *Streptomyces viridochromogenes*'in avilamisin üretim kapasitesi ise 5 round füzyonsonunda artış göstermiştir (Lv et al., 2012). John et al. (2008a) *Lactobacillus delbrueckii* mutanı ve *Bacillus amyloliquefaciens*'in genom shuffling ile rekombinasyonunu sağlamış ve amilaz enzimi kodlayan gene sahip olmayan *Lactobacillus delbrueckii*'nin 3.füzyon döngüsünden sonra amilaz üretmesi sağlanmıştır. Bir başka araştırmada *L.casei* ve *L.acidophilus*88 (laktasin F)'in füzyonu ile lipaz ve proteoliz aktivitesi ile laktik asit üretim kapasitesi artırılmış füzantlar elde edilmiştir. Protoplast füzyonu öncesinde mutasyon gerçekleştirilmemiştir. *L.casei* β -galaktozidaz ve fosfo- β -galaktozidaz aktivitesine sahipken *L.acidophilus* yalnızca β -galaktozidaz aktivitesine sahip bir

suştur. Füzanlarda her iki enzim aktivitesine de rastlanmıştır ve füzan hücreleri parent hücrelere göre daha büyüktür (Young-Bae et al., 1997).

4.4. Füzan Süpernatantlarının Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi

Denemede kullanılan tripsin enzimiyle süpernatantların muamelesi sonucunda hiçbir örnekte diskler etrafında zon gözlenmemiş, yani indikatöre karşı etki görülmemiştir. Güçlü proteolitik aktivite gösteren bu enzim ile etkileşim sonucunda antibakteriyal etkini tamamen yok olması, söz konusu etkinin protein yapılı bir bileşikten kaynaklandığını göstermektedir. İlgili literatürlere göre gasserisin A ve gasserisin T bakteriyosinleri hidrofobik yapıdaki dairesel bakteriyosinler olarak tanımlanmaktadır. Buna göre elde edilen füzanların etkisinin bu bakteriyosinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Katalaz enzimi ortamdaki H_2O_2 'in parçalanmasını katalizleyen bir enzimdir. Buna göre denemelerde elde edilen aktivite değerlerinin bakteriyosin yerine H_2O_2 'den kaynaklanması durumunda katalaz enzimi ile muameleden sonra aktivitenin tamamen kaybolması beklenmektedir (Craik et al., 2003; Kawai et al., 2004b; Maqueda et al., 2008; Sánchez-Hidalgo et al., 2007). Ancak gerçekleştirilen denemeler sonunda süpernatant aktivitelerinin Çizelge-3.19 ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Süpernatantların aktivite değerleri belirlenirken sayısal veriler yerine var/yok değerlendirmesi yapılmıştır.

Sıcaklığa bağlı olarak aktivitedeki değişimlerin belirlendiği denemelerde alınan sonuçlar Çizelge-3.19'da gösterilmiştir. Buna göre 60, 70, 80, 90 ve $100^{\circ}C$ 'lerde 10 dk ve $100^{\circ}C$ 'de 30, 60 dk ısıtım işlem gören süpernatantlarda indikatöre karşı etki düzeyleri değişmemiş; $121^{\circ}C$ 'de 15 dk ısıtım işlem sonucunda ise etki düzeyinin %50 oranında azaldığı, ancak tamamen yok olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar da literatürlerle uyumludur (Karaoğlu vd., 2003).

4.5. Füzantların Genetik Analizleri

İkinci ve üçüncü füzyon sonunda elde edilen füzantların parental suşlar ile benzerliklerinin tespit edilebilmesi ve füzantlarda her iki *Lactobacillus gasseri* suşunun (LA158 ve LA39) ürettiği bakteriyosinlerin (gasserisin T ve gasserisin A) kodlandığı gen bölgelerinin olup olmadığının incelenmesi açısından genetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Parent suşlar ile füzantların DNA izolasyonları yapılmış ve Majhenič et al. (2003)'nın belirttiği koşullarda PZR reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra agaroz jeldeki bant oluşumları incelenmiştir. Buna göre; *gaT* spesifik primerleri ile gerçekleştirilen denemede parent suşlar ile tüm füzantlarda gasserisin T bakteriyosininin kodlandığı gen bölgesine ait bantların bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil-3.4). *gaA* spesifik primerleri ile gerçekleştirilen denemede ise 5T (4.kuyucuk) parent suş örneği dışındaki örnek kuyucuklarından yürütülen PZR ürünlerinde 1. marker çizgisine daha yakın bir yerde bant oluşumu gözlenmiş; 5T örneğinde ise bant oluşumu gözlenmemiştir.

