

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MBL9 SUŞUNDA ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP
ÖZELLİKLERİN GENETİK DETERMİNANTLARI**

Nefise AKKOÇ

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

ANKARA

2008

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımnda bana yol gösteren, araőtırmamın her aşamasında bilgi, yardım ve anlayıőını benden esirgemeyen, çalıőmalarımnda olduğu kadar her zor anımda aynı kararlılık, güç ve anlayıőla daima yanımda olan sevgili hocam, Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK (Ankara Üniversitesi Fen Fakóltesi)'e;

Bana önce hayat veren, ardından da bu hayatı güzel günlerle doldurmam için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, sevgili anneme ve babama;

Sonsuz bir sabırla tüm sıkıntılarımın ortak olan ve bana güzel bir çalışma ortamı sağlayan biricik kardeőim Beyza'ya;

Tüm yardımları için arkadaşlarım; Dr. Çağatayhan ÖZTÜRK, Dr. M. Dilek AVŐAROėLU, Arő. Gör. Ömer ŐİMŐEK, Yrd. Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA ve Arő. Gör. Banu ÖZDEN'e

Sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Nefise AKKOÇ

Ankara, Ocak 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSALTEMELLER.....	3
2.1. <i>Lactococcus</i> Cinsinin Genel Karakteristikleri.....	3
2.2. Laktokok Starter Kültür Suşları.....	4
2.3. <i>L. lactis</i> Starter Kültür Suşlarının Endüstriyel Öneme Sahip Özellikleri.....	5
2.3.1. Laktoz metabolizması.....	5
2.3.2. Kazein hidrolizi.....	6
2.3.3. Faj dirençlilik.....	7
2.3.3.1. Faj adsorbsiyonunun engellenmesi.....	8
2.3.3.2. Faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi.....	8
2.3.3.3. Restriksiyon/modifikasyon.....	9
2.3.3.4. Abortif enfeksiyon.....	10
2.3.4. Bakteriyosin üretimi.....	10
2.3.4.1. Laktisin 481.....	11
2.3.5. Sitrat fermentasyonu.....	15
2.3.6. Antibiyotiklere ve metal iyonlarına dirençlilik.....	15
2.3.7. Ekzopolisakkarit üretimi.....	16
2.4. Gıda Düzeyli Konakçı-Vektör Sistemleri ve Starter Kültür Suşlarının Geliştirilmesinde Kullanılan Modern Yaklaşımlar.....	16
2.5. Konjugasyon.....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Mikroorganizmalar ve bakteriyofajlar (fajlar).....	20
3.1.2. Bakterilerin üretiminde kullanılan besiyerleri.....	20
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşunun biyokimyasal özelliklerinin	

belirlenmesi.....	22
3.2.2. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşunun genetik tanısı.....	25
3.2.3. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşunun plazmidlerinin giderilmesi ve plazmidleri giderilmiş mutantların seçimi.....	25
3.2.4. Plazmid içeriklerinin belirlenmesi.....	26
3.2.4.1. Plazmid izolasyonu.....	26
3.2.4.2. Elektroforez.....	29
3.2.4.3. Plazmid büyüklüklerinin saptanması.....	30
3.2.5. Bakteriyosin üretimi.....	31
3.2.5.1. Bakteriyosin etkinliğinin tanısı.....	31
3.2.5.2. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması.....	32
3.2.5.3. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi.....	32
3.2.5.4. Bakteriyosin yapısal genlerinin PZR amplifikasyonu ile tanımlanması.....	33
3.2.6. Faj biyodenemeleri.....	36
3.2.6.1. Faj titresinin yükseltilmesi.....	36
3.2.6.2. Faj duyarlılıklarının saptanması.....	37
3.2.6.3. Adsorbsiyonun engellenmesi.....	37
3.2.7. Proteolitik aktivite testleri.....	38
3.2.7.1. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının proteolitik aktivite düzeylerinin belirlenmesi.....	38
3.2.7.2. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının fast slow differential agar ortamında proteolitik aktivite ve laktoz fermentasyon yeteneğinin belirlenmesi.....	39
3.2.8. Antibiyotik duyarlılık testleri.....	40
3.2.9. Konjugasyon.....	40
3.2.10. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşunun laktoz plazmidi stabilitesi.....	41
3.2.11. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşunun ve mutantlarının üreme kinetiklerinin matematiksel modeli.....	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	43
4.1. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 Suşunun Genetik ve Biyokimyasal Tanısı.....	43
4.2. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 Suşunun Plazmid İçeriklerinin Tanımlanması.....	45

4.3. Laktoz Fermentasyon Yeteneği.....	47
4.4. Proteolitik Aktivite.....	52
4.5. Faj Dirençlilik.....	55
4.6. Bakteriyosin Üretimi.....	61
4.7. Antibiyotik Dirençlilik.....	75
4.8. Laktoz Fermentasyonu, Proteolitik Aktivite ve Laktisin 481 Üretiminden Sorumlu Plazmidleri Giderilen Mutantların Üreme Kinetikleri.....	78
4.9. Konjugasyon.....	86
4.10. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 Suşunda Endüstriyel Öneme Sahip Özelliklerinin Genetik Stabilitesi.....	89
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Olgun lantibiyotik yapılarının oluşumu.....	14
Şekil 4.1. 16S rDNA primerleri ile <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 'in çoğaltılan gen bölgesi.....	44
Şekil 4.2. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşunun plazmid içeriği.....	46
Şekil 4.3. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının plazmid içerikleri.....	50
Şekil 4.4. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının plazmid içerikleri.....	51
Şekil 4.5. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve tüm plazmidlerini yitirmiş mutantların mutantların jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.6. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının plazmid içerikleri.....	67
Şekil 4.7. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve laktisin 481 üretim yeteneğini kaybetmiş mutantların <i>Micrococcus luteus</i> NCIMB8166 indikatör suşuna karşı antibakteriyel etkinlikleri.....	68
Şekil 4.8. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve laktisin 481 üretim yeteneğini kaybetmiş mutantların <i>Micrococcus luteus</i> NCIMB8166 indikatör suşuna karşı antibakteriyel etkinlikleri.....	69
Şekil 4.9. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve laktisin 481 üretim yeteneğini kaybetmiş mutantların <i>Micrococcus luteus</i> NCIMB8166 indikatör suşuna karşı antibakteriyel etkinlikleri.....	70
Şekil 4.10. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve bakteriyosin üretim yeteneği içeren ve içermeyen mutantların plazmid içerikleri.....	71
Şekil 4.11. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 tarafından üretilen bakteriyosinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) esaslı tamsı.....	72
Şekil 4.12. Laktisin 481 primerleri ile çoğaltılan gen bölgesinin DNA dizi analizi.....	73
Şekil 4.13. Gelişme eğrilerinin çıkarılmasında esas alınan model grafiği.....	81

Şekil 4.14. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşunun zamana karşı gelişme eğrisi.....	82
Şekil 4.15. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9-47 mutantının zamana karşı gelişme eğrisi.....	83
Şekil 4.16. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9-44 mutantının zamana karşı gelişme eğrisi.....	84
Şekil 4.17. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9-162 mutantının zamana karşı gelişme eğrisi.....	85
Şekil 4.18. Laktisin 481 üretiminden sorumlu plazmidin konjugal aktarımı.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. GP kuyu içerikleri.....	23
Çizelge 3.2. Laktisin 481 kodlu plazmidin tanımlanmasında kullanılan oligonükleotit primerlerinin sekansı.....	35
Çizelge 4.1. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşu ve mutantlarının laktoz fermentasyon yetenekleri.....	49
Çizelge 4.2. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının proteolitik aktivite düzeyleri.....	54
Çizelge 4.3. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının faj duyarlılıkları.....	58
Çizelge 4.4. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 tarafından üretilen bakteriyosinin etki spektrumu.....	62
Çizelge 4.5. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşunun ürettiği bakteriyosinin değişik enzim, sıcaklık ve pH uygulamalarına karşı davranışı.....	65
Çizelge 4.6. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının antibiyotik duyarlılıkları.....	77
Çizelge 4.7. Model denklem (Gompertz denklemi) parametreleri.....	80
Çizelge 4.8. Doğal tip <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşu ve laktisin 481 plazmidi aktarılmış konjugantında endüstriyel özellikleri kodlayan plazmidlerin stabilitesi.....	90

SİMGELER DİZİNİ

dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
g	gram
kb	Kilobaz
L	Litre
<i>L</i>	<i>Lactococcus</i>
M	Molar
mL	Mililitre
pfu/mL	Mililitredeki Plak Oluşturma Birimi
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikada Devir Sayısı
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
Mb	Megabaz
N	Normal
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
rDNA	Ribozomal DNA
UV	Ultraviyole
OD	Optik Density:Optik Yoğunluk
nm	Nanometre
log	Logaritma
v/v	Hacim/Hacim
AU	Arbitrary ünite
cfu/mL	Mililitredeki Koloni Oluşturma Birimi
Tyr/mL	Mililitredeki Tirozin Miktarı
kDa	Kilo Dalton
sn	Saniye
mg	Miligram

1. GİRİŞ

Starter kültürler, fermentasyonun başlatılması, fermente gıdaların tipik yapısal ve aromatik özelliklerinin geliştirilmesi amacı doğrultusunda hammaddeye belirli oranlarda ilave edilen mikroorganizma kültürleri olarak tanımlanmaktadır. Bu kültürler, tanımlı tek suşlardan ya da karışık suş kombinasyonlarından üretilebilmektedir. Fermente gıda endüstrisinde ürün kalitesi, standardizasyonu ve üretim ekonomisinin ana unsurlarının başında; starter kültürlerin fermentasyon süreçlerindeki aktivitesi ve kütleli üretimin doğasından kaynaklanan teknolojik sorunlara uygunluğu gelmektedir.

Günümüzde tüketiciler gıda güvenliğine giderek artan bir önem göstermektedir. Bu nedenle fonksiyonel gıdalar olarak adlandırılan, sağlıklı yaşama destek veren gıdaların üretiminde önemli bir artış meydana gelmiştir. Diğer yandan, gıda koruma amacı ile ürünlere ilave edilen kimyasal katkı maddeleri tüketici sağlığını tehdit eder boyutlara ulaşmış ve dünya genelinde tüketiciler doğal gıdalara yönelmiştir. Özellikle fermente gıdaların doğal bileşenlerini oluşturan starter kültür suşlarının ya da onların metabolitlerinin gıda üretimi ve korunmasında kullanımı, hem fonksiyonel gıdaların üretimi ve hem de gıda güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır.

Tüm dünyada en fazla üretimi yapılan fermente süt ürünü peynirdir. Peynir endüstrisinde kullanılan starter kültürlerin ana bileşenini *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) suşları oluşturmaktadır. *L. lactis* starter kültür suşlarının peynir üretimindeki ana fonksiyonları; süt şekeri laktozu kullanarak laktik asit üretmeleri, kazeini parçalamaları ve kontamine florayı inhibe etmeleri yanında, bu ürünler için tipik aroma ve tat bileşiklerini oluşturmalarıdır. Starter kültür suşlarının çevresel stres koşullarına ve faj kontaminasyonlarına karşı direnç yetenekleri; endüstriyel fermente süt ürünlerinin üretiminde temel sorunlardan biri olan ve fermentasyon süreçlerinde meydana gelen yavaşlama ya da durmadan kaynaklanan ürün kayıpları ile karakterize edilen teknolojik sorunları en aza indirmektedir.

Endüstriyel süt fermentasyonlarında kullanılacak starter *L. lactis* suşlarının seçiminde, yukarıda tanımlanan kültürel ve teknolojik özellikler esas alınmaktadır. Bu özellikler bakımından yüksek aktiviteye sahip ve genetik açıdan stabil suşların belirlenmesi ve geliştirilmesi, starter kültür üretim programlarının hareket noktasını oluşturmaktadır. Bu

esas doğrultusunda tasarlanan tez çalışmasında; Türkiye kökenli *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite, faj dirençlilik ve laktisin 481 üretimi özelliklerinin genetik doğasının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada ayrıca, genetik determinantları tanımlanan endüstriyel özelliklerin yatay gen transferi yolu ile aktarım olanaklarının araştırılması ve stabilitesinin belirlenmesi de hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. *Lactococcus* Cinsinin Genel Karakteristikleri

Lactococcus cinsi (laktokoklar); *L. lactis*, *L. piscium*, *L. gaviae*, *L. raffinolactis* ve *L. plantarum* olmak üzere beş farklı tür içermektedir. *Lactococcus* türleri; Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, kok morfolojisinde bakteriler olup, gelişme ortamlarında tek (0.5–1.5 µm), kok çiftleri ya da kısa zincirler halinde bulunabilmektedir. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C olan laktokoklar, 10 °C ve 45 °C arasında gelişme gösterebilmektedir. Laktokokların metabolizması görece basittir. Şekerleri homofermentatif yolla laktik aside dönüştürmek sureti ile enerji elde etmektedirler (Schleifer 1987, Schlegel 1997, Furet *et al.* 2002). Bu kısa ve basit metabolik izyolu, şeker molekülünden az miktarda enerji elde edilmesine yol açmaktadır. Yeterli enerji seviyesine ulaşabilmek için, söz konusu bakteriler metabolik izyolunu çok hızlı bir şekilde kullanırlar. Bu durum da süt ürünlerinde hızlı bir asidifikasyona neden olmaktadır. Laktokoklarda vitaminler ve aminoasitler gibi metabolitlerin anabolizması ise çok sınırlıdır. Dolayısı ile bu gelişme faktörlerinin büyük bir kısmı çevreden sağlanmaktadır (Schleifer 1987, Furet *et al.* 2002).

Hareketsiz ve Lancelfield serolojik grup N üyesi olan *Lactococcus* cinsine ait bakterilerde fonksiyonel sitrik asit döngüsü ve solunum enzimleri bulunmamaktadır. Ancak bu bakteriler flavin tip NADH oksidaz, NADH peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerine sahip olduğu için, düşük oranda oksijeni kullanabilmektedir. Katalaz enzim sistemine sahip olmadıklarından, aerobik koşullarda hidrojen peroksit ortamda birikebilmekte ve hücrel yapıların bozulmasına yol açarak bakteriyel gelişimi engelleyebilmektedir. Flavın tip NADH oksidazlar ve NADH peroksidazlar, düşük düzeyde hidrojen peroksit redüksiyonunu gerçekleştirdikleri için, söz konusu bakteriler mikroaerofilik olarak tanımlanmaktadır. Gıda fermentasyonlarında starter kültür olarak kullanılan laktokok üyeleri, insan ve hayvan tüketiminde güvenilir olarak tanımlanmakla birlikte; *L. piscium* ve *L. gaviae* başta olmak üzere, bazı üyelerinin oportünistik enfeksiyon ajanları olduğu da belirlenmiştir. Genom büyüklükleri ortalama 2.5 Mega baz (Mb) olan laktokoklarda, % G+C oranı 34–42 arasında değişim göstermektedir (Teixeria *et al.* 1996, Schlegel 1997, van Niel *et al.* 2002). Bu bakteriler doğal olarak süt, süt ürünleri ve bitkisel materyaller yanında, balık ve böceklerin ince bağırsağında da bulunabilmektedir (Kimoto *et al.* 2004).

2.2. Laktokok Starter Kültür Suşları

Lactococcus cinsine ait beş tür içerisinde, özellikle *L. lactis*' e ait iki alt tür (*L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*) ile bir biyovaryete (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) fermente süt ürünlerinin ana starter kültür suşlarını oluşturmaktadır (Mundt 1986). Odun ile beslenen termitlerin sindirim kanalının arka kısmından izole edilen ve laktoz fermentasyon yeteneği içermeyen *L. lactis* subsp. *hordniae* ise, *L. lactis* türünün gıda fermentasyonlarında kullanılmayan tek üyesidir (Klijn *et al.* 1995, Nomura *et al.* 1999). Bu bakteriler kullanılarak üretilen temel fermente süt ürünü, tüm dünyada 2000 civarında türü tanımlanan peynirdir. Ülkemizde de 50 civarında farklı peynir türünün endüstriyel ya da geleneksel üretimi gerçekleştirilmektedir. Türkiye'de toplam peynir üretiminin % 85–89'unu teşkil eden beyaz peynir, tulum peyniri ve kaşar peyniri yapımında *L. lactis* starter kültür suşları kullanılmaktadır. *L. lactis* alt türleri, bu peynirlerin doğal florasında da tespit edilmiştir (Sweeney *et al.* 2004, Bulut *et al.* 2005, Jivadipur and Tunçtürk 2006). *L. lactis* üyeleri, peynirler dışında; ekşi krema, yağlı süt, tereyağı gibi çok sayıda fermente süt ürünü ve değişik bitkisel fermente gıdaların üretiminde de kullanılmaktadır. Bu bakteriler, fermentasyonun başlatılması, fermente gıdaların besinsel, duyuşal ve yapısal özelliklerinin geliştirilmesi ve endüstriyel süreçlerde yüksek ürün elde edilmesinden sorumludur (Leroy and de Vuyst 2004, Jivadipur and Tunçtürk 2006).

Aralarında % 20–30 oranında DNA baz dizi farklılığı bulunan *L. lactis* subsp. *lactis* ile *L. lactis* subsp. *cremoris*' in klasik tanıma kullanılan karakteristikleri; en yüksek gelişme gösterdikleri pH ve sıcaklık düzeyleri, arjininden amonyak oluşturma yetenekleri ve riboz ve trehaloz gibi şekerlerin fermentasyonu olarak tanımlanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* 40 °C' de, pH 9.2'de gelişme gösterebilmekte, arjininden amonyak oluşturabilmekte ve riboz ve trehaloz fermentasyonu sonucu L(+) laktik asit oluşturabilmektedir. *L. lactis* subsp. *cremoris* ise bu özellikleri içermemektedir. Son yıllarda *L. lactis* subsp. *lactis*' in ayrıca, glutamat dekarboksilaz enzimini kullanmak sureti ile, glutamattan gama aminobütirik asit (GABA) üretebildiği de tanımlanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* ile *L. lactis* subsp. *diacetylactis* arasındaki yegane farklılık ise, bu biyovaryetenin sitrattan diasetil ve asetoin oluşturma özelliği olarak tanımlanmıştır. Diasetil fermente tereyağının tipik aroma bileşimini oluşturmaktadır (Nomura *et al.* 1999, Kimoto *et al.* 2004, Göncü and Alpkent 2005, Jivadipur and Tunçtürk 2006).

2.3. *L. lactis* Starter Kültür Suşlarının Endüstriyel Öneme Sahip Özellikleri

2.3.1. Laktoz metabolizması

Starter kültür suşları olarak kullanılan laktokok üyeleri, laktozu genellikle plazmidler tarafından kodlanan ve diğer bakteri gruplarında nadir rastlanan fosfo- β -galaktozidaz enziminin anahtar rol oynadığı bir izyolu ile metabolize etmektedir. Bu metabolik yolda laktoz hücre içine, fosfoenol piruvata bağlı fosfotransferaz sistemi izyolunun (PEP-PTS) enzimleri tarafından alınır. PEP-PTS sistemi, laktoz fosfatların oluşumunu katalize etmektedir. Çok elemanlı bir izyolu olan PEP-PTS sistemi; laktoz spesifitesi olmayan Enzim I, laktoz spesifik Enzim II ve ısı stabil bir protein olan HPr içermektedir (Saier and Reizer 1992). Enzim I PEP'in kullanımında fosforile olur ve HPr'nin fosforilasyonunu katalize eder. Bu aşamadan sonra HPr, fosfat gruplarının laktoz spesifik Enzim II'ye transferini gerçekleştirir. Bu sayede Enzim II, şekerin fosforilasyonunu ve transferini sağlar. Hücre içine alınan laktoz-fosfat, fosfo- β -galaktozidaz enzimi aracılığı ile glukoz ve galaktoz-6-fosfata parçalanır. Bu katabolik yol tagatoz-6-fosfat yolu olarak adlandırılmaktadır (Monnet *et al.* 1996). PEP-PTS ve tagatoz-6-fosfat yoluna ait enzimleri kodlayan genler, *L. lactis* suşlarında plazmidler tarafından taşınmaktadır. Laktoz plazmidleri olarak adlandırılan ve farklı suşlarda değişik moleküler büyüklüklerde saptanabilen bu kromozom dışı genetik yapılarda laktoz kullanım genleri, *lacABCDFEGX* operonu halinde bulunmaktadır. Söz konusu operonun transkripsiyonel regülasyonunu kodlayan gen ise, *lac* operonu promotörünün hemen arkasında yer almaktadır. *lac* operonu promotörü ve regülatör promotörleri farklı yönlerde transkripsiyonu yapılan yakın promotörler olarak organize olmuştur (van Rooijen and de Vos 1990, de Vos and Vaughan 1994, Monnet *et al.* 1996).

L. lactis suşlarında daha nadir rastlanan ikinci bir laktoz kullanım yolu, prokaryotlarda ortak olan ve permeaz sistemleri ile karakterize edilen Leloir yoludur. Permeazlar bu sistemde laktozu hücre içine kimyasal modifikasyon yapmaksızın transfer ederler. Bu izyolundaki laktoz transportunda, proton simportu etkinlik göstermektedir. Hücre içine alınan laktoz, β -galaktozidaz enzimi aracılığı ile glukoz ve galaktoza parçalanmakta ve katabolitler Leloir yoluna sokulmaktadır (Monnet *et al.* 1996).

Starter kültür suşu olarak kullanılan *L. lactis* üyelerinde yürütülen çalışmalar sonucunda; fosfo- β -galaktozidaz enzim aktivitesine sahip suşların laktozdan laktat üretim hızları, β -galaktozidaz enzimine sahip olanlara oranla daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle fosfo- β -galaktozidaz enzim aktivitesine sahip suşlar, süt ortamında hızlı gelişme göstererek asitliği düşürmekte ve hızlı bir pıhtı oluşumuna neden olmaktadır. Endüstriyel süt fermentasyonlarında hızlı asit oluşumu, öncelikle pıhtı oluşumunun erken gerçekleşmesine ve dolayısı ile fermentasyon sürecinin kısılmasına yol açmaktadır. Pıhtı oluşumu ayrıca fermente süt ürününün tipik yapısal özelliklerinin gelişiminde de anahtar rol oynamaktadır. Asitlik gelişiminin bir diğer önemli fonksiyonu, kontamine mikrofloranın inhibisyonuna yol açarak, ürünün mikrobiyolojik kalitesini yükseltmektir (Vaughan *et al.* 1998, Carbaco *et al.* 2004).

L. lactis starter kültür suşları fosfo- β -galaktozidaz enzimi içerirken, aynı türün starter kültür suşu olarak kullanılmayan doğal tiplerinin β -galaktozidaz enzimine sahip olmaları, bu bakterilerin evrimine ışık tutmaktadır. Zira bu bakterilerde fosfo- β -galaktozidazlar plazmidler tarafından, β -galaktozidazlar ise kromozomal DNA tarafından kodlanmaktadır. Moleküler biyologlar bu durumu; süt ortamına adapte olmuş *L. lactis* suşlarının hızlı metabolik faaliyetlerini, laktoz plazmidlerinin konjugal transfer yolu ile kazandıklarını ileri sürerek açıklamaktadır (Tamaro *et al.* 2005).

2.3.2. Kazein hidrolizi

Etkin bir starter kültür performansı, kullanılan suş ya da suşların kazein ve diğer süt proteinlerini parçalaması ile doğrudan ilişkilidir. *L. lactis* suşları, proteolitik sistemlerini kullanmak sureti ile süt proteinlerini küçük peptitlere ve amino asitlere parçalayarak gelişmeleri için zorunlu faktörleri sağlamaktadır. Diğer yandan proteoliz ürünleri, özellikle peynirlerde tipik tat ve aroma bileşiklerini oluşturmaktadır. *L. lactis* suşlarında proteolitik sistem, genellikle; kazeinin ilk aşama parçalanması, özgül taşıma sistemleri ve taşınan peptitlerin, peptidazlar aracılığı ile küçük peptitlere ve amino asitlere indirgenmesi reaksiyonlarına katılan ve plazmidler tarafından kodlanan bir hücre dışı proteinaz ile karakterize edilmektedir (Kunji *et al.* 1995).

Plazmidler ile proteolitik aktivite arasındaki ilişki ilk kez, 1970'li yıllarda klasik mutasyon deneyleri sonucunda tanımlanmıştır. Daha sonra *L. lactis* suşlarında hücre dışı proteinaz

kodlayan pHP003 plazmidinin dizi analizi gerçekleştirilerek bu ilişkinin moleküler kanıtları saptanmıştır (Christensson *et al.* 2001). Moleküler tanısı yapılan söz konusu proteinazlar, laktosepinler olarak adlandırılmıştır. Bugüne kadar tanımlanan tüm *L. lactis* laktosepinleri plazmid kodlu olarak bulunmuştur. Laktosepin plazmidlerinin moleküler büyüklükleri ise, 13.4–100 kb (kilobaz) arasında tespit edilmiştir. Değişik araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarda, laktosepin plazmid büyüklüğünün, bulunduğu suşun proteolitik aktivitesi ile doğrudan ilişkili olduğu saptanmıştır. Laktosepin plazmid büyüklüğü arttıkça proteolitik aktivitenin düşmesi, küçük plazmidlerin yüksek kopya sayısı içermeleri ile açıklanmaktadır (Kok 1990, Christensson *et al.* 2001, Mills *et al.* 2006).

Laktokoklarda proteolitik sistem ile laktoz metabolizmasının ilişkisi üzerinde yürütülen çalışmalarda, bu iki özelliğin bazı suşlarda aynı plazmidler üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Söz konusu konjugatif plazmidler, gıda düzeyli genetik yapısı zenginleştirilmiş suş geliştirme çalışmalarında kullanılmış ve üretilen suşların endüstriyel uygulamaları başlatılmıştır. Diğer yandan, aynı suшта farklı plazmidler tarafından kodlanan laktoz metabolizması ve proteolitik aktivite özelliklerinin, verici suşlardan birlikte aktarılabildiği konjugasyon sistemleri de tanımlanmıştır. Bu sistemlerde, konjugasyon sürecinde aktarılacak plazmidlerin koentegre plazmid yapısı oluşturduğu saptanmıştır. Bu sistemler de genetik düzenlemelerde kullanılmaktadır (Mills *et al.* 2006).

