

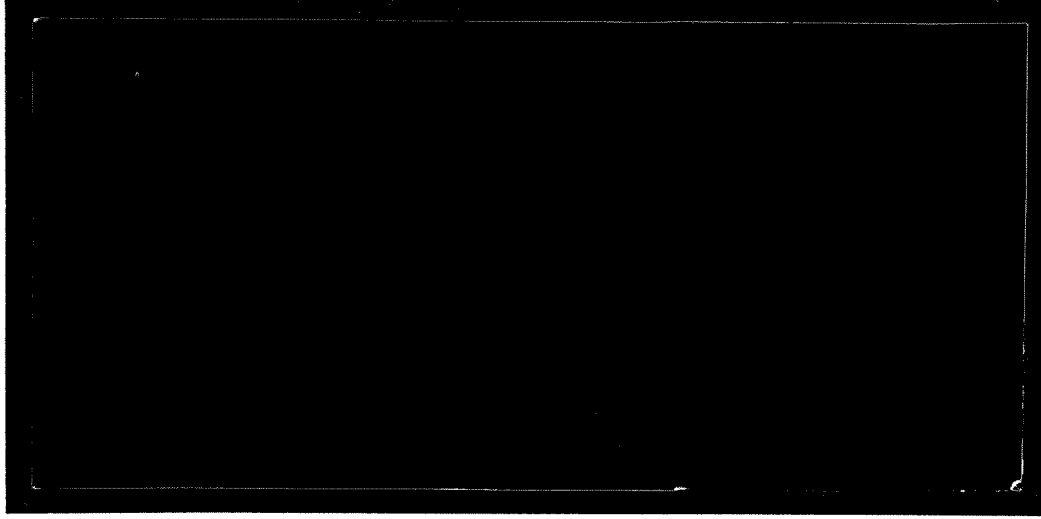
D/P

1999-253



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu  
Agriculture Forestry and Food Technologies Research Grant  
Committee

●  
**PCR TEKNİĞİ İLE BAKTERİOSİN GENİ  
AMPLİFİKASYONU**

**PROJE NO : TOGTAG 1520**

**DOÇ.DR. CANDAN GÜRAKAN  
OSMAN ÇATALOLUK**

**EKİM 1998  
ANKARA**

## ÖNSÖZ

Gerçekleştirilen proje’de bakteriosin üreten ve daha önce literatürde çalışılmamış olan *Laktobasillus* suşları seçilmiş ve PCR yöntemi ile bu genin kromozom üzerinde lokasyonunun bulunmasına çalışılmıştır. *Laktobasillus* LBI suşu için degenerate primerlerle yapılan inverse PCR tekniği ile aranan genin amplifikasyonu sağlanmıştır. Bu yöntemle lokasyonu bulunan genin sekans analizi yapılarak gerçek amino asit sekansı ortaya çıkarılmıştır. Son olarak bir bakteriosin geninin ekspresyonu bakteriosin üretmeyen bir *L. plantarum* 80 suşunda denenmiştir.

TOGTAG 1521 numaralı projemizin, TÜBİTAK-Tarım Orman ve Gıda Araştırma Gurubu tarafından, 25 Aralık 1995-25 Haziran 1998 tarihleri arasında desteklenmesiyle gerçekleştirilebilmesi nedeniyle TÜBİTAK’a araştırma gurubumuz adına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla,

Doç.Dr.G.Candan Gürakan

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
ŞEKİLLER.....	4
TABLolar.....	5
ÖZET.....	6
ABSTRACT.....	7
PROJE ANA METNİ.....	8
GİRİŞ.....	8
GELİŞME.....	10
. Bakteriyel suşlar.....	11
. Besiyeri üreme şartları.....	11
. Bakteriosin aktivitesi.....	11
. Bakteriosin amino asit sıralaması.....	11
. Amino asit sıralamasına göre primer tasarımı.....	12
. Primer 1, Primer 2.....	12
. Yeni primerlerin tasarımı ve sentezi.....	13
. Primer 3, Primer 4, Primer 5.....	13
. Primer 6 .....	14
. Genomik DNA ile PCR.....	15
. Restriksiyon enzimleri ile kesim.....	18
. Ligasyon .....	18
. DNA sekans tayini .....	18
. Elektroporasyon ile transformasyon.....	18
. Plazmit izolasyonları çalışmaları.....	19
. Suş tanımlaması.....	19
SONUÇ.....	20
. Bakteriosin aktivitesi.....	28
NETİCE .....	31
REFERANSLAR.....	32

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Inverse PCR ile amplifikasyon.....	10
Şekil 2: Bakteriosin amino asit sekansı.....	12
Şekil 3: Plazmit izolasyonu.....	21
Şekil 4: 334 bp lik fragmantın jel elektroforezi.....	22
Şekil 5: 334 bp lik fragmantın DNA sekansı.....	23
Şekil 6: 530 bp lik fragmantın DNA sekansı.....	25
Şekil 7: 498 bp lik fragmantın DNA sekansı.....	26
Şekil 8: 498 bp lik DNA dizilimi ve buna göre amino asit sıralaması.....	27
Şekil 9: Proteinaz K'nın bakteriosin üzerine etkisi.....	29
Şekil 10: Zamana ve pH a karşı bakteriosin aktivite ölçümü.....	30

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Aktif bakteriosinin bazı mikroorganizmalar üzerinde etkisi.....	15
Tablo 2: Düz ve ters PCR serilerinde kullanılan primerler.....	28

## ÖZET

Bu çalışmada öncelikle PCR yöntemi ile bakteriosin genine ulaşılabilirlik araştırılmıştır. Birçok primerin kullanıldığı deneylerde *Lactobacillus* suşları bakteriosin üreticisi olarak incelenmiştir. *Listeria monositojenes* üzerinde etkili *Laktobasillus* suşu bu çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir. Bakteriosinin amino asit sıralamasına göre primerler sentezlenmiş ve bakteriosin geni fragmantını amplifiye etmek için kullanılmıştır. Bu organizmanın bakteriosin geni düz ve ters polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) serisi ile amplifiye edilmiş ve *Escherichia coli* 'ye klonlanmış ve sekansı tespit edilmiştir. DNA sekans analizi bu bakteriosinin 38 amino asitden oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. pGKV 21 vektörüne aktarılan bakteriosin operonu, doğal olarak bakteriosin üretemeyen *Laktobasillus plantarum* 80 suşunda bakteriosin üretmiştir. Identifikasyon çalışmaları sonucunda bakteriosin üreticisi mikroorganizmanın *Laktobasillus salivarius* olduğu ortaya çıkmıştır.

Bu araştırma PCR tekniği ile bir *Laktobasillus* suşu olan *Laktobasillus salivarius* da bakteriosin üretiminden sorumlu genetik determinantların yerlerinin tespitini rapor etmektedir. Ayrıca, literatürde henüz bilinmeyen yeni bir bakteriosinin DNA sekans dizilimi bulunmuştur. Bu sekans dizilimi farklı organizmalar tarafından üretilen bakteriosin genlerinin birbiriyle kıyaslanması (Gen Bankası Data Baz Verileri ile) olanağını sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Bakteriosin, *Laktobasillus*, PCR, Ters PCR

## ABSTRACT

In this study, the possibility to reach bacteriocin gene using PCR system was searched. *Lactobacillus* strains were tested as bacteriocin producers. The strain producing an effective bacteriocin on *Listeria monocytogenes* was selected for further studies. A set of degenerate PCR primers deduced from aminoacids were synthesized and used to amplify bacteriocin gene fragment. Using forward and inverse primers, DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR ) series, cloned in *Escherichia coli* and sequenced. DNA sequencing of these fragmants has revealed that this bacteriocin is composed of 38 amino acids. Integration of AseI cut fragment into pGKV 21 and introduction of this recombinant plasmid into *Lactobacillus plantarum* 80 resulted in bacteriocin producing transformants. Identification tests have shown that the bacteriocin producing *Lactobacillus* strain was *Lactobacillus salivarius*.

This study reports the localization of the genetic determinants of a bacteriocin production in a *Lactobacillus* strain, *Lactobacillus salivarius* by using PCR technology. In addition, the DNA sequence of a new, unknown bacteriocin has been determined. This DNA sequence information would provide the sequence comparison (using the GeneBank data base) of bacteriocin genes of different organisms.

Keywords: Bacteriocin, *Lactobacillus*, PCR, Inverse PCR



## PROJE ANA METNİ

### GİRİŞ

Laktik asit bakteri (LAB) lerinin birçok mikroorganizmanın üremesini engelleyici etkisi bu organizmaların gıdaları koruma amaçlı kullanılmasını getirmiştir. Bu bakteriler laktik asit üretimi ile gıdalarda istenmeyen organizmaları engellemektedirler. Birçok fermente gıda madesinde, laktik asit bakterileri baskın bakteriler olarak fermentasyona neden olmaktadır. Bu gıda maddeleri arasında, yoğurt, peynir gibi süt ürünlerini, sucuk, sosis gibi et ürünlerini, turşu, zeytin, sauerkraut gibi bitkisel ürünleri, ekşi ekmek (Trabzon ekmeği) gibi un mamullerini sayabiliriz. Barsakta kolonize olabilen ve barsak hücrelerine yapışma özelliğine sahip bulunan konsantre laktik asit bakterileri ise bugün probiotikler adı altında çok önemli bir ürün olarak Türkiye’de de piyasadaki yerini almış bulunmaktadır (Gıda Teknolojisi Dergisi) . Bazı laktik asit bakterileri ise laktik asit, disetil, hidrojen peroksite ek olarak, antimikrobiyel madde olarak bilinen bakteriosinleri üretirler (TAGG ve McGiven, 1976). Bakteriosinler bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen ve zararlı bazı bakterilerin hücre membranı üzerinde etkili protein veya peptid yapıları olarak tanımlanabilir. Çok önce, 1944 de MATTICK ve Hirsch (1944) tarafından güçlü bir engelleyici madde olarak yayınlanmıştır. Kimi zaman öldürücü (liziz) etkiye sahiptirler (BROUGHTON, 1990). Gıdalarda bulunan patojen mikroorganizmaları ölürebilme özelliğine sahiptirler (LEWUS ve ark., 1991).