Majhenič et al. (2003)'e göre 1980'lerden bu yana izole edilen *Lactobacillus acidophilus* türleri benzer morfolojik ve fenotipik özellikler göstermektedirler. Bunların pek çoğu benzer özellikteki bakteriyosinleri üretebilme kapasitelerine sahiptir. Bu nedenle *Lactobacillus acidophilus* türleri içerisinde aynı bakteriyosini kodlayan gen bölgelerinin bulunması olasıdır. Araştırmada elde edilen bulgular da benzerlik göstermektedir. Buna göre parental LA158 ve LA39 suşlarında *gaT* geni kodlayan bölgeler tespit edilmiş; ancak LA 158'de *gaA* kodlayan bölge bulunamamıştır. Füzantların her birinde her iki gen bölgesi de tespit edildiği için genom-shuffling sonucunda elde edilen füzantların başarılı şekilde rekombine olduğu düşünülmektedir. Benzer bir sonuç da John et al. (2008a) tarafından da bildirilmiştir. Bu çalışmada *Lactobacillus delbrueckii* ve *Bacillus amyloliquefaciens* genom-shuffling ile füzyona uğratılmış ve elde edilen füzantların *Lactobacillus* karakterinde olduğu ancak amilaz üreten gen bölgesini taşıdıkları tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız, gasserisin A ve T üreticisi olarak bilinen iki *Lactobacillus gasseri* suşunun genom-shuffling yöntemi ile bakteriyosin üretim kapasiteleri geliştirilmiş ve füzantların bakteriyosin üretim kapasitelerinde beklenen düzeyde bir artış meydana gelmiştir. Literatürlerde bağırsak probiyotiği olarak bilinen bu bakterilerin bakteriyosin üretim kapasitelerinin artırılmasına yönelik herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu araştırma rekombinant *Lactobacillus gasseri* suşlarının bakteriyosin üretiminde kullanımlarına dair bir ilk olmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda bu araştırma sonunda elde edilen shuffled suşların tüm karakteristiklerinin incelenmesi ile bu suşların ürettiği bakteriyosinlerden endüstriyel ölçekte üretiminin yapılması ve fonksiyonel gıdalar içerisinde veya probiyotik içeren tabletler halinde bu suşların gıda takviyesi olarak kullanımları mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M.A., Takagi, A. and Koga, Y.,** 1998, Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model, *American Journal of Gastroenterology*, 93: 2097–2101.
- Altermann, E. and Henrich, B.,** 2003, Transcript map of the temperate *Lactobacillus gasseri* bacteriophage ϕ adh, *Microbiology*, 149: 2987–2999.
- Arakawa, K., Kawai, Y., Fujitani, K., Nishimura, J., Kitazawa, H., Komine, K., Kai, K. and Saito, T.,** 2008, Bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from human feces in milk-based media, *Animal Science Journal*, 79, 634–640.
- Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., Tsurumi, K. and Saito, T.,** 2009a, Effects of gassericins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation, *Journal of Dairy Sciences*, 92 :2365–2372.
- Arakawa, K., Kawai, Y., Nishimura, J., Kitazawa, H. and Saito, T.,** 2009b, Negative effect of divalent metal cations on production of gassericin T, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri*, in milk-based media, *International Dairy Journal*, 19: 612–616.
- Arihara, K. and Itoh, M.,** 2000, UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 56: 227–230.
- Attallah, A.G. and Abd-El-Aal, S.KH.,** 2007, Interspecific protoplast fusion between *Streptococcus lactis* rennin producing strains, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(6): 572-576.