2.3.3. Faj dirençlilik

Endüstriyel starter kültür olarak kullanılan *L. lactis* suşlarında en önemli teknolojik özelliklerden biri, faj dirençliliği içermeleridir. Zira süt fermentasyonlarının doğası gereği tam anlamı ile aseptik koşulların oluşturulamaması, yüksek düzeyde faj kontaminasyonlarına yol açmaktadır. Fajlarla kontamine olan duyarlı kültürler, hızlı bir şekilde parçalanmakta ve bunun sonucunda ya fermentasyon durmakta ya da büyük oranda ürün kayıplarına yol açan yavaşlamalar meydana gelmektedir (Hill 1993, Dinsmore and Klaenhammer 1995). Bu ürün kayıplarını engellemenin en etkin yolu, doğal faj dirençlilik sistemleri içeren *L. lactis* suşlarının tanımlanması ve kullanımudur. Bu amaç doğrultusunda yürütülen yoğun çalışmalar sonucunda, *L. lactis* suşlarında bulunan dört farklı faj dirençlilik mekanizması tanımlanmıştır. Söz konusu sistemler, etkinlik mekanizması esas alınarak; faj adsorbsiyonunun engellenmesi, faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi,

restriksiyon/modifikasyon ve abortif enfeksiyon olarak adlandırılmıştır (Akçelik and Tunail 1992, Moineau 1999, Dupont *et al.* 2004, Sturino and Klaenhammer 2006) .

2.3.3.1. Faj adsorbsiyonunun engellenmesi

Faj adsorbsiyonunun engellenmesi fenotipi, doğal *L. lactis* suşlarının faj dirençli mutantlarında tanımlanan bir dirençlilik mekanizmasıdır. Bu sistem kromozomal ve plazmid kökenli genler üzerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda, hücre yüzeyinde bulunan karbonhidrat veya protein yapıdaki faj almaç bölgelerinin bozulması ya da maskelenmesi ile karakterize edilmektedir (Forde and Fitzgerald 1999). *L. lactis* suşlarında faj almaç bölgeler ile fajların teması sonucu gerçekleşen tutunma (adsorbsiyon) süreci, geri dönüşebilir bir aşamadır. Ancak, faj ile faj enfeksiyon proteinlerinin temas ettiği ikinci aşama geri dönüşsüz bir interaksiyondur. Kromozomal ya da plazmid kodlu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda her iki aşmanın da kesintiye uğratılabildiği saptanmıştır. Faj adsorbsiyonunun engellenmesi tipte dirençlilik sistemleri, fajların konakçıları ile temasını ilk aşamada etkilediği için, faj ilişkisiz mutantların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu sayede, laktik fajların bu mekanizmayı aşacak direnç sistemlerini geliştirmeleri engellenmektedir. Söz konusu karakteristiği, faj adsorbsiyonunun engellenmesi sistemini süt endüstrisinde kullanılan starter kültür suşları için çok önemli hale getirmektedir (Garvey *et al.* 1996, Walker and Klaenhammer 2003).

Günümüzde, *L. lactis* suşlarında moleküler düzeyde tanımlanan faj adsorbsiyon sistemleri kullanılarak yeni antifaj sistemlerinin geliştirilmesinde önemli başarılar sağlanmıştır. Özellikle faj reseptör bölgeleri maskeleyen proteinler kullanılarak elde edilen antibadilerin fajlardan korunmada yüksek etkinlik göstermesi, bu yöntemin fermente süt ürünlerinin eldesinde kullanımına yönelik çalışmalara önemli bir ivme kazandırmıştır (Spinelli *et al.* 2006).

2.3.3.2. Faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi

Bir fajın prokaryotik hücre yüzeyine tutunması, faj DNA translokasyonunun gerçekleşeceği anlamına gelmemektedir. Zira DNA enjeksiyonunun meydana gelebilmesi için faj enfeksiyon proteinlerine (PIP) gereksinim duyulmaktadır. İlk kez Watanabe *et al.*

(1984) tarafından *Lactobacillus casei*'de tanımlanan PIP proteini, daha sonra *L. lactis* subsp. *lactis* C2'de de saptanmıştır (Valyasevi *et al.* 1990, Valyasevi *et al.* 1991).

Faj enfeksiyonlarından korunmada etkin bir mekanizma olan faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi, laktokoklarda nadir rastlanan bir sistemdir. Bugüne kadar *L. lactis* suşlarında biri plazmid (pNP40) ve diğeri de kromozomal DNA kökenli olan iki farklı faj DNA enjeksiyon engelleme sistemi saptanmıştır (Garvey *et al.* 1995, Akçelik 1998, Haard *et al.* 2005). Söz konusu sistemlerin, izole edildikleri konakçılarda sadece belirli faj ya da faj grupları için etkinlik göstermesi, endüstriyel amaçlı kullanımlarını kısıtlayan ana unsurdur.

2.3.3.3. Restriksiyon/ modifikasyon

Restriksiyon/modifikasyon (R/M) enzimleri; sitoplazmaya giren yabancı DNA moleküllerini parçalarken, konakçı DNA üzerinde söz konusu etkiyi göstermeyen hücresel savunma mekanizmalarıdır. Bu enzimler; moleküler yapıları, tanıma serileri, kesme özgülükleri ve kofaktör gereksinimleri esas alınarak üç grup altında sınıflandırılmıştır (Bickle and Kruger 1993). Schouler *et al.* (1998) tip I R/M sistemlerinin bazı alt ünitelerinin gen kodunun *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 kromozomu üzerinde yer aldığını tespit etmiştir. Bu enzimler HsdR (restriksiyon aktivitesi), HsdM (modifikasyon aktivitesi) ve HsdS (aktivite özgülüğü) olarak adlandırılan üç alt ünite içermektedir. IL1403 suşu üzerinde yürütülen ileri analizlerde, tip I restriksiyon/modifikasyon sisteminin HsdS alt ünitesi gen kodunun plazmid üzerinde bulunduğu, HsdR ve HsdM genlerinin ise kromozomda yer aldığı belirlenmiştir (Schouler *et al.* 1998). Tip II ve tip III R/M sistemleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda da, tip I R/M sistemleri ile benzer şekilde, alt ünite genetik determinantlarının plazmidler ya da kromozomal DNA olduğu saptanmıştır (Moineau *et al.* 1995, Walker and Klaenhammer 2003, O'Driscoll *et al.* 2004).

Restriksiyon/Modifikasyon aktiviteleri, yabancı DNA'yı parçalama spesifitelerinden dolayı çok güçlü faj direnç sistemleri olarak kabul edilmektedir. Ancak, bazı nadir durumlarda faj DNA'sı restriksiyondan önce modifiye edilerek bu sistemlerin etkinliğinden kaçabilmektedir. Özellikle *L. lactis* suşlarında pTR2030 plazmidinde kodlu R/M sistemlerinin endüstride sorun yaratan bazı fajlara karşı etkinliğinin düşük olmasının; söz konusu sistemdeki metilaz aktivitesinin, DNA dizi benzerliği nedeni ile bu fajlarda da

işlev görmesinden kaynaklandığı saptanmıştır. Bu nedenle endüstriyel starter kültür bileşeni olarak kullanılan *L. lactis* suşlarında R/M sistemlerinin, diğer faj direnç sistemleri ile kombine edilerek kullanımı önerilmektedir. Özellikle faj adsorbsiyonunun engellenmesi ya da abortif enfeksiyon tipte dirençlilik sistemleri ile kombine edilen restriksiyon/modifikasyon aktivitelerinin, endüstride sorun yaratan başlıca faj gruplarına karşı etkin bir koruma sağladığı belirlenmiştir. Bu özellikler kombine edilerek genetik yapısı zenginleştirilmiş suşlar, peynir starter kültürleri olarak kullanılmaktadır (O'Driscoll *et al.* 2004, Mills *et al.* 2006).

2.3.3.4. Abortif enfeksiyon

Abortif enfeksiyon (Abi) sistemleri; hücre içine giren fajların, DNA replikasyonu ya da transkripsiyon, translasyon, paketleme ve faj elemanlarının birleşmesi süreçlerini bozmak sureti ile, faj inaktivasyonuna yol açmaktadır. Abi sistemi, enfekte hücrelerin ölümü ile sonuçlanan bir süreci katalize eder. Faj çoğalmasına olanak tanımayan Abi sistemleri, *L. lactis* starter kültür suşlarında tercih edilen faj dirençlilik mekanizmalarıdır (Allison and Klaenhammer 1998, Walker and Klaenhammer 2003). Ancak, özellikle profajların *L. lactis* konakçı hücreleri ile homolog ya da homolog olmayan rekombinasyonları sonucunda, bu sisteme dirençli faj gelişiminin gerçekleştiği tespit edilmiştir (Walker and Klaenhammer 2003). Faj gelişme süreçlerindeki inhibisyon etkinlikleri esas alınarak 21 farklı Abi sistemi tanımlanmıştır. Bu sistemler içerisinde yalnız 3 adedi (AbiB, AbiH ve AbiN) kromozomal DNA kökenli iken, *L. lactis* suşlarındaki diğer 18 Abi sisteminin gen kodununun, değişik suşlarda farklı moleküler büyüklüklerde olabilen plazmidler üzerinde bulunduğu belirlenmiştir. Abi sistemlerinin genellikle plazmid kodlu oluşu, moleküler analiz ve genetik düzenleme çalışmaları ile güçlü antifaj sistemleri içeren *L. lactis* suşlarının geliştirilmesini önemli ölçüde kolaylaştırmaktadır (Forde and Fitzgerald 1999, Brussow and Desiere 2001, Yang *et al.* 2006).

2.3.4. Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosinler, diğer bakteri türleri üzerinde bakteriyosidal ya da bakteriyostatik etkiye sahip, ribozomal sentezlenen peptitler olarak tanımlanmaktadır (Klaenhammer 1993). Bu polipeptitler, gıda bozulması ve gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimini engelleme özelliklerinden dolayı, gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Diğer

yandan, bakteriyosinler, insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde gösterdikleri potansiyel ile, antibiyotiklerin alternatifi olarak öne çıkmaktadır (Nes and Tagg 1996). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler üç ana grup altında toplanmıştır. Lantibiyotikler olarak adlandırılan I. grup bakteriyosinler; lantionin, β -metillantionin, dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi translasyon sonrası modifikasyonlar ile oluşturulan amino asitleri içermektedir. II. grup bakteriyosinler, 5–30 kDa (kilo Dalton) arasında moleküler ağırlığa sahip, modifiye olmamış ısı-stabil peptitlerdir. III. grup bakteriyosinler ise, moleküler ağırlığı 30 kDa yukarısında ve ısı duyarlılık özelliğine sahip peptitler olarak karakterize edilmektedir (Sahl *et al.* 1995, Diep *et al.* 1996, Nilsen *et al.* 2003).

Bakteriyosinler, genellikle por oluşumuna yol açarak ya da hücre duvarı biyosentezini bozarak hedef hücre ölümüne neden olmaktadır. Üretici organizmalar, dirençlilik proteinleri aracılığı ile kendi bakteriyosinlerinin etkisinden korunmaktadır. Bakteriyosinler; gıdaların korunmasının yanında, gıda kalitesinin ve tüketici kabulünün artırılmasına yönelik endüstriyel uygulamalarda da kullanılmaktadır. Endüstriyel kullanım açısından bugüne kadar en geniş uygulama alanı bulan bakteriyosin, lantibiyotik grubu üyesi olan nisindir (Twomey *et al.* 2002, Papagianni 2003). Laktik asit bakterilerinin insan ve hayvan tüketiminde güvenilir gıda düzeyli ajanlar olmaları nedeni ile, bu bakterilerin ürettiği yeni bakteriyosinlerin izolasyonu ve kullanım olanaklarının belirlenmesi üzerinde yoğun araştırmalar sürdürülmektedir (Papagianni 2003).

L. lactis suşlarında tanımlanan başlıca bakteriyosinler; diplokoksin, laktoztrepsinler (Las 1, Las 2, Las 3, Las 4 ve Las 5), lantibiyotikler (nisin, laktisin 481 ve laktisin 3147) ve laktokoksinler (laktokoksin A, B, MN, G, 972 ve MMFII)'dir. Bu bakteriyosinler içerisinde yalnız nisinin gen kodu kromozomal DNA üzerinde tespit edilmiştir. Moleküler genetik analizi yapılan diğer *L. lactis* bakteriyosinlerinin tümü, suşlara ve spesifiye ettikleri bakteriyosinlere göre farklılık gösteren değişik plazmidler tarafından kodlanmaktadır (Beasley and Saris 2004, Horn *et al.* 2004, Diep *et al.* 2007).

2.3.4.1. Laktisin 481

Tüm lantibiyotikler gibi, laktisin 481 de, yapısal bir gen tarafından kodlanan öncü bir peptitten sentezlenmektedir. Prepeptit ya da prelantibiyotik olarak adlandırılan bu öncü molekül, C-terminalinde bulunan propeptidin, N-terminal lider peptitten ayrılmasından

sonra modifiye edilmekte ve olgun lantibiyotik oluşturulmaktadır. Enzimatik modifikasyonlar serin ve treoninin dehidrasyonu sonucu meydana getirilen 2,3-dehidroalanin (Dha) ve (Z)-2,3- dehidrobütirin (Dhb) ile karakterize edilmektedir. Serinin dehidrasyonu sonucu oluşturulan Dha ve treoninin dehidrasyonu sonucu oluşturulan Dhb arasında tiyoeter çapraz köprülerinin oluşturulması yolu ile lantiyonin (Lan), Dha ya da Dhb üzerine bir sistein amino asidinin ilavesi sonucu da 3-metillantionin (MeLan) oluşturulmaktadır (Sahl *et al.* 1995, Guder *et al.* 2000).

DNA dizi benzerlikleri, gen organizasyonu ve protein yapı ve fonksiyonları esas alınmak sureti ile laktisin 481 ailesi üyesi 13 adet lantibiyotik tanımlanmıştır. Bunlar; bütiro vibrosin (*Butyrovibrio fibroselvens*), laktisin 481 (*L. lactis*), makedosin (*Streptococcus macedonicus*), mutasin II (*S. mutans*), nukasin ISK-1 (*Staphylococcus worneri*), ruminokoksin A (*Ruminococcus gravus*), salvarisin A1 (*S. salivarius*), salivarisin A2, A3, A4 ve A5 (*S. salivarius*), salivarisin B (*S. mitis*), streptokoksin A-FF22 (*S. pyogenes*) ve variasin (*Micrococcus varians*)'dir. Laktisin 481 üyesi lantibiyotiklerin farklı bakteri türlerindeki bu geniş dağılımının, yatay gen transferi yolu ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Piard *et al.* 1992, Dabard *et al.* 2001, Tagg 2004).

L. lactis subsp. *lactis*'in değişik türleri tarafından üretilen laktisin 481; 6 gen içeren ve suştan suşa moleküler büyüklük bakımından farklılık gösteren plazmidler üzerinde, genellikle Tn5721 transpozonu ters tekrar serileri arasında yer alan bir operonda kodlanmaktadır. Operonda ilk gen olan *LctA* geni 51 amino asit içeren prepeptidi kodlamaktadır. *LctM* geni enzimatik modifikasyonlardan sorumlu enzim sistemlerinin, *LctFEG* genleri direnç proteinlerinin ve *LctT* geni ise ABC ailesi üyesi transport proteinlerinin üretiminden sorumlu bulunmuştur (Xie *et al.* 2004).

Laktisin 481, diğer lantibiyotiklerde olduğu gibi, hücre membranı üzerinde por oluşumuna yol açarak; pH dengesini, proton motivasyon gücünü ve sonuçta membran bütünlüğünü bozmak suretiyle antimikrobiyel aktivitesini göstermektedir. Bu süreçte lipit II'ye bağlandığı için, hücre duvarı biyosentezini engellediği de saptanmıştır (Twomey *et al.* 2002, Chatterjee *et al.* 2005). Laktisin 481, yakın akraba çok sayıda laktik asit bakterisi yanında; *Clostridium*, *Listeria* ve *Staphylococcus* gibi önemli gıda kökenli hastalık ve bozulma etmeni bakterilerin de gelişimini engelleme özelliği içermektedir (Chatterjee *et al.* 2005). 100 °C'de 15–30 dakika ısı muameleye direnç gösteren bu bakteriyosinin pH 4–10

aralığında antimikrobiyel etkinliğini sürdürdüğü saptanmıştır (şekil 2.1) (Dufour *et al.* 2007).

Yüksek düzeyde antimikrobiyel aktivitesi yanında, fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı gösterdiği stabilite, laktisin 481'in gıda koruma ajanı olarak kullanımını öne çıkarmaktadır. Saflaştırılmış ya da yarı saflaştırılmış laktisinin doğrudan gıdalara ilavesi yanında, fermente edilmiş gıdalara laktisin 481 üreticilerinin starter kültür olarak kullanımı üzerinde pilot çalışmalar tamamlanmış ve kısmi endüstriyel uygulamalar başlatılmıştır. Laktisin 481 operonunun konjugatif plazmidler üzerinde bulunması, doğal aktarım süreçleri kullanılarak starter kültür suşlarının geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu özelliğinden yararlanmak suretiyle gıda düzeyli rekombinantlar üretilmiş ve endüstriyel kullanıma sunulmuştur (Garde *et al.* 2006, Willey and van der Donk 2007).

2.3.5. Sitrat fermentasyonu

Sitrata fermente edebilen laktik asit bakterileri, birçok fermente süt ürününün üretiminde kritik rol oynamaktadır. Bu bakteriler içerisinde yer alan tek *L. lactis* üyesi, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'dir. Sitrat fermentasyonu sonucu üretilen diasetil, tereyağı ve yağlı süt gibi ürünlerin tipik aroma bileşimidir. Ayrıca sitrat fermentasyonu sonucu oluşturulan CO₂, bazı peynir türlerinde arzu edilen göz oluşumu için tercih edilmektedir (An *et al.* 2006).

Sitrat fermentasyon özelliğinin genetik determinantları üzerinde yürütülen araştırmalarda; çalışılan tüm *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşlarında söz konusu özelliğin ~8 kb büyüklükte bir plazmid tarafından kodlandığı saptanmıştır. Bu plazmidin DNA dizi analizi tamamlanmış ve sitrat kullanımının genetik regülasyonunun doğası belirlenmiştir. Bu moleküler çalışmalar sayesinde starter kültür suşlarında sitrat fermentasyon yeteneğinin stabilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Chang and Yan 2007).

2.3.6. Antibiyotiklere ve metal iyonlarına dirençlilik

Laktokoklarda antibiyotik dirençlilik yaygın rastlanan bir özellik değildir. Ancak, özellikle mastitis tedavisinde kullanılan β -laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençlilik gelişimi, dikkate değer bir artış göstermektedir. İlk kez Perreten *et al.* (1997), çiğ süttten üretilen yumuşak peynirlerden, kromozomal DNA kökenli çoklu antibiyotik dirençlilik özelliğine sahip *L. lactis* subsp. *lactis* K214 suşunu izole etmiştir. Teuber *et al.* (1999) tarafından yürütülen çalışmada ise, bazı *L. lactis* suşlarında kloramfenikol, streptomisin ve

tetrasikline karşı çoklu ilaç dirençlilik yeteneği tanımlanmıştır. Plazmid kodlu olan çoklu ilaç dirençlilik genleri üzerinde yürütülen moleküler analizler sonucu, laktokokların söz konusu genleri yakın akraba türlerden konjugatif gen transferi yolu ile kazandığı saptanmıştır (Gajic *et al.* 2003, Teuber *et al.* 2003). Antibiyotik dirençlilik özelliğinin endüstriyel önemi halen tartışılmaktadır. Ancak laktokoklar incebağırsak florasının kalıcı bakterileri olmadığı için sağlık sorunları ile ilişkileri yoktur. Dolayısı ile, özellikle starter kültür suşu geliştirme programlarında antibiyotik dirençlilik markerları, rekombinantların seçimi aşamasında güvenle kullanılabilir (Teuber *et al.* 2003). Laktokok suşlarında organik tuzlar, kadmiyum, bakır, kobalt ve magnezyum dirençlilik genleri detaylı bir şekilde çalışılmış ve kromozomal ya da plazmid DNA kökenli determinantları belirlenmiştir. Özellikle besinsel içerik açısından limitli koşullarda bu direnç özelliklerinin seçici avantaj oluşturması, starter kültür suşları açısından önem taşımaktadır (O' Sullivan *et al.* 2001, Gajic *et al.* 2003, Poole 2005).

2.3.7. Ekzopolisakkarit üretimi

Gıdalarda ekzopolisakkaritler; emülsiyon stabilizasyonu, yüzey tansiyon özelliklerinin geliştirilmesi ve gıdanın su molekülleri ile etkileşiminin düzenlemesi açısından önem taşımaktadır (Sinskey *et al.* 1986). Ekzopolisakkarit üreten *L. lactis* suşları; kolesterol düşürme aktiviteleri ve immünomodülatör yeteneklerinden dolayı prebiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Bu özellikleri, söz konusu suşların fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanım olanaklarının tanımlanması çalışmalarına hız kazandırmıştır. Endüstriyel starter kültür üretiminde kullanılan *L. lactis* suşlarında ekzopolisakkarit üretiminin plazmid kodlu oluşu, bu özelliğin genetik düzenlemeler ile arzu edilen yönde geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (de Vuyst *et al.* 2001).

2.4. Gıda Düzeyli Konakçı-Vektör Sistemleri ve Starter Kültür Suşlarının Geliştirilmesinde Kullanılan Modern Yaklaşımlar

Gıda düzeyli vektör sistemleri, antibiyotik marker içermeyen, doğal aktarım sistemleri ile *L. lactis* suşları arasında geçiş yapabilen plazmidler olarak tanımlanmaktadır. Bu vektörler sayesinde, herhangi bir beklenmedik genetik rekombinasyona yol açmadan ve tüketici sağlığını etkileyecek risk oluşturmadan starter kültür suşlarının geliştirilmesi mümkün olmaktadır (Bron *et al.* 2002). Söz konusu vektör sistemlerinde metabolik seçim kriterleri

olarak; *LacF* geni bozulmuş laktoz operonu, laktisin 481 operonu, timidin sintaz, α -galaktozidaz ve alanin rasemaz genleri kullanılmaktadır. Bu gıda-düzeyleli vektörler aynı zamanda konjugatif plazmidlerin orijin bölgesi ve transfer genleri ile kombine edilmiştir (Cotter *et al.* 2003).

Gıda düzeyli vektör sistemleri kullanılarak yürütölen genetik mühendisliğı uygulamalarının temel hedefi, starter kültür aktivitelerinin geliştirilmesi ve stabilizasyonu yolu ile yüksek ürün verimi ve kalitesinin sağlanmasıdır. Bu yönde yürütölen çalışmalar sonucunda; bakteriyosin üretimi, ekzopolisakkarit sentezi, laktoz katabolizması, kazein hidrolizi ve faj dirençliliğı geliştirilmiş suşlar üretilmiş ve endüstriyel süreçlerde kullanıma başlanmıştır (Bron *et al.* 2002, Mills *et al.* 2006, Walling *et al.* 2005). Diğer yandan, faj lisin genlerinin klonlandığı starter kültür suşlarında bu genler biyolojik saat olarak kullanılmak suretiyle, peynir olgunlaşması hızlandırılmaktadır. Starter kültürlerle klonlanan faj lisin genleri, transkripsiyonel regölasyon stratejisi ile çalışan bir promotordan istenilen zamanda aktive edilmekte ve hücre parçalanması sonucu proteazların peynir yapısına kütlesele geçişi sağlanabilmektedir (Mills *et al.* 2006).

L. lactis suşlarının gerek klasik mutasyonel yöntemler ya da doğal genetik aktarım sistemleri kullanılarak ve gerekse genetik mühendisliğı uygulamaları yolu ile modifiye edilmesi, bu suşların endüstriyel açıdan önem taşıyan özelliklerinin detaylı genetik analizi ve plazmid biyolojisinin anlaşılması ile mümkün olmaktadır. Halen endüstriyel starter kültür suşu geliştirme programlarında ana basamak, istenilen özellikler bakımından yüksek etkinlik ve stabilite gösteren suşların doğal ekosistemlerinden izole edilerek tanımlanmasıdır. Bu tanımlama süreçlerinde en kritik nokta, üzerinde durulan özelliklerin yapısal ve regölasyonel düzeyde anlaşılmasına olanak sağlayacak moleküler analiz çalışmalarıdır (Mills *et al.* 2006, Dufour *et al.* 2007).

2.5. Konjugasyon

Horizontal (yatay) gen transferi, mikrobiyel evrimin en önemli unsurlarından biri olarak kabul edilmektedir. Yatay gen transferinin doğal mekanizmaları; konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyondur (Desiere *et al.* 2001). Transformasyon faktörlerinin *Lactococcus* cinsi üyelerinde bulunmayışı ve transdüksiyon süreçlerinde konakçı hücrelerin arzu edilmeyen yönde faj etkisine maruz kalması, konjugasyonu genetik

düzenleme çalışmalarında vazgeçilmez bir unsur haline getirmiştir. Günümüzde, endüstriyel süreçlerde kullanılacak starter kültür suşlarında, genetik düzenlemeler için izin verilen yegane gen aktarımı yöntemi konjugasyondur (Stentz *et al.* 2004).

Konjugasyon; bakteriyel genlerin, verici ve alıcı hücrelerin fiziksel yüzey teması yolu ile oluşan konjugasyon köprülerinden tek yönlü aktarımı olarak tanımlanmaktadır. Laktokoklarda konjugasyon yolu ile aktarılabilen genetik determinantlar arasında; bakteriyosin üretimi, ekzopolisakkarit sentezi, değişik faj dirençlilik sistemleri, laktoz metabolizması, proteolitik aktivite ve sitrat fermentasyonu gibi endüstriyel açıdan büyük önem taşıyan metabolik faaliyetlerin genleri de bulunmaktadır. Bu özelliklerin, doğal ekosistemlerde populasyon içerisinde ve türler arasında yatay transferi, laktokokların evrimi açısından büyük önem taşımaktadır. Diğer yandan konjugasyon sistemleri kullanılarak, laboratuvar koşullarında teknik ve endüstriyel özellikler bakımından ideal starter bakterileri geliştirilebilmektedir (Desiere *et al.* 2001, Stentz *et al.* 2004).