LAB lerinin bakteriosinleri 3 farklı sınıftan oluşmaktadır. I. Sınıf :Lantibiotikler II. Sınıf: Küçük ve ısıya dayanıklı lantibiotik olmayan gurup (<5kDa) ( II a: Güçlü antilisterial etki ile Pediosin benzeri bakteriosinler, Iib: İki peptidli bakteriosinler IIc: Sec-bağımlı salgılanan bakteriosinler) ve III. Sınıf: Büyük ve ısıya hassas proteinler (>30 kDa) (NES ve ark., 1996). Son yıllarda yapılan çalışmalarda IV üncü bir

bakteriosinler gurubu daha tanımlanmıştır. Kompleks bakteriosinler olarak adlandırılan, bu gurup tanımlanamamış protein, lipid ve karbonhidratların karışımlarından oluşmuştur. Hücrelerin alınıp üstte kalan sıvı kısımdan hazırlanan *Laktobasillus plantarum* LPCO10 bakteriosin aktivitesi proteazların etkisi ile olduğu gibi glikolitik ve lipolitik enzimlerle de yok edilmiştir (JIMENAZ-DIAZ ve ark., 1993). Ancak bu bakteriosinler halen biyokimyasal seviyede yeterli derecede karakterize edilememiştir (NES ve ark., 1996). Deneysel veriler kompleks bakteriosin aktivitelerinin, hücredeki bazı yapıların veya bulyonun bilinen bakteriosinle arasındaki interaksiyondan olabileceğini göstermektedir (JIMENAZ-DIAZ ve ark., 1993).

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen 34 amino asite sahip nisin, 45 i aşkın ülkede belirtilen limitin altında legal olarak, gıda maddelerinde kullanılabilen ve bugüne kadar en çok çalışılmış bakteriosin çeşididir. Bu bakteriosin I.Sınıf bakteriosin gurubuna dahil lantibiotiktir. Lantibiotikler lanthionin içermektedirler. Lanthionin iki alanin aminoasiti arasında S-S bondu ypmış yapıya verilen isimdir. Nisinin detaylı yapısı Broughton tarafından verilmiştir (BROUGHTON, 1990). Bu çalışmada ayrıca nisinin toksik olmadığı, FAO/WHO tarafından kullanımına izin verildiği ve kullanan ülkelerin listesi ile maximum kullanılan limit belirtilmiştir. Fields genel olarak bakteriosinlerin gıdalarda kullanımı ve bu konudaki FDA (Food and Drug Administration) tarafından hazırlanan düzenlemeleri rapor etmiştir (FIELDS, 1996). Nisin için struktural gen klonlanmış ve sekansı çıkarılmıştır (BUCHMAN ve ark., 1988; DODD ve ark., 1990; KALETTA ve Entian, 1989). Gen sekansı, translation sonrası modifikasyona uğrayan 57 amino asitten, 23 tanesinin öncü (leader) peptidi oluşturduğunu, 34 amino asitin ise bakteriosini oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır (BUCHMAN ve ark., 1988). Son yıllarda yapılan araştırmalarda bu protein yapılarının çeşitli bakterilerde farklı olduğu ve farklı organizmalarda etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. *Laktobasillus sake* 54 aminoasitten oluşmuş bir bakteriosin olan Laktosin S i üretmektedir ve bu bakteriosin de lantibiotik gurubuna

girmektedir. *Laktobasillus asidofilus* ise laktasin F olarak isimlendirilen 57 amino asitten oluşan bakteriosini üretmektedir, ancak ısıya dayanıklı ve küçük bakteriosin gurubu olan grup II nin üyesi olarak bilinmektedir. Nisin'in aksine bu bakteriosin translasyon sonrası modifikasyona uğramaz. *Pediococcus* suşu tarafından üretilen Pediocin Ach 1991 yılında rapor edilmiştir (BISWAS ve ark, 1991). *Lactobasiller* tarafından üretilen bakteriosinler üzerine yapılan çalışmalarda da daha birçok bakteriosin çeşidi bulunmuştur. *L. sake* LB 706 tarafından üretilen sakacin (SCHILLINGER ve Lücke, 1989), *L. plantarum* NCDO 1193 suşu tarafından üretilen plantacin B (De Vuyst ve Vandamme, 1994), *Lactobacillus acidophilus* TK8912 suşu tarafından üretilen acidocin 8912 (DE VUYST ve Vandamme, 1994) farklı *Lactobasillus* suşları tarafından üretilen bazı bakteriosin çeşitleridir.

Bakteriosin oluşumu plazmitler tarafından kodlanabileceği (Hoover ve ark., 1988) gibi kromosomal DNA da da kodlanmış (Holck ve ark, 1994) olabilirler. Literatürde nisin A olarak geçen bakteriosinin *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 6F3 tarafından üretileninin oluşumu büyük bir plazmite bağlı iken, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* F15876 ve NIZO R5 tarafından üretilen nisin A kromozoma bağlı sırasıyla Tn5301 ve Tn5276 olarak bilinen konjugatif elementlere bağlıdır (DODD ve Gasson, 1994). Birçok plazmit bağlantılı bakteriosin oluşumu özelliğinin replikasyonlar sırasında kaybolabileceği bulunmuştur (COVENEY, 1987). Endüstride bakteriosin üretimi için kurulan fermenterlerde veya fermente gıda maddelerinin üretimi sırasında, bakteriler çoğalırken bakteriosin üretme özelliği taşıyan plazmitlerin kaybı büyük bir sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle stabil plazmiti olan suşlar kullanılmalı veya klonlama yöntemleri ile istenilen özelliklerin (bakteriosin üretimi gibi) kromozom üzerinde kararlı bir yapı oluşturulmasına çalışılmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin antagonistik aktivitesine olan ilgi, çeşitli bakteriosin genlerinin klonlaması ile sonuçlanmıştır. Birçok farklı laktik asit bakterisi tarafından üretilen bakteriosinler hakkındaki genetik çalışmaların tekrarının yer aldığı yayında Klaenhammer 1993 yılına kadar olan genetik çalışmaları özetlemiştir (KLAENHAMMER, 1993). Nisinin struktural geni klonlanmış ve sekanslanmıştır (BUCHMAN ve ark., 1988; DODD ve ark., 1990; KALETTA ve Entain, 1989). Grup II ye ait olan *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*'in iki bakteriosin geni klonlanmıştır (VAN BELKUM ve ark., 1991); bu genlerde 3 adet ORF (open reading frames) bulunmaktadır ve bir operon olarak düzenlenmişlerdir. İlk iki ORF bakteriosin aktivitesini kodlarken üçüncü ORF immunité için gereklidir. Bunlara ek olarak *Laktobasillus asidofilus* tarafından üretilen laktasin F struktural geni de klonlanmış ve sekanslanmıştır (MURIANA ve Klaenhammer, 1991; MURIANA ve Klaenhammer, 1991). *Leuconostok gelidium* 'un II. gurup bakteriosin geni Hastings ve arkadaşları tarafından klonlanmış ve karakterize edilmiştir (HASTINGS ve ark., 1991).

Grup II nin üyelerinin hepsinde bulunan genel özellikleri arasında aşağıdakiler verilmektedir:

- (i) 18- 21 amino asitlik kısa bir N-terminal sekans bulunmaktadır buna ek olarak
- (ii) ön peptid (prepeptid) methionin ile başlar lizin residue su ile devam eder
- (iii) 2 yanyana glysin residuesu N-terminal öncü (leader) de -1 ve -2 pozisyonlarında bulunur
- (iv) Bir lizin veya aginin residuesu matur bakteriosinin N-terminus (+1) kısmında bulunur (DODD and Gasson, 1994).

Ayrıca bu guruptaki birçok bakteriosin oluşumunun plazmit bağlantılı olduğu düşünülmektedir (DODD and Gasson, 1994).

Grup III olarak bilinen büyük moleküler ağırlığa sahip (>30kDa) ve ısıya hassas (100C veya daha düşük sıcaklıkta 30 dakika sonra inaktive edilen) bakteriosinlerden, Helvetisin J bakteriosininin struktural geni klonlanmış, sekanslanmış ve *Lactobasillus asidofilus*'ta express edilmiştir (JOERGER ve Klaenhammer, 1990). Kaseisin 80, olarak bilinen, ve III. gurup bakteriosin olan *Lactobacillus casei* bakteriosininin amino asit sekansı halen bilinmemektedir (DODD ve Gasson 1994). Kesici enzimlerle muameleden sonra *BclI* fragmantının *Streptococcus lactis* ( şimdiki adı ile *Lactococcus lactis*) subsp *diacetilactis* WM4 bakteriosin oluşumu için klonlanması da ilginç bir çalışmadır (HARMON and McKay, 1987).

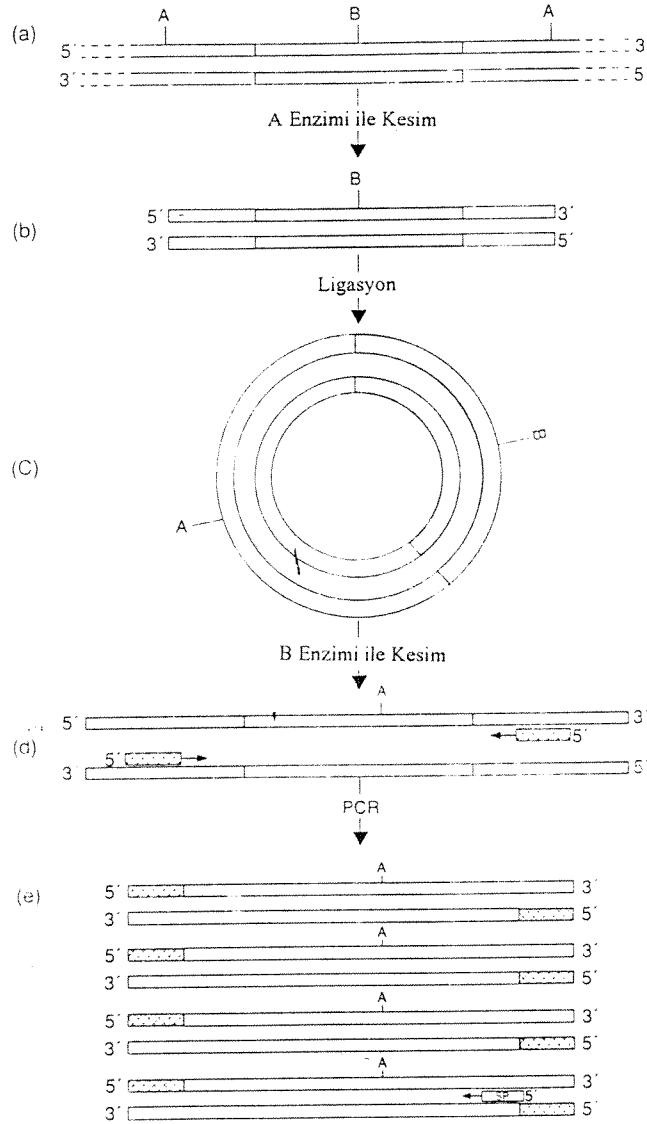
Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı bakteriosinlerin üretiminde birden fazla operonun rol alabileceği ve bu operonların bir indükleyici peptid yardımı ile işlerlik kazanabileceği gözlemlenmiştir. DIEP ve ark. (1996) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus plantarum* 'un küçük katyonik bir peptid (plantaricin A, plnA) ürettiğini ve bu peptidin bakteriosin ve ilgili peptid ve proteinlerin üretiminde indükleyici bir signal olarak; *plnABCD* operonu ile birlikte dört tane daha operonun indüklenmesinde ve transkripsiyonunda görev yaptığını bulmuşlardır. *plnABCD* operonunu PlnA prekürsörünü, ve PlnBCD determinantlarını kodlamaktadır. Diğer indüklenen operonlarsa bakteriosin benzeri çift-glysin-tipi lider peptidleri, bu lider peptidlerin proses edilmesinde görev alan ABC transporter proteinini, ve yine bu peptidlerin dışarı gönderilmesinde görevli peptidleri, immünite proteinlerini kodlamaktadır. Yine bu çalışmada bu beş farklı operonun promoter bölgesinin korunmuş (conserved region) regulatory bölgelerinin olduğu tespit edilmiştir. Indiksiyon faktörü (IF), N-terminal-çift-glysin öncüsü, ABC-taşıyıcı gibi yapıların rol aldığı regülasyonlar sistemleri detaylı olarak aynı gurubun üyeleri tarafından 1996 yılında Laktik Asit Bakterileri Sempozyumunda tartışılmıştır (NES ve ark., 1996).