- Bajwa, P.K., Pinel, D., Martin, V.J.J., Trevors, J.T. and Lee, H.,** 2010, Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling, *Journal of Microbiological Methods*, 81: 179–186.
- Bautista-Gallego, J. Arroyo-López, F.N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A. and Cocolin, L.,** 2013, Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential, *Food Research International*, 50: 135–142.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., López, P. and Spano, G.,** 2012, Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products, *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, K.J.,** 2001, Antibacterial activity associated with *Lactobacillus gasseri* ATCC 9857 from the human female genitourinary tract, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 615-625.
- Choi, G., Umb, H., Kang, H., Kim, Y., Kim, M. and Kim, Y.,** 2010, Bioethanol production by a flocculently hybrid, CHFY0321 obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*, *Biomass and Bioenergy*, 34: 1232-1242.
- Cocconcelli, P.S., Morelli, L., Vescovo, M. and Bottazi, V.,** 1986, Intergeneric protoplast fusion in lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 35: 211-214.
- Connell, H., Lemmon, J. and Tannock, G.W.,** 1988, Formation and regeneration of protoplasts and spheroplasts of gastrointestinal strains of lactobacilli, *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6): 1615-1618.
- Craik, D.J., Daly, N.L., Saska, I., Trabi, M. and Rosengren, K.J.,** 2003, Structures of Naturally Occurring Circular Proteins from Bacteria, *Journal of Bacteriology*, 185(14): 4011–4021.
- Dai, M. and Copley, S.,** 2004, Genome shuffling improves degradation of the anthropogenic pesticide pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4): 2391–2397.
- del Cardayré, S.B.,** 2005, Developments in strain improvement technology, *Natural products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, Totowa, 107-125.
- Desmond, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. and Ross, R.P.,** 2004, Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10): 5929–5936.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hillb, C.,** 2012, Bacteriocin production: a probiotic trait?, *Applied and Environmental Microbiology*, 1-6.
- Dirixa, G., Monsieurb, P., Dombrechta, B., Danielsa, R., Marchalb, K., Vanderleydena, J. and Michiels, J.,** 2004, Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters, *Peptides*, 25: 1425–1440.
- Edelman, S.,** 2005, Mucosa-adherent lactobacilli: commensal and pathogenic characteristics, Helsinki, 71p.
- El-Gendy, M.A.M and EL-Bondkly, A.M.A.,** 2011, Genome shuffling of marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000 for improved ayamycin production, *Antonie van Leeuwenhoek*, 99:773–780.
- Elkins, C.A. and Mullis, L.B.,** 2004, Bile-mediated aminoglycoside sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12): 7200–7209.
- Francel, A.L., Thongaram, T. and Miller, M.J.,** 2010, The PTS transporters of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, *BMC Microbiology*, 10(77): 13p.
- Fujimura, S., Watanabe, A., Kimura, K. and Kaji, M.,** 2012, Probiotic mechanism of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain against *Helicobacter pylori*, *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3): 1134-1136.
- Gao, X., Zhao, H., Zhang, G., He, K. and Jin, Y.,** 2012, Genomes-shuffling of *Clostridium acetobutylicum* CICC 8012 for improved production of acetone–butanol–ethanol (ABE), *Current Microbiology*, 65: 128–132.
- Gong, J., Zheng, H., Wu, Z., Chen, T. and Zhao, T.,** 2009, Genome shuffling: Progress and applications for phenotype improvement *Biotechnology Advances*, 27: 996–1005.
- Gunashree, B.S. and Venkateswaran, G.,** 2010, Enhanced phytase production through interspecific protoplast fusion of *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 auxotrophic mutants, *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 562–567.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harata, G., He, F., Kawase, M., Hosono, A., Takahashi, K. and Kaminogawa, S.,** 2009, Differentiated implication of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 to immune responses of murine Peyer's patch, *Microbiology and Immunology*, 53: 475–480.
- Hatakka, K., Savilahti, E., Pönkä, A., Meurman, J.H., Poussa, T., Näse, L., Saxelin, M. and Korpela, R.,** 2001, Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomized trial, *British Medical Journal*, 322: 1–5.
- Hida, H., Yamada, T. and Yamada, Y.,** 2007, Genome shuffling of *Streptomyces* sp. U121 for improved production of hydroxycitric acid, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 1387–1393.