L. lactis suşlarında yüksek sıklıkta konjugasyon yeteneği; plazmid kodlu küçük yüzey peptitlerine bağlıdır. Seks feromon proteinleri olarak adlandırılan bu yüzey proteinleri, verici-alıcı hücre karışımlarında agregasyona yol açmak sureti ile transfer sıklığını etkilemektedir. CluA olarak adlandırılan konjugasyona yardımcı yüzey proteinleri, verici suşlarda daha yüksek oranda sentezlenmekle birlikte, konjugasyonun gerçekleşebilmesi için alıcı suşlarda da bulunması gerekmektedir. Bu nedenle ideal konjugal verici-alıcı suş karışımları, CluA sentezi yapabilen *L. lactis* suşlarından oluşturulmaktadır. Bu karışımlarda konjugasyon sıklığı 10^{-3} gibi yüksek oranlarda gerçekleşebilmektedir (Waters and Dunny 2001, Belhocine *et al.* 2005). *L. lactis* suşlarında konjugal transfer yeteneği, plazmid ya da transpozon kökenli genlerin kontrolü altındadır. Konjugatif transpozonlar, özellikle bakteriyosin üretimini yöneten genler ile ilişkili bulunmuştur (Belhocine *et al.* 2005).

L. lactis suşlarında tanımlanan endüstriyel öneme sahip özelliklerin konjugatif yeteneğinin araştırılması, genetik analiz ve düzenleme çalışmalarında model sistemlerinin oluşturulmasının temel hareket noktasını teşkil etmektedir. Yüksek sıklıkta konjugasyon yeteneğine sahip verici-alıcı suş sistemlerinin varlığı, arzu edilen yönde düzenlenmiş rekombinantların oluşturulmasını mümkün kılmaktadır. Bu yöntem kullanılarak geliştirilmiş ve bünyesinde değişik endüstriyel özellikleri bulduran rekombinant *L. lactis*

suşları, starter kültür bileşeni olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Belhocine *et al.* 2007).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar ve bakteriyofajlar (fajlar)

Bu çalışmada kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşu, Φplc 61–50, Φplc 61–52 ve Φpll 98–22 fajları ile bu fajların homolog konakçıları (*L. lactis* subsp. *lactis* 98 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* 61) Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Bakteriyosin denemelerinde kullanılan indikatör suşlar (*L. lactis* subsp. *lactis* SIK83, *L. lactis* subsp. *lactis* JC17, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG2912, *L. lactis* subsp. *cremoris* 1198, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* NCDO176, *Lactobacillus plantarum* LMG2003, *Leuconostoc carnosum* DSM5576, *Pediococcus pentasaceus* LMG2001, *Listeria innocua* LMG2813, *Listeria monocytogenes* ATCC15313, *Enterococcus faecalis* LMG2602, *Salmonella enterica* Typhimurium SL1344, *Escherichia coli* CFA1, *Pseudomonas fluorescens* P1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Bacillus subtilis* 12, *Bacillus licheniformis* 40, *Micrococcus luteus* NCIMB8166, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Staphylococcus carnosus* MCIB, *Clostridium tyobutyricum*) Prof. Dr. Ingolf NES'den (Agricultural University of Norway, As/Norway) alınmıştır.

3.1.2. Bakterilerin üretiminde kullanılan besiyerleri

Doğal tip laktokok suşları M17 broth ve agar ortamlarında, laktoz fermentasyonu yeteneğini kaybetmiş *L. lactis* mutantları ise, laktoz yerine 5 g/L olacak şekilde glukoz ilave edilmiş GM17 broth ortamlarında geliştirilmiştir. İndikatör bakterilerin diğer üyeleri olan *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Lactobacillus* cinslerine ait suşlar MRS broth ortamlarında, *Listeria*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* ve *Clostridium* türleri ise LB broth ortamlarında üretilmiştir.

MRS Broth

Kazein pepton	10 g
Et ekstraktı	10 g
Maya ekstraktı	5 g
D-glukoz	20 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	5 g
Diamonyum sitrat	2 g
Sodyum asetat	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.2 g
Tween 80	1 g
Destile su	1000 mL

pH 5.7 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam 118 °C’de 15 dakika sıcaklık uygulanarak sterilize edildi.

M17 Broth

Polipepton	5 g
Fitopepton	5 g
Maya ekstraktı	2.5 g
Et ekstraktı	5 g
B-disodyum gliserofosfat	19 g
Laktoz (%10)	50 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 mL
Askorbik asit	0.5 g
Destile su	950 mL

pH 7.15 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam içerikleri 950 mL destile su içerisinde çözülmüş ve 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Ortam su banyosunda soğutulduktan sonra (45 °C), ayrı sterilize edilen laktoz çözeltisi (50 mL) ilave edilmiştir (Terzaghi and Sandine 1975).

Luria Bertani Broth

Tripton	10 g
Maya ekstraktı	5 g
NaCl	10 g
Destile su	1000 mL
pH 7.0 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)	

Ortam içerikleri 1000 mL destile su içerisinde çözülmüş ve sterilizasyon, 121 °C'de 15 dakika süre ile yapılmıştır (Holt *et al.* 1994).

3.2. Yöntem

3.2.1. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunun biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşunun biyokimyasal metodlarla tanımlanmasında VITEK 2 sisteminden (bioMerieux, USA) yararlanılmıştır. Sistemde bulunan GP kartı ile karbon kaynaklarının kullanımı, enzimatik aktivite ve antibiyotik dirençliliği ölçen 43 biyokimyasal test sonucunda tür tanımlaması yapılmaktadır. Kuyu içerikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. GP Kuyu İçerikleri (bioMerieux, USA)

Kuyu	Test	Sembol	Miktar/Kuyu
2	D-Amigdalın	AMY	0.1875 mg
4	Fosfatidilinozitol Fosfolipaz C	PIPLC	0.015 mg
5	D-Ksiloz	dXYL	0.3 mg
8	Arjinin dihidrolaz 1	ADH1	0.111 mg
9	Beta-Galaktozidaz	BGAL	0.036 mg
11	Alfa-Glukozidaz	AGLU	0.036 mg
13	Ala-Phe-Pro Arilamidaz	APPA	0.0384 mg
14	Siklodekstrin	CDEX	0.3 mg
15	L-Aspartate Arilamidaz	AspA	0.024 mg
16	Beta Galaktopiranozidaz	BGAR	0.00204 mg
17	Alfa-Mannozidaz	AMAN	0.036 mg
19	Fosfataz	PHOS	0.0504 mg
20	Lösın Arilamidaz	LeuA	0.0204 mg
23	L-Proline Arilamidaz	ProA	0.0204 mg
24	Beta-Glukoronidaz	BGURr	0.0018 mg
25	Alfa-Galaktozidaz	AGAL	0.034 mg
26	L-Pirolidonil-Arilamidaz	AlaA	0.0216 mg
27	Beta-Glukoronidaz	BGUR	0.0378 mg
28	Alanin Arilamidaz	AlaA	0.0216 mg
29	Tirozin Arilamidaz	TyrA	0.0276 mg
30	D-Sorbitol	dSOR	0.1875 mg
31	Üreaz	URE	0.15 mg
32	Polimiksin B dirençlilik	POLYB	0.00093 mg
37	D-Galaktoz	dGAL	0.3 mg
38	D-Riboz	dRIB	0.3 mg
39	L-Laktat alkalizasyonu	ILATk	0.15 mg

Çizelge 3.1. GP Kuyu İçerikleri (bioMerieux, USA) (devam)

Kuyu	Test	Sembol	Miktar/Kuyu
42	Laktoz	LAC	0.96 mg
44	N-Acetyl-D-Glukozamin	NAG	0.3 mg
45	D-Maltoz	dMAL	0.3 mg
46	Basitrasin dirençlilik	BACI	0.0006 mg
47	Novobiosin dirençlilik	NOVO	0.000075 mg
50	% 6.5 NaCl'de gelişme	NC6.5	1.68 mg
52	D-Mannitol	dMAN	0.1875 mg
53	D-Mannoz	DMNE	0.3 mg
54	Metil-B-D-Glukopironidaz	MBdG	0.3 mg
56	Pullulan	PUL	0.3 mg
57	D-Rafinoz	dRAF	0.3 mg
58	O/129 dirençlilik (comp.vibrio)	O129R	0.0084 mg
59	Salisin	SAL	0.3 mg
60	Sakkaroz	SAC	0.3 mg
62	D-Trehaloz	dTRE	0.3 mg
63	Arjinin Dihidrolaz 2	ADH2s	0.27 mg
64	Optokin dirençlilik	OPTO	0.000388 mg

3.2.2. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunun genetik tanısı

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşunun genetik tanısında, genel bakteriyel primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılan 16S rDNA bölgesinin homolojisinden yararlanılmıştır. Çalışmalarda ileri primer olarak 5'-AGAGTTTGATCCCTGGCTCAG-3' ve geri primer olarak ise 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' kullanılmıştır (Beasley and Saris 2004). PZR reaksiyon parametreleri 94 °C'de 1 dk, 54 °C'de 15 sn, 72 °C'de 1 dk ve 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonun sonuna, son zincir uzama aşaması için 72 °C'de 10 dakikalık bir süre eklenmiştir (Blaiotta *et al.* 2002). Qiagen saflaştırma kiti (Cat. No. 28104) kullanılarak agaroz jelden saflaştırılan PZR ürünlerinin DNA dizi analizi REFGEN (ODTÜ Teknokent, Ankara) firması tarafından yapılmıştır.

3.2.3. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunun plazmidlerinin giderilmesi ve plazmidleri giderilmiş mutantların seçimi

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşunda plazmid giderme ajanı olarak akriflavin kullanılmıştır. Her bir suşun gelişebildiği en yüksek akriflavin oranı deneysel olarak belirlendikten sonra, suşlar bu akriflavin oranında beş pasaj geliştirilmiştir. Bu süre sonunda gelişen kültürlerden hazırlanan seri dilüsyonlardan, laktoz indikatör agar ortamlarına ekimler yapılmış ve 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda oluşturdukları laktik asit sayesinde indikatör boya rengini sarıya çeviren koloniler, laktoz fermentasyon yeteneğini sürdüren (Lac⁺) koloniler olarak değerlendirilmiştir. Yeterli asit oluşturamadığı için indikatör boya renginin dönüşümüne neden olamayan beyaz koloniler ise, laktoz fermentasyon yeteneğini kaybetmiş mutantlar olarak seçilmiş ve % 5 oranında glukoz ilave edilmiş M17 broth ortamına alınmıştır (McKay *et al.* 1972, Gasson and Davies 1980, Wolfe and McKay 1983). Seçilen mutantların plazmid içeriklerindeki değişimler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

Laktoz İndikatör Agar

Tripton	20 g
Jelatin	2.5 g
Laktoz (%1)	100 mL
NaCl	4 g
Sodyum asetat	1.5 g
Askorbik asit	0.5 g
Brom krezol purpur (% 0.004)	10 mL
Agar	15 g
Destile su	880 g

pH 6.8 ± 0.02 (Sterilizasyondan önce)

Ortam içerikleri 880 mL su içerisinde çözülmüştür. 121 °C’de 15 dakika sterilizasyon işleminden sonra, ayrı sterilize edilen laktoz ve brom krezol purpur ana besiyerine ilave edilmiştir. Besiyeri 45 °C’ye kadar soğuduktan sonra, 15 mL’lik hacimler halinde petri kutularına dökülmüştür.

3.2.4. Plazmid içeriklerinin belirlenmesi

3.2.4.1. Plazmid izolasyonu

Elliker broth besiyerinde 30 °C’de 18 saat geliştirilen *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 kültürlerinden, 10 mL’lik Elliker broth ortamlarına birer mL’lik inokülasyonlar yapılarak, tüpler 30 °C’de 3–3.5 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre bitiminde santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri, 6000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre çökeltilisi kurutulduktan sonra, 379 µL sakkaroz tamponunda çözülmüş ve steril mikrofüj tüplerine aktarılmıştır. 37 °C’ye kadar ısıtılan bu ortama, 96.5 µL lizozim çözeltisi ilave edilerek 37 °C su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. 48.2 µL Tris-EDTA-1 uygulamasından sonra, mikrofüj tüplerine % 20 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 27.6 µL aktararak karıştırılmıştır. Bu aşamada ortamda viskozitenin artışı, lizinin başladığını göstermektedir. Lizinin tamamlanması için, mikrofüj tüpleri 37 °C su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler mekanik karıştırıcıda ve yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA’nın kırılması sağlanmıştır.

Ortama, yeni hazırlanmış 3 N NaOH çözeltisinden 27.6 µL ilave edilmiş ve tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dakika süre ile yavaş bir şekilde çevrilerek kromozomal DNA'nın alkali denatürasyon koşulları oluşturulmuştur. Ortam pH'sının uygulama sırasında 12.1 – 12.3 arasında olup olmadığı kontrol edilmiştir. Denatürasyon aşamasının sonunda mikrofüj tüplerine 49.6 µL 2 M Tris-HCl çözeltisi aktarılarak, 3 dakika süre ile yine düz bir zeminde karıştırılmıştır. Ortam pH'sının 8.5–9.0 arasına düşüşü ile nötralizasyonun sağlandığı belirlenmiştir. Mikrofüj tüplerine, +4 °C'de tutulan 5 M NaCl çözeltisinden 71.1 µL ve % 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 µL ilave edilerek +4 °C'de 15000 devirde 20 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüplerde oluşan üst faz, mikropipet ile yeni mikrofüj tüplerine aktarılmış ve deproteinasyonun sağlanması için kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisinden 700 µL ilave edilmiştir. Tüpler +4 °C'de 15000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek üst faz alınmış ve eşdeğer hacimde izopropanol uygulanmıştır. Ekstraktlar - 20 °C'de 1 gece bekletilmiş ve plazmid DNA, 15000 devirde 20 dakika santrifüj edilmek suretiyle çöktürülmüştür. Son aşamada sıvı faz akıtılarak DNA çökeltisi kurutulmuştur. Çökeltiler, 20 µL Tris-EDTA-2 içerisinde çözülmüş ve elektroforez uygulamasından önce RNaz A stok çözeltisinden 2 µL ilave edilerek 37 °C'de 45 dakika inkübe edilmiştir (Anderson and McKay 1983).

Elliker Broth

Tripton	20	g
Maya ekstraktı	5	g
Jelatin	2.5	g
Dekstroz	5	g
Laktoz	5	g
Sakkaroz	5	g
Sodyum klorür	4	g
Sodyum asetat	1.5	g
Askorbik asit	0.5	g
Destile su	1000	mL
pH 6.8 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)		

Öncelikle jelatin, 250 mL su içerisinde, kaynar su banyosunda eritilmiş ve soğuduktan sonra besiyeri ortamına ilave edilmiştir. Besiyeri 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Sakkaroz Çözeltisi

Tris	0.655 g
EDTA	0.0372 g
Sakkaroz	6.7 g
Destile su	100 mL
pH 8.0 ± 0.02	

Lizozim Çözeltisi

Tris	0.3 g
Lizozim	0.1 g
Destile su	10 mL
pH 8.0 ± 0.02	

Tris-EDTA-1

Tris	0.6 g
EDTA	9.31 g
Destile su	100 mL
pH 8.0 ± 0.02	

Tris-HCl

Tris-HCl	31.52 g
Destile su	100 mL
pH 7.0 ± 0.02	

SDS Cözeltisi

Tris	0.6 g
EDTA	0.74 g
SDS	20 g
Destile su	100 mL
pH 8.0 ± 0.02	

Tris EDTA-2

Tris	0.121 g
EDTA	0.037 g
Destile su	100 mL
pH 7.5 ± 0.02	

%3 NaCl ile Doyurulmuş Fenol Cözeltisinin Hazırlanışı: 100 g fenol üzerine 20 mL destile su ve 3 g NaCl aktarılarak 45 °C'deki su banyosunda çözülmüştür. Ortama 0.1 g hidroksiguinolin ilave edilmiş ve karıştırılarak oda sıcaklığında tutulmuştur.

RNaz A Cözeltisinin Hazırlanışı: 5 mL steril destile su içinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat cözeltisinin pH'sı, asetik asit ile 5'e ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A ilave edilmiştir. Kaynar su içerisinde 5 dakika tutulduktan sonra, ortam -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.4.2. Elektroforez

DNA örneklerinin elektroforezi, % 0.7 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Meyers *et al.* 1976). Yatay jel sistemleri için agaroz, 100 mL tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde ve kaynar su banyosunda çözülmüştür. 45 °C'ye kadar soğutulan ortam elektroforez plakalarına 30–50 mL olacak şekilde aktarılmış ve jel tarakları yerleştirilerek 60 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tampon cözelti, jeli kapatacak şekilde elektroforez tanklarına dökülmüş ve jellerin zedelenmemesine dikkat edilerek, taraklar çıkartılmıştır. 37 °C'de 45 dakika inkübe edilen DNA örnekleri su banyosundan alınarak, 2 µL marker boya cözeltisi ile karıştırılmış ve mikropipet aracılığı ile jel kuyucuklarına aktarılmıştır. Elektroforez, 80 voltta 2–2.5 saat süreyle yapılmıştır. Marker boyanın jel sistemleri terk

etmesinden sonra, elektrik akımı kesilmiş ve ortamdan alınan jeller, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren çözeltisinde 1 saat boya işlemine tabi tutulmuştur. Boyama işlemi bitiminde jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışıkta incelenmiş ve Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, USA) kullanılarak fotoğrafları alınmıştır (Macrina *et al.* 1982).

TRIS-Asetat Tampon

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

Marker Boya

Bromfenol blue	0.25	g
Sakkaroz	40	g
Destile su	100	mL

3.2.4.3. Plazmid büyüklüklerinin saptanması

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

$$\text{Eğrinin Eğimi (I)} = \frac{E - (G.C)}{B - (G.A)}$$

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

$$\text{Moleküler Büyüklük (W)} = \text{Antilog}_{10} [I. (\alpha - G) + H]$$

X = marker DNA moleküllerinin agaroz jel üzerindeki göç aralığı (mm)

Y = Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

$$A = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n$$

$$B = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + \dots + X_n^2$$

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

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

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

$$G = \text{Ortalama X} = \frac{A}{N}$$

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

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

3.2.5. Bakteriyosin üretimi

3.2.5.1. Bakteriyosin etkinliğinin tanısı

Bakteriyosin üretim özelliğinin tanısında, van Belkum *et al.* (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Test edilecek laktokok suşları M17 broth ortamında 30 °C'de 24 saat geliştirildikten sonra, GM17 agar ortamlarına aktarılmış ve 30 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda gelişen kolonilerden steril kürdan aracılığıyla GM17 agar ortamına, bir petride beş farklı laktokok suşu olacak şekilde nokta ekim yapılmış ve 30 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9'un antibakteriyel aktivitesi, Bölüm 3.1.1.'de belirtilen indikatör suşlar kullanılarak tespit edilmiştir. MRS broth ortamında 37 °C'de 18 saat geliştirilen indikatör bakteri,

% 0.7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak MRS agar ortamına inoküle edilerek, nokta ekim yapılan GM17 agar ortamı üzerine ikinci tabaka halinde dökülmüş ve homojen bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra petriyer indikatör bakterilerin gelişimi için uygun sıcaklık olan 37 °C’de 18–24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 mutantlarının indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiştir (van Belkum *et al.* 1989).

3.2.5.2. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması

Bakteriyosin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suş kültüründen, 100 mL M17 broth ortamlarına 1 mL ekim yapılmış ve 30 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, gelişen kültürler 5000 devirde 20 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek yeni tüplere aktarılan kültür üst sıvılarının pH’ sı 10 N NaOH kullanılarak 6.5’e ayarlanmıştır. Kültür üst sıvılarına, son konsantrasyon oranı % 40 olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilmiş ve eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Amonyum sülfat ilave edilen nötralize edilmiş kültür üst sıvıları santrifüj tüplerine aktarılmış ve +4 °C’de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra örnekler +4 °C’de 15000 devirde 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitiminde üst faz dökülmüş ve çökelti kurutulmuştur. Kurutulmuş çökelti 1 mL sodyum fosfat tampon içerisinde çözülmüş (pH 6.5) ve üzerine 15 mL metanol/kloroform (1:2 v/v) çözeltisi ilave edilerek +4 °C’de 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler +4 °C’de 15000 devirde 30 dakika santrifüj edilmiş, üst faz dökülmüş ve çökelti kurutulmuştur. Son aşamada, kurutulmuş çökelti 100 µL steril saf suda çözülmüş ve -20 °C’de saklanmıştır (Moreno *et al.* 2003)

3.2.5.3. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi

30 °C’de 18 saat geliştirilen *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 kültürleri 6000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiş ve kültür üst sıvılarının pH’ ları, 6 N NaOH kullanılarak 2.0–11.0 değerleri arasında ayarlanmıştır. pH’ ları ayarlanan kültür üst sıvıları, 0.45 µm por çaplı membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilerek sterilize edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ortamlar +4 °C’de 24 saat bekletilmiştir. pH değişimlerinin bakteriyosinlerin inhibisyon düzeyleri üzerindeki etkisi; membran filtrelerden geçirildikten sonra hiçbir işleme tabi tutulmayan kültür üst sıvılarının inhibisyon etkilerinin, pH düzeyleri ayarlanan

kültür üst sıvılarının inhibisyon etkileri ile karşılaştırılması sonucu tanımlanmıştır. pH ayarlaması yapılan kültür üst sıvılarında, bakteriyosin aktivitesinin pH değişimlerinden etkilendiği, bu ortamlara proteinaz K uygulaması sonrası antibakteriyel aktivitenin tamamen kaybı belirlenerek kesinlik kazanmıştır. Farklı pH düzeylerinde bakteriyosin aktivitelerindeki değişimler, duyarlı indikatör bakteriye karşı kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Bakteriyosin aktiviteleri; inhibisyon zonu alınan en yüksek dilüsyon oranının, 1000/aktarılan miktar ile çarpımından elde edilen arbitrary ünite (AU) cinsinden hesaplanmıştır (kritik dilüsyon yöntemi).

Nötralize edilmiş kültür üst sıvılarında bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi; söz konusu ortamların 100 °C'de 5, 10, 15, 20 dakika ve 121 °C'de 15 dakika süre ile sıcaklığa tabi tutulmasından sonra, bu ortamlardan alınan örneklerin duyarlı indikatör bakteriye denenmesi sureti ile saptanmıştır. Kontrol olarak sıcaklık uygulanmamış kültür üst sıvıları kullanılmıştır. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerinde yarattığı etki, kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Bakteriyosin aktivitesi üzerine değişik enzimlerin etkisi; pH ve sıcaklığın etkisinin saptandığı testlerde olduğu gibi, kültür üst sıvıları kullanılarak tanımlanmıştır. Nötralize edilmiş kültür üst sıvılarına, son enzim konsantrasyonu 1mg/mL olacak şekilde tripsin (pH 7.0 Merck, Germany), α -kemotripsin (pH 7.0 Sigma, Chem. Co., USA), α -amilaz (pH 7.0 Sigma, Chem. Co., USA), lipaz (pH 7.0 Sigma, Chem. Co., USA), katalaz (pH 7.0 Sigma, Chem. Co., USA) ve lizozim (pH 7.0 Sigma, Chem. Co., USA) enzimleri ilave edilmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktiviteleri, 100 °C'de 5 dakika ısı uygulaması ile sonlandırılmıştır. Denemelerde kontrol olarak, enzim muamele edilmiş kültür üst sıvıları kullanılmıştır. Bakteriyosin aktiviteleri, kritik dilüsyon yöntemi esas alınarak saptanmıştır. Tüm denemelerde indikatör suş olarak *Micrococcus luteus* NCIMB8166 kullanılmıştır (Franz *et al.* 1997).

3.2.5.4. Bakteriyosin yapısal genlerinin PZR amplifikasyonu ile tanımlanması

Laktisin 481 üretiminden sorumlu yapısal genlerin tanımlanması için Çizelge 3.2 'de verilen primerler kullanılmak suretiyle PZR amplifikasyonu yapılmıştır. Reaksiyon parametreleri 94 °C'de 45 sn, 56 °C'de 45 sn ve 72 °C'de 1 dk olmak üzere 30 döngü olarak belirlenmiştir. Bu reaksiyonun sonuna, son zincir uzaması için 72 °C'de

10 dakikalık bir süre eklenmiştir. Çoğaltılan fragmentlerin büyüklükleri, % 1 agaroz jel sistemlerinde ve 1 kb marker (Fermentas, Finland) kullanılarak saptanmıştır. Elektroforez işlemi 100 voltta 1.5 saat süre ile yapılmış ve 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren tampon çözeltide 30 dk boyama işlemine tabi tutulmuştur. Boyama işlemi bittiğinde, jeller 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışııkta incelenmiş ve Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, USA) kullanılarak fotoğrafları alınmıştır (Rodriguez *et al.* 2000). Qiagen saflaştırma kiti (Cat. No. 20021) prosedürü ile agaroz jelden geri kazanılan PZR ürünlerinin DNA dizi analizi REFGEN (ODTÜ Teknokent, Ankara) firması tarafından yapılmıştır.

Çizelge 3.2 Laktisin 481 kodlu plazmidin tanımlanmasında kullanılan oligonükleotit primerlerinin sekansı

Primer	Spesifite	5' - 3' Sekansı	PZR Ürün Büyüküğü (*bp)
1 (ileri primer)	Laktisin 481	TGATTTCTGAAGGTAAG	585
2 (geri primer)	Laktisin 481	AAAGCTTTACCTGTACT	

* bp: baz çifti

3.2.6. Faj biyodenemeleri

3.2.6.1. Faj titresinin yükseltilmesi

Faj duyarlılık testlerinde, titreleri 10^7 plak oluşturma birimi (pfu/mL) ve daha yukarısına yükseltile faj süspansiyonları kullanılmıştır. Faj titresinin yükseltilmesi için ilk aşamada; 0.1 mL faj süspansiyonu, 0.1 mL homolog konakçı suş kültürü ve 0.1 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1M) çözeltisi steril bir tüp içerisinde karıştırılmış ve 30°C 'de 15 dakika tutularak adsorbsiyonun tamamlanması beklenmiştir. Adsorbsiyonun gerçekleştiği faj-bakteri karışımları, 10 mL steril GM17 broth ortamlarına aktarılmış ve 30°C 'de 18 saat inkübe edilmiştir. Bu süre bitiminde ortamlar 6000 devir/dk hızda 15 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve tüplerde oluşan üst sıvılar, steril $0.45\ \mu\text{m}$ por çapında membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilmek suretiyle faj süspansiyonları elde edilmiştir. Söz konusu faj süspansiyonları homolog konakçı suşlara toplam 3 pasaj denendikten sonra, faj titreleri saptanmıştır.