PCR ve southern hibridizasyon ile ilgili çalışmalardan biri psikrotrofik organizmaların biodegradasyonu üzerine yapılmıştır ( WHYTE ve ark., 1996).

Ters (Inverse) PCR genel tanımı itibarı ile merkez bölgenin bilinen dizilimlerinin yardımı ile bilinmeyen uç kısımları amplifiye eden bir sistemdir (şekil 1) (NEWTON ve Graham, 1994). Dejenere primerlerin kullanımı ve ters primerlerin kullanımı ile bakteriosin genine ulaşmak için benzer bir alışma *Lactococcus lactis* için KIM ve Batt (1993) tarafından yapılarak yayınlanmıştır. Yine aynı organizma için *rec A* (homolog rekombinasyon, SOS hareketi, DNA tamiri, mutajenesis, bakteriofaj indüklemesi gibi olaylarda anahtar element) geninin sekans tayinine ulaşmak amacı ile dejenere primerler kullanılmıştır (DUWART ve ark., 1992) *Staphylococcus aureus* için de dejenere primerler sensör genlerine ulaşmak için yapılmıştır (BAYLES, 1993).

Bizim bu alışmamızda, Hollandadaki ortaklarımız tarafından izole edilen 2 *Lactobacillus* suşunda bakteriosin aktivitesinin geniş bir spektruma sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bakteriosinlerden birinin, *Listeria monocytogenes* gibi tehlikeli bir patojen üzerinde olduğu gibi, ayrıca diğer birçok laktik asit bakterisi üzerinde de engelleyici olarak aktif olduğu gözlenmiştir. Identifikasyon alışmaları sonucunda bu suş *L. salivarius* olarak tanımlanmıştır. *Laktobasillus salivarius*'un diğer bir kullanım alanı, potansiyel probiyotik olma özelliğine sahip olmasıdır. 1998 yılında yapılan bir çalışmada *L. salivarius*'un potansiyel probiyotik olarak çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılığı diğer potansiyel *Lactobasillus* türleri ile birlikte test edilmiştir (CHARTERIS ve ark., 1998). *Laktobasillus salivarius*'un bakteriosin oluşturması, özellikle hayvan yeminde probiyotik olarak kullanımında, değer katan bir özelliktir.

Bu suş üzerinde PCR yöntemi ile bakteriosin geni amplifikasyonu çalışmaları iki gurubun ortaklığı ile yapılmıştır. Bu çalışmada daha önce tanımlanmamış bir bakteriosin üretimi ile ilgili genin lokasyonu rapor edilmiştir. Bu lokasyonun bulunmasında PCR yöntemi kullanılmış ve ulaşılan genin kimliği DNA sekas analizi ile belirlenmiştir. Bu bakteriosinin orjinal olarak bakteriosin üretmeyen *L. plantarum*



Şekil 1. Inverse PCR ile amplifikasyon

80 organizmasında üretimi mümkün olmuştur. Ekspresyonu artırmak için ve endüstriyel önemi olan laktik asit bakterilerinde salivarisin üretimini sağlayabilmek için diğer (*L.plantarum* 80 haricindeki) laktik asit bakterilerine aktarma (klonlama) çalışmalarına başka bir proje ile devam edilmesi planlanmaktadır.

Yapılan literatür araştırmasında, bugüne kadar yapılmış, *Laktobasillus salivarius* 'un ürettiği bir bakteriosin için, DNA sekanslaması, klonlama gibi herhangi bir genetik çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle de, çalışmamız orjinalliğini korumaktadır.



## GELİŞME

**Bakteriyel suşlar:** *Laktobasillus salivarius* olarak tanımlanan bakteriosin üreticisi, *Laktobasillus fermentum* (indikatör bakteri), *Laktobasillus plantarum*, *Laktobasillus acidophilus*, *Bacillus cereus*, *Stafilokokkus faekalis*, *Stafilokokkus epidermidis*, *Stafilokokkus aureus*, *Listeria monositogenes*.

**Besiyerleri ve üreme şartları:** Bakteriosin üretici organizma 37C de MRS sıvı ve katı besiyerinde üretilmiştir.

### **Bakteriosin aktivitesi:**

Bakteriosin aktivitesi farklı organizmalar üzerinde denenmiş ve pozitif reaksiyonlar aşağıda sonuç bölümünde verildiği gibi belirlenmiştir (Tablo 2). Hassasiyetinin deneneceği organizma 50C sıcaklıktaki sıvı agar ile karıştırılır ve steril petriye dökülür. Hassasiyeti ölçülmek istenen bakterinin içinde bulunduğu sıvı agarın katılaşmasından sonra agar üzerinde pastör pipet arkası ile daire şeklinde küçük delikler açılır ve bu deliklere pH'ı 7 ye getirilmiş (laktik asitin inhibisyon etkisini ortadan kaldırır), daha önceden sentrifiye edilmiş ve 0.2 µm lik filtre de filtre edilmiş olan bakteri supernatantı ve katalaz enzimi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in etkisini yok etmek amacı ile) eklenir (LEWUS ve Montville, 1991). 18-24 saatlik inkübasyondan sonra delikler etrafındaki bakteriosine hassasiyeti ölçülen organizmanın inhibisyonunu gösteren zon oluşumu gözlenir. Zonların büyüklüğü bakterinin hassasiyeti ile doğru orantılıdır (SCHILLINGER ve Lucke, 1989). Bakteriyel üremeye göre aktivite (AU/ml) tayini GONZALES ve ark. (1994) e göre yapılmıştır.

### **Bakteriosin amino asit sıralaması:**

Bakteriosin ammoniumsulfat presipitasyonu, ionexchange kromatografi (SP-sefaroze), hidrofobik interaksiyon kromatografisi ve reverse faz FPLC ile saflaştırılmıştır (HOLCK ve ark., 1994). Aminoasit kompozisyonu ve saflaştırılmış bakteriosin amino asit sekansı analiz edilmiştir (HASTINGS ve ark., 1991). Aktif bakteriosinin 36 aminoasiti sırasıyla tespit edilmiştir. Aktif bakteriosinin amino asit sıralaması aşağıda gösterildiği gibi belirlenmiştir (Şekil 2). Bu bölüm bakteriosin üreticisi organizma bize gönderilmeden önce Hollandadaki ortaklarımız tarafından yapılmıştır.

RNSYDYIDSGQFGYDIGXTIANTKFFKRLRHSNQNI (36 amino asit)

**Şekil 2.** Amino asit sekans analiz yöntemi ile belirlenen bakteriosin amino asit sekansı.

Aktif bakteriosinin mol ağırlığı 4251 D olarak SDS-PAGE yöntemi ile bulunmuştur ve 1 tane şimdiye kadar tanımlanmamış bir amino asite (X) sahiptir. 1, 24, 27, 28 ve 32 inci pozisyonların belirsiz olduğu saptanmıştır.

### **Bu amino asit sıralamasına göre primer tasarımı:**

Primerlerin tasarımında daha önce rapor edilen esaslar dikkate alınmıştır (DUWAT ve ark., 1992; BAYLES, 1993; KİM ve - BATT, 1993).

### **Düz PCR için primerler:**

*primer 1* : NSYDYID (Asn,Ser,Tyr,Asp,Tyr,Ile,Asp)

5'-AA(CT) (AT)(GC)(AGCT)TA(CT)GA(CT)TA(CT)AT(ACT)GA-3'

-Asp amino asiti GA(TC) şeklinde dizilmiştir (kodlanmıştır). 3' ucun daha spesifik olması için bu uç GA-3' olarak kesilmiştir.

-ilk aminoasit R kesinleşmemiş (uncertain) bir amino asit olduğu için primer sentezinde dikkate alınmamıştır.

-Redundancy: 768

**primer 2** : LRHSNQNI (Leu,Arg,His,Ser,Asn,Gln,Asn,Gln,Asn,Ile) amino asitlerine göre sentezlenmiştir.

(TC)T(AGCT)(CA)G(AGCT)CA(TC)(AT)(GC)(AGCT)AA(TC)CA(AG)AA(TC)AT(TCA)

Karşıt DNA iplikciği (3' 5' yönünde):

3'-(AG)A(AGTC)(GT)C(AGTC)GT(AG)(TA)(CG)(AGTC)TT(GA)GT(TC)TT(AG)TA(AGT)-5'

5' 3' sıralama:

5'-(AGT)AT(AG)TT(CT)TG(AG)TT(AGCT)(GC)(AT)(AG)TG(AGCT)C(GT)(AGCT)A(AG)-3'

Redundancy: 49152

#### **Yeni primerlerin tasarımı ve sentezi:**

Daha önceki rapor döneminde belirttiğimiz bu primerler den sonuç elde edilemediği için PCR çalışmalarına yeni sentezlenen primerlerle de devam edilmek üzere primerler sipariş edilmiştir. Bu primerler daha küçük oligonukleotit boyutuna sahiptirler.

**primer 3** : YDYID (Tyr,Asp,Tyr,Ile,Asp)

-Asp amino asiti GA(TC) şeklinde dizilmiştir (kodlanmıştır). 3' ucun daha spesifik olması için bu uç GA-3' olarak kesilmiştir.