- Honda, H., Nagaoka, S., Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Kitazawa, H. and Saito, T.,** 2012, Purification and characterization of two phospho- β -galactosidases, LacG1 and LacG2, from *Lactobacillus gasseri* ATCC33323T, *Journal of General and Applied Microbiology*, 58: 11-17.
- Hong-Ki, J., Park, H.J., Baik, H.S. and Song, J.C.,** 1991, Production and regeneration of *Lactobacillus bulgaricus* protoplasts, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1(4): 246-250.
- Hotchkiss, R.D. and Gabor, M.H.,** 1980, Biparental products of bacterial protoplast fusion showing unequal parental chromosome expression, *Genetics*, 77(6): 3553-3557.
- Ito, Y., Kawai, Y., Arakawa, K., Honme, Y., Sasaki, T., and Saito, T.,** 2009, Conjugative plasmid from *Lactobacillus gasseri* LA39 that carries genes for production of and immunity to the circular bacteriocin gassericin A, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19): 6340–6351.
- Itoh, T., Fujimoto, Y., Kawai, Y., Toba, T. and Saito, T.,** 1995, Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*, *Letters in Applied Microbiology*, 21: 137-141.
- Itoh, H., Uchida, M., Sashihara, T., Ji, Z., Li, J., Tang, Q., Ni, S., Song, L. and Kaminogawa, S.,** 2011, *Lactobacillus gasseri* OLL2809 is effective especially on the menstrual pain and dysmenorrhea in endometriosis patients: randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Cytotechnology*, 63:153–161.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jang, Y., Park, J.M., Choi, S., Choi, Y.J., Seung, D.Y., Cho, J.H. and Lee, S.Y.**, 2011, Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches, *Biotechnology Advances*, 1-12.
- Jin, Z.H., Xu, B., Lin, S.Z., Jin, Q.C. and Cen, P.L.**, 2009, Enhanced production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by genome-shuffling, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159:655-663.
- Jingping, G., Hongbing, S., Gang, S., Hongzhi, L. and Wenxiang, P.**, 2012, A genome shuffling-generated *Saccharomyces cerevisiae* isolate that ferments xylose and glucose to produce high levels of ethanol, *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*,
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A.**, 2007a, Production of L(+) lactic acid from cassava starch hydrolyzate by immobilized *Lactobacillus delbrueckii*, *Journal of Basic Microbiology*, 47: 25–30.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A.**, 2007b, Fermentative production of lactic acid from biomass, an overview on process developments and future perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 524–534.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A.**, 2007c, Polyurethane foam as an inert carrier for the production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus casei* under solid state fermentation, *Letters Applied Microbiology*, 44: 582–587.
- John, R.P., Gangadharan, D. and Nampoothiri, K.M.**, 2008a, Genome shuffling of *Lactobacillus delbrueckii* mutant and *Bacillus amyloliquefaciens* through protoplasmic fusion for l-lactic acid production from starchy wastes, *Bioresource Technology*, 99: 8008–8015.
- John, R.P. and Nampoothiri, K.M.**, 2008b, Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:3105–3109.
- John, R.P., Anisha, G., Pandey, A. and Nampoothiri, K.M.**, 2010, Genome shuffling: A new trend in improved bacterial production of lactic acid, *Industrial Biotechnology*, 6(3): 164-169.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kadooka, Y., Ogawa, A., Ikuyama, K., and Sato, M.,** 2012, The probiotic *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits enlargement of visceral adipocytes and upregulation of serum soluble adhesion molecule (sICAM-1) in rats, *International Dairy Journal*, 2: 623-627.
- Kang, J., Chen, X., Chen, W., Li, M., Fang, Y., Li, D., Ren, Y. and Liu, D.,** 2011, Enhanced production of pullulan in *Aureobasidium pullulans* by a new process of genome shuffling, *Process Biochemistry*. 46: 792–795.
- Karaoğlu, Ş.A., Aydın, F., Kılıç, S.S. and Kılıç, A.O.,** 2003, Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 33: 7-13.