Faj titresinin belirlenmesinde çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır (Terzaghi and Sandine 1975). İçinde 9 mL fizyolojik tuzlu su bulunan tüplere, aseptik koşullar altında steril pipet yardımıyla faj süspansiyonundan 1 mL aktararak, 10^{-6} düzeyine kadar seyrelti dizisinin hazırlanması sağlanmıştır. 3 saatlik GM17 broth kültürlerinden GM17 yumuşak agar içine 0.1 mL ilave edilip köpürmeyecek bir şekilde karıştırılmış ve petri plağına, homojen yayılmasına özen gösterilerek, dökülmüştür. Katılaşması için bir süre beklendikten sonra, faj süspansiyonlarından ve hazırlanan faj seyreltilerinin herbirinden, bölümlere ayrılan petri plaklarına $10'$ ar μL damlatma yapılmıştır. 30°C 'de 18 saat inkübe edilen ortamlarda, damlatılan bölgelerdeki lize plakları incelenerek faj titreleri saptanmıştır.

Çift Tabaka M17 Agar Ortamlarının Hazırlanışı: Faj denemelerinde, M17 alt tabaka agar ortamı, ayrı sterilize edilen 1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 10 mL/L ilave edilerek petrilere aktarılmış (15–20 mL) ve $22\text{--}25^\circ\text{C}$ 'de 18 saat tutulmuştur. Üst tabaka ortamı, M17 alt tabaka içeriklerinin tümünün yanı sıra % 0.5 oranında glukoz katılması ile hazırlanmıştır. % 0.45 oranında agar içeren üst tabaka, 3 mL'lik porsiyonlar halinde 121°C 'de 15 dakika sıcaklık uygulaması ile sterilize edilmiştir (Terzaghi and Sandine 1975).

3.2.6.2. Faj duyarlılıklarının saptanması

Titreleri 10^7 plak oluşturma birimi/mL (pfu/mL) ve yukarısında elde edilen faj lizatlarının, izole edilen laktokok suşlarına karşı etkinlikleri çift tabaka agar yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan 3 saatlik bakteri kültürlerinden yumuşak agar ortamına 0.1 mL aktarılıp karıştırıldıktan sonra, alt tabaka M17 agar üzerine dökülmüştür. Yumuşak agarın homojen bir şekilde alt tabaka üzerine yayılması sağlanıp, katılaşması için bir süre beklenmiştir. Bu süre sonunda test edilecek faj lizatları, 10 µL olacak şekilde ortama damlatılmıştır. Test ortamları 30 °C'de 18 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra, faj plak oluşumuna göre suşlar duyarlı ya da dirençli olarak tanımlanmıştır (Terzaghi and Sandine 1975).

3.2.6.3. Adsorbsiyonun engellenmesi

Titreleri 10^5 pfu/mL düzeyine kadar seyreltilen faj süspansiyonlarından 0.75 mL alınarak, 0.75 mL faj dirençli bakteri kültürü ve 37.5 µL $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.185 M) çözeltisi ile mikrofuj tüplerinde karıştırılmıştır. Tüpler 30 °C'de 15 dakika tutularak adsorbsiyonun tamamlanması sağlanmıştır. Bu süre bitiminde, test tüpleri 5000 devirde 3 dk santrifuj edilmiş ve üst sıvıdan 1 mL alınarak 9 mL'lik fizyolojik tuzlu su ile seri dilusyonları yapılmıştır. Bu dilusyonlar faj duyarlı kontrol suşlarına denenmek suretiyle faj adsorbsiyonundan sonraki titre saptanmıştır. % Faj adsorbsiyonu aşağıdaki formülden belirlenmiştir:

$$\% \text{ Faj Adsorbsiyonu} = \frac{(\text{Başlangıç faj titresi} - \text{Adsorbsiyondan sonraki titre}) \times 100}{\text{Başlangıç faj titresi}}$$

(Lucey *et al.* 1992)

3.2.7. Proteolitik aktivite testleri

3.2.7.1. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve mutantlarının proteolitik aktivite düzeylerinin belirlenmesi

Doğal suş ve mutantların proteolitik aktivite düzeyleri, gelişme ortamında meydana gelen tirozin miktarının spektrofotometrik olarak ölçümü ile tespit edilmiştir. Bu amaçla Citti *et al.* (1963) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Doğal suş ve mutantlar, Elliker broth ortamında 30 °C’de 24 saat süre ile inkübasyona tabi tutulduktan sonra, bu aktif kültürlerden reconstituted skim milk ortamına % 1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Bu ortamlarda 30 °C’de 24 saat geliştirilen kültürlerden, 2’şer mL hacimdeki örnekler steril erlenlere aktarılmış ve 1 mL destile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Analiz için hazırlanan bu örnekler 10 mL çözelti A uygulamasından (10 dakika) sonra, filtrasyon işlemi yapılmış (Whatman No.40) ve filtratlar 5 mL’lik hacimler halinde ayrı erlenlere alınmıştır. Bunların üzerine 10 mL B çözeltisi ve 3 mL C çözeltisi ilave edilip, mavi renk oluşumu için 5 dakika beklenmiştir. Spektrofotometrik ölçümler, 1 cm ışık yoluna sahip küvetler kullanılarak 650 nm dalga boyunda yapılmıştır (Shimadzu UV-1700 spectrophotometer, Japan). Elde edilen değerler, tirozin standardı sonuçları ile karşılaştırılmış ve tirozin eşdeğeri olarak verilmiştir. Örneklerin okunmasında şahit olarak, steril reconstitute skim milk besiyerinden alınan (2 mL) ve yukarıda belirtilen işlemler uygulanarak elde edilen karışım kullanılmıştır.

A Çözeltisi: 0.72 N triklor asetik asit (TCA).

B Çözeltisi: 150 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve 20 g tetrasodyum-difosfat 1000 mL destile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

C Çözeltisi: Kullanılmadan hemen önce 1 birim Folin-Ciocalteu (Merck-Germany) çözeltisi, 2 birim destile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Tirozin Standart Çözeltisinin Hazırlanması: 100 mg tirozin, 250 mL destile su

içerisinde çözülmüştür. Tirozin çözeltisinden 2.5, 5, 10, 15, 20 ve 30 mL hacimlerde alınmış ve ayrı ayrı her biri 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden 5'er mL alınarak erlenlere aktarılmıştır. Çözeltilerin üzerine 1'er mL destile su ilave edilerek hacimleri 6 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.7.2. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının fast slow differential agar ortamında proteolitik aktivite ve laktoz fermentasyon yeteneğinin belirlenmesi

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşunun yanında, doğal suşun plazmid giderme ajanları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen mutantları, Fast-Slow Differential (FSD) agar ortamına inoküle edilerek 30 °C'de 48 saat, anaerobik koşullarda geliştirilmiştir. Bu süre sonunda gelişen kolonilerde çap ve morfolojik özellikler belirlenerek laktoz fermentasyon yeteneği (Lac⁺) ile proteolitik aktivite (Prt⁺) özelliklerindeki değişimler araştırılmıştır. Lac⁺ ve Prt⁺ koloniler; 2-3 mm çapında, beyaz konkav morfolojik yapı göstermiş ve koloni çevresinde kırmızı zon oluşturmuşlardır. Prt⁻ ve Lac⁻ koloniler ise; düz, yarı şeffaf olup, çapları 1mm den küçük bulunmuş ve koloni çevresinde kırmızı zon saptanmamıştır. Lac⁺, Prt⁻ kolonilerin Lac⁻, Prt⁻ kolonilerden başlıca farklılığı, koloni çevresinde kırmızı zonun oluşması şeklinde belirlenmiştir (Huggins ve Sandine 1984, Sanders *et al.* 1986).

Fast Slow Differential (FSD) Agar

Yağsız süt tozu	100 g
Sodyum glisero fosfat	19 g
Bakto litmus	1.0 g
Brom krezol purpur (% 0.004)	10 mL
Agar	10 g
Destile su	990 mL

540 mL destile su içeren erlen içerisine aktarılan agar, kaynar su banyosunda çözülmüş, sodyum glisero fosfat ve litmus ilave edilerek karıştırılmıştır. 450 mL destile su içeren bir başka erlende yağsız süt tozu çözülmüştür. Erlenler ayrı ayrı 121 °C'de 17 dakika sterilize edilmiştir. 55 °C'ye kadar soğutulan ortamlar karıştırılarak, stok brom krezol purpur

çözeltisinden 10 mL ilave edilmiş ve 20'şer mL hacimlerde petri kutularına aktarılmıştır. Ortamlar, kullanılmadan önce 30 °C'de 48 saat tutulmuştur.

3.2.8. Antibiyotik duyarlılık testleri

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve plazmid giderme ajanları ile muamelesi sonucu elde edilen mutantlarının antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesinde Bauer *et al.* (1966) tarafından önerilen disk difüzyon yöntemi, modifiye edilerek kullanılmıştır.

Test edilecek MBLL9 suşu ve farklı plazmid içeriğine sahip 7 mutant (M44, M47, M53, M105, M110, M139, M145) GM17 broth ortamında 30 °C'de 18 saat geliştirildikten sonra, 10^{-7} düzeyinde dilüsyonlar hazırlanmış ve GM17 agar ortamlarına, her dilüsyondan 5 µL damlatılarak 30 °C'de 18 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda gelişen koloniler sayılmış ve antibiyotik denemeleri için uygun konsantrasyon olan 1×10^5 cfu/mL'ye kadar seyreltilmiştir. Bakteri kültürleri 100 mL GM17 agar ortamında 1×10^5 cfu/mL olacak şekilde inoküle edilmiş ve karıştırıldıktan sonra, 5 petri plakına 20'şer mL dökülmüştür. Agarın katılaşması beklenmiş ve incelenecek olan antibiyotikler 1 petride 5 adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Hazırlanan petri plakları 30 °C'de 18 saat inkübe edildimiş ve zon çapları ölçülerek mm cinsinden kaydedilmiştir.

3.2.9. Konjugasyon

Konjugasyonda kullanılacak *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve alıcı suş olan *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363, M17 broth ortamlarında 30 °C'de 18 saat (alıcı suş için bu ortamlara 5 µg/mL eritromisin ilave edilmiştir) geliştirilmiş ve aynı ortamlarda 10^{-1} düzeyinde dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan alınan 2 mL verici ve 3 mL alıcı suş kültürleri karıştırıldıktan sonra, filtrasyon işlemi ile steril membran filtreler (0.45 µm, Sartorius, Germany) üzerinde toplanmıştır. Alıcı ve verici suş kültür karışımlarını içeren filtreler M17 agar plaklarına yerleştirilerek, 30 °C'de 18 saat tutulmuştur. Bu süre bitiminde M17 agar plaklarından alınan filtreler, 1 mL steril fizyolojik su içerisinde çözülmüş ve 10^{-8} düzeyine kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan 5 µg/mL eritromisin içeren laktoz indikatör agar plaklarına sürme ekim yapılarak 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen koloniler ortamdan seçilmiştir. Laktoz indikatör agar üzerinde seçilen koloniler fast slow differential agar

ortamına alınmış, bu ortamda da tüm eritromisin dirençli koloniler laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite yetenekleri bakımından incelenmiştir. Laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite yeteneklerinden yoksun bulunan koloniler son olarak laktisin 481 üretim özellikleri açısından incelenmiştir. Bu aşamada indikatör bakteri olarak LB broth ortamında, 37 °C’de 18 saat geliştirilen *Micrococcus luteus* NCIMB8166 kullanılmış ve seçilen kolonilerden laktisin 481 üretme yeteneğinde olanlar, konjugant olarak tanımlanmıştır.

3.2.10. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşunda laktoz plazmidi stabilitesi

L. lactis subsp. *lactis* MBL9 doğal suşunda ve mutantlarında laktoz plazmidi stabilitesi; herbirinin % 10 reconstitute skim milk (Oxoid Ltd. England) ortamında 10 pasaj (~ 70 generasyon) geliştirilmesinden sonra seçilen kolonilerin, laktoz indikatör agarda test edilmesi ile saptanmıştır (Coakley *et al.* 1997). Bu ortamlarda 30 °C’de 18 saat inkübasyon sonucu indikatör boya rengini sarıya çeviren koloniler laktoz fermentasyon yeteneğini sürdüren (Lac⁺) koloniler olarak tanımlanmıştır. Lac⁺ kolonilerin popülasyondaki oranı, yüzde stabilite cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.11. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşunun ve mutantlarının üreme kinetiklerinin matematiksel modeli

L. lactis subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve mutantlarının gelişme eğrileri, zamana karşı ölçülen optik yoğunlukları (OD₆₅₀) esas alınarak ve modifiye edilmiş Gompertz denklemi kullanılarak modellenmiştir.

Modifiye Gompertz denklemi:

$$y(t) = a \cdot \text{üssel faz} \{ - \text{üssel faz} [(\mu \cdot e/a) \cdot (\lambda - t) + 1] \}$$

Denklemden $y(t)$, OD₆₅₀ değerini; e , üssel fazı; a , azami değeri; μ , azami özgül büyüme hızını ve λ , lag (uyum) zamanını ifade etmektedir (Zwietering *et al.* 1990, Zwietering *et al.* 1991).

Model uygunluğunun değerlendirilmesinde, saptama katsayısı (R^2) ve ortalama hata karesi (MSE) esas alınmıştır. Model parametreleri, sigma Plot 2000 (versiyon 6.00 Chicago, IL, USA) programı kullanılarak elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 Suşunun Genetik ve Biyokimyasal Tanısı

Özkalp *et al.* (2007) tarafından, morfolojik, kültürel ve bazı biyokimyasal analizler sonucu tanımlanan *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşunda ileri tanı testleri olarak, VITEK 2 (bioMerieux, USA) esaslı biyokimyasal testler ve 16S rDNA dizi analizleri kullanılmıştır. VITEK 2 sisteminde denenen 43 adet biyokimyasal test sonucunda, test edilen suşun % 99 olasılıkla *L. lactis* subsp. *lactis* olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.1). *L. lactis* subsp. *lactis* 16S rDNA primerleri ile yürütülen tanımlayıcı PZR ve DNA dizi analizleri sonucunda da (Şekil 4.1), çoğaltılan gen bölgesinin *L. lactis* subsp. *lactis* genomundaki bölge ile % 100 oranında homoloji verdiği BLAST analizleri ile saptanmıştır.

Günümüzde bakteriyel tanımlama çalışmalarında; klasik tanı testleri, detaylı biyokimyasal (hücre duvarı yağ asidi kompozisyonu, enzimatik analizler ve immunokimyasal testler gibi) ve moleküler genetik analizler (restriksiyon fragment boy polimorfizmi, DNA homolojisi, 16S rDNA genlerinin tanımlayıcı PZR uygulamaları ve DNA dizi analizleri gibi) araştırmaları ile desteklenerek yürütülmektedir (Samarzija *et al.* 2001, Corsetti *et al.* 2003). Bu sayede özellikle yakın akraba bakteriler ya da türler ve alt türler arasında kesin bir ayırımın yapılabilmesi mümkün olmaktadır (Vadeboncoeur and Moineau 2004). Bu amaçla *L. lactis* alt türlerinin ayırımında tanı kitlerini esas alan otomatize sistemler ve tanımlayıcı PZR primerleri geliştirilmiştir. Araştırmamızda da bu elemanlardan yararlanılarak, çalışmamızda kullanılan bakterinin *L. lactis* subsp. *lactis* olduğu kesinlik kazanmıştır.

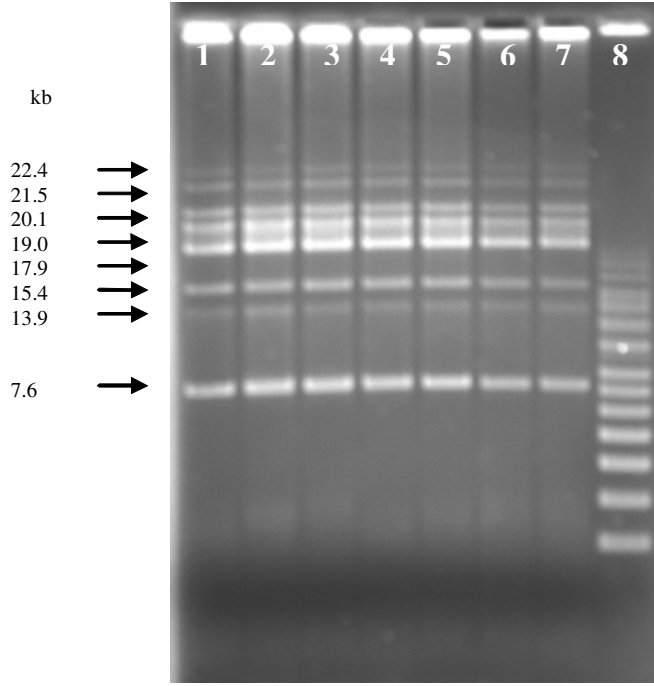
Şekil 4.1. 16S rDNA primerleri ile *L. lactis* subsp. *lactis*'in çoğaltılan gen bölgesi

GTGCGGTCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTATTGCGTTAGCTGCGATACAGAG
AACTTATAGCTCCCTACATCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGTGTCAGTTACAGGCC
AGAGAGCCGCTTTCGCCACCGGTGTTCTCCATATATCTACGCATTTACCGCT
ACACATGGAATTCCACTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGC
ATACAATGGTTGAGCCACTGCCTTTTACACCAGACTTAATAAACCACCTGCGCT
CGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTCGGGACCTACGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCCTTTCTGGGTAGTTACCGTCACTTGATGAG
CTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGATCCGAAAA
CCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGAT
TCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAATGTGGC
CGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCA
CCA ACTAGCTAATAACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTC
AAACTTAAA ACTTGTGTTTAAAGTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAA
TGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCAGATTCCCCACGCGT TACTCACCCGTTTCGCTGC
TCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTTCAGCGCTCAACTTGCATGTATAGCAC
GCCGCACGTCTGCGCTCCGGGGCGAAAAATAATATATATAAAAAACCACGCGG
GGAAATGGGTGTGGGAGGGGCGAAGAAGAAGAGGGGGCACTACGGCATAAAG
CAAATAGT

4.2. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 Suşunun Plazmid İçeriklerinin Tanımlanması

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşunda plazmid içerikleri Anderson ve McKay (1983) tarafından önerilen alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Özellikle 30 kb' dan büyük plazmidlerde sıklıkla rastlanan stabilite sorunu göz önünde bulundurularak, plazmid izolasyonunda 5 mL ile 1 L arasında değişen başlangıç kültür hacimleri denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda standart plazmid izolasyonunun yapılabildiği en düşük kültür miktarı 10 mL olarak tanımlanmış ve bu kültür hacmi analizlerde kullanılmıştır. Üç paralelli ve iki tekrarlı olarak yürütülen plazmid izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi çalışmaları sonucu, MBLL9 suşunun 8 farklı plazmid içerdiği belirlenmiştir. Moleküler büyüklükleri bilinen ticari plazmid marker' larının jel göçü ölçülerek çıkarılan standart eğri esas alınmak suretiyle, bu plazmidlerin büyüklükleri; 22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 15.4, 13.9 ve 7.6 kb olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2).

Laktokoklarda, süt fermentasyonlarında hayati önem taşıyan bazı fonksiyonların gen kodunun plazmidler üzerinde bulunduğu belirlenmesi, plazmid biyolojisini çok önemli bir çalışma alanı haline getirmiştir. *L. lactis* suşlarında yürütülen fiziksel plazmid analizleri sonucunda; bu bakterilerin, büyüklükleri 1–100 kb, sayıları ise 1–15 adet arasında olan ve kovalent bağlarla kendi üzerine kapanmış (ccc) kromozom dışı DNA molekülleri içerdiği saptanmıştır (Teuber *et al.* 2003, Xiang *et al.* 2003). Araştırmamızda elde edilen bulgular, bu literatür verileri ile uygunluk göstermiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda 10 mL gibi küçük bir hacimde, stabil plazmid profillerinin alınabilmesi, içerdiği en büyük plazmidin 22.4 kb moleküler ağırlıkta oluşu ile açıklanabilir. Zira laktokoklarda 1–30 kb arasındaki plazmidler genellikle yüksek kopya sayısı içermekte ve bu nedenle izolasyonları kolay yapılabilmektedir (Trotter *et al.* 2004).



Şekil 4.2. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşunun plazmid içeriği

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (MBLL9)
(Lac⁺, Prt⁺, Bac⁺)

8 (ccc plazmid DNA marker) : 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.1 kb

4.3. Laktoz Fermentasyon Yeteneği

L. lactis subsp. *lactis* MBL9 suğu, laktozdan hızlı asit oluğuurma yeteneğinde bulunmuğuur (Özkalp *et al.* 2007). Doğal suğuun, akriflavin uygulandıktan sonra laktoz indikatör agar ortamında örneklenen bazı kolonilerinde, laktoz fermentasyon yeteneğinin kaybolduğu (Lac⁻) saptanmığutır. Lac⁻ koloniler, laktoz indikatör agarda 18 saat gelişmeleri sonucunda, çevresinde sararmaya yol açmayan, beyaz koloniler olarak seçilmiğutır (Çizelge 4.1). Laktozu fermente eden (Lac⁺) ya da edemeyen (Lac⁻) mutantlarda proteolitik aktivite, faj dirençlilik ve bakteriyosin üretim özellikleri de araştırılmığutır.

Laktoz fermentasyon yeteneğini kaybetmiş mutantlar ile bu özelliği sürdüren ancak farklı plazmidlerini kaybetmiş mutantların ve doğal suğuun plazmid içerikleri bakımından karşılaştırılması sonucunda (Şekil 4.3 ve 4.4) 21.5 kb büyüklüğündeki plazmidin, söz konusu suğuta laktoz fermentasyonu yeteneğinden sorumlu olduğu tespit edilmiğutır. Plazmid içerikleri, öncelikle 21.5 kb plazmidi kaybeden bütün mutantlarda Lac⁻ fenotipin meydana geldiğine işaret etmiğutır. Daha detaylı incelemeler sonucunda Lac⁻ fenotipteki MBL9-44 mutanı ile Lac⁺ MBL9-47 mutanı arasındaki yegane plazmid farklılığının 21.5 kb büyüklükteki plazmid olduğunun tespit edilmesi, bu bulguyu desteklemiğutır (Şekil 4.4).

Endüstriyel fermentasyon ajanları olarak kullanılan laktik asit bakterilerinde, genellikle azot kaynakları bakımından sınırlı ve ucuz hammaddenin tam fermentasyonu sonucu yüksek oranda sterospesifik laktik asit üretim yeteneği kritik önem taşımaktadır. Laktokoklar bu özellik sayesinde; fermentasyonun başlatılması, sütte pıhtı oluğuunu ve kontamine floranın gelişiminin engellenmesi gibi, son ürün kalitesi ve miktarını önemli ölçüde değiştiren unsurları kontrol etmektedir. *L. lactis* suğularında, süt şekeri laktozdan hızlı asit oluğuurma yeteneğinin anahtar enzimi olan fosfo-β-galaktozidaz gen kodu, plazmidler (laktoz plazmidleri) üzerinde bulunmaktadır (Soomro *et al.* 2002).

L. lactis suğularında laktoz plazmidleri, genellikle 20 kb'dan büyük ve yüksek stabilite gösteren kromozom dığu DNA elementleri olarak tanımlanmaktadır. Bugüne kadar starter kültür olarak kullanılan *L. lactis* suğularında söz konusu plazmidlerin konjugatif hareketlilik içerdiği ve laktoz fermentasyonu yanında; bakteriyosin üretimi, faj dirençlilik ve proteolitik aktivite gibi özelliklerin de gen kodunu taşıdığı belirlenmiğutır (Akçelik 1999, Soomro *et al.* 2002, Narayanan *et al.* 2004, Smid *et al.* 2005). *L. lactis* subsp. *lactis*

MBLL9 suşunda belirlenen laktoz plazmidi, bu suştaki en büyük plazmid olmaması ile nadir rastlanan bir karakteristik göstermektedir. Laktoz plazmidleri üzerinde yürütülen moleküler analizlerde nadir rastlanan bu durumun plazmid entegrasyon ve çözülme süreçlerinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Makarova and Koonin 2007). *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda belirlenen laktoz plazmidi ile yürütülecek moleküler analizler doğrultusunda bu durum açıklığa kavuşturulabilir. Söz konusu analizler, laktoz plazmidlerinin ve dolayısı ile konakçı suşların evrimine ışık tutması açısından büyük önem taşımaktadır. Tez kapsamında araştırılmayan bu nokta, konu üzerinde yürütülecek ileri çalışmalarda ele alınacaktır.