**5'TA(CT)GA(CT)TA(CT)AT(ACT)GA-3' (15 nükleotid)**

**primer 4** : HSNQNI (His,Ser,Asn,Gln,Asn,Ile)

3'CA(TC)(AT)(GC)AGCT)AA(TC)CA(AG)AA(TC)AT(TCA)-5'

Karşıt DNA iplikciği (3' 5'):

3'-GT(AG)(TA)(CG)(AGTC)TT(GA)GT(TC)TT(AG)TA(AGT)-5'

5'-(AGT) kesinleşmemiş bir amino asit olduğundan dizilimden silindi

5' 3' sıralama

**5'-AT(AG)TT(TC)TG(AG)TTN(CG)(TA)(AG)TG-3' (17 nükleotid)**

*primer 5*

5'YDYIDSG3' (Tyr, Asp, Tyr, Ile, Asp, Ser, Gly)

**5'TA(CT)GA(CT)TA(CT)AT(ACT)GA(CT)(AT)(GC)(AGTC)GG(GC)-3' (15  
nükleotid)**

-Gly amino asiti GG(GC) şeklinde dizilmiştir (kodlanmıştır). 3' ucun daha spesifik olması için bu uç GG-3' olarak kesilmiştir.

*primer 6*

5' LRHSNQNI 3'

LRHSNQNI (Leu,Arg,His,Ser,Asn,Gln,Asn,Gln,Asn,Ile) amino asitlerine göre sentezlenmiştir.

(TC)T(AGCT)(AC)G(AGCT)CA(TC)(AT)(GC)(AGCT)AA(TC)CA(AG)AA(TC)A  
T(TCA)

Karşıt DNA iplikciği (3' 5' yönünde):

3'-(AG)A(AGTC)(GT)C(AGTC)GT(AG)(TA)(CG)(AGTC)TT(GA)GT(TC)TT(AG)  
TA(AGT)-5'

5' 3' sıralama:

5'-(AGT)AT(AG)TT(CT)TG(AG)TT(AGCT)(GC)(AT)(AG)TG(AGCT)C(GT)(AG  
CT)A(AG)-3'

İlk nükleotid (AGT) atıldı ve 3' uçtaki (AGCT)A(AG) atıldı. Primer 6 sonhalini aldı.

5' 3' sıralama:

**5'-AT(AG)TT(CT)TG(AG)TT(AGCT)(GC)(AT)(AG)TG(AGCT)C(GT)-3' (20  
mer)**

Inverse PCR reaksiyonları için:

- primer QJ95R, 5'-GTATTAGCGATTGTACATCC-3' (20 mer, T<sub>m</sub> 56C)  
primer QJ96F, 5'-TCAAAAGATTAAGACATTCAAATC-3' (24mer, T<sub>m</sub> 60C)  
primer QJ97R, 5'-CCATCTAACCAGATATTCCA-3' (20 mer, T<sub>m</sub> 56C)  
primer QJ94F 5'-TAGAGGAAGGAAGAGATATG-3' (20 mer, T<sub>m</sub> 56C)  
primer OJ98F, 5'-AGAAATAGTCAAAAAGAGCAG-3' (21 mer, T<sub>m</sub> 56C)

**Table 1.** Düz ve ters PCR serilerinde kullanılan primerler.

---

**Düz PCR reaksiyonları için**

- primer1 5'-AA(CT)(AT)(GC)(AGCT)TA(CT)GA(CT)TA(CT)AT(ACT)  
GA-3'(20 mer)
- primer2 5'-(AGT)AT(AG)TT(CT)TG(AG)TT(AGCT)(GC)(AT)  
(AG)TG(AGCT)C(GT)(AGCT)A(AG)-3' (24 mer)
- primer 3 5'TA(CT)GA(CT)TA(CT)AT(ACT)GA-3' (15 mer)
- primer 4 5'-AT(AG)TT(TC)TG(AG)TTN(CG)(TA)(AG)TG-3' (17 mer)
- primer 5 5' -TA(TC)GA(TC)TA(TC)AT(TCA)GA(TC(TA)(CG)IGG (20 mer)
- primer 6 5' -AT(AG)TT(CT)TG(AG)TT(AGCT)(GC)(AT)(AG)TG(AGCT)C  
(GT)-3'(20 mer)

**Ters PCR reaksiyonları için:**

- primer QJ95R, 5'-GTATTAGCGATTGTACATCC-3' (20 mer, T<sub>m</sub> 56C)  
primer QJ96F, 5'-TCAAAAGATTAAGACATTCAAATC-3' (24mer, T<sub>m</sub> 60C)  
primer QJ97R, 5'-CCATCTAACCAGATATTCCA-3' (20 mer, T<sub>m</sub> 56C)  
primer QJ94F 5'-TAGAGGAAGGAAGAGATATG-3' (20 mer, T<sub>m</sub> 56C)  
primer OJ98F, 5'-AGAAATAGTCAAAAAGAGCAG-3' (21 mer, T<sub>m</sub> 56C)
-

### **Genomik DNA ile PCR:**

MRS besiyerinde 37C de 14-16 saat bakteriosin üreticisi organizma çoğaltılmış 10000rpm de 10 dak. centrifüj ile çöktürülmüş ve supernatant bakteriosin üretmek için ayırılmıştır. Çökelen hücreler 1M Tris.HCl, pH 8 de suspansiyon haline getirilmiştir. Hücre suspansiyonu 1.5 ml lik Eppendorf tüplere aktarılmış ve 500 µl fenol eklenmiştir. 500µl Zirkonium boncukları ile doldurulan tüp yüksek hızda boncuk dövücü ile 100 saniye kadar dövülmüştür. Tüp 5 dak buza yerleştirilmiş ve daha sonra 5 dakika 12000rpm de minifüjde döndürülmüştür. Temiz, üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve 500µl kloroform/isoamylalkol (24:1 v/v) karışımı eklenmiştir. Bu karışım 5 dak sert olmayacak bir şekilde karıştırılarak 5 dak buzda dinlendirilmiştir ve daha sonra da 5 dak 12000 rpm de çöktürülmüştür. Üst faz 2.0 ml lik temiz bir Eppendorfa aktarılmıştır. 1.5 ml - 20 C de saf Etil alkol (EtOH) ve 30µl 3M sodium acetat (NaAc) eklenmiştir. Karışım 20C de yarım saat inkübe edilmiş ve sonra 10 dak 14000 rpm de sentrifüjlenmiştir. Çökelek 70% EtOH ile yıkanmış ve vakum kurutucuda 10 dak 1200 mBar da kurutulmuştur. Çökelek 200 µl TE ile 100 µg/ml RNAase A ile suspanse edilip 37C de 20 dak bekletilmiştir. Bu izolasyon sonucunda saf DNA izole edilmiştir (KIM ve Dunn, 1997; LEWINGTON ve ark., 1987). Bu DNA ile ve amino asit sekansına göre sentezlenen degenerate primerlerden, primer1,2,3,4 ile yapılan PCR çalışmaları sonuç vermemiştir. PCR için optimizasyon çalışmaları yapılmış. Şartları optimize etmek için farklı sıcaklıklar ve farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları uygulanmıştır. Ancak yine bir amplifikasyon görülmemiştir. Uygulanan PCR aşağıdaki şartlara göre yapılmıştır.

3 PCR tüpü için reaksiyon karışımı aşağıdaki gibidir.:

PCR tampon çözelti	15 µ L
dNTP	15 µ L
Primer CG1	5 µ L
Primer CG2	5 µ L
Kromosomal DNA	100pmol (10 µ L)
Taq polimeraz	7.5 ünite (4.5 µ L)
H <sub>2</sub> O (çift distile, steril)	85 µ L
MgCl <sub>2</sub>	2.5 µL (0.05 mM/L) birinci PCR tüpü için; 4 µL (1mM/L) ikinci PCR tüpü için ; 6.5 µL (3mM/l) üçüncü PCR tüpü için.

Reaksiyon şartları:

Bakteriosin polipeptidinin amino asit sekansına göre uzunluğuna uygun olarak reaksiyon şartları ayarlanmıştır.

Başlangıç 95°C de 3 dakika

Denaturasyon 94°C de 1 dakika

Annealing (primer yapışması) 40°C de 45 saniye

Extension (uzama, sentez) 72°C de 30 saniye

Bu çalışmada pozitif kontrol olarak *E. coli*'nin PXL fragmanı (220 nukleotidlik) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 40°C den başlayarak 45°C, 48°C, 50°C, 55°C ve 60°Cde PCR yapılmış. Ancak yalnızca pozitif kontrolde 55°C de amplifikasyon gözlenmiştir.

İzole edile genomik DNA ile Primer 5 ve 6 ile yapılan düz PCR sonucunda parlak bir 334 bp lik fragmant elde etmek mümkün olmuştur. Bu PCR için uygulanan reaksiyon karışımı şöyledir:

3 farklı konsantrasyonda Genomik DNA numuneleri taşıyan (0.1 µg, 0.01 µg ve 0.05 µg) 3 PCR tüpü için reaksiyon karışımları aşağıdaki gibidir:

PCR tampon çözelti (10X)	30 µ L
dNTP	30 µ L
Primer 5	6 µ L
Primer 6	6 µ L
Kromosomal DNA	0.1, 0.01, veya 0.05 µg
Taq polimeraz	1.2 µ L
H <sub>2</sub> O (çift distile, steril)	178.8-160.8 µ L
MgCl <sub>2</sub>	9-18 µL 25 mM
Mineral yağı	65µ

Reaksiyon şartları: 95 C de 6 dak ile başlandı, 30 saniye 95 C de, 50 saniye 43C de 20 saniye 72C de 5 dak 72 C de 35 devir yapıldı.

Bu reaksiyonların sonucunda 0.05 g DNA içeren tüpte yaklaşık ağırlığı 330-340 bp olan DNA en verimli şekilde elde edilmiştir.



**Restriksiyon enzimleri ile kesim:**

Hind III, EcoRI, NdeI, BglI, BamH I, Sau 3AI Ase I DNA yı kesmek için kullanılan enzimlerdir.

**Ligasyon:**

PCR fragmanı	6µl
Ligasyon tampon çözeltisi (10X)	1 µl
Vektör 25ng/µl	2µl
T <sub>4</sub> DNA Ligaz	1µl
Toplam hacim	10µl

Reaksiyon karışımı 14C de bir gece inkübasyona bırakıldı.

**DNA sekans tayini:**

Perkin Elmer marka BigDye Terminator Cyle Sequencing Ready Reaction Kiti ile yapıldı

**Elektroporasyon ile transformasyon:**

Donmuş hücreler oda sıcaklığında çözüldükten sonra buza konuldu. 40µl hücre 1.5 ml lik soğutulmuş propilen tüpe aktarıldı, 2µl DNA solüsyonu son konsantrasyonu 10pg/ml olacak şekilde eklendi. Suspansiyon sert bir şekilde tüpe vurarak karıştırıldı. Karışım elektroporatör küvetine eklendi ve soğutulmuş elektrotlara (güvenlik kabini) yerleştirildi. Uygun pals (25µF, 100Ω , 5msaniye, ve 2.5kV) uygulandı. Pals verilmesinden sonra hücreler derhal kabinden alınarak 400 µl besiyerine yerleştirildi. Numuneler 225 rpm de 1 saat inkübe edildi. Expresyon periodu sonunda, hücreler seyreltilerek Agar tabaklarına dökülmüştür (POSNO et al., 1991).