- Kawase, M., He, F., Kubota, A., Yoda, K., Miyazawa, K. and Hiramatsu, M.,** 2012, Heat-killed *Lactobacillus gasseri* TMC0356 protects mice against influenza virus infection by stimulating gut and respiratory immune responses, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 64: 280–288.
- Kawai, Y., Saito, T., Toba, T., Samant, S.K. and Itoh, T.,** 1994, Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (Gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(7):1218-1221.
- Kawai, Y., Saito, T., Uemura, J. and Itoh, T.,** 1997, Rapid detection method for bacteriocin and distribution of bacteriocin-producing strains in *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria isolated from human feces, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(1): 179-182.
- Kawai, Y., Saito, T., Suzuki, M. and Itoh, T.,** 1998, Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericin A, hydrophobic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62: 887-892.
- Kawai, Y., Saitoh, B., Takashi, O., Kitazawa, H., Saito, T., Nakajima, H. and Itoh, T.,** 2000, Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64: 2201-2208.
- Kawai, Y., Ishii, Y., Uemura, K., Kitazawa, H., Saito, T. and Itoh, T.,** 2001, *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin, *Food Microbiology*, 18: 407-415.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Itoh, T. and Saito, T., 2004a,** Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5): 2906–2911.
- Kawai, Y. Kemperman, R., Kok, J. and Saito, T., 2004b,** The circular bacteriocins gassericin A and circularin A, *Current Protein and Peptide Science*, 5: 393-398.
- Kawai, Y., Takahashi, R., Arakawa, K. and Saito T., 2006,** Structural and functional characteristics of gassericin A and T produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 and LA158, *Journal of Lactic Acid Bacteria*, 17: 32–39.
- Kawai, Y., Kusnadi, J., Kemperman, R., Kok, R., Ito, Y., Endo, E., Arakawa, K., Uchida, H., Nishimura, J., Kitazawa, H. and Saito, T., 2009,** DNA sequencing and homologous expression of a small peptide conferring immunity to gassericin A, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5): 1324-1330.
- Kimura, K., 2004,** Health benefits of probiotics: probiotics for *Helicobacter pylori* infection, *Food Science Technology Research*, 10(1): 1-5.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C.J., 2008,** Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4): 728–764.
- Leja, K., Myszka, K. and Czaczyk, K., 2011,** Genome shuffling: a method to improve biotechnological processes, *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 92(4): 345-351.
- Li, S., Li, F., Chen, X., Wang, L., Xu, J., Tang, L. and Mao, Z., 2012,** Genome-shuffling enhanced ϵ -poly-L-lysine production by improving glucose tolerance of *Streptomyces gramineus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166:414–423.
- Lin, T., 2012,** Sensory analysis, instrumental analysis and consumers' acceptance toward multifunctional ice creams, Doctor of Philosophy, University of Missouri, 184p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Luo, J., Li, J., Liu, D., Liu, F., Wang, Y., Song, X. and Wang, M.**, 2012, Genome-shuffling of *Streptomyces gilvosporeus* for improving natamycin production, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 6026–6036.
- Lv, X., Jin, Y., Li, Y., Zhang, H. and Liang, X.**, 2012, Genome shuffling of *Streptomyces viridochromogenes* for improved production of avilamycin, *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Majhenič, A.C., Matijašič, B.B. and Rogelj, I.**, 2003, Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7; *Journal of Dairy Research*, 70: 199-203.
- Magnusson, J.**, 2003, Antifungal activity of lactic acid bacteria, Doctor's dissertation, 38p.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Di'az-Mun'iz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Alterman, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D. Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. And Mills, D.**, 2006, Comparative genomics of the lactic acid bacteria, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 103(42): 15611–15616.
- Maqueda, M., Sa'nchez-Hidalgo, M., Fern'andez, M., Montalba'n-Lo'pez, M., Valdivia, E. and Mart'inez-Bueno, M.**, 2008, Genetic features of circular bacteriocins produced by gram-positive bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 32: 2–22.
- Miyazawa, K., He, F., Kawase, M., Kubota, A., Yoda, K. and Hiramatsu, M.**, 2011, Enhancement of immunoregulatory effects of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 by heat treatment and culture medium, *Letters in Applied Microbiology*, 53: 210–216.