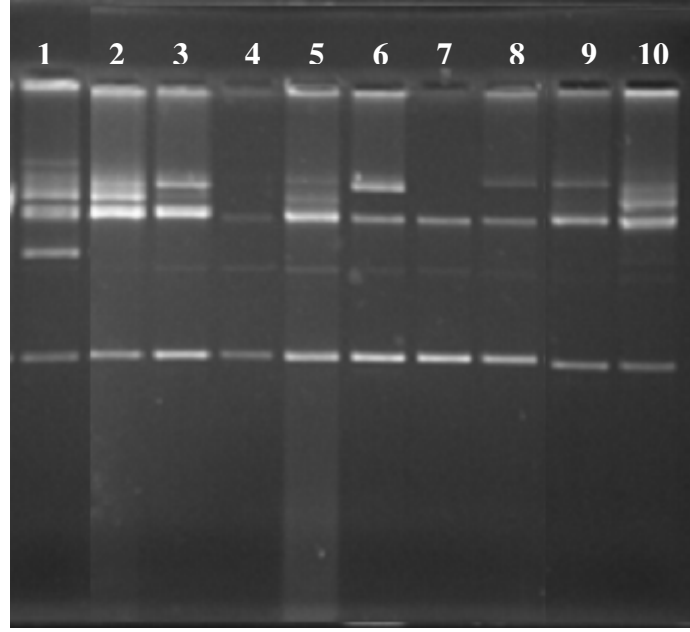
Çizelge 4.1. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşu ve mutantlarının laktoz fermentasyon yetenekleri

Bakteri Kod No	Laktoz Fermentasyon Yeteneği
MBLL9	+
MBLL9-41	+
MBLL9-43	-
MBLL9-44	-
MBLL9-47	+
MBLL9-52	+
MBLL9-66	-
MBLL9-73	-
MBLL9-76	+
MBLL9-80	+
MBLL9-82	+
MBLL9-86	+
MBLL9-88	+
MBLL9-97	+
MBLL9-105	-
MBLL9-110	-
MBLL9-111	-
MBLL9-118	-
MBLL9-139	-
MBLL9-146	-
MBLL9-157	-

MBLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

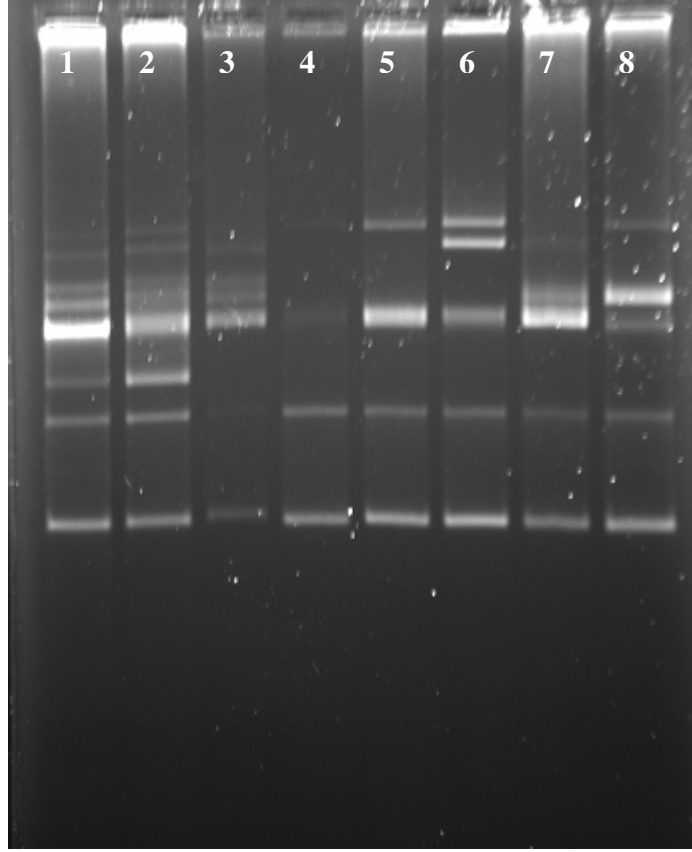
+ : laktozu fermente eden

- : laktozu fermente edemeyen



Şekil 4.3. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve mutantlarının plazmid içerikleri

1. MBL9	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 15.4, 13.9, 7.6 kb
(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
2. MBL9-41	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 7.6 kb
(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
3. MBL9-42	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 13.9, 7.6 kb
(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
4. MBL9-43	:	15.4, 13.9, 7.6 kb
(Lac ⁻ , Prt ⁻ , Bac ⁻)		
5. MBL9-45	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 13.9, 7.6 kb
(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
6. MBL9-47	:	22.4, 21.5, 15.4, 13.9, 7.6 kb
(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
7. MBL9-66	:	17.9, 13.9, 7.6 kb
(Lac ⁻ , Prt ⁻ , Bac ⁻)		
8. MBL9-52	:	22.4, 21.5, 19.0, 17.9, 13.9, 7.6 kb
(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
9. MBL9-73	:	22.4, 15.4, 13.9, 7.6 kb
(Lac ⁻ , Prt ⁻ , Bac ⁺)		
10. MBL9	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 15.4, 13.9, 7.6 kb
(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		



Şekil 4.4. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve mutantlarının plazmid içerikleri

1	MBLL9	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 15.4, 13.9, 7.6 kb
	(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
2	MBLL9	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 15.4, 13.9, 7.6 kb
	(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
3	MBLL9-41	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 7.6 kb
	(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
4	MBLL9-43	:	15.4, 13.9, 7.6 kb
	(Lac ⁻ , Prt ⁻ , Bac ⁻)		
5	MBLL9-44	:	22.4, 15.4, 13.9, 7.6 kb
	(Lac ⁻ , Prt ⁻ , Bac ⁺)		
6	MBLL9-47	:	22.4, 21.5, 15.4, 13.9, 7.6 kb
	(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
7	MBLL9-52	:	22.4, 21.5, 19.0, 17.9, 13.9, 7.6 kb
	(Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺)		
8	MBLL9-66	:	22.4, 19.0, 17.9, 13.9, 7.6 kb
	(Lac ⁻ , Prt ⁻ , Bac ⁺)		

4.4. Proteolitik Aktivite

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşunda yürütülen analizler sonucu proteolitik aktivite 43.35 µg Tirozin/mL olarak saptanmıştır (Çizelge 4.2). Bu oran, laktokok starter kültür suşları için yüksek proteolitik aktivite düzeyi olarak tanımlanmaktadır (Madera *et al.* 2003). Peynir üretiminde tipik aroma ve tat bileşiklerinin temel etmeni olmasından dolayı kritik bir önem taşıyan proteolitik aktivite özelliği, MBLL9 suşunda mutasyon çalışmaları sonucu, bazı mutantlarda kaybolmuştur (Çizelge 4.2, Şekil 4.3 ve 4.4). Bu durum söz konusu özelliğin plazmid kodlu olduğuna işaret etmiştir. Mutantlarda proteolitik aktivite (Prt⁺) ve laktoz fermentasyon özelliğinin (Lac⁺) FSD agar ortamında tanımlanan birlikte kaybı, her iki özelliğin de aynı plazmid üzerinde olduğunu kanıtlamıştır. Bölüm 4.3’de ifade edildiği gibi, 21.5 kb büyüklükteki laktoz plazmidi kaybı ile Lac⁻/Prt⁻ fenotip oluştururken (MBLL9–44), tek farklılık olarak bu plazmidi içeren mutant (MBLL9–47), doğal suşta olduğu gibi, Lac⁺/Prt⁺ fenotipini muhafaza etmiştir (Şekil 4.4).

L. lactis türleri gelişmeleri için zorunlu birçok faktörü sentezleme yeteneği içermemektedir. Bu gelişme faktörlerinin en önemlileri amino asitler ya da küçük peptitlerdir. Sütte düşük oranda bulunan söz konusu amino asitler ve peptitler, kazein hidrolizi yolu ile sağlanmaktadır. *L. lactis* türleri sütte bulunan dört farklı tip kazeinden (α_{S1} , α_{S2} , β ve K-kazein) daha çok β ve K-kazeini kullanmak suretiyle, metabolizması için gerekli giriş substratlarını oluşturmaktadır. Kazein hidrolizi, laktokokların süt ortamında hızlı üremeleri için kritik bir parametre teşkil etmesi yanında, süt fermentasyonlarında ürünün tat ve aromasına katkıda bulunan bileşiklerin oluşturulması açısından da oldukça önemlidir. Özellikle peynir üretiminde kullanılan *L. lactis* suşları, bu ürünlerin aroma ve tat bileşiklerinin oluşumunu yöneten proteolitik enzimlerin kaynağını teşkil etmektedir. Bu nedenlerle, söz konusu bakterilerin yüksek proteolitik aktivite içermeleri, starter kültür suşu olarak kullanımlarında başlıca seçim kriterlerinden biri olarak kullanılmaktadır (Christensson *et al.* 2001).

L. lactis suşlarında laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite özelliklerinin aynı plazmid üzerinde bulunması, süt ortamında suş gelişimi ve stabilite açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle starter kültür olarak kullanılan *L. lactis* suşlarında laktoz ve proteolitik aktivite özelliğini kodlayan farklı plazmidlerin in-vitro ya da konjugasyonel süreçlerle koentegrasyonu stratejisi kullanılmaktadır (Mills *et al.* 2006, Donkor *et al.*

2007). *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9’da etkin laktoz metabolizması ve proteolitik aktivite genlerinin doğal olarak aynı plazmid üzerinde bulunuşu, bu suşta seçici bir avantaj kazandırmaktadır. Zira bu suşta laktik asit üretimi, plazmid kodlu fosfo-β-galaktozidaz enzim etkinliği sayesinde yüksek oranda gerçekleşmektedir (Özkalp *et al.* 2007). Aynı plazmid tarafından determine edilen proteolitik aktivitenin de starter kültür suşları için arzu edilen düzeyde oluşu (Çizelge 4.2), söz konusu plazmidin starter kültür suşu geliştirme çalışmaları için önemine işaret etmektedir.

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşunda tanımlanan 21.5 kb büyüklükteki Lac⁺/Prt⁺ özelliklerinden sorumlu plazmidin replikasyon fonksiyonlarının, kopya sayısı etkinliğinin ve DNA baz diziliminin saptanması, genetik yapısı zenginleştirilmiş suşların oluşturulması çalışmaları için zorunludur.

Çizelge 4.2. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının proteolitik aktivite düzeyleri

Bakteri Kod No	Proteolitik aktivite µg Tirozin (Tyr/mL)
MBLL9	43.35
MBLL9-41	42.20
MBLL9-43	<10
MBLL9-44	<10
MBLL9-47	40.63
MBLL9-52	43.30
MBLL9-66	<10
MBLL9-73	<10
MBLL9-76	42.73
MBLL9-80	41.25
MBLL9-82	42.30
MBLL9-86	42.25
MBLL9-88	43.25
MBLL9-97	40.85
MBLL9-105	<10
MBLL9-110	<10
MBLL9-111	<10
MBLL9-118	<10
MBLL9-139	<10
MBLL9-146	<10
MBLL9-157	<10

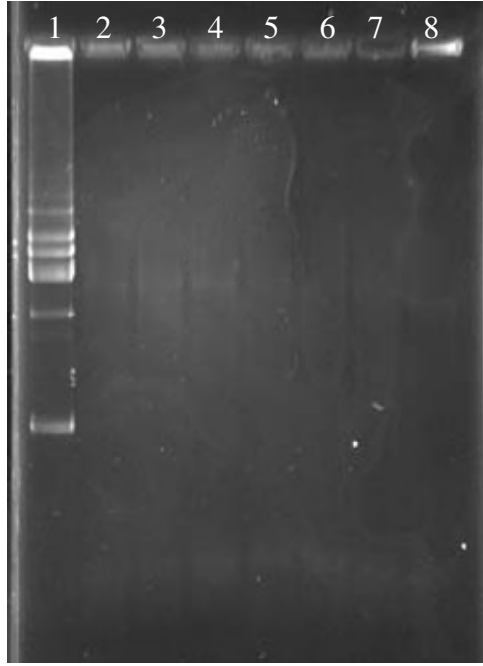
4.5. Faj Dirençlilik

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşunda faj dirençlilik mekanizması Türkiye'den izole edilen ve en geniş konakçı özgülüğü gösteren Φ plc 61–50, Φ plc 61–52, Φ pll 98–22 (Akçelik and Şanlıbaba 2002) fajları kullanılarak araştırılmıştır. Doğal suşta bulunan tam dirençlilik mekanizması, değişik plazmidleri giderilmiş mutantlar yanında (Şekil 4.2, 4.3, 4.4) tüm plazmidleri giderilmiş mutantlarla da devam etmiştir (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.3). Bu durum, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda bulunan faj dirençlilik sisteminin kromozomal DNA kökenli olduğunu kanıtlamaktadır. Doğal suşta Φ plc 61–50 fajının adsorbsiyonu % 8.3 düzeyinde gerçekleşirken, bu oran Φ plc 61–52, Φ pll 98–22 fajları için ise % 9.7 olarak saptanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunun değişik plazmidleri giderilmiş ya da plazmid içermeyen mutantlarında Φ plc 61–50, Φ plc 61–52 ve Φ pll 98–22 fajlarının adsorbsiyonu % 0–13.8 oranlarında gerçekleşmiştir (Çizelge 4.3). Mutantlar için faj adsorbsiyonunda tanımlanan düşük orandaki (\pm % 5.5-8.3) değişimler, doğal suştaki tam dirençlilik fenotipi üzerinde etkili olmamıştır. Tüm bu bulgular, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda üç dominant faja karşı test edilen sistemin, faj adsorbsiyonunun engellenmesi mekanizması ile etkinlik gösterdiğini ispat etmektedir.

Faj-bakteri yüzey temasının (adsorbsiyon) engellenmesi, faj-bakteri etkileşimlerini en aza indiren temel dirençlilik mekanizmasıdır. Bugüne kadar *L. lactis* suşlarında tanımlanan faj adsorbsiyonunun engellenme sistemlerinin büyük bir çoğunluğunun gen kodunun, farklı plazmidler üzerinde bulunduğu saptanmıştır. Değişik tip nokta mutasyonlarından kaynaklandığı belirlenen kromozomal DNA kökenli faj adsorbsiyon sistemlerine ise *L. lactis* suşlarında oldukça nadir rastlanmaktadır. Laktokoklarda tanımlanmış olan faj adsorbsiyonunun engellenmesi tipte dirençlilik sistemleri, çoğunlukla sınırlı fajlara (genellikle bir adet) karşı etkinlik göstermektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* pLL102, ME2, SK110 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UL503 suşlarında tanımlanan söz konusu sistemlerin denenen fajlar için adsorbsiyonu % 50–80 oranında düşürdüğü tespit edilmiştir. Plazmid kodlu olan bu sistemlerde faj adsorbsiyonunda gerçekleşen % 50 oranında düşmelerin bile faj çoğalmasının engellenmesi için yeterli olduğu tespit edilmiştir (Akçelik and Tunail 1992, Daly *et al.* 1996, Allison and Klaenhammer 1998, Devlieghere *et al.* 2004, Tükel *et al.* 2006).

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşunda tanımlanan kromozomal DNA kökenli faj adsorbsiyonunun engellenme sistemi, Türkiye kökenli fajlara karşı çok yüksek bir etkinlik göstermektedir. Literatür verileri ile karşılaştırıldığında söz konusu sistemin % 20–50'ye varan oranlarda yüksek bir aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Allison and Klaenhammer 1998, Devlieghere *et al.* 2004, Tükel *et al.* 2006). Diğer yandan bu suşta faj adsorbsiyonunun engellenmesi tipte faj dirençlilik sisteminin kromozomal DNA kökenli oluşu, stabilite açısından büyük bir avantaj teşkil etmektedir. Zira plazmid kodlu dirençlilik sistemleri, özellikle fermente gıda üretim süreçlerinin doğasından kaynaklanan stres koşullarının etkisi ile suşlardan elimine olabilmektedir. Bu durum da süt endüstrisinde söz konusu suşların kullanımını önemli ölçüde kısıtlamaktadır (Buzrul *et al.* 2007).

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşunun sahip olduğu faj adsorbsiyonunun engellenmesi dirençlilik sisteminin, tüm dünyada etkin endüstriyel fajlara karşı denenmesi ve kromozomal esasının moleküler düzeyde aydınlatılması, endüstriyel kullanım olanağının belirlenmesine yardımcı olacaktır.



Şekil 4.5. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve tüm plazmidlerini yitirmiş mutantların jel görüntüsü

1	MBLL9	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 15.4, 13.9, 7.6 kb
2	MBLL9-157	:	-
3	MBLL9-158	:	-
4	MBLL9-159	:	-
5	MBLL9-160	:	-
6	MBLL9-161	:	-
7	MBLL9-162	:	-
8	MBLL9-163	:	-

Çizelge 4.3. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının faj duyarlılıkları

Bakteri Kod No	Faj Kod No			
	Φplc 61–50			
	Başlangıç Faj Titresi	Adsorbsiyondan Sonraki Titre	% Adsorbsiyon	Litik Etki
MBLL9	7.2×10^7	6.6×10^7	8.3	-
MBLL9-41	7.2×10^7	7.1×10^7	1.4	-
MBLL9-43	7.2×10^7	7.0×10^7	2.7	-
MBLL9-44	7.2×10^7	7.0×10^7	2.7	-
MBLL9-47	7.2×10^7	6.5×10^7	9.7	-
MBLL9-52	7.2×10^7	6.6×10^7	8.3	-
MBLL9-66	7.2×10^7	6.9×10^7	4.2	-
MBLL9-73	7.2×10^7	6.7×10^7	7	-
MBLL9-76	7.2×10^7	6.6×10^7	8.3	-
MBLL9-80	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-82	7.2×10^7	6.2×10^7	13.8	-
MBLL9-86	7.2×10^7	6.4×10^7	11.1	-
MBLL9-88	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-97	7.2×10^7	6.3×10^7	13	-
MBLL9-105	7.2×10^7	6.3×10^7	13	-
MBLL9-110	7.2×10^7	6.2×10^7	13.8	-
MBLL9-111	7.2×10^7	6.9×10^7	4.2	-
MBLL9-118	7.2×10^7	7.1×10^7	1.4	-
MBLL9-139	7.2×10^7	7.0×10^7	2.7	-
MBLL9-146	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-157	7.2×10^7	6.6×10^7	8.3	-

Çizelge 4.3. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının faj duyarlılıkları (devam)

Bakteri Kod No	Faj Kod No			
	Φplc 61–52			
	Başlangıç Faj Titresi	Adsorbsiyondan Sonraki Titre	% Adsorbsiyon	Litik Etki
MBLL9	7.2×10^7	6.5×10^7	9.7	-
MBLL9-24	7.2×10^7	7.1×10^7	1.4	-
MBLL9-41	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-43	7.2×10^7	7.0×10^7	2.7	-
MBLL944	7.2×10^7	6.6×10^7	8.3	-
MBLL9-47	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-52	7.2×10^7	6.9×10^7	4.2	-
MBLL9-66	7.2×10^7	6.3×10^7	12.5	-
MBLL9-73	7.2×10^7	6.5×10^7	9.7	-
MBLL9-76	7.2×10^7	6.4×10^7	11.1	-
MBLL9-80	7.2×10^7	7.1×10^7	1.4	-
MBLL9-82	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-86	7.2×10^7	6.5×10^7	9.7	-
MBLL9-88	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-97	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-105	7.2×10^7	6.9×10^7	4.2	-
MBLL9-110	7.2×10^7	6.2×10^7	13.8	-
MBLL9-111	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-118	7.2×10^7	6.9×10^7	4.2	-
MBLL9-139	7.2×10^7	7.0×10^7	2.7	-
MBLL9-146	7.2×10^7	6.9×10^7	4.2	-
MBLL9-157	7.2×10^7	7.1×10^7	1.4	-

Çizelge 4.3. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının faj duyarlılıkları (devam)

Bakteri Kod No	Faj Kod No			
	Φpl1 98–22			
	Başlangıç Faj Titresi	Adsorbsiyondan Sonraki Titre	% Adsorbsiyon	Litik Etki
MBLL9	7.2×10^7	6.5×10^7	9.7	-
MBLL9-41	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-43	7.2×10^7	7.1×10^7	1.4	-
MBLL944	7.2×10^7	6.6×10^7	8.3	-
MBLL9-47	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-52	7.2×10^7	7.1×10^7	1.4	-
MBLL9-66	7.2×10^7	7.0×10^7	2.7	-
MBLL9-73	7.2×10^7	7.0×10^7	2.7	-
MBLL9-76	7.2×10^7	7.1×10^7	1.4	-
MBLL9-80	7.2×10^7	6.2×10^7	13.8	-
MBLL9-82	7.2×10^7	6.8×10^7	5.5	-
MBLL9-86	7.2×10^7	6.5×10^7	9.7	-
MBLL9-88	7.2×10^7	6.5×10^7	9.7	-
MBLL9-97	7.2×10^7	6.9×10^7	4.2	-
MBLL9-105	7.2×10^7	6.5×10^7	9.7	-
MBLL9-110	7.2×10^7	6.3×10^7	13	-
MBLL9-111	7.2×10^7	7.0×10^7	2.7	-
MBLL9-118	7.2×10^7	6.9×10^7	4.2	-
MBLL9-139	7.2×10^7	6.2×10^7	13.8	-
MBLL9-146	7.2×10^7	7.1×10^7	1.4	-
MBLL9-157	7.2×10^7	7.0×10^7	2.7	-

4.6. Bakteriyosin Üretimi

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşunun ürettiği bakteriyosinin karakterizasyonu için, ilk aşamada antibakteriyel etki spektrumu belirlenmiştir. Değişik indikatör bakterilere karşı test edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosin, *L. lactis* subsp. *lactis* SIK83 hariç denemede kullanılan Gram-pozitif bakterilerin tümüne karşı inhibisyon etkinliği göstermiş, ancak Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı bulunmuştur. Testlerde kullanılan kontrol nisin üretici suş ile bazı indikatör bakteriler için farklı etkinliğe sahip bulunan *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 bakteriyosini, laktisin 481 üreticisi JC17 suşu ile tamamen aynı inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Bu testlerde en kritik bulgu, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 bakteriyosininin laktisin 481 üreticisi JC17 suşuna etkinliği saptanmazken, nisin üreticisi SIK83 suşuna karşı orta düzeyde inhibisyon aktivitesine sahip olmasıdır. Diğer yandan nisin üreticisi SIK83 suşunun, hem MBLL9 ve hem de laktisin 481 üreticisi JC17 suşuna karşı orta düzeyde inhibisyon etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çapraz aktivite testleri de, MBLL9 ve JC17 suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin, indikatör bakterilere karşı yürütülen testlerden elde edilen sonuçları desteklemektedir(Çizelge 4.4).

MBLL9 suşunun ürettiği bakteriyosinin karakterizasyonunda, kısmen saflaştırılan bakteriyosinin değişik enzim, sıcaklık ve pH uygulamalarına karşı davranışı belirlenmiştir. Bu denemelerde de nisin ve laktisin 481 kontrol olarak kullanılmıştır. MBLL9 bakteriyosininin aktivitesi α -kemotripsin, proteinaz K ve α -amilaz uygulaması sonucu tamamen kaybolmuş, ancak tripsin, lipaz, katalaz ve lizozim uygulamalarından etkilenmemiştir. Enzim muamelelerine karşı kontrol nisin ve laktisin'den yegane farklılığı, MBLL9 bakteriyosininin α -amilaza karşı yüksek duyarlılık göstermesidir (Çizelge 4.5). Bakteriyosinler protein yapıda olmakla birlikte, özellikle son yıllarda bazı lantibiyotiklerin agregasyonunda, karbohidrat çapraz köprülerinin rol aldığı da belirlenmiştir (Riley and Wertz 2002, Akçelik *et al.* 2006). Enzim denemelerinden elde edilen bu bulgu, MBLL9 bakteriyosininin benzer bir agregasyon mekanizmasına sahip olduğuna işaret etmektedir. MBLL9 bakteriyosini ve JC17 tarafından üretilen laktisin 481 tamamen aynı ısıl direnç ve geniş pH aralığında (pH 1–11) yüksek aktivite göstermiştir. Kontrol olarak kullanılan nisin ise, özellikle daha dar ve asidik pH değerlerinde yüksek bakteriyosin aktivitesine sahip bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 tarafından üretilen bakteriyosinin etki spektrumu

İndikatör Suş	Test Edilen Bakteri Kod No.		
	MBLL9	SIK83	JC17
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG2912	++	+	++
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 1198	+++	++	+++
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> NCDO176	++	++	++
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> LMG2003	+++	+++	+++
<i>Leuconostoc</i> <i>carnosum</i> DSM5576	++	+++	++

- : inhibisyon zonu yok
+ : inhibisyon zonu ≤ 5 mm
++ : inhibisyon zonu $> 5 \leq 10$ mm
+++ : inhibisyon zonu > 10 mm

Çizelge 4.4. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 tarafından üretilen bakteriyosinin etki spektrumu (devam)

İndikatör Suş	Test Edilen Bakteri Kod No.		
	MBLL9	SIK83	JC17
<i>Pediococcus pentasaceus</i> LMG2001	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	+++	+++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2602	++	+++	++
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium SL1344	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> CFA1 (ETEC)	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-
<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC15442	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> LMG2732	++	+++	++
<i>Bacillus subtilis</i> 12	++	+++	+++

- : inhibisyon zonu yok
+ : inhibisyon zonu ≤ 5 mm
++ : inhibisyon zonu $> 5 \leq 10$ mm
+++ : inhibisyon zonu > 10 mm

Çizelge 4.4. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 tarafından üretilen bakteriyosinin etki spektrumu (devam)

İndikatör Suş	Test Edilen Bakteri Kod No.		
	MBLL9	SIK83	JC17
<i>Bacillus licheniformis</i> 40	++	+++	++
<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB8166	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	++	++	++
<i>Staphylococcus carnosus</i> MCIB	++	++	++
<i>Clostridium tyobutyricum</i>	++	++	++
<i>Lactococcus lactis</i> SIK83	++	-	++
<i>Lactococcus lactis</i> JC17	-	++	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9	-	++	-

- : inhibisyon zonu yok
+ : inhibisyon zonu ≤ 5 mm
++ : inhibisyon zonu $> 5 \leq 10$ mm
+++ : inhibisyon zonu > 10 mm

Çizelge 4.5. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunun ürettiği bakteriyosinin değişik enzim, sıcaklık ve pH uygulamalarına karşı davranışı

Uygulama	Bakteriyosin Aktivitesi (AU /mL)*		
	MBLL9**	SIK83***	JC17****
Kontrol	6400	12800	3200
α -Kemotripsin	0	0	0
Tripsin	6400	6400	3200
Proteinaz K	0	0	0
α - Amilaz	0	12800	3200
Lipaz	6400	12800	3200
Katalaz	6400	12800	3200
Lizozim	6400	12800	3200
100 °C 5 dk	6400	12800	3200
100 °C 10 dk	6400	12800	3200
100 °C 15 dk	6400	12800	3200
100 °C 20 dk	6400	12800	3200
121 °C 15 dk	3200	1600	1600
pH			
1	6400	25600	3200
2	6400	25600	3200
3	6400	25600	3200
4	6400	25600	3200
5	6400	12800	3200
6	6400	12800	3200
7	6400	12800	3200
8	6400	6400	3200
9	6400	6400	3200
10	3200	3200	1600
11	1600	1600	800

* : İndikatör suş olarak *Micrococcus luteus* NCIMB8166 kullanılmıştır

** : *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9

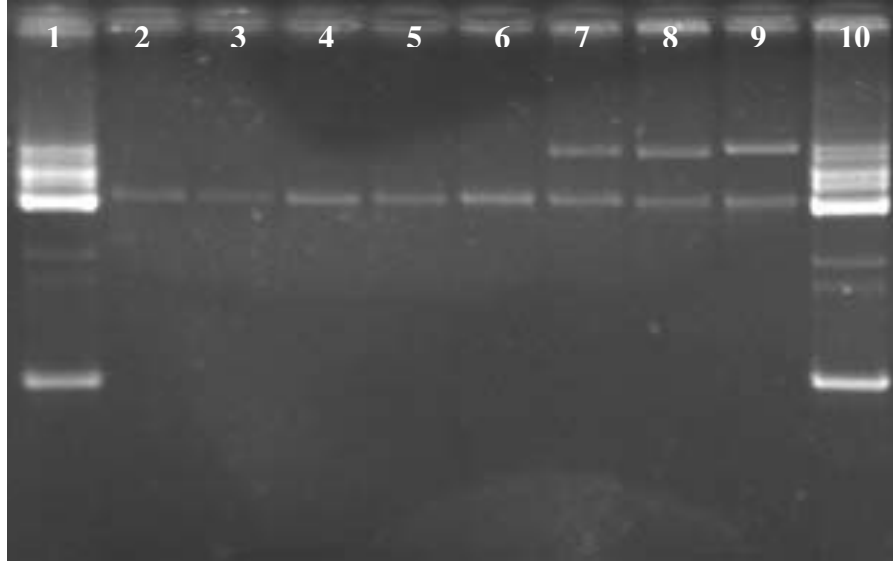
*** : *L. lactis* subsp. *lactis* SIK83 (nisin üreticisi)

**** : *L. lactis* subsp. *lactis* JC17 (laktisin 481 üreticisi)

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 bakteriyosininin genetik doğasının incelendiği çalışmalarda, ilk aşamada klasik mutasyon denemesi sonucu seçilen mutantlar kullanılmıştır. Bakteriyosin üretim özelliğini sürdüren tüm mutantlarda 22.4 kb plazmid bulunurken, bu mutantlardan sadece söz konusu plazmidin giderilmesi sonucu bakteriyosin üretim fenotipi kaybolmuştur. Diğer yandan sadece 22.4 kb büyüklükteki plazmidi içeren bir mutantta da (MBLL9–118) bakteriyosin üretim yeteneği devam etmiştir (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10). Bu bulgular MBLL9 suşunda bakteriyosin üretiminin 22.4 kb plazmid tarafından kodlandığını kanıtlamaktadır.