Elektroporasyonun sonucu bakteriosin üretmeyen suşta bakteriosin oluşumunun indikatör bakteri yardımı ile test edilmesi ile kontrol edilmiştir.

**Plazmit izolasyonu çalışmaları:**

Lizozim ile plazmit izolasyonu çalışmaları sonucunda plazmit izole edilemeyince 500U/mL konsantrasyonunda mutanolysin eklendikten sonra kromosomal DNA dan daha büyük ağırlığa sahip çok büyük bir plazmit ile birlikte toplam üç adet plazmit izole edilmiştir. Mutanolisin lizozim ile birlikte hücre duvarı üzerinde daha güçlü bir parçalayıcı etki yapmıştır. Mutanolisin eklenmesi Hollandadaki ortaklarımızca Laktobasiller üzerindeki plazmit izolasyonu deneyimlerine dayanarak önerilmiştir (Van der Vossen *et al.*, 1994). Ancak bu plazmitler her deney sonucunda stabil olarak izole edilememektedir. Plazmit izolasyonu sonuçları aşağıda veriler bölümünde sunulmuştur.

**Suş tanımlanması:**

Hollandadaki ortaklarımız tarafından bakteriosin üreticisi olarak izole edilen ve *L. plantarum* olarak tahmin edilen suş için geniş tanımlama yöntemleri uygulanmıştır. Yöntemler arasında karbonhidrat fermentasyon testleri, API kit kullanımını sayabiliriz (GURAKAN ve ark., 1995). Tanımlama sonucunda bakteriosin üreten bu suşun gerçekte *L. salivarius* olduğuna karar verilmiştir.

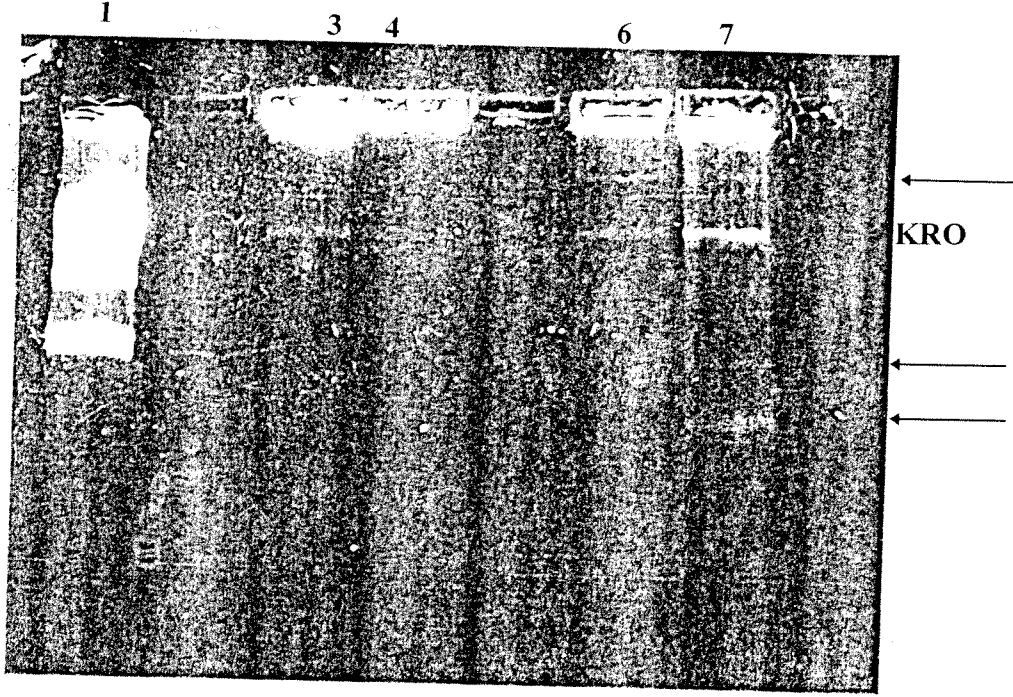
## SONUÇ

Plazmit izolasyonu çalışmaları sonucunda bu bakteride stabil olmayan 3 adet plazmitin varlığı bulunmuştur (Şekil 3). Ancak plazmit izolasyonu ve küreme çalışmalarımızda bu plazmitlere her izolasyon sonucunda ulaşılamaması bu bakteriosin geninin nerede olduğu sorusunun cevaplanamamasına neden olmuştur. Bu nedenle çalışmalara izole edilen genomik DNA ile devam edilmiştir.

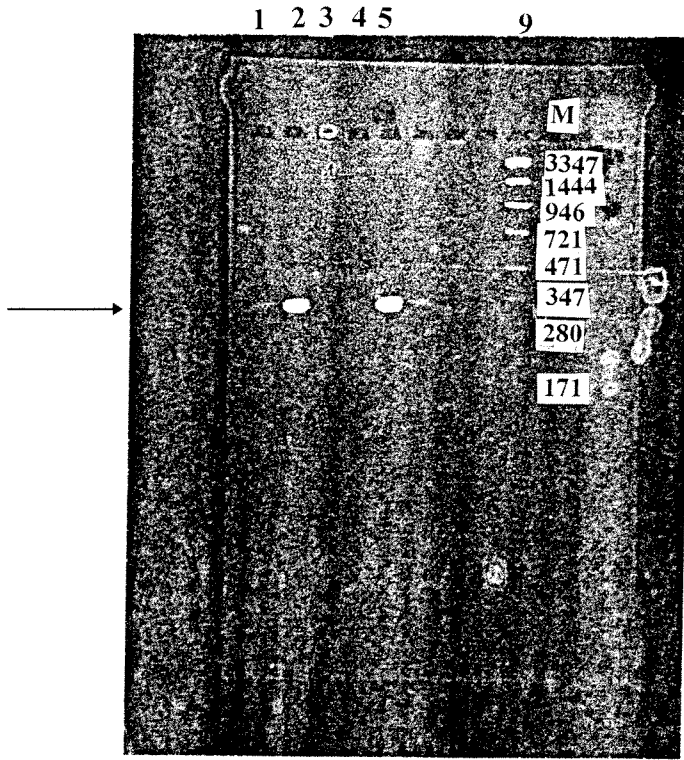
Genomik DNA izolasyonu beadler ile gerçekleştirilmiş ve bu total DNA üzerinde uygulanan inverse PCR ile bakteriosin genine ulaşmak mümkün olabilmıştır.

Amino asit sekansı kullanılarak sentezlenen dejenere primerler ile uygulanan düz PCR'dan yaklaşık 334 bp lik bir DNA fragmanı amplifiye edilmiştir (Şekil 4) . Bu fragmant beklenen 90-100bp lik DNA'dan daha büyüktür. 90-100 bp lik DNA'ya ulaşamadığı için 334 bp lik DNA ile deneylere devam edilmiş ve bu fragmanın aranan bakteriosin genini içerdiği bulunmuştur. Daha büyük bir fragmanın amplifikasyonunun nedeni olarak ise dejenere primerlerden birindeki olabilecek nonspesifik bağlantıyı gösterebiliriz.

DNA fragmantının tahmin edilenden ve bakteriosin içeren geni taşıyıp taşımadığını anlamak için bu fragmant önce *E. coli* ye klonlanmış ve DNA sekans analizi yapılmıştır. DNA dizilimi analizi sonucunda bakteriosin geninin başlangıç kodonlarına benzer bir sekans görülmüş ancak bu sekansın devamında bazı dizilimler amino asit sekansı Şekil 2 de belirtilen bakteriosin geninin taşınması gerektiği gibi gelmemiştir (Şekil 5). Nukleotid diziliminde bir shifting (kodon atlaması) olduğu saptanmıştır (Şekil 5). Bu kodon atlaması S yerine R amino asitini kodlamaktadır. Bu sorunu çözmek amacı ile ters PCR için 334 bp lik DNA sekans analizi kullanılarak ters PCR yapabilmek amacı ile ters primerler (Tablo 1) sentezlenmiştir. Ters PCR için genomik DNA birçok enzim ile kesilmiş ve ligasyon ile tekrar daire haline getirilmiştir. Şekil 1 de B enzimi ile ikinci bir kesim işlemine gerek duyulmamıştır. Kullanılan enzimlerden Sau 3AI ve Ase I ile kesilen fragmantlarda genomik DNA dan farklı boyutta DNA elde etmek mümkün olmuştur. Bu fragmantların uçları ligaz



Şekil 3. 1. çukurecuk, Hind III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 3. ve 4. çukurecuk, *Lactobasillus plantarum*; 6. ve 7. çukurecuk, *Lactobasillus salivarius*. KRO, Kromosomal DNA



Şekil 4. 2. ve 5. çukurcuk, 342 bp lik DNA fragmanı;9. çukurcuk, marker DNA.

334 BPS DNA

\* \* \* S E Q U E N C E \* \* \*

QJ95R

```

1  TATGATTATA TTGATAGGGG ACAGTTTGGT TATGATATAG GATGTACAAT CGCTAATACC
   Y D Y I D R G Q F G Y D I G C T I A N T
   M I I L I G D S L V M I - D V Q S L I
   - L Y - G T V W L - Y R M Y N R - Y
           QJ96F
61  AAATTTTCA AAAGATTAAG ACATTCAAAT CAAAATATTT GTAGTTAAAC AGAAATGTAA
   K F F K R L R H S N Q N I C S - T E M
   P N F S K D - D I Q I K I F V V K Q K C
   Q I F Q K I K T F K S K Y L - L N R N V
21  CCAACTAGGT ATAAAACATT TTATGCTAAA TTGATATTTG AATACGGAAT GATAATACAA
   P T R Y K T F Y A K L I F E Y G M I I Q
   N Q L G I K H F M L N - Y L N T E - - Y
   T N - V - N I L C - I D I - I R N D N T
31  TAAAAGTGTA AGCATATGTT TCACAAGTGT TTAGAGAGG ATGTGTTCTA TGTGCTGAAA
   - K C K H M F H K C F R E D V F Y V L K
   N K S V S I C F T S V L E R M C S M C
   I K V - A Y V S Q V F - R G C V L C A E
41  AAATTAAGGA ATATCTGGTT AGATGGCGGA TTAATTAGAG GAAGGAAGAG ATATGTAATC
   K L W N I W L D G G L I R G R K R Y V I
   K N Y G I S G - M A D - L E E G R D M
   K I M E Y L V R W R I N - R K E E I C N
51  ATTCCAATTA TTTTGGCAAT ATTTCTTCCC CAAT
   I P I I F A I F L P Q
   S F Q L F L Q Y F F P N
   H S N Y F C N I S S P