- Moncheva, P., Tishkov, S. and Chipeva, V.**, 2001, Innovative aspects in biotechnology of prokaryotes, Sofia-Bulgaria, 206p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morelli, L., Cocconcelli, P.S., Bottazi, V., Damiani, G., Ferretti, L. and Sgaramella, V.**, 1987, *Lactobacillus* protoplast transformation, *Plasmid*, 17: 73-75.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P.V., Jain, S. and Yadav, H.**, 2012, Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods, *FEMS Microbiology Letters*, 334: 1–15.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. and Clemens, R.A.**, 1999, Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(1): 13–126.
- Nakamura, K., Arakawa, K., Kawai, Y., Yasuta, N., Chujo, T., Watanabe, M., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., Tsurumi, K. and Saito, T.**, 2012, Food preservative potential of gassericin A-containing concentrate prepared from cheese whey culture supernatant of *Lactobacillus gasseri* LA39, *Animal Sciece Journal*, 1-6.
- Nitisinprasert, S., Nilphai, V., Bunyun, P., Sukyai, P., Doi, K. and Sonomoto, K.**, 2000, Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. resistant to antibiotics, *Journal of Natural Science*, 34: 387-400.
- Nowroozi, J., Mirzaii, M. and Norouzi, M.**, 2004, Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria, *Iranian Journal of Public Health*, 33(2): 1 -7.
- Oh, K., Kim, M., Kim, H., Kim, B., Baik, M., Auh, J. and Park, C.**, 2005, Enzymatic characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 expressed in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiology Letters*, 252:175–181.
- Oh, S., Kim, S.H. and Worobo, R.W.**, 2000, Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC, *Journal of Dairy Sciences*, 83: 2747–2752.
- Otte, B., Grunwaldt, E., Mahmoud, O., Jennewein, S.**, 2009, Genome-shuffling in *Clostridium diolis* DSM 15410 for improved 1,3-propanediol production, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24): 7610–7616.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Patnaik, R., Louie, S., Gavrilovic, V., Perry, K., Stemmer, W.P.C., Ryan, C.M. and del Cardayre, S.**, 2002, Genome-shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance, *Nature Biotechnology*, 20: 707-712.
- Petri, R. and Schmidt-Dannert, C.**, 2004, Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling, *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 298–304.
- Rogelj, I. and Matijašić, B.B.**, 2006, *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7-from isolation to application, *Biologia*, 61(6): 761-769.
- Saito, T.** "Search for excellent probiotic lactic acid bacteria and their applications", <http://www.talab.org.tw/download/T.Saito.pdf>.
- Sánchez-Hidalgo, M., Montalbán-López, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E. and Maqueda, M.**, 2007, Natural ribosomally synthesized circular proteins, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Sanders, M.E. and Klaenhammer, T.R.**, 2001, The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic, *Journal of Dairy Sciences*, 84: 319–331.
- Sashihara, T., Suek, N., Furuichi, K. and Ikegami, S.**, 2007, Effect of growth conditions of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on the immunostimulatory activity for production of interleukin-12 (p70) by murine splenocytes, *International Journal of Food Microbiology*, 120: 74-281.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O.**, 1972, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriological Reviews*, 36(4): 407-477.
- Shi, D., Wang, C. and Wang, K.**, 2009, Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*, 36:139–147.
- Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K.**, 2002, Role of lactic acid bacteria in food preservation and human health, *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1): 20-24.
- Stephanopoulos, G.**, 2002, Metabolic engineering by genome shuffling, *News and Views*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stoecker, L., Nordone, S., Gunderson, S., Zhang, L., Kajikawa, A., LaVoy, A., Miller, M., Klaenhammer, T.R. and Dean, G.A.,** 2011, Assessment of *Lactobacillus gasseri* as a candidate oral vaccine vector, *Clinical Vaccine Immunology*, 18(11): 1834-1844.
- Sukmarini, L., Nurhayati, R.W., Fitriani, D. and Saksono, B.,** 2009, Genome shuffling of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus rhamnosus* for developing fusants for L-lactic acid production from biomass: Development of a biomarker for selecting fusants target, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108.