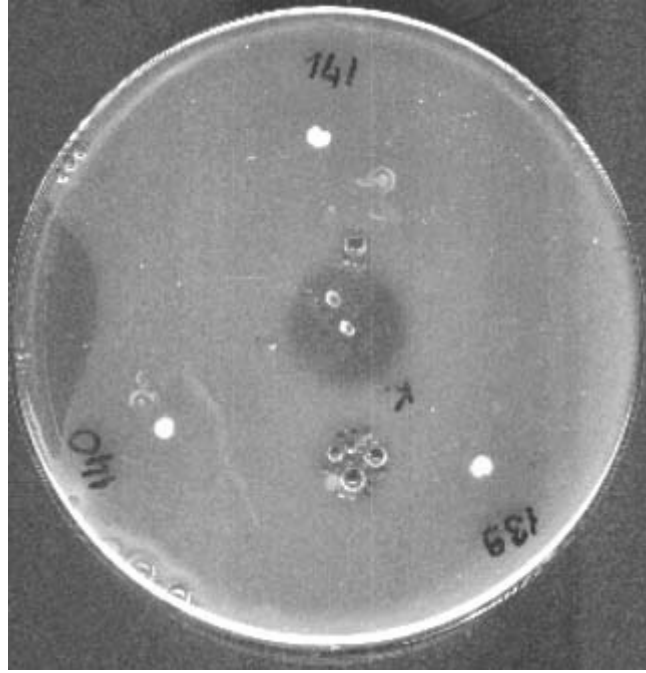
Gerek klasik mutasyon testlerinin kesinlik kazanması ve gerekse MBLL9 bakteriyosininin nihai tanısı amacı ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. İnhibitör aktivite ve enzim, sıcaklık ve pH denemelerine verdiği benzer yanıtlar nedeni ile laktisin 481 olduğu düşünülen MBLL9 bakteriyosininin, 22.4 kb plazmidi kullanılarak PZR esaslı tanısında, laktisin 481 primerleri kullanılmıştır. Jelden kesilerek saflaştırılan 22.4 kb plazmid yanında, toplam DNA ve plazmid DNA izolasyonları ile yürütülen tanımlayıcı PZR testlerinin tümünde laktisin 481 primerleri ile PZR ürünü (500–700 baz çifti arasında) elde edilmiştir (Şekil 4.11). Bu ürünlerin DNA dizi analizine tabi tutulması sonucu, çoğaltılan bölgenin Tn5721 transpozonunu, *LctA* geninin tamamını ve *LctM* geninin bir kısmını içeren operon bölgesi olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12). Bu bulgular, MBLL9 suşunun ürettiği bakteriyosinin laktisin 481 olduğunu, hiçbir kuşkuya yer bırakmayacak şekilde kanıtlamıştır.

L. lactis suşlarının ürettiği bakteriyosinler içerisinde yegane endüstriyel kullanım alanı bulan bakteriyosin nisindir. Ancak nisinin özellikle dar pH etkinliği ve saflaştırma yöntemlerinin düşük verim karakteristiği, bu bakteriyosinin gıda uygulamalarını sınırlandırmaktadır (Rastall and Maitin 2002, Riley and Wertz 2002). Bunun yanında, lantibiyotik sınıfının bir başka üyesi olan laktisin 481; gerek endüstriyel üretim süreçlerine uygunluğu ve gerekse tüketici sağlığı yönünden herhangi bir yan etki içermemesi nedeni ile, son yıllarda gıda düzeyli bakteriyosin uygulamalarının odağı haline gelmiştir (Twomey *et al.* 2002).



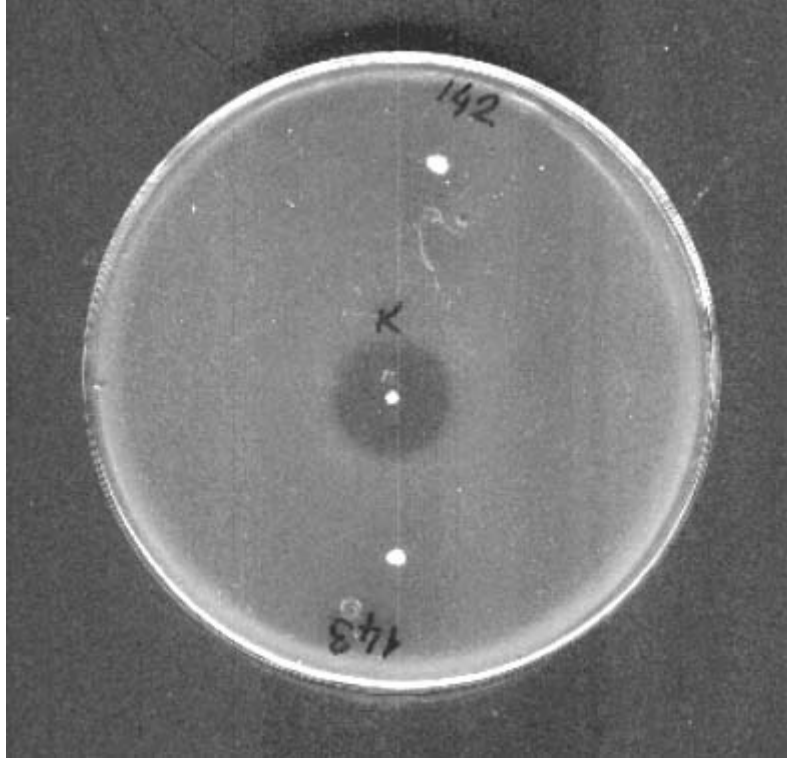
Şekil 4.6. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve mutantlarının plazmid içerikleri

1	MBLL9 (Bac ⁺)	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 15.4, 13.9, 7.6 kb
2	MBLL9-139 (Bac ⁻)	:	17.9 kb
3	MBLL9-140 (Bac ⁻)	:	17.9 kb
4	MBLL9-141 (Bac ⁻)	:	17.9 kb
5	MBLL9-142 (Bac ⁻)	:	17.9 kb
6	MBLL9-143 (Bac ⁻)	:	17.9 kb
7	MBLL9-144 (Bac ⁺)	:	22.4, 17.9 kb
8	MBLL9-145 (Bac ⁺)	:	22.4, 17.9 kb
9	MBLL9-146 (Bac ⁺)	:	22.4, 17.9 kb
10	MBLL9 (Bac ⁺)	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 15.4, 13.9, 7.6 kb



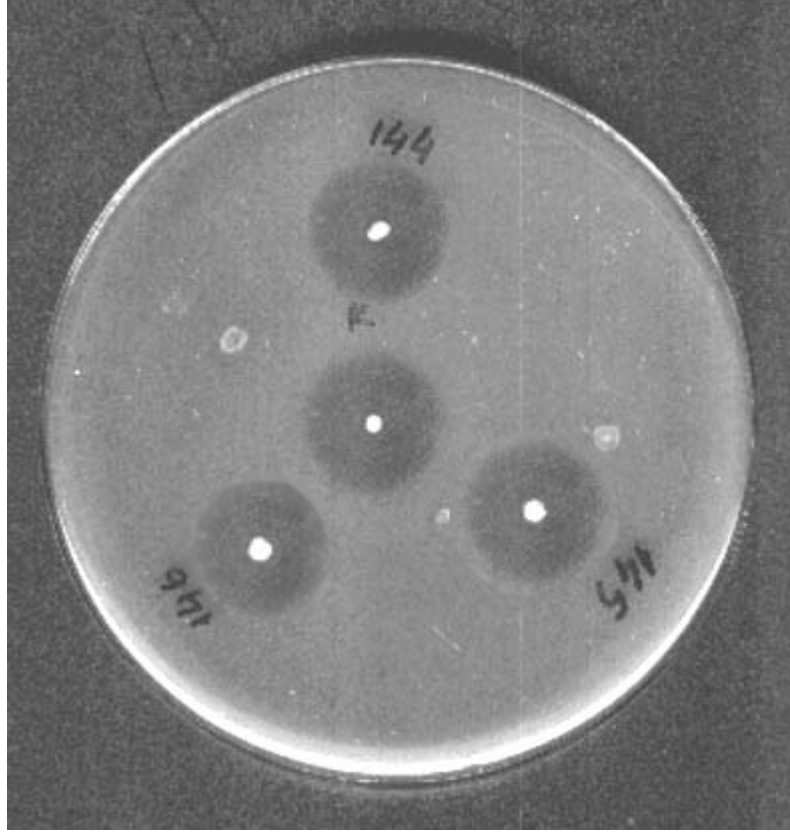
Şekil 4.7. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve laktisin 481 üretim yeteneğini kaybetmiş mutantların *Micrococcus luteus* NCIMB8166 indikatör suşuna karşı antibakteriyel etkinlikleri

- K (Kontrol) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9
- 139 (Mutant) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9–139
- 140 (Mutant) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9–140



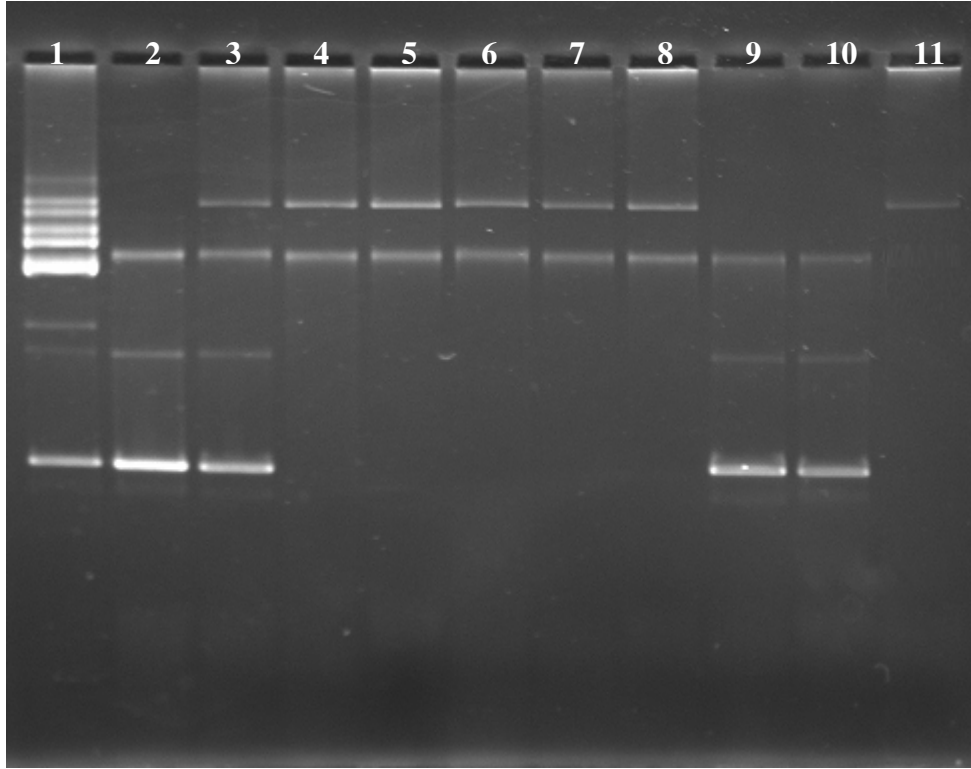
Şekil 4.8. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve laktisin 481 üretim yeteneğini kaybetmiş mutantların *Micrococcus luteus* NCIMB8166 indikatör suşuna karşı antibakteriyel etkinlikleri

- K (Kontrol) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9
142 (Mutant) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9-142
143 (Mutant) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9-143



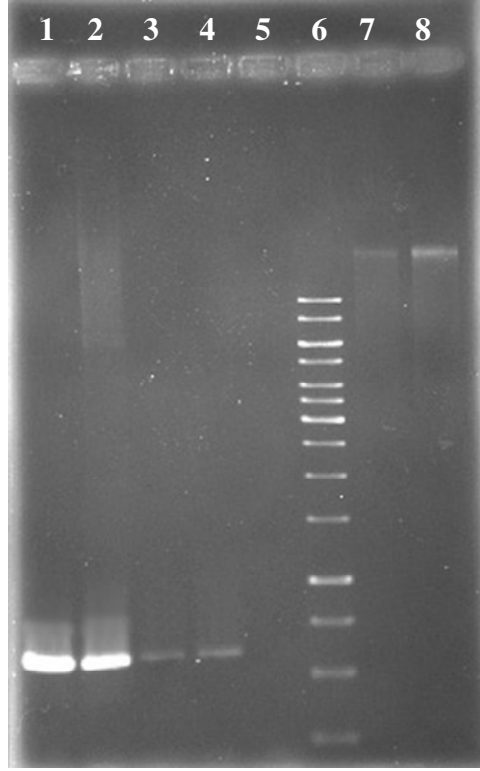
Şekil 4.9. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve laktisin 481 üretim yeteneğini kaybetmiş mutantların *Micrococcus luteus* NCIMB8166 indikatör suşuna karşı antibakteriyel etkinlikleri

- K (Kontrol) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9
144 (Mutant) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9-144
145 (Mutant) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9-145
146 (Mutant) : *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9-146



Şekil 4.10. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve bakteriyosin üretim yeteneği içeren ve içermeyen mutantlarının plazmid içerikleri

1	MBLL9	:	22.4, 21.5, 20.1, 19.0, 17.9, 15.4, 13.9, 7.6 kb
	(Bac ⁺)		
2	MBLL9-105	:	17.9, 13.9, 7.6 kb
	(Bac ⁻)		
3	MBLL9-100	:	22.4, 17.9, 13.9, 7.6 kb
	(Bac ⁺)		
4	MBLL9-111	:	22.4, 17.9 kb
	(Bac ⁺)		
5	MBLL9-112	:	22.4, 17.9 kb
	(Bac ⁺)		
6	MBLL9-113	:	22.4, 17.9 kb
	(Bac ⁺)		
7	MBLL9-114	:	22.4, 17.9 kb
	(Bac ⁺)		
8	MBLL9-115	:	22.4, 17.9 kb
	(Bac ⁺)		
9	MBLL9-116	:	17.9, 13.9, 7.6 kb
	(Bac ⁻)		
10	MBLL9-117	:	17.9, 13.9, 7.6 kb
	(Bac ⁻)		
11	MBLL9-118	:	22.4 kb
	(Bac ⁺)		



Şekil 4.11. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 tarafından üretilen bakteriyosinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) esaslı tanısı

- 1 Genomik DNA örneği PZR ürünü
- 2 Toplam plazmid DNA örneği PZR ürünü
- 3 22.4 kb plazmid DNA PZR örneği
- 4 22.4 kb plazmid DNA PZR örneği
- 5 Negatif kontrol
- 6 1 kb DNA Marker : 10, 8.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 kb
- 7 22.4 kb plazmid jel saflaştırma örneği
- 8 22.4 kb plazmid jel saflaştırma örneği

Şekil 4.12 Laktisin 481 primerleri ile çoğaltılan gen bölgesinin DNA dizi analizi

5'-GGTCGGCTTTACCAGTACGGGAGTGCTTTAAATGTCAGAACAAAACTCTTTTA
ATCTTCTTCAAGAAGTGACAGAAAGTGAATTGGACCTTATTTTAGGTGCAAAAG
GCGGCAGTGGAGTTATTCATACAATTTCTCATGAATGTAATATGAATAGCTGGCA
ATTTGTATTTACTTGCTGCTCTTAATTTTATTGAAAAGAAATTATATTCTATGGAG
CAATGATTAATTATTGCTCCTTTCTTTTTATAAATCGTAATCTTTAGCAAATGATA
AAAGAGGTGTAATTACCTTTTTAGATGAATAGCAACATAAGGACAAAATAGTGA
AAAAAAGACTTACCAATTTGAAAAATTTTTAAAAAATACTTTTGATCAATTTTC
TATTAAGCAAAATGAAGTTCTGGTTGAAGATGATTTAAACGATATAATTATGAAC
GTTTGTGGAAAAGCACTTGTTTTGATGATAAATGAAAAAAGAGAAATGAATCTA
TTAATGGGCAATACACCCAGAGGAAAGGTACCAATATTTTGAAAATGAGTATTC
GAGTCGGGGGTAAAAGCTTTAA-3'

*Altı çizili bölge laktisin 481 yapısal genidir (*lctA*)

Lantibiyotiklerin bir üyesi olan laktisin 481 üretimi ve dirençliliğinden sorumlu genler, nisinde olduğu gibi, *L. lactis* subsp. *lactis* genomunda operonlar halinde yer almaktadır. Tamamı *lanAMTFEG* olarak ifade edilen bu gen grubunda, *lanA* yapısal proteinin (*LctA*), *lanM* geni modifikatör proteinin (*LctM*), *lanT* geni ABC sınıfı transporter proteinin (*LctT*) ve *lanFEG* genleri ise laktisin 481 dirençlilik sisteminin (*LctFEG*) üretiminden sorumlu bulunmuştur. Çok sayıda laktisin üreticisinde bu gen grubunun, konjugatif özellikteki kompozit transpozonlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Dufour *et al.* 2000, Uguen *et al.* 2005). Laktisin 481, özellikle düşük pH içeren konserve gıdaların ve fermente süt ürünlerinin gıda kökenli patojen ve hastalık etmeni bakterilerden korunması amacı ile yaygın bir şekilde kullanılan nisin ile büyük ölçüde benzer bir antimikrobiyel etkinlik spektrumu içermektedir. Bunun yanında nisinle kıyaslandığında en önemli avantajı, daha geniş bir pH aralığında aktivitesini korumasıdır. Bu özelliği laktisin 481'e nisinden daha geniş bir gıda uygulama potansiyeli kazandırmaktadır (Dufour *et al.* 2000, Chen and Hoover 2003, Florez *et al.* 2005). Laktisin 481 ile yapılan pilot ölçek uygulamalar, bu bakteriyosinin gıda koruma ajanı olarak kullanımının nisine alternatif oluşturacak bir potansiyel taşıdığına işaret etmektedir. Halen saflaştırma, geri kazanma ve *L. lactis* suşlarında yüksek laktisin üretim özelliği geliştirme çalışmaları sürdürülmektedir. Diğer yandan, nisin üretici suşların fermentasyon süreçlerinde starter kültür bileşeni olarak kullanımı giderek yaygınlık kazanmaktadır. Laktisin 481 gen grubunun moleküler düzeyde tanısı, gıda düzeyli vektör sistemlerin geliştirilmesinde ve bu genlerin peynir olgunlaştırma süreçlerinde biyolojik saat olarak kullanımında yeni uygulama alanları doğurmuştur. Özellikle peynir üretim süreçlerinde proteolizin hızlandırılması ve olgunlaştırma süresinin kısaltılması uygulamalarında laktisin 481 esaslı vektör sistemlerinden yararlanılmaktadır (Florez *et al.* 2005, Garde *et al.* 2006, Dufour *et al.* 2007).

Bu çalışmada MBLL9 suşunun laktisin 481 üretim yeteneği 6400 AU/mL olarak tespit edilmiştir. Bu oran literatür verilerinde tanımlanan yüksek bakteriyosin üretim sınırları içerisinde (Dufour *et al.* 2007). Diğer yandan karbonhidrat yan grupları ile agregat oluşturma yeteneği, üretim ortamında bakteriyosinin geri kazanımını ve saflaştırılmasını basitleştirmesi yanında, etkinliğinin artırılmasında da uygulama kolaylığı kazandıracak bir özelliktir.

4.7. Antibiyotik Dirençlilik

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 suşu ile yürütülen antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda, bu suşun test edilen 26 farklı antibiyotikten sadece üçüne (sulfadiazin, trimethoprim ve basitrasin) karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. Diğer 23 antibiyotiğe karşı ise değişik düzeylerde duyarlılık tespit edilmiştir. MBLL9 doğal suşunun, değişik plazmidleri giderilmiş ya da plazmid içermeyen mutantlarında ise, antibiyotik dirençlilik bakımından herhangi bir farklanma meydana gelmemiştir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.6, 4.10 ve Çizelge 4.6). Bu bulgular, MBLL9 suşunda sulfadiazin, trimethoprim ve basitrasin dirençliliğinin kromozomal DNA kökenli olduğuna işaret etmektedir. Mutantlar ile doğal suş arasında bazı antibiyotikler için belirlenen zon çapı değişimlerinin ise, duyarlılık düzeylerini değiştirmeyecek oranlarda olduğu saptanmıştır. Bu durum büyük olasılıkla agarlı ortamlardaki difüzyon değişimlerinden ileri gelmektedir.

L. lactis üyeleri genellikle Gram-pozitif bakterilere karşı etkili antibiyotiklere (makrolidler, basitrasin, eritromisin, linkomisin, novobiosin, teikoplanin ve vankomisin gibi), geniş spektrumlu antibiyotiklere (rifampisin, spektinomisin ve kloramfenikol gibi) ve β -laktam grubu antibiyotiklere (penisilin, ampisilin, amoksisilin, piperasilin, tikorsisilin ve imipenem gibi) duyarlılık içermektedir. Tetrasiklin, sefolothin, nitrofurantoin ve sefotetan duyarlılık suştan suşa farklılık göstermektedir. Diğer yandan çoğu laktokok suşu; metronidazol, sefoksitin ve trimethoprime, Gram-negatif bakterilere etkili antibiyotiklere (fusidik asit, nalidiksik asit ve polimiksin B gibi), amigdalinlere, gentamisine ve kanamisine karşı ise dirençli bulunmuştur (Tammermann *et al.* 2003, Florez *et al.* 2005). Laktobasillerde belirlendiği gibi, bazı nadir *L. lactis* suşları kloramfenikol, klindamisin, streptomisin, eritromisin ve tetrasikline karşı dirençlilik içermektedir. Laktokoklarda tanımlanan antibiyotik dirençli suşların çoğunluğunda bu özelliklerin kromozomal DNA kökenli oluşu ve genetik aktarımlarının gerçekleşmemesi, bu genlerin popülasyondaki frekansını düşük tutan ana unsurdur. Bununla birlikte, özellikle son yıllarda plazmid kodlu çoklu antibiyotik dirençlilik yeteneğine sahip *L. lactis* suşlarının tanımlanması, söz konusu bakterilerde direnç gelişimini hızlandırmaktadır. Antibiyotik direnç mekanizmaları üzerinde yürütülen detaylı biyokimyasal çalışmalar sonucunda, bu bakterilerdeki genel detoksifikasyon sistemlerinin, minimal inhibisyon konsantrasyonlarını indüklediği de belirlenmiştir (Perreten *et al.* 1997, Tammermann *et al.* 2003, Ammor *et al.* 2007). Bu çalışmada *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda tanımlanan basitrasin dirençlilik,

laktokokların genel antibiyotik duyarlılık karakteristikleri ile uyuşmamaktadır. İnsanlarda ve bazı kümes hayvanlarında tedavi amaçlı uygulamaları bulunan basitrasın dirençliliğinin MBLL9 suşunda gelişimi, yeni bir veri niteliği taşımaktadır. İnsan sütünden *L. lactis* subsp. *lactis* izolasyonlarının gerçekleştirildiği göz önünde bulundurulur ise, basitrasın dirençliliği bu suşun kökeninin gözden geçirilme zorunluluğu ortaya çıkarmaktadır. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda tanımlanan sınırlı antibiyotik direnç özelliklerinin kromozomal DNA kökenli oluşu, bu bakterinin gıda düzeyli uygulamalarda güvenle kullanılabilmesine işaret etmektedir.