```

Şekil 5. 334 bp lik fragmanın DNA sekansı.

enzimi yardımı ile birleştirilerek daire şeklinde DNA parçacıkları oluşturulmuştur. Bu parçacıklarla yapılan ters PCR lar sonucunda 530 bp lik bir fragmant elde edilmiştir. Amplifiye edilen 530 bp lik bir DNA fragmantı QJ95R ve QJ96F ters primerleri ile oluşturulmuştur(Şekil 5). 530 bp lik fragmantın DNA sekans analizi yapılmış ve bu sekans analizi kullanılarak, ters primerlerden QJ97R'a uygun olmak üzere düz PCR için QJ98F tasarlanmıştır (Şekil 6). Bu düz PCR için genomik DNA templet olarak kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda da 498 bp lik bir fragmant oluşmuştur (Şekil 7). Tekrar düz PCR yapılmasının nedeni 30 bp lik bir küçük fragmantın, 500 bp lik AseI kesimi ile oluşan büyük fragmant ile ligasyon sırasında birleşmiş olabileceği düşüncesi ve 530 bp olarak bulunan DNA sekansının genomik DNA da gerçekten olup olmadığını teyid etmektir. 530 bp lik ters PCR fragmantının DNA sekans dizilimi, düz PCR sonucu elde edilen 498 bp lik DNA fragmantının DNA sekans dizilimi ile kıyaslandığında birbirini doğruladıklarına ve istenen bakteriosin genin 498 bp lik fragmantta yakalandığına karar verilmiştir (Şekil 6, Şekil 7). Ters PCR sisteminde sonuçlar Ase I enzimi ile elde edilmiştir. Denenen Hind III BgIII, NdeI, Bam HI, EcoRI, Sau3AI enzimi ile sonuca ulaşamamıştır.

Bu analizlerin sonucunda 498 bp lik genomik DNA nın sekans analizi aranan bakteriosin genimizin sekansı olarak kabul edilmiştir (Şekil 8). Bu sekans kullanılarak bakteriosinimizin gerçek amino asit sıralaması yapılmıştır (Şekil 8). DNA sekans sıralamasının tespiti ile daha önce amino asit sıralaması metodu ile 36 amino asit olarak tespit edilmiş olan bakteriosinin 38 amino asitten oluştuğu ortaya çıkmıştır. Bu sekans analizleri sonucunda flanking sekanslar olarak adlandırılan uç kısımların sekansları da bulunmuş ve elde edilen bakteriosinin immunité genine de sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Leusin amino asitinden önceki çiftli glysin aminoasitleri (GG) operon içerisindeki immunité geninin başlangıcını göstermektedir (Şekil 7).

Bu DNA parçacığının bakteriosin üretme kapasitesine sahip olmayan *L.plantarum* 80 ye pGKV 21 plazmit vektörü ile aktarıldığında bu organizmada İndikatör bakteri olan *L. fermentum*'a etkili bakteriosin üretimi görülmüştür. Klonlama çalışmalarına yeni bir proje ile devam edilecektir. Böylelikle literatürde henüz bulunmayan bir klonlama olan, salivarisinin klonlanması işlemi gerçekleştirilmiştir.

530 BPS DNA

\* \* \* S E Q U E N C E \* \* \*

QJ98F

```

1 AGATTAGAAG AAATAGTCAA AAAGAGCAGA TGAAGTGAAT AATTATAAGT GTAAATTATA
  R L E E I V K K-S R - S E - L - V - I I
  D - K K - S K R A D E V N N Y K C K L
  I R R N S Q K E Q M K - I I I S V N Y

1 GCTATAATAA ATTTTAAAA TTATGAGGTG TTGAAGTTAT GAATAATAAT TTTATACAAG
  A I I N F - N Y E V L K L - I I I L Y K
  - L - - I F K I M R C - S Y E - F Y T
  S Y N K F L K L - G V E V M N N N F I Q

1 TTGATAAGAA AGAATTGGCA CATATAATTG GTGGAAGAAA TTCTTATGAG TTATATAGAT
  L I R K N W H I - L V E E I L M S Y I D
  S - - E R I G T Y N W W K K F L V I -
  V D K K E L A H I I G G R N S Y E L Y R

1 AGCGGACAGT TTGGGTTATG ATTATATTGA TAGGGGACAG TTTGGTTATG ATATAGGATG
  S G Q F G L - L Y - - G T V W L - Y R M
  I A D S L G Y D Y I D R G Q F G Y D I G
  - R T V W V M I I L I G D S L V M I D

1 TACAATCGCT AATACCAAAT TTTTCAAAG ATTAAGACAT TCAAATCAAA ATATTTGTAG
  Y N R - Y Q I F Q K I K T F K S K Y I
  C T I A N T K F F K R L R H S N Q N I C
  V Q S L I P N F S K D - D I Q I K I F V

1 TTAAACAGAA ATGTAACCAA CTAGGTATAA AACATTTTAT GCTAAATTGA TATTTGAATA
  L N R N V T N - V - N I L C - I D I - I
  S - T E M - P T R Y K T F Y A K L I F E
  V K Q K C N Q L G I K H F M L N - Y L N

1 CGGAATGATA ATACAATAAA AGTGTAAGCA TATGTTTCAC AAGTGTTTTA GAGAGGATGT
  R N D N T I K V - A Y V S Q V F - R G C
  Y G M I I Q - K C K H M F H K C F R E D
  T E - - Y N K S V S I C F T S V L E R M
                                     QJ97R
1 GTTCTATGTG CTGAAAAAAT TATGGAATAT CTGCTTAGAT GGCGGATTAA TTAGAGGAAG
  V L C A E K I M E Y L V R W R I N - R K
  V F Y V L K K L W N I W L D G G L I R G
  C S M C - K N Y G I S G - M A D - L E E

1 GAAGAGATAT GTAATCATTG CAATTATTTT TGCAATATTT CTTCCCAAT
  E E I C N H S N Y F C N I S S P
  R K R Y V I I P I I F A I F L P Q
  G R D M - S F Q L F L Q Y F F P N
  
```

Şekil 6. 530 bp lik fragmanın DNA sekansı



## 498 BPS DNA

\* \* \* S E Q U E N C E \* \* \*

1 AGATTAGAAG AAATAGTCAA AAAGAGCAGA TGAAGTGAAT AATTATAAGT GTAANTTATA  
 R L E E I V K K S R - S E - L - V - I I  
 D - K K - S K R A D E V N N Y K C K L  
 I R R N S Q K E Q M K - I I I S V N Y

61 GCTATAATAA ATTTTAA AAA TTATGAGGTG TTGAAGTTAT GAATAATAAT TTTATAACAAG  
 A I I N F - N Y E V L K L - I I I L Y K  
 - L - - I F K I M R C - S Y E - - F Y T  
 S Y N K F L K L - G V E V M N N N F I Q

21 TTGATAAGAA AGAATTGGCA CATATAATTG GTGGAAGAAA TTCTTATGAT TATATAGATA  
 L I R K N W H I - - L V E E I L M I I - I  
 S - - E R I G T Y N W W K K F L - L Y R  
 V D K K E L A H I I G G R N S Y D Y I D

81 GCGGACAGTT TGGTTATGAT ATAGGATGTA CAATCGCTAA TACCAAATTT TTCAAAAGAT  
 A D S L V M I - D V Q S L I P N F S K D  
 - R T V W L - Y R M Y N R - Y Q I F Q K  
 S G Q F G Y D I G C T I A N T K F F K R

41 TAAGACATTC AAATCAAAAT ATTTGTAGTT AAACAGAAAT GTAACCAACT AGGTATAAAA  
 - D I Q I K I F V V K Q K C N Q L G I K  
 I K T F K S K Y L - L N R N V T N - V -  
 L R H S N Q N I C S T E M - P T R Y K

01 CATTTTATGC TAAATTGATA TTTGAATACG GAATGATAAT ACAATAAAAAG TGTAAAGCATA  
 H F M L N - Y L N T E - - Y N K S V S I  
 N I L C - I D I - I R N D N T I K V - A  
 T F Y A K L I F E Y G M I I Q - K C K H

51 TGTTCACAA GTGTTT TAGA GAGGATGTGT TCTATGTGCT GAAAAAATTA TGGAAATATCT  
 C F T S V L E R M C S M C - K N Y G I S  
 Y V S Q V F - R G C V L C A E K I M E Y  
 M F H K C F R E D V F Y V L K K L W N I

11 GGTTAGATGG CGGATTAATT AGAGGAAGGA AGAGATATGT AATCATTCCA ATTATTTTGT  
 G - M A D - L E E G R D M - S F Q L F L  
 L V R W R I N - R K E E I C N H S N Y F  
 W L D G G L I R G R K R Y V I I P I I F

1 CAATATTTCT TCCCCAAT  
 Q Y F F P N  
 C N I S S P  
 A I F L P Q

Şekil 7. 498.bp lik fragmanın DNA sekansı

## \* \* \* S E Q U E N C E \* \* \*

```

1  AGATTAGAAG AAATAGTCAA AAAGAGCAGA TGAAGTGAAT AATTATAAGT GTAAATTATA
61  GCTATAATAA ATTTTAAAA TTATGAGGTG TTGAAGTTAT GAATAATAAT TTTATACAAG
121  TTGATAAGAA AGAATTGGCA CATATAATTG GTGGAAGAAA TTCTTATGAT TATATAGATA
181  GCGGACAGTT TGGTTATGAT ATAGGATGTA CAATCGCTAA TACCAAATTT TTCAAAAGAT
241  TAAGACATTC AAATCAAAAT ATTTGTAGTT AAACAGAAAT GTAACCAACT AGGTATAAAA
301  CATTTTATGC TAAATTGATA TTTGAATACG GAATGATAAT ACAATAAAAG TGTAAGCATA
361  TGTTTCACAA GTGTTTTAGA GAGGATGTGT TCTATGTGCT GAAAAAATTA TGGAATATCT
421  GGTTACATGG CGGATTAATT AGAGGAAGGA AGAGATATGT AATCATTCCA ATTATTTTGT
481  CAATATTTCT TCCCCAAT

```

```

1  MNNNFIQVDK KELAHIIIGGR NSYDYIDSGQ FGYDIGCTIA NTKFFKRLRH SNQNICs

```

57 AA PROTEIN

Şekil 8. 498 bp lik DNA dizilimi ve buna göre amino asit sıralaması.

Bu DNA parçacığının bakteriosin üretme kapasitesine sahip olmayan *L.plantarum* 80 e pGKV 21 plazmit vektörü ile aktarıldığında bu organizmada İndikatör bakteri olan *L. fermentum*'a etkili bakteriosin üretimi görülmüştür. Böylelikle literatürde henüz bulunmayan bir klonlama olan, salivarisinin klonlanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Endüstriyel önemi olan ve starter kültür olarak kullanılan daha birçok laktobasilde bu bakteriosinin üretimi denenebilir. *L. plantarum* 80 dışındaki diğer laktobasillerde klonlama çalışmalarına, yeni bir proje ile devam edilmesi planlanmaktadır.