- Tanaka, O. and Ohmomo, S.,** 2001, Efficient protoplast regeneration for some homofermentative lactobacilli and pediococci, *Archives of Microbiology*, 177: 36–40.
- Toba, T., Yoshioka, E. and Itoh, T.,** 1991, Lactacin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Letters in Applied Microbiology*, 12: 43-45.
- Toit, M.D., Dicks, L.M.T. and Holzapfel, W.H.,** 2001, Taxonomy of obligately homofermentative and facultatively heterofermentative lactobacilli in pig faeces, *Letters in Applied Microbiology*, 32: 199-204.
- Tsai, C., Ke, P., Hsu, T. and Hsieh, Y.,** 2012, Oral administration of multiple lactic acid bacteria strains suppressed allergic responses IgE in an ovalbumin-induced allergy BALB/c mouse model, *African Journal of Microbiology Research*, 6(6): 1206-1212.
- Turková, K., Mavrič, A., Narat, M., Rittich, B., Španová, A., Rogelj, I., and Matijašić, B.B.,** 2012, Evaluation of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties, *Folia Microbiology*.
- Verma, N., Bansal, M.C. and Kumar, V.,** 2011, Protoplast fusion technology and its biotechnological applications.
- Wang, Y., Li, Y., Pei, X., Yu, L. and Feng, Y.,** 2007, Genome-shuffling improved acid tolerance and l-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*, *Journal of Biotechnology*, 129: 510–515.
- Wang, C., Zhang, X., Chen, Z., Wen, Y. and Can, Y.S.,** 2009, Strain construction for enhanced production of spinosad via intergeneric protoplast fusion, *Journal of Microbiology*, 55: 1070–1075.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, M., Liu, S., Li, Y., Xu, R., Lu, C. and Shen, Y.,** 2010, Protoplast mutation and genome-shuffling induce the endophytic fungus *Tubercularia* sp. TF5 to produce new compounds, *Current Microbiology*, 61: 254–260.
- Wang, H., Zhang, J., Wang, X., Qi, W. and Dai, Y.,** 2012, Genome shuffling improves production of the low temperature alkalophilic lipase by *Acinetobacter johnsonii*, *Biotechnology Letters*, 34:145–151.
- Wei, P., Li, Z., He, P., Lin, Y. and Jiang, N.,** 2008, Genome shuffling in the ethanologenic yeast *Candida krusei* to improve acetic acid tolerance, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 49: 113–120.
- Welman, A.D., Maddox, I.S. and Archer, R.H.,** 2003, Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 95: 1200–1206.
- Wu, T., Tsai, C., Hwang, Y. and Chiu, T.,** 2012, Effect of antioxidant activity and functional properties of chingshey purple sweet potato fermented milk by *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, and *L. gasseri* strains, *Journal of Food Science*, 71(1): M2-M8.
- Xu, S., Boylston, T.D. and Glatz, B.A.,** 2005, Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9064-9072.
- Xu, B., Jin, Z., Wang, H., Jin, O., Jin, X., and Cen, P.,** 2008, Evolution of *Streptomyces pristinaespiralis* for resistance and production of pristinamycin by genome shuffling, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80:261–267.
- Yamada, T., Hida, H. and Yamada, Y.,** 2007, Isolation of hydroxycitric acid-producing *Streptomyces* sp. U121 and generation of improved mutants by genome shuffling, *Actinomycetologica*, 21: 40–45.
- Yasuda, E., Serata, M. and Sako, T.,** 2008, Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall associated polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* 74, 4746-4755.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yebra, M.J., Monedero, V., Pérez-Martínez, G. and Rodríguez-Díaz, J.,** 2012, Genetically engineered lactobacilli for technological and functional food applications, *Food Industrial Processes–Methods and Equipment*, 143-168.
- Yoda, K., He, F., Kawase, M., Miyazawa, K. and Hiramatsu, M.,** 2012, Oral administration of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 stimulates peritoneal macrophages and attenuates general symptoms caused by enteropathogenic *Escherichia coli* infection, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 1-6.