Çizelge 4.6. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve mutantlarının antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik adı	Konsantrasyon	İnhibisyon Zonu Çapı (mm)							
		MBLL9	MBLL9- 44	MBLL9-47	MBLL9- 53	MBLL9- 105	MBLL9-110	MBLL9-139	MBLL9-145
Ampisilin/sulbactam (SAM)	20µg	21	23	29	27	25	29	18	25
Rifampisin (RD)	5µg	3	3	4	5	3	-	3	4
Novobiosin (NV)	5µg	13	11	9	11	13	12	8	14
Eritromisin (E)	15µg	20	18	25	24	20	22	13	21
Gentamisin (GM)	10µg	7	9	12	11	13	13	5	10
Meropenem (MEM)	10µg	27	29	32	30	25	28	22	26
Klindamisin (DA)	2µcg	21	22	25	20	22	22	14	19
Metisilin (MET)	5µg	16	18	18	21	14	19	12	16
Azitromisin (AZM)	15µg	19	19	21	20	16	15	9	14
Kloramfenikol (C)	30µg	21	20	23	25	19	20	12	19
Ceftazidim/Klavulanik Asit (CZC)	30µcg/10µcg	6	6	13	7	6	7	7	9
Streptomisin (S)	10µg	2	2	7	5	5	3	2	4
Spektinomisin (SPT)	100µg	11	9	20	14	14	13	11	15
Sulfadiazin (SD)	0.25mg	-	9	-	8	6	-	-	-
Amikasin (AK)	30µg	4	6	8	8	9	8	4	6
Seftriakson (CRO)	30µg	17	23	27	27	24	25	17	25
Tetrasiklin (TE)	30µg	22	24	25	27	21	25	15	21
Ampisilin (AM)	10µg	21	27	27	27	24	26	19	23
Trimethoprim (TMP)	5µg	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamisin (K)	30µg	7	8	11	9	11	10	5	7
Vankomisin (VA)	30µg	13	15	15	16	15	17	10	14
Penisilin G (P)	10 units	19	26	28	27	24	30	19	23
Sefaklor (CEC)	30µg	14	18	18	19	19	21	13	16
İmpenem (IPM)	10µg	25	28	32	33	29	34	25	28
Basitrasin (B)	0.04U	-	-	3	3	-	3	-	-
Sefalozin (KZ)	30µg	14	17	22	22	18	24	14	19

-: Dirençli

4.8. Laktoz Fermentasyonu, Proteolitik Aktivite ve Laktisin 481 Üretiminden Sorumlu Plazmidleri Giderilen Mutantların Üreme Kinetikleri

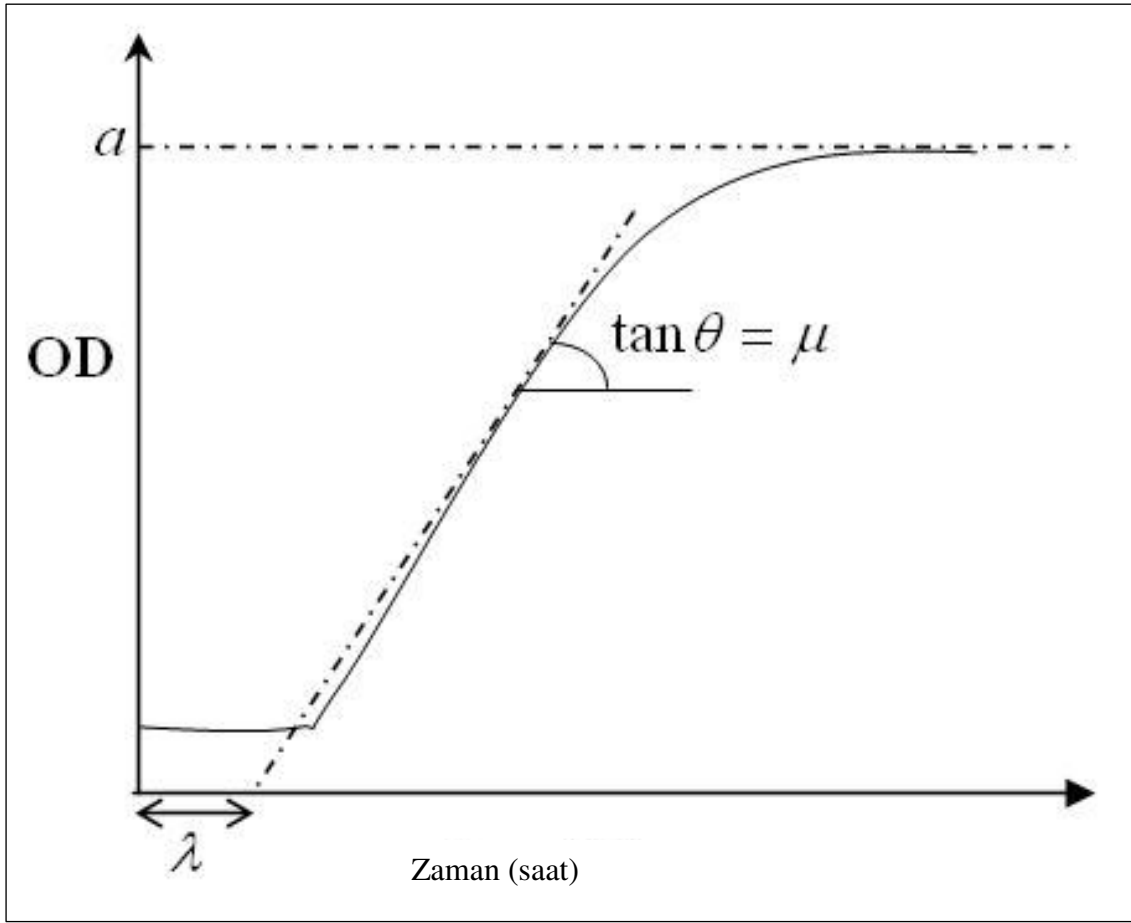
L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşunun ve mutantlarının M17 ortamlarında zamana karşı gelişme eğrileri, üreme ortamından 15 dakikalık aralıklarla alınan örneklerin optik yoğunlukları belirlenerek çıkarılmıştır (Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17 ve Çizelge 4.7). *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşun ve mutantlarının gelişme eğrileri çıkarılırken, Zwietering *et al.* (1990, 1991) tarafından önerilen matematiksel modelden yararlanılarak model grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.13). Bu testler sonucunda doğal suşun yaklaşık 2 saatlik bir lag faz ve 6 saatlik bir logaritmik faz içerdiği saptanmıştır (Şekil 4.14). Laktoz/proteolitik aktivite ve laktisin 481 üretimini kodlayan her iki plazmidi de içeren MBLL9–47 mutantında gelişme kriterleri, doğal suş ile tamamen aynı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.15). Diğer yandan, MBLL9–47' den plazmid profili bakımından tek farkı laktoz/proteolitik aktiviteden sorumlu plazmidi içermemek olan MBLL9–44 mutantında lag faz uzamış ve maksimum gelişme oranı % 45 oranında düşmüştür (Şekil 4.16). Tüm plazmidleri giderilmiş MBLL9–162 mutantında da, benzer sonuçlar elde edilmiş ve maksimum gelişme oranı % 61 düzeyinde düşmüştür (Şekil 4.17). *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve mutantlarında yürütülen gelişme kinetiği çalışmaları; laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite özelliklerini kodlayan 21.5 kb büyüklükteki plazmidin, bu suşun üreme ortamına adaptasyonu ve gelişme yeteneğini doğrudan etkilediğini göstermiştir. Diğer yandan suşun içerdiği laktisin 481 üretiminden sorumlu plazmid ya da kriptik plazmidlerin üreme yeteneğini etkilemediği belirlenmiştir. Bu bulgular MBLL9 suşunda laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite özelliğinden sorumlu plazmidin doğru tanımlandığını kanıtlamaktadır.

Değişik araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarda, laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite özelliklerini kodlayan plazmidlerin, *L. lactis* suşlarının maksimum gelişme hızı ve oranı üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmalarda laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite özelliklerini kontrol eden plazmidlerin farklı replikonlar olması durumunda; laktoz plazmidini içeren (Lac^+) ancak proteolitik aktiviteyi kontrol eden plazmidi kaybetmiş mutantlarda (Prt^-), Lac^- ve Prt^+ mutantlara oranla maksimum gelişme hızı ve oranının daha az etkilendiği belirlenmiştir. Araştırmacılar bu durumu, sınırlı proteolitik aktivitenin kromozomal DNA kökenli proteinaz sistemlerinden kaynaklanması ile açıklamıştır. Araştırmamızdaki bulgular ile paralel şekilde, her iki plazmidi de

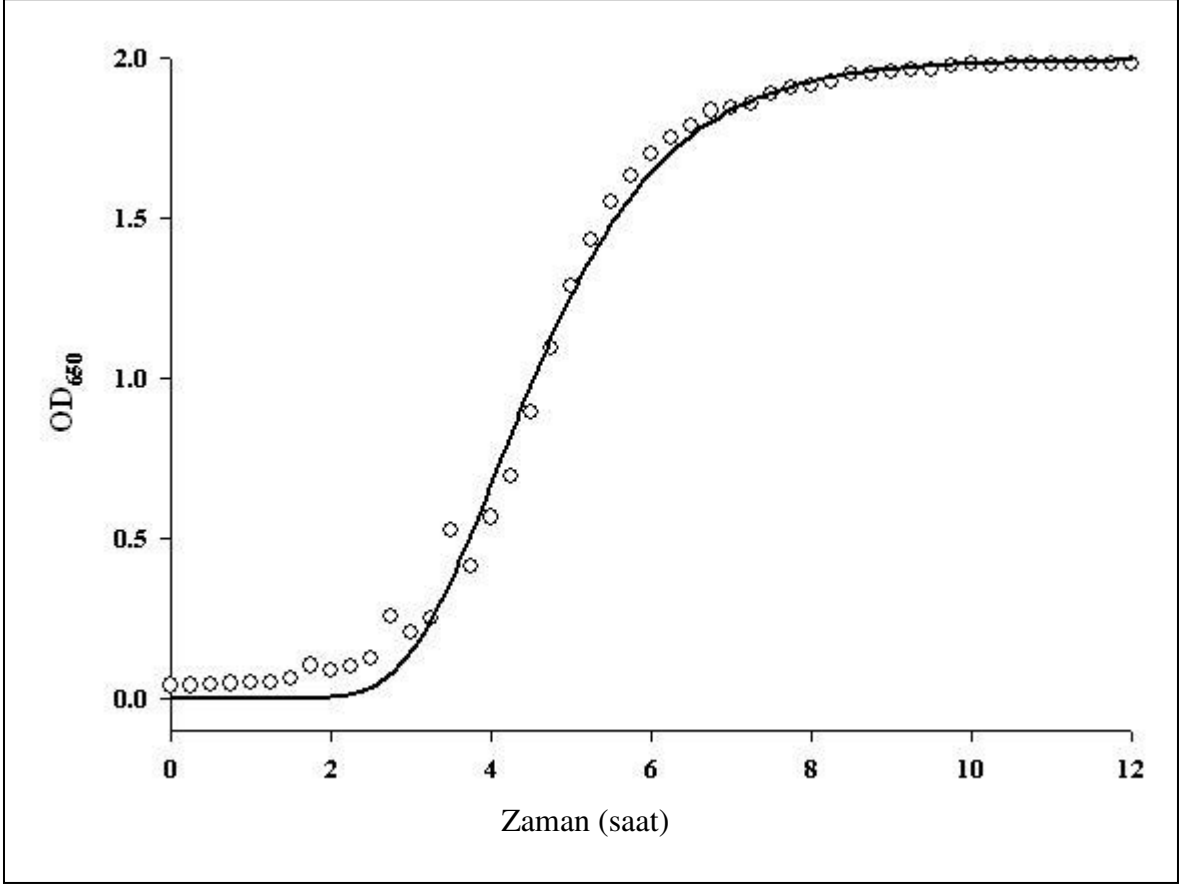
kaybetmiş mutantlarda *L. lactis* suşlarının gelişme kinetiklerinde en yüksek düzeyde düşme belirlenmiştir (Kobayashi *et al.* 2002, Kibeom and Seung-Heyon 2003, Kobayashi *et al.* 2003). Türkiye kökenli *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite yeteneğinin aynı plazmid üzerinde kodlu oluşu; özellikle stres koşullarına bağlı olarak kaybı halinde, bu bakteride maksimum gelişme hızını ve oranını önemli ölçüde düşüreceğinden bir dezavantaj olarak görülebilir. Bununla birlikte, laktoz plazmidlerinin laktokoklarda yüksek stabilite içerdiği bilinmektedir (Mills *et al.* 2006). Stabilite çalışmalarından elde edilecek verilerin, bu literatür bilgisini desteklemesi halinde ise, MBLL9 suşundaki söz konusu metabolik özellikleri kodlayan plazmid, endüstriyel uygulamalar için bu bakteriye öncelik kazandıracaktır.

Çizelge 4.7. Model denklem (Gompertz denklemi) parametreleri. Denklem değişkenleri \pm % 95 güven aralığındadır. Çizelgede yer alan ifadelerden; R^2 saptama katsayısını, MSE ortalama hata karesini, a azami değeri, μ azami özgül büyüme hızını ve λ uyum süresini ifade etmektedir. Aynı sütundaki değişik harfler $p < 0.05$ ' deki anlamlı farklılıkları belirtmektedir.

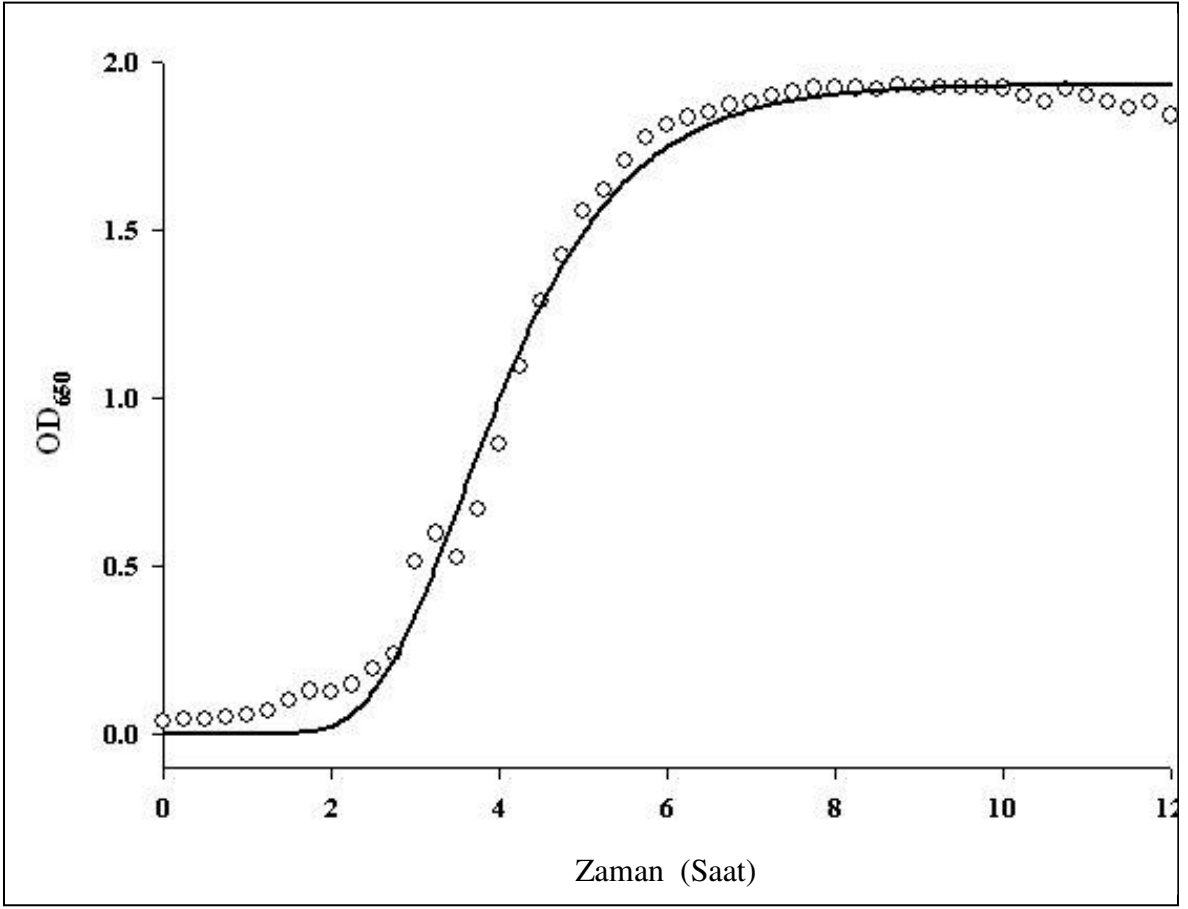
Doğal suş ve mutantları	Denklem Değişkenleri				
	a (—)	μ (h^{-1})	λ (h)	R^2	MSE
MBLL9	1.99 ± 0.03^A	0.64 ± 0.05^X	2.95 ± 0.13^x	0.995	0.0038
MBLL9-47	1.93 ± 0.03^A	0.67 ± 0.06^X	2.50 ± 0.14^y	0.992	0.0047
MBLL9-44	0.80 ± 0.02^B	0.29 ± 0.04^Y	2.74 ± 0.21^{xy}	0.984	0.0017
MBLL9-162	0.78 ± 0.02^B	0.39 ± 0.08^Y	3.42 ± 0.22^z	0.976	0.0027



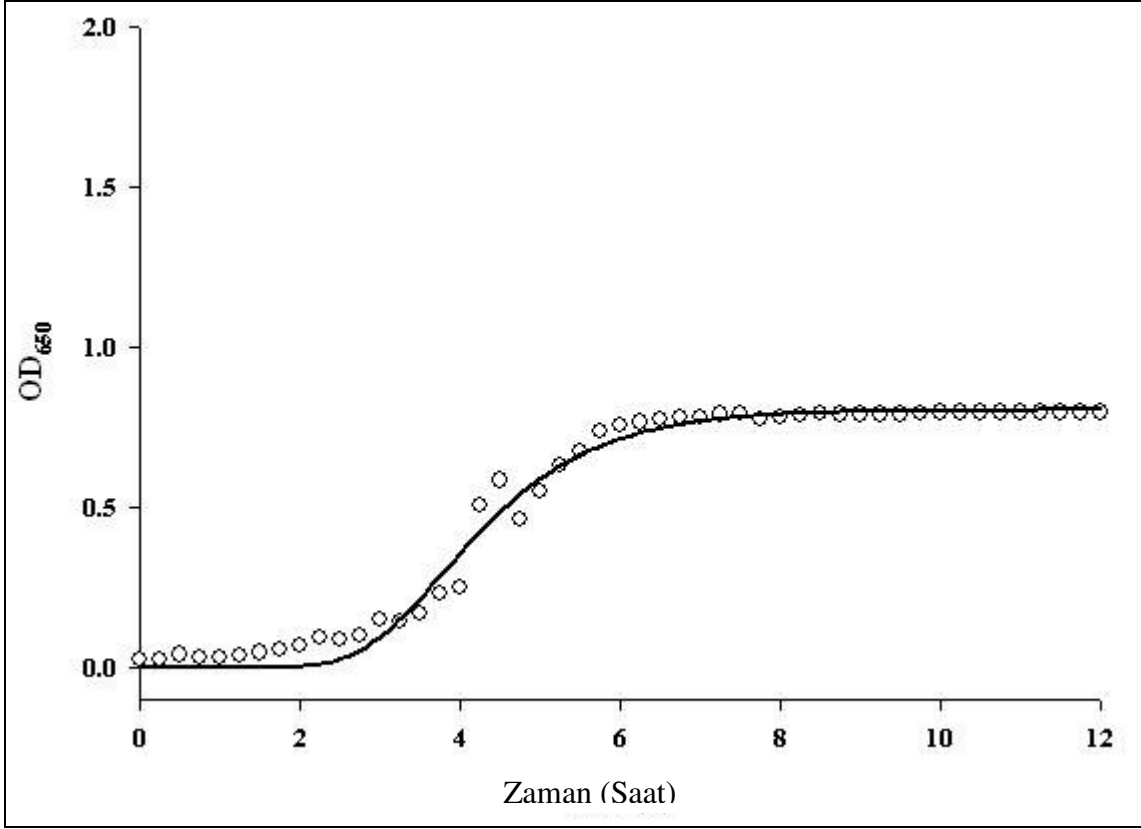
Şekil 4.13. Gelişme eğrilerinin çıkarılmasında esas alınan model grafiği



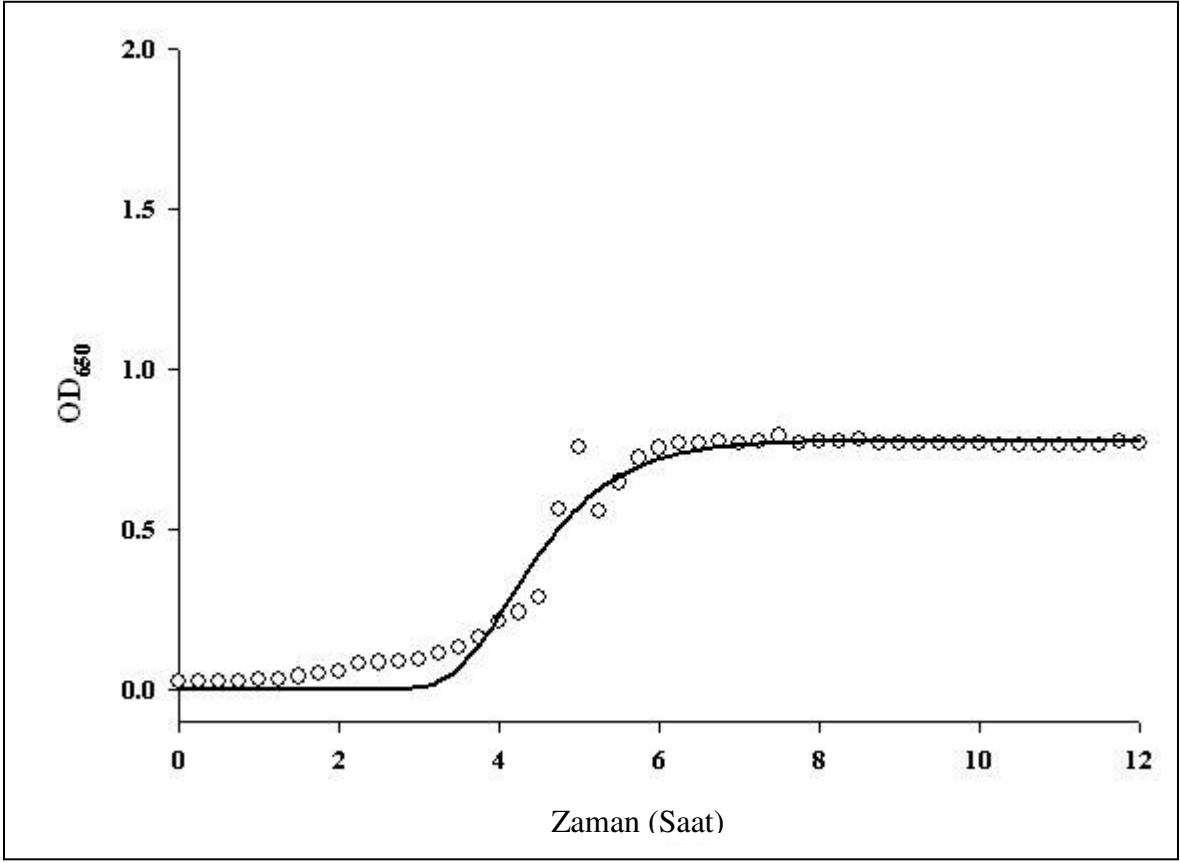
Şekil 4.14. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşunun zamana karşı gelişme eğrisi



Şekil 4.15. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9-47 mutantının zamana karşı gelişme



Şekil 4.16. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9-44 mutantının zamana karşı gelişme eğrisi



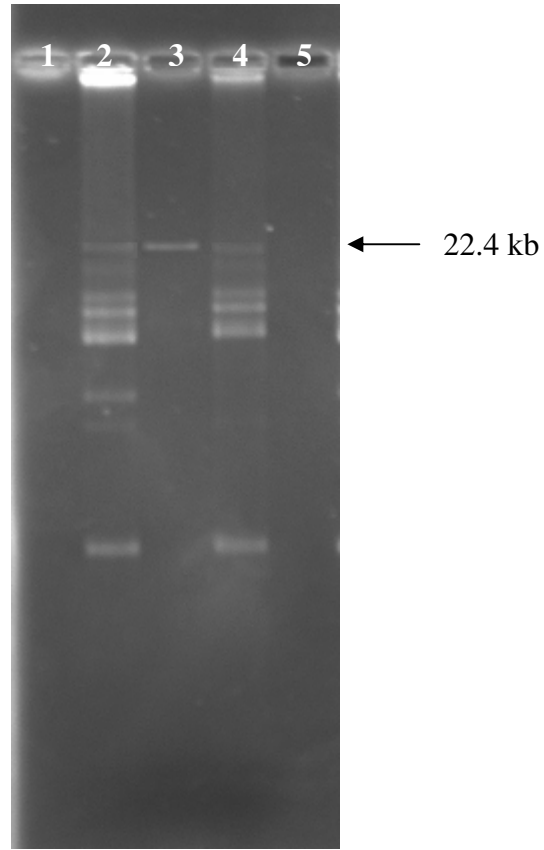
Şekil 4.17. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9-162 mutantının zamana karşı gelişme eğrisi

4.9. Konjugasyon

L. lactis subsp. *lactis* MBLL9'da konjugatif yeteneğin belirlenmesi için, bu suş verici olarak kullanılmış ve eritromisin dirençlilik (5 µg/ mL) içeren, plazmidsiz *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 alıcı suşu ile filtre üzerinde eşleştirme denemeleri yürütülmüştür. Konjugant seçiminde ilk aşamada eritromisin içeren laktoz indikatör agar kullanılmıştır. Bu ortamda hiç laktoz fermentasyon yeteneği içeren koloni tanımlanamamıştır. İkinci aşamada, laktoz indikatör agar üzerinde seçilen koloniler fast slow differential agar (FSD) ortamına alınmıştır. Bu ortamda da tüm eritromisin dirençli koloniler laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite yeteneğinden yoksun tespit edilmiştir. Son aşamada söz konusu koloniler, indikatör suş *Micrococcus luteus* NCIMB8166'ya karşı denenmiş ve bazı kolonilerin laktisin 481 üretme yeteneğinde olduğu saptanmıştır. Bu durum doğal suşta konjugasyonel hareketlilik içeren yegane plazmidin 22.4 kb büyüklükteki plazmid olduğunu kanıtlamaktadır (Şekil 4.18). Laktisin 481 plazmidinin konjugasyon sıklığı, verici hücre başına 4.6×10^{-4} olarak belirlenmiştir.