Genomik DNA izolasyonlarında plazmitlerden tümüyle kurtulmanın mümkün olmadığını bililmektedir. Bu durumda bu bakteriosinin plazmit bağlantılı olması mümkündür. Bu kısım da bundan sonra araştırılabilecek ayrı bir proje oluşturmıştır. Aranılan gene dejenere primerler yardımı ile genomik DNA dan PCR lar dizisi ile ulaşılabilmesinin mümkün olduğu ortaya çıkmıştır. QJ97R ve QJ98F düz primerleri ile 498 bp lik bakteriosinin sekans analizinin tamamıyla çıkarılması mümkün olmuştur. Daha önce literatürde bilinmeyen bir bakteriosinin genetik yapısı ve buna bağlı gerçek amino asit sekansı ortaya çıkmıştır. Bu birçok bakteriosinin genetik yapılarının karşılaştırılabilme olanağını sağlayacaktır. *Listeria monocytogenes* üzerinde etkili olma özelliğine sahip olduğundan Sınıf II'ye ait bir bakteriosin çeşidi olduğu ortaya çıkarılmıştır.

#### **Bakteriosin aktivitesi:**

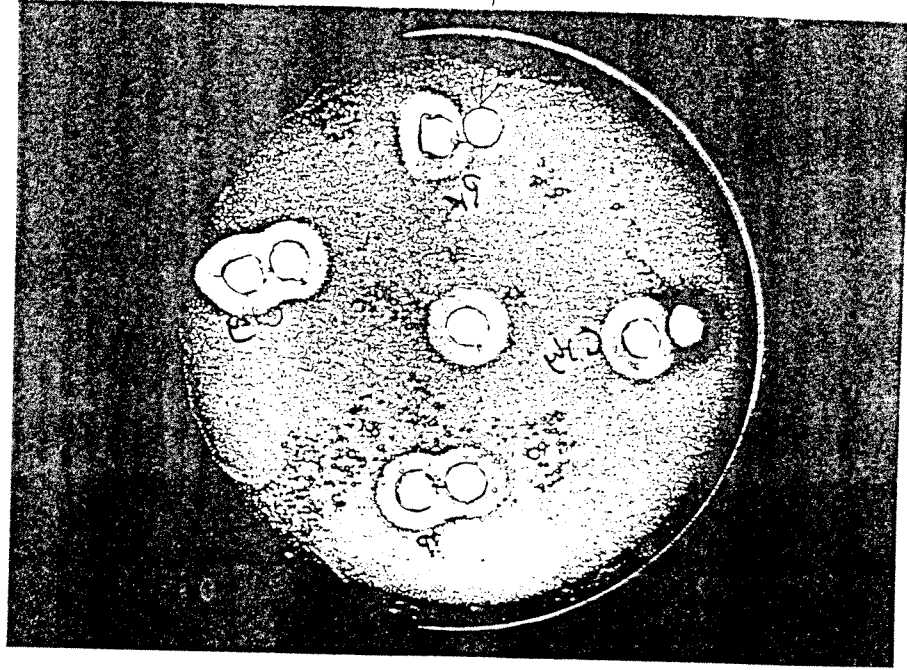
İnhibisyonun protein bazlı olduğunu göstermek için çeşitli enzimler kullanılmıştır. Kullanılan enzimler Proteinaz K, pepsin, tripsin, ve katalaz'dan oluşmaktadır. Katalaz, inhibisyonun hidrojenperoksitten dolayı olmadığını göstermiştir. Özellikle Proteinaz K bakteriosinden dolayı oluşan indikatör bakteri inhibisyonunu belirgin şekilde engellemiştir (Şekil 9). Bu da protein yapılı bir madde olan bakteriosin oluşumunu ispatlamaktadır. Bakteriosin aktivitesi organizmanın üreme eğrisine göre belirlenmiştir. Aynı zamanda pH belirlenmesi de yapılmıştır (Şekil 10). Bu çalışma bakteriosin aktivitesinin 9 uncu saatte en yüksek olduğunu göstermiştir. Tablo 2 de ise aktif bakteriosinin aktivitesi farklı mikroorganizmalar üzerinde gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Aktif bakteriosinin bazı mikroorganizmalar üzerine etkisi.

Bakteriosine hassas organizma	Bakteriosin aktivitesi
<i>L. fermentum</i>	+
<i>L. plantarum</i>	+
<i>L. acidophilus</i>	+
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>S. faecalis</i>	+
<i>S. epidermidis</i>	+
<i>S. aureus</i>	-
<i>L. monocytogenes</i>	+

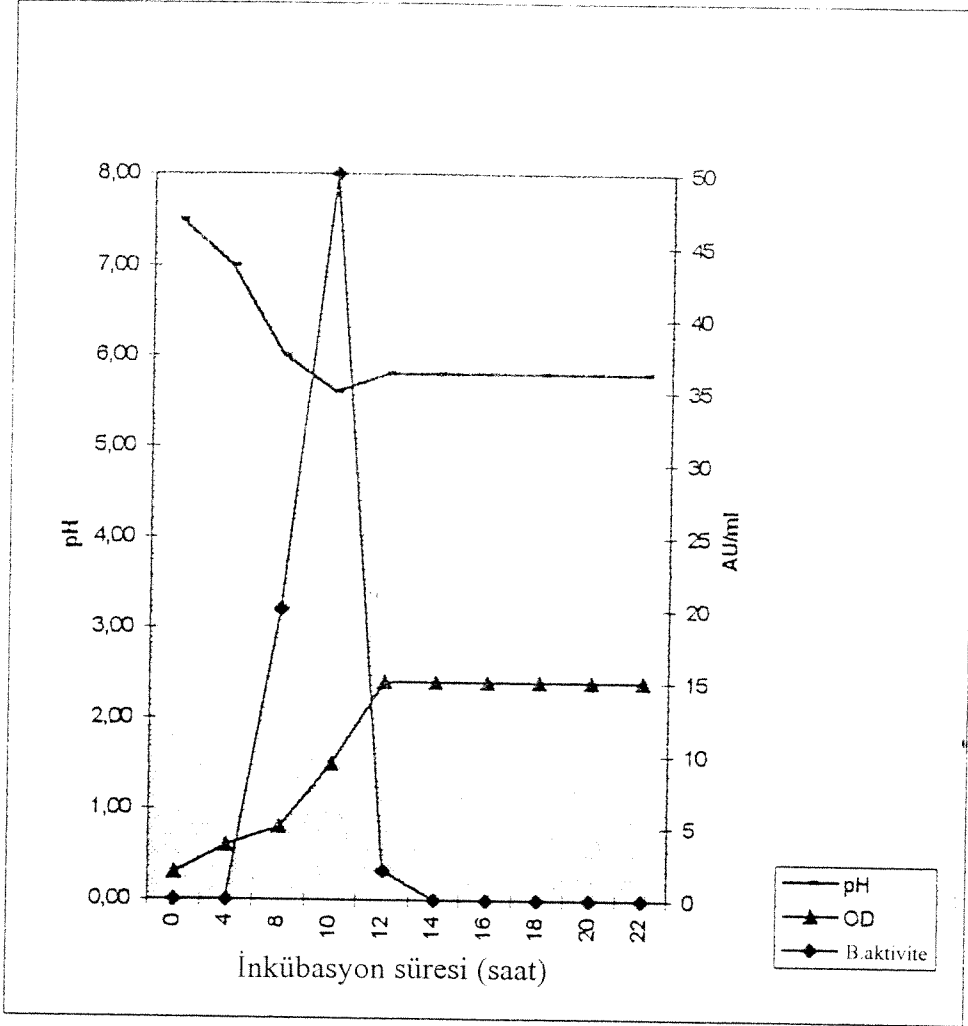
+, pozitif bakteriosin aktivitesi; -, negatif bakteriosin aktivitesi

Proteinaz K eklenmiş çukurcuk



Şekil 9. Proteinaz K nın bakteriosin üzerine etkisi.

İnkübasyon süresi	pH	OD	Bakteriosin aktivitesi
0	7,50	0,3	0
4	7	0,6	0
8	6	0,8	20
10	5,6	1,5	50
12	5,8	2,4	2
14	5,8	2,4	0
16	5,8	2,4	0
18	5,8	2,4	0
20	5,8	2,4	0
22	5,8	2,4	0



Şekil 10. Zamana ve pH'a karşı bakteriosin aktivite ölçümü.

## YARARLANILAN KAYNAKLAR

- BAYLES, K. W. The use of degenerate, sensor gene-specific, oligodeoxyribonucleotide primers to amplify DNA fragments from *Staphylococcus aureus*. *Gene*, 123, 99-103 (1993)
- BROUGHTON, J.D. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, November, 100-112 (1990).
- BISWAS, S.R., P. RAY, M.C. JOHNSON AND B RAY. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocinAcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1265-1267.
- BUCHMAN G.W., Banerjee S., and Hansen J.N. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 263, 16260-16266 (1988).
- CHARTERIS W.P., Kelly P., Morelli L., Collins J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 61, 1636-1643 (1998).
- COVENEY J.A., Fitzgerald G.F., Daly C. Detailed characterization and comparison of four lactic streptococcal bacteriophages based on morphology, restriction mapping, DNA homology, structural protein analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1439-1447 (1987).
- DE VUYST L., Vandamme E.J. (Ed). 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and Professional. Chapman and Hall. Glasgow, UK.
- DIEP B.D., Havarstein L.S., Nes I.F. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*, 178, 4472-4483 (1996).
- DODD H.M., Gasson M. J. Bacteriocins of lactic acid bacteria, Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Gasson M.J., De Vos W.M. (ed). Chapman and Hall, Glasgow, 1994, 211-251.