- Yoshida, A., Yamada, K., Yamazaki, Y., Sashihara, T., Ikegami, S., Shimizu, M. and Totsuka, M.,** 2011, *Lactobacillus gasseri* OLL2809 and its RNA suppress proliferation of CD4+ T cells through a MyD88-dependent signalling pathway, *Immunology*, 133, 442-451.
- Young-Bae, J., Heo, K., Kim, S., Baik, H. and Jun, H.,** 1997, Properties of the fusants of *Lactobacillus acidophilus* 88 and *Lactobacillus casei* subsp. *casei* KCTC 1121, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(1), 25-31.
- Yu, L., Pei, X., Lei, T., Wang, Y. and Feng, Y.,** 2008, Genome shuffling enhanced l-lactic acid production by improving glucose tolerance of *Lactobacillus rhamnosus*, *Journal of Biotechnology* 134: 154–159.
- Yuan, L., Kurek, I., English, J. and Keenan, R.,** 2005, Laboratory-directed protein evolution, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(3): 373–392.
- Zhao, K., Zhou, D., Ping, W. and Ge, J.,** 2004, Study on the preparation and regeneration of protoplast from taxol-producing fungus *Nodulisporium sylviforme*, *Nature and Science*, 2(2): 52-59.
- Zhao., K., WenXiang, P., LiNa, Z., Jun, L., Yan, L., Tao, J. and DongPo, Z.,** 2008, Screening and breeding of high taxol producing fungi by genome shuffling, *Science in China Series C: Life Sciences*, 51(3): 222-231.
- Zhao, J., Li, Y., Zhang, C., Yao, Z., Zhang, L., Bie, X., Lu, F. and Lu, F.,** 2012, Genome shuffling of *Bacillus amyloliquefaciens* for improving antimicrobial lipopeptide production and an analysis of relative gene expression using FQ RT-PCR, *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*, 9(6): 889-96.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhang, Y., Perry, K., Vinci, V.A. and Powell, K.,** 2002, Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria, *Nature*, 415: 644-646.
- Zhang, Y., Liua, J., Huangb, J. and Maoa, Z.,** 2010, Genome shuffling of *Propionibacterium shermanii* for improving vitamin B12 production and comparative proteome analysis, *Journal of Biotechnology*, 148: 139–143.
- Zheng, H., Gong, J., Chen, T., Chen, X. and Zhao, X.,** 2010, Strain improvement of *Sporolactobacillus inulinus* ATCC 15538 for acid tolerance and production of d-lactic acid by genome shuffling, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1541–1549.
- Zheng, Z., Sheng, B., Ma, C., Zhang, H., Gao, C., Su, F. and Xua, P.,** 2012a, Relative catalytic efficiency of ldhL- and ldhD-encoded products is crucial for optical purity of lactic acid produced by *Lactobacillus* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 3480–3483.
- Zheng, P., Liu, M., Liu, X., Du, Q., Ni, Y. and Sun, Z.,** 2012b, Genome shuffling improves thermotolerance and glutamic acid production of *Corynebacteria glutamicum*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:1035–1043.

ÖZGEÇMİŞ**KİŞİSEL BİLGİLER****Soyadı** : ERTEN**Adı** : Özlem**Mektup Adresi** : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100, Bornova-İzmir/ TÜRKİYE**Cep Tel.** : +90 505 8040307**E-posta** : ozlemerten2003@yahoo.com, ozlemerten2003@gmail.com**Doğum Tarihi** : 21/ 01/ 1976**Doğum Yeri** : ANKARA**EĞİTİM****Doktora (2006-2013)** : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**Yüksek Lisans (2003-2005):** Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü**Lisans (1994-1999)** : Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü**Lise (1986-1994)** : Ankara Gazi Anadolu Lisesi**BURS ve ÖDÜLLER**

1999: Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölüm İkindiliği

2006-2013: TÜBİTAK Yurt İçi Doktora Bursu

Yüksek Lisans Tezinin Adı:

Diş çürüklerine karşı probiyotiklerin kullanılma olanakları

Doktora Tezinin Adı:Protoplast füzyonu kullanılarak bazı *Lactobacillus* suşlarının bakteriyosin üretim kapasitelerinin artırılması