Etkin bir yatay gen transferi olması nedeni ile konjugasyon, laktokokların evriminde anahtar rol oynamaktadır. Bu bakteriler bitkisel habitatlarından süt ortamına geçerken, laktoz plazmidini konjugasyon yolu ile kazanmıştır. Laktoz plazmidleri laktokoklarda halen büyük ölçüde konjugatif yeteneklerini sürdürmekte ve bu sayede yüksek stabilite göstermektedir. Diğer yandan; proteolitik aktivite, faj dirençlilik ve bakteriyosin üretimi gibi endüstriyel özellikleri kodlayan plazmidlerin de laktokoklarda konjugatif hareketlilik içeren türleri tanımlanmış ve konakçılarında yüksek stabilite içerdikleri belirlenmiştir (Stentz *et al.* 2004, Luo *et al.* 2005). Konjugatif özellik içeren plazmidlerin buldukları konakçılardaki stabiliteyi, yüksek sıklıkta aktarım yetenekleri ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle tanımlanan plazmidlerde konjugatif yeteneğin biyokimyasal ve genetik doğasının belirlenmesi de önem taşımaktadır (Luo *et al.* 2005). Araştırmamızda konjugatif özellikte tanımlanan laktisin 481 plazmidinin konjugasyon sıklığının yüksek oluşu, gerek bu özelliğin stabilitesine ve gerekse endüstriyel starter kültür suşu geliştirme çalışmaları açısından taşıdığı ciddi potansiyele işaret etmektedir. Zira konjugasyonel aktarım, genetik yapısı zenginleştirilmiş (GEO) *L. lactis* suşlarının eldesinde kullanımına izin verilen yegane genetik aktarım yöntemidir (Makarova and Konin 2007). *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda tanımlanan laktoz fermentasyonu/proteolitik aktivite plazmidinin

konjugal hareketlilik içermemesi, laktokoklarda nadir rastlanılan bir durumdur. Söz konusu plazmidin DNA dizi analizleri, evrimsel kökeni hakkında daha detaylı bilgi sunabilir.



Şekil 4.18. Laktisin 481 üretminden sorumlu plazmidin konjugal aktarımı

- 1 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 alıcı suş
- 2 *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 verici suş
- 3 *L. lactis* subsp. *lactis* MN30 (Konjugant)
- 4 *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 verici suş
- 5 *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 alıcı suş

4.10. *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 Suşunda Endüstriyel Öneme Sahip Özelliklerinin Genetik Stabilitesi

L. lactis starter kültür suşu geliştirme çalışmalarında, üstün endüstriyel yeteneklere sahip bakterilerin tanımlanması ve karakterizasyonu kadar, bu özelliklerin stabilitesinin belirlenmesi de önem taşımaktadır. Zira çoğunluğu plazmid kökenli olan bu özelliklerin, üretim koşullarından kaynaklanan stres faktörlerinin etkisi ile suşlardan kaybı sonucu starter kültür performansı önemli ölçüde düşmektedir (Venema 1993, O'Sullivan *et al.* 2001).

L. lactis subsp. *lactis* MBL9 suşunda plazmid stabilitesi, % 10 reconstitute skim milk (Oxoid Ltd., England) ortamında 10 pasaj (~ 70 generasyon) geliştirilen kültürlerin plazmid içerikleri tanımlanması suretiyle belirlenmiştir. Testler sonucunda örneklenen 100 koloninin 98'inde laktoz ve proteolitik aktivite özelliklerini beraber kodlayan plazmidin, 96'sında ise laktisin 481 üretiminden sorumlu plazmidin varlığı tespit edilmiştir. Laktisin 481 üretiminden sorumlu plazmidin aktarıldığı konjugant olan *L. lactis* subsp. *lactis* MN30' da ise 22.4 kb plazmidin stabilitesi % 100 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Gerek doğal suş ve gerekse laktisin 481 plazmidini aktarılan konjugantta belirlenen plazmid stabilite oranları, endüstriyel starter kültür suşları için tanımlanan düzeylerin çok üzerindedir (Mills *et al.* 2006). Özellikle konjugatif özellik içermeyen laktoz fermentasyonunu ve proteolitik aktiviteyi kodlayan plazmidin çok yüksek bir stabiliteye sahip olması, suşun süt ortamında gelişme karakteristikleri açısından hayati önem taşımaktadır. Ancak bu stabilite pilot üretim ölçeğinde denendikten sonra endüstriyel üretim için kesin bilgi verebilir. Diğer yandan laktisin 481 plazmidinin alıcı suşta doğal suştan daha yüksek bir stabilite oranı içermesi, yeni konakçıda daha yüksek kopya sayısı ile regüle ediliyor oluşundan kaynaklanabilir. Bu durumun açıklığa kavuşması için söz konusu plazmidin replikasyon orijin fonksiyonlarının ve kopya sayısı genlerinin detaylı analizi zorunludur.

Çizelge 4.8. Doğal tip *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşu ve laktisin 481 plazmidi aktarılmış konjugantında endüstriyel özellikleri kodlayan plazmidlerin stabilitesi

Doğal Suş ve Konjugant Kod No.	Plazmid Büyüklüğü (kb)	Kontrol Ettiği Özellik ***	Stabilite %
MBLL9*	22.4	Lct 481 ⁺	96
MBLL9	21.5	Lac ⁺ /Prt ⁺	98
MN30**	22.4	Lct 481 ⁺	100

* *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 (Doğal suş)

** *L. lactis* subsp. *lactis* MN30 (Konjugant)

*** Lac⁺: Laktoz fermentasyonu; Prt⁺: Proteolitik aktivite; Lct 481⁺: laktisin 481 üretimi

KAYNAKLAR

- Akçelik, M. and Tunail, N. 1992. A 30 kd cell wall protein produced by plasmid DNA which encodes inhibition of phage adsorption in *L. lactis* subsp. *lactis* P25. *Milchwissenschaft*, 47: 215–217.
- Akçelik, M. 1998. A phage DNA injection-blocking type resistance mechanism encoded by chromosomal DNA in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Milchwissenschaft*, 53: 619–622.
- Akçelik, M. 1999. The conjugal plasmid pLL10236 encodes lactose fermentation ability, restriction/ modification activity, bacteriocin production and immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102. *Food Microbiol.*, 16: 487–494.
- Akçelik, M. and Şanlıbaba, P. 2002. Characterization of an exopolysaccharide preventing phage adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MA39. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 26: 1151–1156.
- Akçelik, O., Tükel, Ç., Özcengiz, G. and Akçelik, M. 2006. Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates. *Mol. Nut. Food Res.*, 50: 306–313.
- Allison, G.E. and Klaenhammer, T.R. 1998. Phage resistance mechanism in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 8: 207–226.
- Ammor, M.S., Florez, A.B. and Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, 24: 559–570.
- An, H.Y., Tsuda, H. and Miyamoto, T. 2006. Expression of citrate permease gene of plasmid pcM1 isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* NIAI N-7 in *Lactobacillus casei* L-49-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: 609–616.

- Anderson, D.G. and McKay, L.L. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 549–552.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M. and Sherris, J.C. 1966. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Pathol.*, 19: 493–496.
- Beasley, S.S. and Saris, P.E.J. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5051–5053.
- Belhocine, K., Yam, K.K. and Cousineau, B. 2005. Conjugative transfer of the *Lactococcus lactis* chromosomal sex factor promises dissemination of the L1.LtrB Group II intron. *J. Bacteriol.*, 187: 930–939.
- Belhocine, K., Mak, A.B. and Cousineau, B. 2007. Trans-splicing of the L1.LtrB Group II intron in *Lactococcus lactis*. *Nuc. Acid. Res.*, 35: 2257–2268.
- Bickle, T.A. and Kruger, D.H. 1993. Biology of DNA restriction. *Microbiology Rev.*, 57: 434–450.
- Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., Andolfi, R. and Moschetti, G. 2002. 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garreriae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence. *Analysis System Appl. Microbiol.*, 25: 520-527.
- Bron, P.A., Benchimol, M.G., Lambert, J., Palumbo, E., Deghorain, M., Delcour, J., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. and Hols, P. 2002. Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5663–5670.
- Brussow, H. and Desiere, F. 2001. Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol. Microbiol.*, 39(2): 213–222.

- Bulut, C., Güneş, H., Okuklu, B., Harsa, Ş., Kılıç, S., Çoban, H.S. and Yenidünya, A.F. 2005. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Çömlek peyniri from Cappadocia region. *J. Dairy Res.*, 72: 19–24.
- Buzrul, S., Öztürk, P., Alpas, H. and Akçelik, M. 2007. Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages. *LWT.*, 40: 1671–1677.
- Campbell, R.C. 1974. *Statistics for biologists*. Cambridge University Press, Second Edition, 385 p.
- Carbaco, R., Pin, C. and Rodrogez, A. 2004. Growth and metabolic behaviour of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 947 in anaerobic lactose-limited chemostat cultures. *European Food Research and Technology.*, 219: 277–281.
- Chang, S.M. and Yan, T.R. 2007. DNA sequence analysis of a cryptic plasmid pL2 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Biotechnology Letters*, 29: 1519–1527.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. and van der Donk, W.A. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.*, 105: 633–683.
- Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 82–100.
- Christensson, C., Pillidge, C.J., Ward, L.J. and O’Toole, P.W. 2001. Nucleotide sequence and characterization of the cell envelope proteinase plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 334–343.
- Citti, J.E., Sandine, W.E. and Elikler, P.R. 1963. Some observation on the Hull method for measurement of proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 46: 337–345.

- Coakley, M., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. 1997. Application and evaluation of the phage resistance and bacteriocin encoding plasmid pMC01 for the improvement of dairy starter cultures. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 63(4): 1434–1440.
- Corsetti, A., De Angelis, M., Dellaglio, F., Paporelle, A., Fox, P.F., Settoni, L. and Gobbetti, M. 2003. Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell wall protein analyses. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 641–654.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. 2003. A food-grade approach for functional analysis and modification of native plasmids in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 702–706.
- Dabard, J., Bridonneau, C., Philippe, C., Anglade, P., Molle, D., Nardi, M., Ladire, M., Girardin, H., Marcille, F., Gomez, A. and Fons, M. 2001. Ruminococcin A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4111–4118.
- Daly, C., Fitzgerald, G.F. and Davis, R. 1996. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 99–110.
- Desiere, F., Mc Shan, W.M., van Sinderen, D., Ferretti, J.J. and Brussow, H. 2001. Comparative genomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic Streptococci: evolutionary implications for pathogen-host interactions. *Virology*, 288: 325–341.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J. 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.*, 14: 273–285.
- de Vos, W.M. and Vaughan, E.E. 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 15: 217–237.

- de Vuyst, L., de Vin, F., Vaningelgem, F. and Degeest, B. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 11: 687–707.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S. and Nes, I.F. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, 178: 4472–4483.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. and Nes, I. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *PNAS*, 104: 2384–2389.
- Dinsmore, P.K. and Klaenhammer, T.R. 1995. Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1129–1136.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T. and Skah, N.P. 2007. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in-vitro angiotensin- converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, 86: 21–38.
- Dufour, A., Rince, A., Uguen, P. and Pennec, J.P. 2000. IS1675, A novel Lactococcal insertion element, forms a transposon like structure including the lactacin 481 lantibiotic operon. *J. Bacteriol.*, 182: 5600–5605.
- Dufour, A., Hindre, T., Haras, D. and Pennec, J.P. 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31: 134–167.
- Dupont, K., Janzen, T., Vogensen, F.K., Josephsen, J. and Stuer-Lauridsen, B. 2004. Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5825–5832.

- Elder, J.K., Amos, A., Southern, E.M. and Shippey, G.A. 1983. Measurement of DNA length by electrophoresis (I). *Analytical Biochemistry*, 128: 223–226.
- Elder, J.K. and Southern, E.M. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis (II): comparison of methods for planting mobility of fragment length. *Analytical Biochemistry*, 170: 38–44.
- Florez, A.B., Delgado, S. and Mayo, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can. J. Microbiol.*, 51: 51–58.
- Forde, A. and Fitzgerald, G.F. 1999. Bacteriophage defence system in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 89–113.
- Franz, C.M.A.P., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U. And Holzapfel, W.H. 1997. Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J. Basic. Microbiol.*, 37: 187-196.
- Furet, J.P., Queene, P. and Talliez, P. 2002. Quantification de bacteries lactiques parPCR quantitative. *Sci. Aliments*, 22: 33–44.
- Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O.P. and Kok, J. 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.*, 278: 34291–34298.
- Garde, S., Avila, M., Gaya, P., Medina, M. and Nunez, M. 2006. Proteolysis of Hispanico cheese manufactured using lacticin 481- producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 639. *J. Dairy Sci.*, 89: 840–849.
- Garvey, P., Fitzgerald, G.F. and Hill, C. 1995. Clonning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants for the lactococcal plasmid pNP40. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 4321–4328.

- Garvey, P., Hill, C. and Fitzgerald, G.F. 1996. The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affect phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 676–679.
- Gasson, M.J. and Davies, F.L. 1980. High frequency conjugation associated with donor cell aggregation in *Streptococcus lactis* 712. *J. Bacteriol.*, 143: 1260-1264.
- Göncü, A. and Alpkent, Z. 2005. Sensory chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yogurth or a commercial cheese culture as a starter. *Int. Dairy J.*, 15: 771–776.
- Guder, A., Wiedemann, I. and Sahl, H.G. 2000. Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics. *Biopolymers*, 55: 62–73.
- Haard, H.J.W., Bezemer, S., Ledebor, A.M., Müller, W., Poender, P.J., Moineau, S., Cappelmans, M.C., Verldeij, A.J., Frenken, L.G. and Verrips, C.T. 2005. Llama antibodies against a lactococcal protein located at the tip of the phage tail prevent phage infection. *J. Bacteriol.*, 187: 4531–4541.
- Hill, C. 1993. Bacteriophage in dairy starter culture technology. *Food Technology*, 38: 41–50.
- Holt, G.H., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Ninth Edition, 787 p.
- Horn, N., Fernández, A., Dodd, H.M., Gasson, M.J. and Rodríguez, J. 2004. Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin and non-nisin producing *Lactococcus lactis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5030–5032.
- Huggins, A.R. and Sandine, W.E. 1984. Differentiation of fast and slow milk coagulating isolates is strains of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 67(8): 1675-1679.

- Jivadipur, I. and Tunçtürk, Y. 2006. Effect of using interesterified and non-interesterified corn and palm oil blends on quality and fatty acid composition of Turkish white cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2: 1–10.
- Kibeom, L. and Seung-Heyon, M. 2003. Growth kinetics of *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* harboring different plasmid content. *Current Microbiology*, 47: 17–21.
- Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, M., Okamoto, T. and Ohmomo, S. 2004. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. *JARQ*, 38: 111–117.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39–86.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H. and de Vos, W.M. 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2): 788–792.
- Kobayashi, M., Nonura, M., Fujita, Y., Okamoto, T. and Ohmomo, S. 2002. Influence of Lactococcal plasmid on the specific growth rate of host cells. *Letters in Appl. Microbiol.*, 35: 403–408.
- Kobayashi, M., Nonura, M., Fujita, Y., Ohmomo, S. and Okamoto, T. 2003. Molecular characterization of a lactococcal plasmid reducing growth rate of host cells. *JARQ*, 37: 53–57.
- Kok, J. 1990. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol., Rev.* 7: 15–42.
- Kunji, E.R.S., Hagting, A., de Vries, C.J., Juillard, V., Haandrikman, A.J., Poolman, B. and Konings, W.N. 1995. Transport of β -casein derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 270: 1569–1574.

- Leroy, F. and de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 67–78.
- Lucey, M., Daly, C. and Fitzgerald, G.F. 1992. Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI 528 a 46 Kb plasmid encoding inhibition of bacteriophage adsorption. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2137-2143.
- Luo, H., Wan, K. and Wang, H.H. 2005. High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAM β 1 transmission by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 2970–2978.
- Macrina, F.L., Kopecko, D.J., Jones, K.R., Ayers, D.S. and McCoven, S.M. 1978. A multiple plasmid containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*, 1: 417–420.
- Macrina, F.L., Tobian, J.A., Jones, K.R., Evans, R.P. and Clewell, D.B. 1982. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*, 19: 345–353.
- Madera, C., Garcia, P., Janzen, T., Rodriguez, A. and Suarez, J.E. 2003. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *Int. J. Food. Microbiol.*, 86: 213–222.
- Makarova, K.S. and Koonin, E. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, 189: 1199–1208.
- McKay, L.L., Baldwin, K.A. and Zottola, E.A. 1972. Loss of lactose metabolism in lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 23 (6): 1090-1096.
- Meyers, J.A., Sanches, D., Elwell, L.P. and Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127: 1529-1537.

- Mills, S., McAuliffe, O., Coffey, A., Fitzgerald, F.G. and Ross, P.R. 2006. Plasmid of lactococci-genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol. Rev.*, 30: 243–273.
- Moineau, S., Walker, S.A., Holler, B.J., Vedamuthu, E.R. and Vandenberg, P.A. 1995. Cloning and sequencing of *LlaII* restriction-modification genes from *Lactococcus lactis* and relatedness of this system to the *Streptococcus pneumoniae Dpn II* system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2193–2202.
- Moineau, S. 1999. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 377–382.
- Monnet, V., Condon, S., Cogan, T.M. and Gripon, J.C. 1996. Metabolism of starter cultures. *Dairy Starter Cultures* (Cogan T.T. and Accolas, J., eds), pp. 47-99. VCH Publishers Inc., New York.
- Moreno, F.M.R., Callewaert, R., Devreese, B., van Beeumen, J. and de Vuyst, L. 2003. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 214-229.
- Mundt, J.O. 1986. Enterococci and Lactic acid streptococci. In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology* (Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Sharpe, M.E. Eds.) pp. 1063–1066 Williams and Wilkins, Baltimore.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. L (+) Lactic acid fermentation and its product polymerization. *Microbiol. Biotechnol.*, 7: 167–179.
- Nes, I.F. and Tagg, J.R. 1996. Novel lantibiotics and their pre-peptides. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 89–97.
- Nilsen, T., Nes, I.F. and Holo, H. 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2975–2984.

- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y. and Suzuki, I. 1999. Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 163–166.
- O’Driscoll, J., Glynn, F., Cahalane, O., O’Connell-Motherway, M., Fitzgerald, G.F. and van Sinderen, D. 2004. Lactococcal plasmid pNP40 encodes a novel, temperature sensitive restriction-modification system. Appl. Environ. Microbiol., 70: 5546–5556.
- O’Sullivan, D., Ross, R.P., Twomey, D.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C. and Coffey, A. 2001. Naturally occurring lactococcal plasmid pAH90 links bacteriophage resistance and mobility functions to a food-grade selectable marker. Appl. Environ. Microbiol., 67: 929–937.
- Özkalp, B., Özden, B., Tuncer, Y., Şanlıbaba, P. and Akçelik, M. 2007. Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey. Lait (in press).
- Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. Biotechnol. Adv., 21: 465–499.
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. and Teuber, M. 1997. Antibiotic resistance spread in food. Nature, 389: 801–802.
- Piard, J.C., Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Desmazeaud, M.J. and Klaenhammer, T.R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. Appl. Environ. Microbiol., 58: 279–284.
- Poole, K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56: 20–51.

- Rastall, R.A. and Maitin, V. 2002. Genetic engineering: threat or opportunity for the dairy industry. *Int. J. Dairy Tech.*, 55: 161–165.
- Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 117–137.
- Rodriguez, E., Gonzalez, B, Gaya, P., Nunez, M. and Medina, M. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 10: 7–15.
- Sahl, H.G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, 230: 827–853.
- Saier, M.H. Jr and Reizer, J. 1992. Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.*, 174: 1433–1438.
- Samarzija, D., Autunac, N. and Havrarek, J.K. 2001. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: A Review. *Mijekarstvo*, 51: 35–48.
- Sanders, M.E., Leonhard, P.J., Sing, W.D. and Klaenhammer, T.R. 1986. Conjugal strategy for construction of fast acid producing, bacteriophage resistant lactic Streptococci for use in dairy fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(5): 1001–1007.
- Schaffer, H.E. and Sederof, R.R. 1981. Improvement estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 115: 122–133.
- Schlegel, H.G. 1997. *General Microbiology*, Cambridge University Press, New York, USA. 673p.
- Schleifer, K.H. 1987. Recent changes in taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 46 (3): 201–203.

- Schouler, C., Gautier, S., Ehrlich, A.D. and Chopin, M.C. 1998. Combinational variation of restriction modification specificities in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.*, 28: 169–178.
- Sinskey, A., Jamas, S., Easson, D.J. and Rha, C. 1986. Biopolymers and modified polysaccharides. *Biotechnology in Food Processing* (Harlander, S.K. and Labuza, T.P., eds), pp.73-114. Nova, New Jersey.
- Smid, E.J., van Enkevort, F.J.H., Wegkamp, A., Boekhorst, J., Molenaar, D., Hugenholtz, J., Siezen, R.J. and Teusink, B. 2005. Metabolic models for rational improvement of lactic acid bacteria as cell factories. *J. Appl. Bacteriol.*, 98: 1326–1331.
- Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K. 2002. Role of lactic acid bacteria (Lab) in food preservation and human health- a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1: 20–24.
- Southern, E.M. 1979. Measurement of DNA lengths by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 100: 319–323.
- Spinelli, S., Desmyter, A., Verrips, C.T., Hard, H.J.W., Moineau, S. and Cambillau, C. 2006. Lactococcal bacteriophage p2 receptor-binding protein structure suggests a common ancestor gene with bacterial and mammalian viruses. *Nature Struc. Mol. Biol.*, 13: 85–89.
- Stentz, R., Jury, K., Eaton, T., Parker, M., Narbad, A., Gasson, M. and Shearman, C. 2004. Controlled expression of Clu A in *Lactococcus lactis* and its role in conjugation. *Microbiology*, 150: 2503–2512.
- Sturino, J.M. and Klaenhammer, T.R. 2006. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nature Reviews*, 4: 395–404.

- Sweeney, P.L.H., Ottogalli, G. and Fox, P.F. 2004. Diversity of cheese varieties. Cheese: chemistry, physics and microbiology (Ed. Sweeney, P.L.). Elsevier Ltd. New York (USA) 585 p.
- Tagg, J.R. 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. Indian J. Med. Res., 199: 13-6.
- Tamaro, A., Kok, J., Renault, P. and Bordowski, J. 2005. Alternative lactose catabolic pathway in *Lactococcus lactis* ILI403. Appl. Environ. Microbiol., 71: 6060–6069.
- Tammerman, R., Pot, B., Huys, G. and Swings, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. Int. J. Food Microbiol., 81: 1–10.
- Teixeira, L., Luica, V., Merquior, V.L., Vianni, M.C., Corvako, M.G.S., Fracalanza, S.E.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. and Facklam, R.R. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garrivae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garrivae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. Int. J. Syst. Bacteriol., 46(3): 664–668.
- Teuber, M., Meile, L. and Schwarz, F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek, 76: 115–137.
- Teuber, M., Schwarz, F. and Meile, L. 2003. Antibiotic resistance and transfer in lactic acid bacteria. Genetics of Lactic Acid Bacteria, Vol. 3 (Wood B.L.B. and Warner, P.J., eds), pp. 317–354. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol., 29: 807–813.

- Trotter, M., McAuliffe, O.E., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Ross, R.P. and Coffey, A. 2004. Variable bacteriocin production in the commercial starter *Lactococcus lactis* DPC 4275 is linked to the formation of the cointegrate plasmid pMRC02. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 34–42.
- Tükel, Ç., Şanlıbaba, P., Özden, B. and Akçelik, M. 2006. Identification of adsorption inhibition, restriction/modification and abortive infection type phage resistance systems in *Lactococcus lactis* strains. *Acta Biologica Hungarica*, 57: 377–385.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Maeney, B. and Hill, C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Leeuwenhoek*, 82: 165–185.
- Uguen, P., Hindre, T., Didelot, S., Marty, C., Haras, D., Pennec, J.P., Vallee-Rahel, K. and Dufour, A. 2005. Maturation by LatT is required for biosynthesis of full-length lantibiotic lactacin 481. *App. Environ. Microbiol.*, 71: 562–565.
- Vadeboncoeur, C. and Moineau, S. 2004. The relevance of genetic analysis to dairy bacteria: building upon our heritage. *Microbial Cell Factories*, 3: 1–4.
- Valyasevi, R., Sandine, W.E. and Geller, B.L. 1990. The bacteriophage kh receptor of *L. lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1882–1889.
- Valyasevi, R., Sandine, W.E. and Geller, B.L. 1991. A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* c2. *J. Bacteriol.*, 173: 6095–6100.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G. 1989. Cloning of two bacteriocin plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(5): 1187–1191.

- van Niel, E.W.J., Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. 2002. Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 68(9): 4350–4356.
- van Rooijen, R.J. and de Vos, W.M. 1990. Molecular cloning transcriptional analysis, and nucleotide sequence of *lacR*, a gene encoding the repressor of lactose phosphotransferase systems of *Lactococcus lactis*. J. Biol. Chem., 265: 18449–18503.
- Vaughan, E.E., Primore, R.D. and Mollet, B. 1998. Transcriptional regulation and evolution of lactose genes in the galactose-lactose operon of *Lactococcus lactis* NCDO 2054. J. Bacteriol., 180: 4893–4902.
- Venema, G. 1993. Molecular biology and genetic modification of lactococci. J. Dairy Sci., 76: 2133–2144.
- Walker, S.A. and Klaenhammer, T.R. 2003. The genetics of bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. Genetics of Lactic Acid Bacteria, Vol. 3 (Wood B.J.M. and Warner P.J., eds), pp. 291–315. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Walling, E., Gindreau, E. and Lonvaud-Funel, A. 2005. A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. Int. J. Food Microbiol., 98: 53–62.
- Watanabe, K., Ishibashi, K., Nakashima, Y. and Sakurai, T. 1984. A phage resistance mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. J.Gen. Virol., 65: 981–986.
- Waters, C. and Dunny, G.M. 2001. Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. J. Bacteriol., 183: 5659–5667.

- Willey, J.M. and van der Donk, W.A. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Ann. Rev. Microbiol.*, 61: 477–478.
- Wolfe, T.W. and McKay, L.L. 1983. Isolation and partial characterization of lactose-negative mutants from *Streptococcus lactis* C2 defective in phosphotransferase system. *J. Dairy Sci.*, 67: 950–959.
- Xiang, H., Wei, W. and Tan, H. 2003. Food grade expression of human glutathione S-transferase and Cu/Zn superoxide dismutase in *Lactococcus lactis*. *Biomol. Eng.*, 20: 107–112.
- Xie, L., Miller, L.M., Chatterjee, C., Averin, O., Kelleher, N.L. and van der Donk, W.A. 2004. Lacticin 481: In vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science*, 303: 679–681.
- Yang, J.M., De Urraza, P.J., Matvienko, N. and O’Sullivan, D.J. 2006. Involvement of LlaKRZI methylase in expression of the AbiR bacteriophage defense system in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KRZ. *J. Bacteriol.*, 188: 1920–1928.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and van’ t Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1875–1881.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C. and van’ t Riet, K. 1991. Modelling bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1094–1101.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nefise AKKOÇ

Doğum Yeri : Adana

Doğum Tarihi : 18.11.1983

Medeni hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Adana Fen Lisesi (1998-2001)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2001-2005)

Çalıştığı Kurum ve Yıl : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü/2007-