- DODD H.M., Horn N., and Gasson, M.J. Analysis of the genetic determinant for the production of the peptide antibiotic nisin. *Journal of General Microbiology* 136, 555-566 (1990)
- DUWAT P., Ehrlich S. D., and Gruss A. Use of degenerate primers for polymerase chain rection cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* recA gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2674-2678 (1992)
- FIELDS F.O. Use of bacteriocins in food : Regulatory considerations. *Journal of Food Protection*, 1996 supplement, 72-77 (1996).
- GIDA TEKNOLOJİSİ DERGİSİ. Probiotik yoğurt "LC1" . Gıda Teknolojisi, 11, 32-34 (1998)
- GONZALES B., Arca P., Mayo B., Suarez J.E. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2158-2163 (1994).
- GÜRAKAN, G.C., Bozoglu T.F., Weiss N., Identification of *Lactobacillus* strains from Turkish-style dry fermented sausages. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 28, 139-11 (1995)
- HARMON K.S., McKay L. Restriction enzyme analysis of lactose and bacteriocin plasmids from *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis* WM4 and cloning of *BclI* fragments coding for bacteriocin production. *Applied Environmental Microbiology*, 53, 1171-1174 (1987)
- HASTINGS J.W., Sailer M., Johnson K., Roy, K.L., Vederas J.C., and Stiles M.E. Characterization of Leucocin A-UAL 187 and Cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology*, 173, 7491-7500 (1991).
- HOLCK, A., L.AXELSSON, K.HÜHNE VE L.KRÖCKEL. Purification and cloning sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiology Letters*, 115, 143-150 (1994).
- HOOVER, D.G., P.M. WALSH, K.M.KOLAETIS, VE M.M. DALY. A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with 5.5 megadalton plasmid. *J.Food Protection* 51, 29-31(1988).



- JIMENEZ-DIAZ R., Rioz-Sanchez R.M., Desmadzeaud M. Ruiz-Barba J.L., Piard J.C. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus Plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1416-1424 (1993).
- JIMENEZ-DIAZ R., Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Holo H., Nes IF, Sletten K.H. Warner P.J. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4459-4463 (1995)
- JOERGER M.C., Klaenhammer T.R. Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *Journal of Bacteriology* 172, 6339-6347 (1990).
- KLAENHAMMER T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, p. 39-86. FEMS Microbiology Reviews, Forth Symposium on Lactic Acid Bacteria, Genetics, Metabolism and Applications. Nordwiekerhout, 5-9 September, The Netherlands. 1993. Eds: G.Gottschalk. Elsevier, Amsterdam
- KALETTA C., Entian K.D. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *Journal of Bacteriology* 171, 1579-1601 (1989).
- KIM S.G., BATT C.A. Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *groESL* operon. *Gene*, 127, 121-126 (1993).
- KIM W.S., and Dunn N.W. Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. *Current Microbiology* 35, 59-63 (1997).
- LEWINGTON J., Greenaway S.D., Spillane B.J. Rapid small scale preparation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis. *Letters in Applied Microbiology* 5, 51-53 (1987)
- LEWUS C.B., Kaiser A., Montville T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1683-1688 (1991)

- LEWUS C.B., Montville T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 13, 145-150 (1991).
- MATTICK A.T., Hirsch A. A powerful inhibitory substance produced by group N-streptococci. *Nature*, 154, 551-553 (1944)
- MURÍANA P.M., Klaenhammer T.R. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 114-121 (1991).
- MURÍANA P.M., Klaenhammer T.R. Cloning, phenotypic expression and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *Journal of Bacteriology*, 173, 1779-1788 (1991).
- NES I.F., Diep B.D., Havarstein L.S. Brurberg M.B., Eijsink V., Halo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria, p. 113-128, *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Proceedings of the Fifth Symposium held in Velhoven, The Netherlands, 8-12 September 1996. Eds: G.Venema, J.H.J.Huisin'tVeld, J.Hugenholtz. Antonie van Leeuwenhoek Volume 70: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- NEWTON, C.R., A. Graham (Ed.) 1994. *In* PCR, Introduction to Biotechniques. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.
- POSNO M., Leer R.J., Van Luijk N., Van Giezen M.J.F., Heuvelmans P. T.H.M., Lokman B.C., and Pouwels P. H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1822-1828 (1991).
- SCHILLINGER, U. AND F. K. LUCKE. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901-1906.
- SINHA, R.P. 1989. A new simple method of curing plasmids in lactic streptococci. *FEMS Microbiology Letters* 57, 349-352.
- TAGG J.R., McGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology*, 21, 943-947 (1971).
- VAN BELKUM M.J., Hayema B.J., Jeeninga R.E., Kok, J., and Venema G. Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 492-498.

- VAN DER VOSSSEN, J.M.B.M., Herwijnen, M.H.M., Leer, R.J., Brink, B. Pouwels, P.H., Huisn't Veld. 1994. Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid-encoded trait: Plasmid curing, genetic marking by in vivo plasmid integration, and gene transfer. *FEMS Microbiology Letters* 116, 333-340.
- WEST, C.A., P. J. Warner. Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol. Lett.* 49, 163-165 (1998).
- WHYTE L.G., Greer C.W., Inniss W.E. Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 99-106 (1996).

## BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: TOGTAG-1520

2- Rapor Tarihi: 25.10.1998

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 25.11.1995 / 25.6.1998

4- Projenin Adı: PCR tekniği ile bakteriosin geni amplifikasyonu

5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Doç.Dr.G.Candan Gürakan  
Osman Çataloluk6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü  
06531 ANKARA

7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK

- Öz (Abstract): Bu çalışmada öncelikle PCR yöntemi ile bakteriosin genine ulaşılabilirlik araştırılmıştır. Birçok primerin kullanıldığı deneylerde *Lactobacillus* suşları bakteriosin üreticisi olarak incelenmiştir. *Listeria monositojenes* üzerinde etkili *Laktobasillus* suşu bu çalışmanın devamında kullanılmak için seçilmiştir. Bakteriosinin amino asit sıralamasına göre primerler sentezlenmiş ve bakteriosin geni fragmantını amplifiye etmek için kullanılmıştır. Bu organizmanın bakteriosin geni düz ve ters polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) serisi ile amplifiye edilmiş ve *Escherichia coli* 'ye klonlanmış ve sekansı tespit edilmiştir. DNA sekans analizi bu bakteriosinin 38 amino asitten oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. pGKV 21 vektörüne aktarılan bakteriosin operonu, doğal olarak bakteriosin üretemeyen *Laktobasillus plantarum* 80 suşunda bakteriosin üretmiştir. İdentifikasyon çalışmaları sonucunda bakteriosin üreticisi mikroorganizmanın *Laktobasillus salivarius* olduğu ortaya çıkmıştır. Bu araştırma PCR tekniği ile bir *Laktobasillus* suşu olan *Laktobasillus salivarius* da bakteriosin üretiminden sorumlu genetik determinantların yerlerinin tespitini rapor etmektedir. Ayrıca, literatürde henüz bilinmeyen yeni bir bakteriosinin DNA sekans dizilimi bulunmuştur. Bu sekans dizilimi farklı organizmalar tarafından üretilen bakteriosin genlerinin birbiriyle kıyaslanması (Gen Bankası Data Baz Verileri ile) olanağını sağlayacaktır.

nahtar Kelimeler: Bakteriosin, Laktobasillus, PCR, Ters PCR

Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler Hazırlanmakta olan makalenin FEMS Microbiology dergisine gönderilmesi planlanmaktadır.

- Bilim Dalı:

Doçentlik B. Dalı Kodu: Biyoteknoloji ISIC Kodu:  
Uzmanlık Alanı Kodu:- Dağıtım (\*):  Sınırlı  Sınırsız- Raporun Gizlilik Durumu :  Gizli  Gizli Değil

Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz



# TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

Atatürk Bulvarı No: 221  
Kavaklıdere, 06100 ANKARA

Telefon : (0.312) 468 53 00  
Telgraf : TÜBİTAK - ANKARA

Teleks : 46 830 BTAK TR  
Faks : (0.312) 427 74 89

SAYI : B.02.1.BAK.0.06.00.07-1520/ 2263-67  
KONU: Raportörlüğünüz

5 Temmuz 1999

Sayın Prof.Dr. Jale Acar  
Hacettepe Ü. Mühendislik Fak.  
Gıda Mühendisliği Bölümü  
ANKARA

Grubumuzca desteklenen ve raportörü bulunduğunuz TOGTAG-1520 no.lu projenin yeniden hazırlanan kesin raporu, değerlendirmeniz için ekte gönderilmektedir.

Anılan rapora ilişkin görüşlerinizin, yapılacak ilk Yürütme Komitesi Toplantısı'na kadar Grubumuza iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Neşet Kılınçer  
Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri  
Araştırma Grubu  
Yürütme Komitesi Sekreteri

Ek : TOGTAG-1520 Kesin rapor  
Değerlendirme Formu

## ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU İNCELEME FORMU

1. Proje sonuç raporu'nun organizasyonunun yazım tekniğinin ve diğer özelliklerinin, bilimsel ve teknik bir çalışmanın takdimi için gerekli olan ve TÜBİTAK'na belirlenen "Sonuç Raporu Yazımında Uyulacak Kurallar"a uygun olup olmadığını belirtiniz.

2. Literatür özetini yeterli ve anlamlı buluyor musunuz? Açıklayınız.

3. Proje amacının literatüre göre yeri ve önemini gözönüne alarak değerlendirmesini yapınız.

4. Projede kullanılan yöntemleri değerlendiriniz.

5. Projede ortaya çıkan sorunları / aksaklıkları değerlendiriniz.

6. Proje, öneri formunda belirtilmiş olan amaca ne ölçüde ulaşmıştır? Açıklayınız.

7. Öngörülen çalışmaların gerçekleşme oranları hakkında görüşlerinizi açıklayınız.

8. Elde edilen sonuçların uyumluluğu ve yapılan ölçmelerin hassasiyeti konusunda görüşlerinizi belirtiniz.

9. Proje sonuçlarının uygulamaya konulup konulamayacağı konusundaki görüşlerinizi ve eğer uygulamaya konulabilir ise sonuçların duyurulmasında yarar gördüğünüz ilgili kurum/kuruluşların isimlerini belirtiniz.

10. Patent alınması söz konusu mudur? Açıklayınız.

11. Paporda, projeyi ileri götürücü başka ek proje önerileri bulunuyor mu? Sizin bu konudaki önerileriniz nelerdir? Belirtiniz.

12. Rapor, projenin bilimsel ve teknik tüm yönleri ve sonuçları konusunda yeterli bilgi içeriyor mu? Açıklayınız.

13. Proje bütçesini gözönüne alarak genel bir değerlendirme yapınız ve eklemek istediğiniz hususları belirtiniz.

14. Sonuç raporunun kabul edilmesini uygun buluyor musunuz? Varsa raporla ilgili değişiklik önerilerinizi ve gerekçelerinizi belirtiniz.

15. Sonuç raporunun başka bir uzman tarafından da incelenmesini uygun görüyor musunuz? Görürseniz, uzmanlık dalını, mümkünse adı- soyadını belirtiniz.

(\* ) Yanıtlarınızı soru numarası belirterek ek sayfalarda veriniz.

**DANIŞMANLA İLGİLİ BİLGİLER**

Adı- Soyadı :

Üniversite/Kuruluş Adı :

Bölümü/Birimi :

Adresi :

Banka Hesap No :

- Varsa Danışmanlık yapabileceği diğer alanlar:

Herhangi bir nedenle Danışmanlık yapılamaması durumunda konuyla ilgili önerilebilecek danışman veya danışmanlar: