

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DOĞAL TİP *LACTOCOCCUS LACTIS* SUŞLARININ ENDÜSTRİYEL  
STARTER KÜLTÜR POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Burcu ÖZKALP**

Danışman  
**Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK**

ANKARA  
2006

## Doğal Tip *Lactococcus lactis* Suşlarının Endüstriyel Starter Kültür Potansiyellerinin Belirlenmesi

### ÖZET

Türkiye'nin değişik bölgelerinden sağlanan çiğ sütlerden izole edilen 50 adet laktokok suşunun 30 adedi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 15 adedi *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve 4 adedi de *L. lactis* subsp. *cremoris* olarak tanımlandı. Klasik tanı testlerinde atipik sonuçlar alınan bir suşun ise kesin tanısı yapılamadı. Bu bakterilerde yürütölen analizler sonucu, yalnız *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunun yüksek düzeyde, diğer 49 suşun ise düşük düzeyde laktik asit ürettiği belirlendi. Değişik indikatör bakterilere karşı inhibisyon etkinlikleri test edilen laktokoklardan 3 adedinin (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1, MBLL9 ve MBLL57) bakteriyosin üreticisi olduğu tespit edildi. Bu suşların ürettiği bakteriyosinlerin kısmi karakterizasyon verilerine dayanarak; *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1 ve MBLL9 bakteriyosinin laktisin 481, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL57 bakteriyosininin ise nisin olduğu saptandı. Türkiye kökenli laktokok suşlarının faj direnç özellikleri, 61 adet laktik faja karşı test edildi. Laktokok suşlarının 11 adedi değişik fajlara karşı duyarlılık fenotipi gösterirken, 39 adedi denenen fajların tümüne karşı dirençli bulundu. 15 adet *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşu iğerisinden 5 adedi (MBLD5, MBLD7, MBLD17, MBLD21 ve MBLD54) yüksek, 3 adedi orta (MBLD10, MBLD51 ve MBLD55) ve 7 adedi de düşük (MBLD4, MBLD19, MBLD29, MBLD35, MBLD36, MBLD59 ve MBLD63) düzeyde diasetil üreticisi olarak tanımlandı. Kesin tanısı yapılamayan MBL34 suşunun da orta düzeyde diasetil üreticisi olduğunun belirlenmesi, bu bakterinin atipik bir *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* olduğuna işaret etti. Denemede kullanılan laktokok suşlarından 11 adedi (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL8, MBLL9, MBLL44, MBLL60, MBLL61 ve MBLL64, *L. lactis* subsp. *cremoris* MBLC38, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MBLD5, MBLD17, MBLD21 ve MBLD63) yüksek (25 µg Tyr/mL ve üzeri), kalan 39 adedi ise düşük düzeyde (<25 µg Tyr/mL) proteolitik aktiviteye sahip bulundu. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite, faj dirençlilik ve bakteriyosin üretim özelliklerinin stabilite oranları, skim milk ortamında ve ~70 generasyon sonunda %75-100 arasında değişim gösterdi. İzole edilen laktokok suşlarında plazmid sayıları 1-10 adet ve büyüklükleri 1.9-29.2 kb arasında bulundu.

*Anahtar Kelimeler: Lactococcus lactis, endüstriyel özellikler, starter kültür*

## Detection of Industrial Starter Culture Potentials of Wild Type *Lactococcus lactis* Strains

### ABSTRACT

Out of 50 strains of lactococci isolated from raw milk obtained from different regions of Turkey, 30 strains were identified as *L. lactis* subsp. *lactis*, 15 strains as *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and 4 strains as *L. lactis* subsp. *cremoris*. Only one strain could not be characterized conclusively in accordance with the atypical results obtained from classical diagnostic tests. As a result of the analysis carried out with these bacteria, it was determined that only *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 had high level of lactic acid production whereas other 48 strains had low levels of production. Among lactococci tested against different indicator bacteria for their inhibition efficiency, 3 strains (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1, MBLL9 and MBLL57) were determined to be bacteriocin producers. The bacteriocin produced by *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1 and MBLL9 were identified as lacticin 481, and *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL57 as nisin based on their partial characterization data. Lactococcal strains originated from Turkey were tested against 61 lactic phages for their phage resistance properties. While 11 of the lactococcal strains exhibited sensitive phenotype against different phages, 39 of them were found to be resistant to whole phages analysed. Among 15 *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* strains, 5 strains (MBLD5, MBLD7, MBLD17, MBLD21 and MBLD54) were defined as high, 3 strains (MBLD10, MBLD51 and MBLD55) as intermediate and 7 strains (MBLD4, MBLD19, MBLD29, MBLD35, MBLD36, MBLD59 and MBLD63) as low level diacetyl producers. The determination of poorly characterized strain MBL34 at an intermediate level diacetyl producer signed that this strain was to be an atypical *diacetylactis*. Within the lactococcal strains used in the experiment, 11 strains (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL8, MBLL9, MBLL44, MBLL60, MBLL61 and MBLL64, *L. lactis* subsp. *cremoris* MBLC38, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MBLD5, MBLD17, MBLD21 and MBLD63) were detected to have high levels (25 µg Tyr/mL and above), while the remaining 39 strains had low levels (<25 µg Tyr/mL) of proteolytic activity. Stability rates of lactose fermentation, proteolytic activity, phage resistance and bacteriocin production properties in *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 were ranged at 75-100% after ~70 generations in skim milk media. *L. lactis* strains were found to have plasmid contents changing between 1.9-29.2 kb in size and 1-10 in number.

*Key Words: Lactococcus lactis, industrial traits, starter culture*

## TEŞEKKÜR

Doğal tip *Lactococcus lactis* suşlarının endüstriyel starter kültür potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından 2004/154 nolu, “Endüstriyel Açıdan Kullanışlı *Lactococcus lactis* Suşlarının Tanısı ve Laktik Fajların İnaktivasyonu Üzerinde Araştırmalar” adlı proje kapsamında desteklenmiştir.

Bana bu çalışmamı gerçekleştirirken bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, her aşamada yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Akçelik’e;

Beni hayatımın her aşamasında destekleyen ve fedakarlıklarını esirgemeyen sevgili anne ve babama;

Tüm yardımları için laboratuvar arkadaşlarım, Dr. Yasin TUNCER, Banu ÖZDEN, Araş. Gör. Ömer ŞİMŞEK, Araş. Gör. Dilek AVŞAROĞLU ve Pınar ÖZTÜRK’e; başta Gökhan KANAAT olmak üzere tüm dostlarıma;

En içten teşekkürlerimi sunarım

Burcu ÖZKALP

Ankara, Haziran 2006

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	2
2.1. <i>Lactococcus</i> Cinsi ve Bu Cinse Ait Türlerin Taksonomik Özellikleri.....	2
2.2. <i>L. lactis</i> Suşlarının Endüstriyel Öneme Sahip Özellikleri.....	3
2.2.1. Laktik asit üretimi.....	3
2.2.2. Bakteriyosin üretimi.....	5
2.2.3. Faj dirençlilik.....	9
2.2.4. Sitrat fermentasyonu.....	12
2.2.5. Proteolitik aktivite.....	13
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Bakteriler ve fajlar.....	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Laktokok suşlarının izolasyonu ve tanısı.....	17
3.2.2. İzolatların Tanımlanması.....	18
3.2.2.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi.....	19
3.2.2.2. Arjininden amonyak oluşumu.....	20
3.2.2.3. Elliker broth besiyerinde gelişme.....	21
3.2.2.4. Sitrat fermentasyon testi.....	21
3.2.3. Laktokok suşlarının laktik asit üretim düzeylerinin belirlenmesi.....	22
3.2.4. Bakteriyosin üretimi.....	23
3.2.4.1. Proteolitik enzim uygulaması.....	25
3.2.4.2. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi.....	25
3.2.4.2.1. pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	25

3.2.4.2.2. Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	26
3.2.4.2.3. Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	26
3.2.5. Laktokok suşlarının faj duyarlılıklarının belirlenmesi.....	27
3.2.5.1. Faj titresinin yükseltilmesi.....	27
3.2.5.2. Laktokok suşlarının faj duyarlılıklarının saptanması.....	28
3.2.6. Laktokok suşlarının diasetil üretim düzeylerinin belirlenmesi.....	28
3.2.7. Laktokok suşlarının proteolitik aktivite düzeylerinin belirlenmesi.....	28
3.2.8. Laktokok suşlarının plazmid içeriklerinin belirlenmesi.....	30
3.2.8.1. Plazmid izolasyonu.....	30
3.2.8.2. Elektroforez.....	33
3.2.8.3. Plazmidlerin büyüklüklerinin saptanması.....	34
3.2.9. <i>L. lactis</i> suşlarında endüstriyel özelliklerin stabilitesinin belirlenmesi.....	35
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>36</b>
4.1. Laktokok Suşlarının Tanısı.....	36
4.2. <i>L. lactis</i> Suşlarının Laktik Asit Üretim Düzeyleri.....	43
4.3. <i>L. lactis</i> Suşlarının Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	49
4.4. <i>L. lactis</i> Suşlarının Faj Duyarlılıkları.....	62
4.5. <i>L. lactis</i> Suşlarının Diasetil Üretim Özellikleri.....	70
4.6. <i>L. lactis</i> Suşlarının Proteolitik Aktivite Düzeyleri.....	72
4.7. <i>L. lactis</i> Suşlarının Plazmid İçerikleri.....	76
4.8. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 Suşunda Endüstriyel Özelliklerin Stabilitesi.....	82
<b>5. SONUÇLAR.....</b>	<b>84</b>
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER DİZİNİ

ATP	Adenozin Tri Fosfat
AU	Arbitrary Unit
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
g	Gram
GRAS	Generally Recognized as Safe (İnsan ve Hayvan Tüketiminde Güvenilir)
kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
LAB	Laktik Asit Bakterisi
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
nm	Nanometre
N	Normal
NRCLA	Neutral Red Chalk Laktoz Agar
pfu	Plak Oluşturma Birimi
cfu	Koloni Oluşturma Birimi
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	Triklor asetik asit
Tyr	Tirozin
UV	Ultra Viole
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşlarının tanısında kullanılan testler.....	18
Şekil 4.1. <i>L. lactis</i> suşlarının $\Delta$ pH dağılımları.....	47
Şekil 4.2. <i>L. lactis</i> suşlarının plazmid içerikleri.....	78



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan laktokok suşlarının izolasyon materyalleri ve izolasyon materyallerinin sağlandığı bölgeler.....	38
Çizelge 4.2. Laktokok suşlarının tanısı.....	40
Çizelge 4.3. <i>L. lactis</i> suşlarının skim milk besiyerine %1 inokülasyonu ile elde edilen $\Delta$ pH ve hesaplanan % laktik asit değerleri.....	45
Çizelge 4.4. <i>L. lactis</i> suşlarının Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı inhibisyon etkinliği.....	54
Çizelge 4.5. <i>L. lactis</i> suşlarının ürettiği antimikrobiyel maddelerin proteinaz K duyarlılıkları.....	59
Çizelge 4.6. <i>L. lactis</i> suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	60
Çizelge 4.7. <i>L. lactis</i> suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine enzim ve sıcaklığın etkisi.....	61
Çizelge 4.8. <i>L.lactis</i> suşlarının faj duyarlılıkları.....	64
Çizelge 4.9. <i>L. lactis</i> suşların diasetil üretim özellikleri.....	71
Çizelge 4.10. <i>L. lactis</i> suşlarının proteolitik aktivite düzeyleri.....	74
Çizelge 4.11. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşunda endüstriyel özelliklerin stabilitesi.....	83

## 1. GİRİŞ

*Lactococcus lactis* türüne ait iki alt tür (*L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*) ve bir biyovaryete (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) yarı sert peynirler, eritme süt ürünleri ve kefir gibi çok sayıda fermente süt ürününün üretiminde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel starter kültür suşları; laktoz ve sitrat fermentasyonu, faj dirençlilik, bakteriyosin üretimi ve dirençlilik ile proteolitik aktivite gibi ürünün yapı, aroma ve tat karakteristikleri yanında, mikrobiyolojik kalitesi üzerinde de etkili olan metabolik özellikleri esas alınarak seçilmektedir. Yüksek verimlilik, standart ve kaliteli ürün hedeflenerek uygulama preparatları hazırlanan starter kültürler tek bir suştan oluşturulabildiği gibi, endüstriyel özellikler bakımından birbirini destekleyen birden fazla *L. lactis* suşunun ya da farklı türün kombine edilmesi suretiyle de üretilebilmektedir. *L. lactis* suşlarında, yukarıda belirtilen endüstriyel açıdan önem taşıyan metabolik özelliklerin gen kodunun plazmidler üzerinde bulunduğu belirlenmesi, bu bakterilerde genetik analiz çalışmalarına büyük bir ivme kazandırmış ve endüstriyel starter kültür suşlarının, bilinçli müdahaleler ile istenilen doğrultuda düzenlenmesini olası hale getirmiştir. Ancak, özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde genetik bakımdan modifiye edilmiş organizmalar kullanılarak üretilen gıdalara karşı oluşan tüketici tepkisi ve çoğu kez genetik mühendisliği uygulamalarının beklenen sonuçları vermemesi, starter kültür suşlarında in vitro genetik düzenleme çalışmalarını büyük ölçüde sınırlandırmıştır. Bunun yerine, starter kültür olarak kullanılacak nitelikleri taşıyan suşların doğal ortamlardan izole edilerek tanımlanması ve endüstriyel özelliklerinin stabilitesinin korunması çalışmaları yeniden önem kazanmıştır.

Çok uzun zamandır starter kültür suşları kullanılarak fermente gıda üretimi yapan ve geleneksel üretimlerin sınırlı olduğu gelişmiş ülkelerde, farklı doğal suş izolasyonu nerede ise olanaksız hale gelmiştir. Ancak ülkemiz gibi, geleneksel fermente gıda üretiminin yaygın olarak sürdüğü ve endüstriyel starter kültür suşu kullanımının kısa bir geçmişi olan ülkelerde, endüstriyel fermentasyon süreçlerinde kullanışlı yeni doğal suşların tanımlanma olasılığı yüksektir. Bu esaslara yönelik olarak tasarlanan çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinden sağlanan çiğ süt örneklerinden izole edilerek tanımlanacak *L. lactis* suşlarının endüstriyel açıdan önem taşıyan özelliklerinin karakterizasyonu ve starter kültür potansiyellerinin tespiti amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. *Lactococcus* Cinsi ve Bu Cinsin Ait Türlerin Taksonomik Özellikleri

Fermente gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan laktik asit bakterileri (LAB) içinde yer alan laktokoklar (*Lactococcus* sp.); Gram-pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, fakültatif anaerob bakteriler olarak tanımlanmaktadır. 1980'li yılların ortasında; DNA hibridizasyonu, immunolojik analiz, lipotaykoik asit yapısı, yağ asidi profilleri ve menakinon kompozisyonu yanında, klasik tanı testlerinden elde edilen verilere de dayanılarak *Lactococcus* cinsi oluşturulmuştur. Bu veriler doğrultusunda; *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinden ayrılan bazı türler (*Lactobacillus xylosus*, *Lactobacillus hordinae*, *Streptococcus garviae*, *Streptococcus plantarum* ve *Streptococcus raffinolactis*) *Lactococcus* cinsine transfer edilmiştir. Laktokoklar; *L. lactis*, *L. raffinolactis*, *L. garviae*, *L. piscium* ve *L. plantarum* olmak üzere beş tür içermektedir. *Lactococcus* cinsine ait bu beş tür; 40 °C üzerinde ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (>% 4 sodyum klorür) gelişebilme ve farklı şekerlerden (laktoz, mannitol ve rafinoz) asit oluşturma özellikleri bakımından farklılık göstermektedir. Laktozu fermente etme yeteneği, özellikle süt endüstrisinde starter olarak kullanılan laktokoklar için kritik bir önem taşımaktadır. Şekerlerin fermentasyonu sonucu başlıca son ürün olarak L (+) laktik asit üretilmektedir. Genellikle Lancefield N serolojik grubuna dahil edilen bu bakteriler; üreme ortamlarında tek, çift ya da nadiren zincir formunda bulunmakta ve ovoid veya sferik yapı içermektedir. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C olan laktokoklar; 10 °C' nin altında ve 45 °C' nin üzerinde, % 6.5 NaCl varlığında ve ortam pH'sının 9.6 olması durumunda gelişemezler. Laktokoklar bu özellikleri ile streptokoklardan ve enterokoklardan ayrılırlar (Schleifer *et al.* 1985, Schleifer and Kilpper-Bälz 1987, Stiles and Holzapfel 1997, Carr *et al.* 2002).

*Lactococcus* cinsini oluşturan bakteriler içerisinde *L. lactis* türü, endüstriyel açıdan büyük öneme sahiptir. Özellikle süt endüstrisinde kullanılan mezofilik starter kültürler arasında en çok tercih edilen bakteriler, bu türe ait alt türlerdir. Temelde *L. lactis* türü , *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* olmak üzere iki alt türe ayrılmaktadır. *L. lactis* subsp. *lactis* alt türü, arjinin hidrolizi sonucu amonyak oluşturma ve 40 °C' de gelişebilme yetenekleriyle, *L. lactis* subsp. *cremoris*'den farklılık göstermektedir. *L. lactis* türüne ait

tek biyovaryete ise (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), yalnız sitrat fermentasyonu yeteneği ile *L. lactis* subsp. *lactis*'den ayrılmaktadır. Sitrat fermentasyonu yeteneğinin tüm *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşlarında plazmid kodlu oluşu ve söz konusu plazmidlerin konakçı bakteriden kendiliğinden kaybının sıklıkla gerçekleşmesi, bu biyovaryetenin *L. lactis* subsp. *lactis*'den kesin hatlarla ayrılmasını imkansız hale getirmektedir. Fermente gıda endüstrisinde kullanılan diğer tüm laktik asit bakterileri gibi, *L. lactis* türü üyeleri de; insan ve hayvan sağlığı açısından tüketilmelerinde herhangi bir sakınca bulunmayan, güvenilir mikroorganizmalar olarak (GRAS) kabul edilmektedir. Özellikle moleküler analiz tekniklerinin gelişimi; starter kültür suşlarının, patojen ya da gıda bozulması etmeni bakterilerden farklılaşma süreçlerinin, evrimsel ilişkilerle açıklanmasını olanaklı hale getirmiştir (Schleifer and Kilpper-Bälz 1987, Stiles and Holzapfel 1997, Corroler *et al.* 1998, Corroler *et al.* 1999, Mannu *et al.* 2000, Ayad *et al.* 2001, Nomura *et al.* 2002, Delgado and Mayo 2004, Liu *et al.* 2005).

## **2.2. *L. lactis* Suşlarının Endüstriyel Öneme Sahip Özellikleri**

### **2.2.1. Laktik asit üretimi**

Endüstride gıda, ilaç ve kozmetik gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan laktik asit, süt fermentasyonlarının temel ürünüdür. Fermentasyon süreçlerinde LAB tarafından üretilen bu organik asit, ortamda pH'nın hızla düşmesine sebep olmakta ve böylelikle gıda bozulmaları ve gıda kökenli hastalık etmeni mikroorganizmaların gelişmeleri için uygun ortam koşullarının oluşumu engellenmektedir. Laktik asit aynı zamanda, fermente ürünlerde istenen duyuşsal ve yapısal özelliklerin gelişmesine de katkıda bulunmaktadır. Örneğin; peynir yapımı sırasında oluşan laktik asit, pH'nın ve su aktivitesinin düşmesine yol açarak, peyniraltı suyunun kolaylıkla pıhtıdan ayrılmasını sağlamaktadır. Karbonhidrat metabolizması ayrıca, birçok fermente süt ürünüde temel yapısal özelliklerin gelişmesini kontrol eden ekzopolisakkaritlerin sentezinde anahtar rol oynamaktadır. Tüm bu nedenlerle; hızlı asit üretme yeteneği, starter kültür olarak kullanılacak bakterilerin seçiminde önemli bir kriter olarak ele alınmaktadır. Ancak özellikle yavaş olgunlaştırılan bazı geleneksel fermente süt ürünlerinin ve peynirlerin yapımında, yavaş asit üreten starter kültür suşları da tercih edilebilmektedir (Cogan *et al.* 1997, Durlu-Özkaya *et al.* 2001, Medina *et al.* 2001, Pérez *et al.* 2003, Narayanan *et al.* 2004).

*Lactococcus* cinsi üyesi bakteriler, süt ortamında bulunan başlıca karbon kaynağı olan laktozdan homofermentatif yolla L(+) laktik asit üretme yeteneğine sahiptir. Ancak bu bakterilerin düşük pH değerlerinde D(-) laktik asit üretebildikleri de tespit edilmiştir. Laktokoklar ortamda bulunan laktozu, fosfoenolpirüvata bağlı-fosfotransferaz sistemi (PEP-PTS) ile hücre içine almakta ve hücre içinde laktoz-6-fosfat, fosfo- $\beta$ -galaktosidaz enzimi ile hidrolize ederek, glikoz ve galaktoz-6-fosfata dönüştürülmektedir. İleri aşamada bu metabolitlerden, glikoliz ve tagatoz-fosfat metabolik yolu kullanılarak, trioz-fosfatlar oluşturulmaktadır. Trioz-fosfatlar, daha sonra pirüvata dönüştürülmekte ve pirüvat da elektron dengesinin sağlanması amacıyla laktata indirgenmektedir. Laktokoklarda laktozu fermente etme yeteneği plazmidler tarafından kodlanmaktadır. Bu fenotipin oluşumunu kontrol eden genlerin analizi sonucu tanımlanan yedi genin (*lacABCDFEG*), tek bir operon halinde bulunduğu belirlenmiştir. Laktokoklar, diğer laktik asit bakterileri dikkate alındığında, hızlı asit üretme yeteneğine sahip türler olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte laktozdan hızlı asit üretme yeteneği laktokoklarda cins karakteristiği olmayıp, suştan suşa değişiklik göstermektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, hızlı asit üreten suşlar kadar yavaş asit üretme yeteneğine sahip olan suşların da yaygın olarak *Lactococcus* cinsi içerisinde yer aldığı tespit edilmiştir (McKay 1983, Crow and Thomas 1984, Cogan *et al.* 1997, Ayad *et al.* 2000, Delgado *et al.* 2002, Ayad *et al.* 2004, de Vos and Hugenholtz 2004, Cock and de Stouvenel 2006).

Laktokoklarda laktoz metabolizmasını kontrol eden plazmidler; 20 kb'dan büyük, stabil ve çoğunlukla konjugatif özellik içeren kromozom dışı genetik yapılar olarak karakterize edilmektedir. Konjugatif özellikleri, bu plazmidlerin doğal yollarla suşlar arasında aktarımını sağlamaktadır. Starter kültür suşu geliştirme programlarında yalnız konjugasyonel düzenlemelerin yapılmasına izin verilmesi, konjugatif özellikteki laktoz plazmidlerine büyük bir önem kazandırmıştır (Medina *et al.* 2001, de Vos and Hugenholtz 2004, Cock and de Stouvenel 2006).

### 2.2.2. Bakteriyosin üretimi

Starter olarak kullanılan LAB'nin birçoğu organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosinlerin de içinde bulunduğu çeşitli antimikrobiyel bileşikler üretme yeteneğindedir. Bu metabolitler; hem fermente gıdalarda yapı, aroma ve tat oluşumuna katkıda bulunmakta, hem de üründe bozulma ya da gıda kökenli hastalık etmeni mikroorganizmaların gelişmelerini engellemektedir. Söz konusu bileşikler özetle; fermente gıdaların raf ömrü, mikrobiyolojik kalitesi ve tüketici kabulü üzerinde anahtar rol oynamaktadır (Moreno *et al.* 1999, McAuliffe *et al.* 2001, Ross *et al.* 2002). Eski çağlardan beri tüketilmekte olan gıdalarda bulunan LAB'nin insan sağlığı üzerinde bilinen olumlu etkilerinin yanında, ürettikleri bakteriyosinlerin de gıda korumada antibiyotiklerden daha uygun ajanlar olduğunun tespit edilmesi, bu bakterilerin önemini bir kat daha arttırmıştır. Son yıllarda, antibiyotiklere karşı direnç özelliği gösteren mikroorganizmaların sayısındaki artış ve antibiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki belirlenen olumsuz etkileri, tüketicilerin gıda korumada bakteriyosinler gibi bileşiklere daha fazla yönelmelerini sağlamıştır (Cleveland *et al.* 2001, Benkerroum *et al.* 2002, Chen and Hoover 2003). LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin, gıda sistemlerinde biyokoruyucu olarak kullanılma potansiyelleri, geniş konakçı etkinlikleri ve farklı çevresel koşullarda gösterdikleri stabilite düzeyleri esas alınarak tanımlanmaktadır. Günümüzde biyokorumanın esasları, gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların parçalanması ya da inhibe edilmesi için, doğrudan antagonistik mikroorganizmaların veya onların metabolitlerinin kullanımına dayanmaktadır. Tüm bu nedenlerle gıdanın biyokorumasına yönelik araştırmalar, bakteriyosinler ve bakteriyosin üreticisi suşların karakterizasyonu üzerinde odaklanmıştır (Huot *et al.* 1996, Scannell *et al.* 2000, Lee and Paik 2001, Hindré *et al.* 2003, Joerger 2003).

Bakteriyosinler, antibakteriyel etkiye sahip, genellikle Gram-pozitif bakteriler ve üretici suşlara yakın türler üzerinde etkili olan, protein doğasında bileşiklerdir. Bu bileşikler yapısal, kimyasal ve fonksiyonel özellikleri esas alınarak 4 sınıfa ayrılmaktadır:

I. sınıf bakteriyosinler; lantibiyotikler olarak da adlandırılan ve translasyon sonrası modifikasyonlar sonucu aktif formları oluşturulan bakteriyosinlerdir. Doğada bulunmayan doymamış amino asitler [didehidroalanin (Dha) ve didehidrobütirin (Dhb)] ve tiyoeter

köprüleri [lantiyonin (Lan) ve 3-metillantiyonin (3-Melan)] içerirler. Bu amino asitler, öncü peptidin enzimatik reaksiyonlarla modifikasyonu sonucunda oluşturulmaktadır. Sırasıyla serin ve treonin amino asitlerinin dehidrasyonu ile Dha ve Dhb oluşmakta, bu amino asitlerle sistein rezidüleri arasında tiyoeter köprülerinin kurulmasıyla da Lan ve 3-Melan meydana gelmektedir. Tiyoeter köprülerinin pozisyonu ile düzenlenen yapı temel alınarak, lantibiyotikler; lineer (TipA) ve globüler (TipB) olmak üzere, iki ana gruba ayrılmaktadır. Ayrıca Tip A lantibiyotikler de kendi aralarında, Tip AI ve AII olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Tip A lantibiyotikler konakçı sitoplazma membranında porlar oluşturarak, Tip B lantibiyotikler ise DNA, RNA veya hücre duvarı sentezinde görev alan enzimleri inhibe ederek, hedef organizmaya etki etmektedir (Diep and Nes 2002, Hindré *et al.* 2003).

II. sınıf bakteriyosinler; lantiyonin içermeyen, ısıya dayanıklı peptitler olarak tanımlanmakta ve Sınıf IIa, Sınıf IIb, Sınıf IIc ve Sınıf IId olmak üzere 4 alt grup altında incelenmektedir. Bu alt gruplar içerisinde, antilisteriyal aktiviteleri nedeniyle, sınıf IIa gıda korunmasında güçlü bir potansiyele sahiptir. Sınıf IIb üyeleri de iki ayrı peptit içermeleri ile diğer sınıflardan ayrılmaktadır. Bu sınıf üyeleri, yüksek düzeyde aktivite için iki peptidin birleşmesine gereksinim duymaktadır (Benkerroum *et al.* 2002, Noonpakdee *et al.* 2003).

III. sınıf bakteriyosinler; büyük, ısıya duyarlı proteinler olup, bakteriyosinlerin fizyolojik aktivitelerini gösteren, bakteriyolitik ekstraselüler enzimleri de kapsamaktadır.

IV. sınıf bakteriyosinler ise; lipit ve karbonhidrat yan gruplar içeren, kompleks bakteriyosinlerdir. Bu sınıf bakteriyosinlerin yapıları ve fonksiyonları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Klaenhammer 1993, de Vuyst and Vandamme 1994, Jack *et al.* 1995, Diep and Nes 2002, Røssland *et al.* 2003).

Bakteriyosinler; genellikle hedef hücrenin sitoplazmik membranına etki ederek membran potansiyellerinin bozulmasına ve çeşitli iyonlar, amino asitler ile ATP gibi küçük metabolitlerin hücreden dışarı sızması sonucu DNA, RNA, protein ve polisakkarit sentezinin durmasına yol açarlar. Bakteriyosin üreticisi suşlar, ürettikleri dirençlilik

proteinleri sayesinde kendi bakteriyosinlerinin etkisinden korunurlar (Jack *et al.* 1995, Scannell *et al.* 2000, Chen and Hoover 2003).

LAB bakteriyosinleri içerisinde özel bir öneme sahip olan laktokok bakteriyosinleri ise; konakçı çeşitlilikleri, farklı enzimlere (tripsin, pepsin, lipaz gibi) karşı duyarlılıkları, ısı dirençleri ve diğer bakteriyosin-konakçı interaksiyonları göz önünde bulundurularak kendi aralarında; laktokoksinler, lantibiyotikler, diplokoksinler ve laktozstrepsinler olmak üzere 4 sınıfa ayrılmaktadır. Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerden en bilinenleri; nisin başta olmak üzere, laktokoksin A, laktokoksin B, laktokoksin MN, laktokoksin G, laktokoksin 972, laktisin 481, laktisin 3147 ve son yıllarda tanımlanan laktisin FS92, laktisin RM, laktisin NK24, laktokoksin R, laktokoksin MMT24 ve laktokoksin MMFII'dir. Laktokok bakteriyosinlerine ait yapısal genler ve dirençlilik proteinlerini kodlayan genler, genellikle plazmid kökenlidir. Kromozomal DNA tarafından kodlanan nadir laktokok bakteriyosinlerinin en bilineni nisin'dir (Venema *et al.* 1995, Martínez *et al.* 1996, Ross *et al.* 1999, Yarmus *et al.* 2000, Ferchichi *et al.* 2001, Lee and Paik 2001, O'Sullivan *et al.* 2003a, Badis *et al.* 2004).

Laktokoklar tarafından üretilen birçok bakteriyosin tanımlanmasına karşın, gıdalarda endüstriyel kullanım olanağı bulan tek bakteriyosin *L. lactis* subsp. *lactis* suşları tarafından üretilen nisindir. Nisin, başta Gram-pozitif bakteriler olmak üzere, gıda kaynaklı hastalık ve gıda bozulması etmeni birçok bakteriye ve bunların sporlarına karşı inhibisyon etkisine sahiptir. Ancak Gram-negatif bakteriler ile maya ve küflere karşı inhibisyon etkisi içermemektedir. Yakın geçmişte yürütülen araştırmalar sonucu; etilendiamintetraasetik asit gibi çeşitli çelat oluşturan ajanlarla birlikte kullanıldığında, nisinin Gram-negatif bakterilere karşı da inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Çelat oluşturan ajanlar, metal iyonları ile stabil metal kompleksleri meydana getirebilen bileşiklerdir. Böyle bir uygulama ile Gram-negatif bakterilerin dış membranlarındaki  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonları tutularak membran stabilitesi bozulmakta ve membranın geçirgenliğinin kontrolü ortadan kalkmaktadır. Bu etkilerin sonucu olarak da Gram-negatif hücreler nisine duyarlı hale gelmektedir (Bozariis and Adams 1999, Benech *et al.* 2002, Noonpakdee *et al.* 2003, Hindré *et al.* 2004).



Bakteriyosinlerin gıdalarda koruyucu amaçlı kullanımında farklı yöntemler tercih edilebilmektedir. Bunların içerisinde; tam veya yarı saflaştırılmış bakteriyosinin ürüne doğrudan ilavesi ya da bakteriyosin üreticisi suşun fermentasyon ortamına inoküle edilmesi, en çok kullanım alanı bulan yöntemlerdir. Bakteriyosin üreticisi suşların doğrudan gıda üretiminde kullanımı ile ilgili yasal bir kısıtlama ya da engelin bulunmaması, uygulama için herhangi bir özel alet ve ekipmana gereksinim duyulmaması ve ayrıca maliyet açısından daha ekonomik olması, bu yöntemin, bakteriyosinlerin saflaştırılarak kullanımına oranla daha avantajlı hale gelmesine neden olmaktadır (Trotter *et al.* 2004, Ghrairi *et al.* 2005).

Özellikle litik etkiye sahip bakteriyosinler, peynir endüstrisinde giderek artan bir önem kazanmaktadır. Peynir üretiminde kritik bir süreç olan proteolizin hızlandırılması amacıyla litik etkiye sahip bakteriyosin üreticisi suşların, starter kültürler ile birlikte kullanılabilmesi belirlenmiştir. Bakteriyosinler ve üretici suşlar, peynirin olgunlaşma sürecinin kısaltılmasına yardımcı oldukları gibi, peynir pıhtısının dağılımının homojen olmasına da katkıda bulunmaktadır. Ancak en önemli katkıları; özellikle çiğ süttten üretilen geleneksel fermente ürünler ve peynirlerde hijyenik açıdan kalitenin korunmasını sağlamalarıdır. Fermente gıda sistemlerinde bakteriyosinler ve bakteriyosin üreticisi suşların kullanımında çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır. Birçok gıda ürünüde kullanılan ticari nisin (Nisaplin) aktivitesinde, gıdanın depolanma süresi boyunca kayıpların meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca ticari nisin kullanımının maliyeti çok yüksek olduğu için, ürün maliyeti de önemli ölçüde etkilenmektedir. Diğer yandan bakteriyosinler, starter kültürün gelişmesini etkileyerek, asidifikasyonun gecikmesine neden olabilmekte ve peynir üretim sürecinde değişimlere yol açabilmektedir. Bunun önlenmesi için bakteriyosin üreticisi suşun düşük inokülasyon oranlarında ortama ilavesi ya da bakteriyosine dirençli suşların kullanımı ideal stratejiler olarak önerilmektedir (Benkerroum *et al.* 2000, Martínez-Cuesta *et al.* 2001, Benech *et al.* 2002, Trotter *et al.* 2004).

Gıda fermentasyonlarında bakteriyosin üreticisi suşların starter kültür suşları ile birlikte kullanımı ya da saflaştırılan bakteriyosinin doğrudan uygulanmasının yanı sıra, son yıllarda, bakteriyosinlerin paketleme materyallerine immobilizasyonu ve saflaştırılmış nisin lipozomlara ilavesi ile elde edilen kapsüllerin peynir üretiminde kullanımı gibi

değişik yöntemler de geliştirilmiştir (Scannell *et al.* 2000, Benech *et al.* 2002, Chen and Hoover 2003, Dimov *et al.* 2005).

Daha önce de ifade edildiği gibi, bugüne kadar laktokoklara ait çok sayıda farklı bakteriyosinin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Tanımlanan bu bakteriyosinlerden çok azı ticari kullanım potansiyeli içermektedir. Nisin dışında, laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerden laktisin 3147; sahip olduğu geniş konakçı etkinliği, stabilitesi ve nisine nazaran daha geniş pH aralıklarında aktif olmasıyla, ticari kullanım açısından ön plana çıkmaktadır. Laktisin 481 de, nisin ile benzer şekilde, çok sayıda LAB ve özellikle *Clostridium tyrobutyricum*'a karşı inhibisyon etkisi göstermektedir. Bu bakteriyosinin peynirlerin olgunlaşma sürecinde starter kültürlerin parçalanmasında yüksek etkinlik gösterdiği ve bu amaçla kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. Ayrıca son yıllarda tanımlanan laktokoksin R'nin de; geniş konakçı etkinliği, asidik pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda stabilitesini koruması, uzun depolama periyotlarına dayanıklı olması ve 3.4 kDa'luk nisin molekülünden daha küçük olması (2.5 kDa) gibi özelliklerinden dolayı, gıdalarda koruyucu olarak kullanılma potansiyeli içerdiği belirtilmektedir. Laktisin FS92 de, *Listeria monocytogenes* dahil olmak üzere *Clostridium* ve *Bacillus* cinslerini de kapsayan geniş konakçı etkinliği ve ısı stabilitesi göz önüne alındığında gıdalarda koruyucu amaçla kullanılabilir bir başka bakteriyosin olarak öne çıkmaktadır (Yıldırım and Johnson 1998, Mao *et al.* 2001, Chen and Hoover 2003, O'Sullivan *et al.* 2003a, O'Sullivan *et al.* 2003b, Guinane *et al.* 2005).

### **2.2.3. Faj dirençlilik**

Starter kültürlerin fajlarla enfekte edilmesi, süt endüstrisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri olma özelliğini sürdürmektedir. Fajlar, süt fermentasyonlarının kesintiye uğramasına ya da durmasına ve bu yolla büyük ekonomik kayıpların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Normalde çiğ ve pastörize sütte faj konsantrasyonu düşük olmasına karşın, kullanılan starter kültürler arasında fajlara karşı duyarlı bakterilerin bulunması durumunda, ortamdaki faj konsantrasyonu hızla artış göstermektedir. Artan faj konsantrasyonuna paralel bir şekilde duyarlı bakterilerin parçalanması da hızlanmaktadır. Ortamdaki starter kültür suşlarının bu hızlı parçalanması sonucu; asidifikasyon yavaşlamakta, proteoliz azalmakta ve aroma ve tat oluşumuna katkıda bulunan bileşiklerin

üretiminde düşme gerçekleşmektedir. Bu da fermentasyonun gecikmesine ya da durmasına neden olmaktadır (Forde *et al.* 1999, Bouchard *et al.* 2002, Gabs and Josephsen 2003). Fermentasyon ortamına fajların dahil olması; kullanılan starter kültür tipi, fermente gıda üretim yöntemi, sanitasyon işlemleri, yerel çevre ve coğrafi bölge gibi faktörlere bağlı olarak gerçekleşmektedir. Süt fermentasyon ortamları, doğası gereği faj kontaminasyonları için oldukça elverişlidir. Çiğ süt, karışık-tanımlı olmayan starter kültür kullanımı veya lizogenik özellik içeren starter kültür suşlarında bulunan profajların indüksiyonu, süt fermentasyon ortamlarında gerçekleşen faj kontaminasyonlarının başlıca kaynaklarını teşkil etmektedir. Fermente süt endüstrisinde; yeni teknolojilere dayalı hijyen ve sanitasyon yöntemlerinin devreye sokulması, starter kültür rotasyonunun, çoklu suş içeren starter kültürlerin ve faj dirençli suşların kullanımı gibi değişik yöntemlerin geliştirilmesine rağmen, faj kontaminasyonlarından kaynaklanan sorunlara etkin bir önlem alınmamıştır. Bu nedenle de son yıllarda yapılan çalışmalar; faj dirençli starter suşların geliştirilmesi, fajların karakteristik özelliklerinin detaylı tanısı ve faj-konakçı etkileşimlerinin belirlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Laktokoklarda doğal faj dirençlilik sistemlerinin genellikle plazmid kodlu karakterler oluşu, genetik manupilasyonlarda kullanılabilirliklerini de beraberinde getirmiştir. Konjugal aktarım sistemleri kullanılarak geliştirilmiş faj dirençli laktokok suşları, endüstriyel starter kültür suşları olarak kullanılmaktadır (Fabrizio *et al.* 1991, Josephsen *et al.* 1999, Durmaz and Klaenhammer 2000, Madsen *et al.* 2001, McGrath *et al.* 2002, De Haard *et al.* 2005 ).

Laktokok suşları, laktik faj yaşam döngüsünün çeşitli aşamalarında faj enjeksiyon sürecini kesintiye uğratabilecek dirençlilik sistemleri içermektedir. Bu sistemler, etkinlik mekanizmaları esas alınarak; faj adsorbsiyonunun engellenmesi, faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi, restriksiyon/modifikasyon ve abortif enfeksiyon sistemleri başlıkları altında toplanmaktadır (Sanders 1988, McGrath *et al.* 2002, Madera *et al.* 2004, Fortier *et al.* 2005).

Bakteriyel faj enfeksiyonlarında ilk aşama, fajın konakçı hücre yüzeyine tutunmasıdır (adsorbsiyon). Laktokoklarda iki aşamalı olarak gerçekleşen tutunma sürecinde öncelikle, faj yüzey proteinlerinin bakteri hücre duvarında bulunan almaç bölgeler ile teması meydana gelmektedir. Geri dönüşebilir olan bu aşamadan sonra, faj DNA'sı bakteri sitoplazma membranında bulunan ikinci bir reseptör proteinle temas ederek stabil (geri

dönüşsüz) adsorbsiyon gerçekleşmektedir. Laktokoklarda faj tutunmasının engellenmesi tipte dirençlilik sistemi, hem faj almaç bölgelerin maskelenmesi, hem de konakçı hücre membran reseptör protein sisteminin sentezinin durdurulması yolu ile gerçekleşmektedir. Her iki sistem üzerinde yürütülen çalışmalarda da, bu dirençlilik mekanizmasının gen kodunun plazmidler üzerinde taşındığı belirlenmiştir (Akçelik and Tunail 1992, Tuncer and Akçelik 2002, Hicks *et al.* 2004, Lunde *et al.* 2005).

Laktokoklarda faj DNA'sının hücre içine translokasyonunda rol oynayan sistemler üzerinde çok az bilgi mevcuttur. Bazı araştırmacılar belirli suşlarda faj tutunmasının yüksek oranda (%99 ve üzeri) gerçekleşmesine rağmen, faj DNA'sının hücre içine enjekte edilemediğini saptamıştır. Bu mekanizmanın esasına yönelik olarak yürütülen çalışmalarda; söz konusu dirençlilik sisteminin bulunduğu bakterilerde, plazmidler ya da kromozomal DNA tarafından kodlanan bazı proteinlerin, translokasyonda görev aldığı varsayılan proteinlerin üretimini baskıladığı ya da fonksiyonlarını bloke ettiği saptanmıştır (Garbutt *et al.* 1997, Akçelik 1998a, Madsen *et al.* 2001, Sturino and Klaenhammer 2004, Fortier *et al.* 2005).

Restriksiyon/modifikasyon sistemleri; hücreye giren yabancı DNA'nın parçalanmasını sağlayan restriksiyon endonükleazlar ve bu enzimlerin aktivitesinden konakçı hücre DNA'sını koruyan modifikatör metilazlar ile karakterize edilmektedir. Laktokoklarda çok yaygın olarak bulunmayan bu sistemlerin elemanları, plazmid ya da kromozomal DNA kökenli olabilmektedir. Konakçı hücre restriksiyon/modifikasyon sistemlerine karşı direnç geliştiren ya da enfeksiyonun gücüne bağlı olarak bu sistemin etkisinden kurtulan fajların, modifikatör enzimler tarafından metillenmesi, sistemin starter kültür suşlarında kullanımını sınırlamaktadır. Bu bakterilerin starter kültür suşu olarak kullanımının zorunlu olduğu durumlarda, genellikle ilave faj dirençlilik sistemleri devreye sokulmaktadır (Allison and Klaenhammer 1998, Mahoninpong *et al.* 2001, Ward *et al.* 2004, Lunde *et al.* 2005).

Abortif enfeksiyon sistemleri (Abi); faj DNA'sının bakteri hücresi içerisine enjeksiyonundan sonra, enfeksiyonun ileri aşamalarının herhangi bir basamakta engellenmesi sonucu oluşturulan dirençlilik ile karakterize edilmektedir. Etkinlik gösterdikleri faj enfeksiyon aşamaları dikkate alınarak yapılan sınıflandırma sonucu, laktokoklarda 22 farklı Abi sisteminin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sistemi diğer faj

dirençlilik mekanizmalarından ayıran en önemli kriter, faj saldırısına uğrayan dirençli konakçı hücrenin ölmesidir. Bu sayede popülasyonda faj çoğalması gerçekleşmemektedir. Laktokoklarda yaygın olarak bulunan Abi sistemlerinin gen kodu, AbiH hariç, bu bakterilerin içerdiği değişik büyüklüklerdeki plazmidler üzerinde taşınmaktadır. Söz konusu plazmidlerin, özellikle konjugal hareketlilik yeteneğine sahip olanları faj dirençli starter kültür suşu geliştirme çalışmalarının temel biyomateryalini teşkil etmektedir (Twomey *et al.* 2000, Miklič and Rogelj 2003, Domingues *et al.* 2004, Lunde *et al.* 2005).

#### **2.2.4. Sitrat fermentasyonu**

Laktik asit bakterileri içerisinde yalnız *Lactococcus* cinsi üyelerinden *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *Leuconostoc* türleri sitrati fermente edebilme yeteneğini içermektedir. Bu organizmalar sitrat fermentasyonu sonucunda asetoin ve diasetil oluştururlar. Laktokoklarda, sitrat fermentasyonu özelliğinden sorumlu olan genlerin 8.0 kb'lık bir plazmid üzerinde kodlu olduğu ve bu plazmidi kaybeden suşların süt ortamında gelişmelerinde önemli derecede yavaşlama meydana geldiği saptanmıştır. Diasetil birçok fermente süt ürünüde tat ve aromaya katkıda bulunan en önemli bileşiklerden biridir. Başta tereyağı olmak üzere, taze peynirler, acı krema, yağlı süt gibi ürünlerde kuvvetli acı tadın oluşmasına katkıda bulunmaktadır. Özellikle tereyağı, taze ve olgunlaştırılmayan peynirlerde tipik aroma ve tadın gelişimini sağlayan ve bu nedenle de söz konusu ürünlerde oluşumu arzu edilen bir bileşiktir (Bassit *et al.* 1993, Haddad *et al.* 1997, Bandell *et al.* 1998, Hugenholtz *et al.* 2000).

Diasetilin biyosentez mekanizmasına ilişkin iki yol olduğu öne sürülmektedir. Bunlardan ilki, diasetil sintaz enziminin etkisiyle ortamda biriken asetil koenzimA ve aktif asetaldehitten diasetilin oluşturulmasını esas alan enzimatik yoldur. Ancak laktokoklarda diasetil sintaz enziminin varlığı henüz belirlenmemiştir. Diğer biyosentez yolu ise,  $\alpha$ -asetolaktatın oksidatif dekarboksilasyonu sonucu diasetilin oluşumu ile karakterize edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Lactococcus* türlerinde bu yolun etkin olduğu tespit edilmiştir (Verhue and Tjan 1991, Goupil *et al.* 1996, Mauriello *et al.* 2001).

Diasetil oluşumunda ilk aşama, sitratın hücre içine alınmasıdır. Bu aşamada sitrat permeaz enzimi görev almaktadır. Hücre içine alınan sitrat, sitrat liyaz enziminin etkisiyle asetat ve okzalasetata parçalanır. Okzalasetat, okzalasetat dekarboksilaz enzimiyle pirüvata dönüştürülür. Pirüvattan da,  $\alpha$ -asetolaktat sintaz enziminin katalizörlüğünde  $\alpha$ -asetolaktat oluşturulur. Kararsız bir bileşik olan  $\alpha$ -asetolaktatın oksidatif dekarboksilasyonu (kimyasal) sonucunda ise, diasetil meydana getirilir. Buna ek olarak  $\alpha$ -asetolaktat,  $\alpha$ -asetolaktat dekarboksilaz enzimi ile veya oksidatif olmayan kimyasal dekarboksilasyon sonucu asetoine de dönüşebilmektedir. Süt ürünlerinden izole edilen bazı *L. lactis* suşlarının,  $\alpha$ -asetolaktat dekarboksilaz enzimi içermediklerinden, sitrattan hızlı bir şekilde  $\alpha$ -asetolaktat oluşturduğu belirlenmiştir. Bu mutantlar, ortamda biriken  $\alpha$ -asetolaktatın kimyasal dekarboksilasyonu yolu ile, oldukça yüksek miktarda diasetil üretimi gerçekleştirebilmektedir. Doğal tip *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşları ise, diasetil ve  $\alpha$ -asetolaktatı daha az miktarda üretmektedir. Sitrat fermentasyonu süresince,  $\alpha$ -asetolaktatın büyük bir kısmı  $\alpha$ -asetolaktat dekarboksilaz enzimi tarafından asetoine dönüştürülmektedir. Diasetil üretim mekanizması üzerine sağlanan bilgiler ışığında, yüksek oranda diasetil üretimi için değişik metabolik düzenleme stratejileri geliştirilmiştir. Diasetil üretim miktarı, starter kültür olarak kullanılan suşa bağlı olmakla birlikte; pH, oksijen ve sıcaklık gibi fermentasyon koşullarından da etkilenmektedir. Çoğu zaman yüksek miktarda diasetil oluşumu için gerekli çevresel koşullar, suşların optimum gelişme koşulları ile uyuşmamaktadır. Örneğin; yüksek oksijen gerilimi, üretim ortamında diasetil miktarının artışına yol açmakta, ancak starter kültürlerde bulunan oksijene duyarlı suşların tümünün gelişimini engellemektedir. Bu nedenle, yüksek miktarda diasetil üreten suşların tespit edilmesi, üretimden kaynaklanan bu gibi kısıtlamaların önüne geçilmesinde büyük katkılar sağlayacaktır (Swindell *et al.* 1996, Boumerdassi *et al.* 1997, Curic *et al.* 1999, Hugenholtz *et al.* 2000, Monnet *et al.* 2000, Martín *et al.* 2004).

### **2.2.5. Proteolitik aktivite**

Süt, laktik asit bakterilerinin gelişmeleri için zorunlu olan amino asitler ve peptitleri çok düşük konsantrasyonlarda içermektedir. Ancak laktik asit bakterileri sahip oldukları proteolitik aktivite sayesinde, gelişmeleri için gerekli olan bu amino asit ve peptitleri proteoliz ürünlerinden sağlayabilmektedir. Sütte laktik asit bakterilerinin gelişmeleri için elzem olan bu bileşiklerin başlıca kaynağı, sütün temel proteini olan kazeindir. Sütte  $\alpha_{s1}$ -

$\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein olmak üzere dört farklı tip kazein proteini bulunmaktadır. Bu 4 farklı kazein arasında, laktokokların optimal düzeyde gelişebilmeleri için gereksinim duydukları esansiyel amino asitlerin en ideal kaynağını,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein oluşturmaktadır. *L. lactis* subsp. *cremoris* HP suşu ile yapılan bir çalışmada, bu suşun gelişmesinin  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazeinin birlikte bulunduğu ortamda daha iyi olduğu belirlenmiştir. Proteoliz, laktokokların gelişmeleri için kritik bir parametre teşkil etmesi yanında, süt fermentasyonlarında ürünün tat ve aromasına katkıda bulunan bileşiklerin oluşturulması açısından da oldukça önemlidir. Bazı amino asitlerin, aroma ve tat bileşiklerinin öncü molekülleri olduğuna inanılmaktadır. Starter kültürler, peynir üretiminde gerekli olan proteolitik enzimlerin kaynağını oluşturmaktadır. Bu nedenlerle, starter kültür olarak kullanılacak suşların seçiminde yeterli proteolitik aktivite içermeleri, aranan bir özellik olmaktadır (Smid *et al.* 1991, Exterkate *et al.* 2001, Luoma *et al.* 2001).

Laktokoklarda proteolitik aktivite, moleküler büyüklüğü suştan suşa farklılık gösterebilen plazmidler tarafından kodlanmaktadır. Proteolitik sistem; hücre duvarında lokalize olan proteinazlar ile peptit ve amino asit taşıyıcısı proteinler ve hücre içi peptidazlardan oluşmaktadır. Laktokokların proteolitik sisteminde anahtar rolü oynayan hücre duvarına bağlı proteinaz enzimi, *prtP* ve *prtM* olmak üzere iki gen tarafından kodlanmaktadır. Yapısal gen olan *prtP*, serin proteinazların subtilisin ailesiyle homoloji gösteren bir öncü proteinini ve *prtM* ise, öncü proteinin olgunlaştırılmasında görev alan bir lipoproteini kodlamaktadır. Laktokoklarda bulunan proteinazlar kazein spesifitelerine göre ikiye ayrılmaktadır. Bunlar;  $\beta$ -,  $\alpha_{s1}$ - ve  $\kappa$ -kazein üzerinde etki gösteren P<sub>III</sub> tip proteinazlar ve daha çok  $\beta$ -kazein üzerinde etki gösteren P<sub>I</sub> tip proteinazlardır. Her iki enzim de  $\beta$ -kazeini parçalamasına karşın,  $\beta$ -kazeini parçalama yolları farklıdır ve sonuçta farklı proteoliz ürünleri oluşmaktadır. Birçok laktokok suşunun karışık bir P<sub>I</sub>-P<sub>III</sub> enzim spesifitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Efstathiou and McKay 1976, Leenhouts *et al.* 1991, Van Der Vossen *et al.* 1992, Flambard *et al.* 1998, Malone *et al.* 2002). Proteinazlar tarafından kazeinin parçalanmasıyla oluşan oligopeptitler, laktokokal peptit transport sistemiyle hücre içine taşınır ve burada peptidazların etkisiyle peptitler ve amino asitlere parçalanır. Laktokoklarda oligopeptit transfer sistemi (Opp); ABC transporter süperailisine ait olan OppA, OppB, OppC, OppD ve OppF olmak üzere beş farklı transfer proteininden oluşmaktadır. Oligopeptitler ilk aşamada OppA proteinine bağlanırlar. Membrana bağlı olarak bulunan OppA'nın, peptit transportunun spesifitesini belirleyen protein olduğu

düşünülmektedir. Laktokoklarda dipeptidazlar, tripeptidazlar, aminopeptidazlar, prolidaz ve endopeptidazları içeren birçok farklı tipte peptidaz bulunmaktadır. *Lactococcus* suşları ile yapılan çalışmalar; proteinaz ve peptidaz üretimi ve regülasyonunun, gelişme ortamı ve üretici suşa bağlı olarak değişim gösterdiğine işaret etmiştir (Smid *et al.* 1991, Bruinenberg *et al.* 1992, Meijer *et al.* 1996, Exterkate *et al.* 2001, Luoma *et al.* 2001, Helinck *et al.* 2003).

Kazeinin hidrolizi laktokoklarda çok yavaş bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Bu da laktokokların sütte maksimum gelişme hızına ulaşmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Hücre duvarı ile ilişkili olan hücre dışı proteinazın üretim artışına bağlı olarak, laktokokların sütte gelişme ve asidifikasyon hızlarının da arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca proteinaz enzim tipinin de *L. lactis* suşlarının gelişimi üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (Bruinenberg *et al.* 1992, Flambard *et al.* 1997, Helinck *et al.* 2003). Fermentasyon ortamında asıl peptidoliz, starter olarak kullanılan bakterinin lize olmasıyla gerçekleşmektedir. Bakterinin lize olmasıyla hücre içi peptidazları ortama salınmakta ve bu enzimler fermentasyon ortamında bulunan peptitlere doğrudan etki edebilmektedir. Böylece aroma ve tat için gerekli olan amino asit bileşikleri daha fazla miktarlarda sentezlenmektedir. Bakteriyel lizinin ardından peptidazların ortama salınma oranı ve hızı, fermente ürünlerden özellikle peynirlerde olgunlaşma, tat ve aroma oluşumu açısından önem taşımaktadır. Proteinaz ve peptidazların spesifik aktiviteleri sonucu oluşan amino asit ve peptitlerin, fermente ürünlerin aroma ve tat gelişiminde büyük pay sahibi oluşu yanında, laktokokların gelişmelerinde kritik bir rol üstlenmeleri, söz konusu enzimlerin moleküler karakterizasyonları ve üretimlerinin düzenlenmesi yönündeki çalışmalara büyük bir ivme kazandırmıştır (Meijer *et al.* 1996, Boutrou *et al.* 1998, Buist *et al.* 1998, Luoma *et al.* 2001, Malone *et al.* 2002, Martínez-Cuesta *et al.* 2002, de la Plaza *et al.* 2004, Picon *et al.* 2005).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bakteriler ve fajlar

Çalışma kapsamında; Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan çiğ süt örneklerinden izole edilen 50 adet laktokok suşu ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanan 61 adet laktokok fajı ile Prof. Dr. Ingolf. F. Nes' den (Department of Genetics and Biochemistry, Agricultural University of Norway, As/Norway) temin edilen 23 adet (*L. lactis* SIK-83, *L. lactis* IL1403, *L. lactis* LMG2907, *L. lactis* LMG2908, *L. lactis* LMG2909, *L. lactis* LMG2910, *L. lactis* LMG2911, *L. lactis* LMG2912, *L. lactis* LMG2088, *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG2132, *L. lactis* JC17, *Lactobacillus sake* NCDO2714, *Lactobacillus plantarum* LMG2003, *Listeria innocua* LMG2813, *Escherichia coli* LMG3083, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium LMG3085, *Pseudomonas fluorescens* LMG3020, *Enterococcus faecalis* LMG2708, *Enterococcus faecalis* LMG2602, *Staphylococcus aureus* LMG3022, *Staphylococcus carnosus* LMG2709, *Bacillus cereus* LMG2732 ve *Pediococcus pentosaceus* LMG2001) indikatör bakteri kullanıldı.

Bakteriler M17, LB, MRS ve Elliker broth ortamlarında % 20 oranında steril gliserol ilave edilerek, -20 °C'de saklandı. Fajlar ise, M17 broth ortamında % 40 oranında steril gliserol ilave edilerek, -20 °C'de muhafaza edildi.

Çalışma materyalleri, gliserol ilave edilmemiş M17, LB, MRS ve Elliker Broth ortamında, +4 °C'de ve haftalık transferler yapılarak korundu.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Laktokok suşlarının izolasyonu ve tanısı

Çiğ süt örneklerinden  $10^{-7}$  düzeyine kadar hazırlanan seri dilüsyonlardan, Neutral Red Chalk Lactose Agar (NRCLA) (Harrigan and McCance 1966) ortamlarına 0.1 mL aktararak, drigalski spatülü ile yayıldı.  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilen petri plaklarında tipik laktokok kolonileri; koyu kırmızı renkte ve çevrelerinde berrak zon oluşumu kriterlerine göre seçildi.

#### Neutral Red Chalk Lactose Agar (NRCLA)

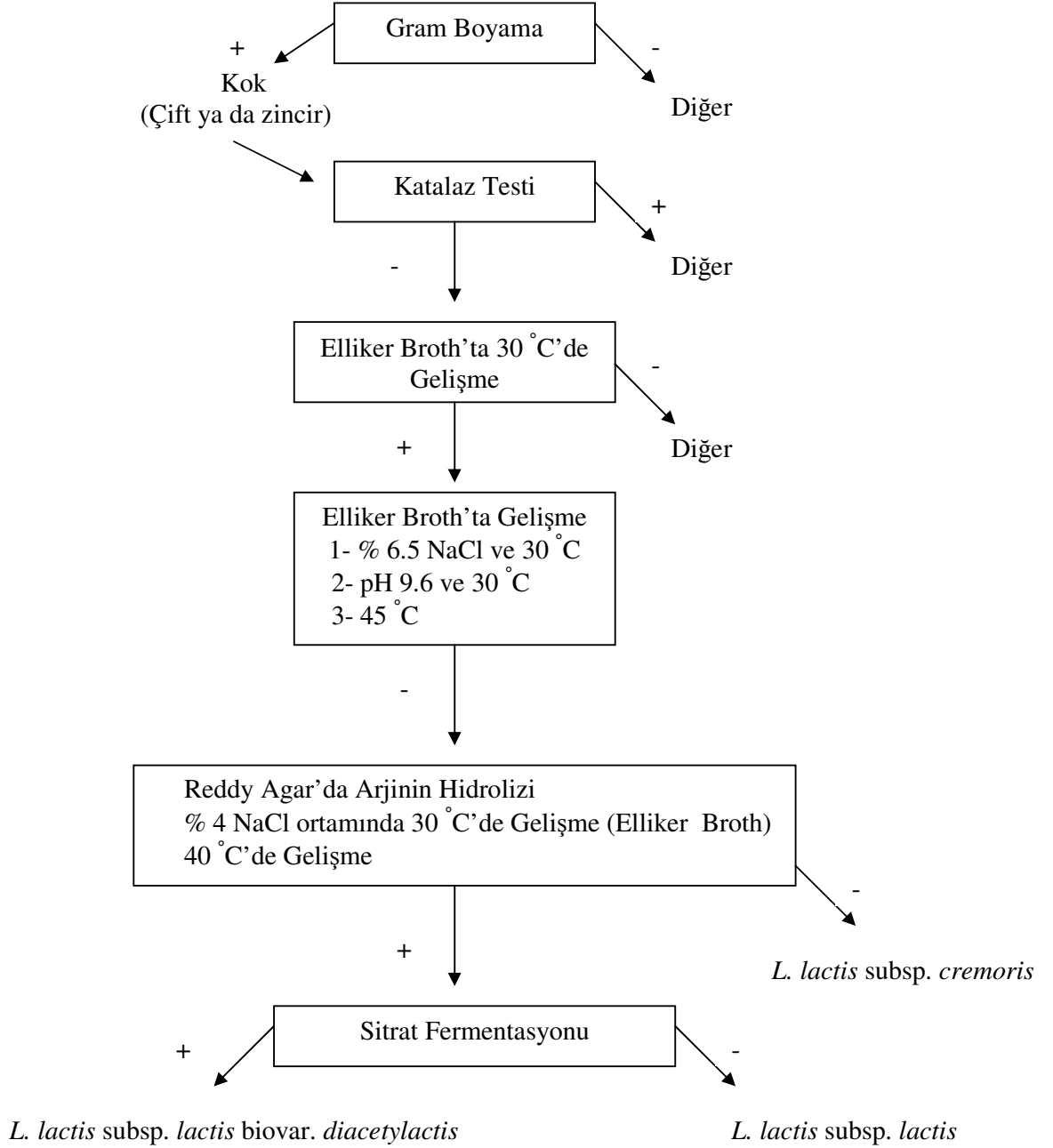
Laktoz	10	g
Pepton	3	g
Lab-Lemko et ekstraktı	3	g
Maya ekstraktı	3	g
Agar	15	g
CaCO <sub>3</sub>	15	g
Neutral Red (%1'lik çözelti)	5	mL
Destile su	1000	mL

pH  $6.8 \pm 0.02$  (sterilizasyondan önce)

Pepton, et ekstraktı ve maya ekstraktı destile suda çözüldükten sonra (buhar banyosunda) pH 6.8'e ayarlandı. Agar ilavesinden sonra ortam  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sıcaklık uygulanarak sterilize edildi. Laktoz, CaCO<sub>3</sub> ve neutral red ayrı ayrı  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika süre ile sterilize edilip, besiyerine karıştırıldı (Harrigan and McCance 1966) .

### 3.2.2. İzolatların Tanımlanması

Laktokok suşlarının tanımlanmasında Şekil 3.1.'de verilen tanı şeması izlendi (Huggins 1984, Holt *et al.* 1994).



Şekil 3.1. *L. lactis subsp. lactis* suşlarının tanısında kullanılan testler (Huggins 1984, Holt *et al.* 1994).

### 3.2.2.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi

Bakteri morfolojileri, Gram boyama yöntemi ile hazırlanan preparatların ışık mikroskopunda incelenmesi (X1500) sonucunda belirlendi. Katalaz testi için, M17 agar ortamında geliştirilen bakteri kolonileri lam üzerine aktarıldı ve % 3'lük hidrojen peroksit çözeltisinden bir damla ilave edilerek, mikroskop altında 100 X büyütmede gaz çıkışı olup olmadığı gözlemlendi. Gaz çıkışı gözlenen lamlarda test pozitif olarak değerlendirildi.

#### M17 Broth ve Agar

Polipepton	5	g
Fitopepton	5	g
Maya ekstraktı	2.5	g
Et ekstraktı	5	g
Laktoz veya Glikoz (%10'luk)	50	mL
L(+) askorbik asit	0.5	g
$\beta$ -disodyum gliserofosfat	19	g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1M)	1	mL
Destile su	950	mL
pH 7.15 $\pm$ 0.02 (sterilizasyondan önce)		

Ortam içerikleri, laktoz hariç, 950 mL destile su içerisinde çözüldürülerek agar ilavesinden önce pH 7.15'e ayarlandı. Sterilizasyon, 121 °C'de 15 dakika süre ile yapıldı. Ortam 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, ayrı sterilize edilen laktoz çözeltisi (50 mL) ilave edildi (Terzaghi and Sandine 1975).

### 3.2.2.2. Arjininden amonyak oluşumu

İzolatların arjininden amonyak oluşturma özelliklerinin saptanması amacı ile Reddy agar (Reddy *et al.* 1969) kullanıldı. İzolatlar, Reddy agar ortamına inoküle edildikten sonra, petri kutuları 30 °C'de 48 saat tutuldu ve süre bitiminde gelişen kolonilerdeki renk değişimlerine göre arjininden amonyak oluşumu tanımlandı. Arjininden amonyak oluşturan kolonilerde gelişen asitlik, amonyak oluşumu ile nötralize edilmekte ve asitliğin neden olduğu sarı renk kaybolmaktadır. Arjininden amonyak oluşturmeyenlerde ise, asitlik indikatör boya rengini (menekşe) sarıya çevirmekte ve inkübasyon boyunca renk değişmemektedir (Reddy *et al.* 1969).

#### **Reddy Agar**

Tripton	5	g
Maya ekstraktı	5	g
L-arjinin monohidroklorit	4	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	g
CaCO <sub>3</sub>	3	g
Karboksimetil selüloz	6	g
Rekonstitüt yağsız süt (%10)	50	mL
Brom krezol purpur (%0.1)	20	mL
Agar	15	g
pH 6.8 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)		

Öncelikle 430 mL destile su içeren bir erlenmayer içinde agar, 500 mL destile su içeren bir diğer erlenmayer içinde ise karboksimetil selüloz, kaynar su banyosunda çözüldü ve birbirine karıştırıldı. Daha sonra bu ortama tripton, maya ekstraktı, L-Arjinin monohidroklorit, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> ilave edildi ve erlenmayer alüminyum folyo ile kaplanarak 10 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. 121 °C'de 15 dakika sıcaklık uygulanarak sterilize edilen ortam, ayrı sterilize edilen rekonstitute skim milk ve brom krezol purpur aktarıldıktan sonra petrilere döküldü.

### 3.2.2.3. Elliker broth besiyerinde gelişme

Bakteriler Elliker broth ortamında 30 °C'de 18 saat inkübe edildikten sonra, % 6.5 NaCl ilavesi ve pH 9.6'ya ayarlanarak yeniden hazırlanan iki ayrı Elliker broth ortamına inoküle edildi. Ayrıca Elliker broth içinde, suşların 45 °C'de gelişme özellikleri de incelendi.

#### **Elliker Broth (Difco Manual, 1984)**

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 içeren bir erlenmayer içerisinde kaynar su banyosunda eritildi ve soğuduktan sonra besiyeri ortamına ilave edildi. Sterilizasyondan önce ortam pH'sının ayarlanmasında 6N NaOH kullanıldı. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edildi.

### 3.2.2.4. Sitrat fermentasyon testi

Sitrat fermentasyonu, Kempler ve McKay (1980) tarafından önerilen yöntemle tanımlandı. Bakteriler sitrat fermentasyon ortamlarına inoküle edilerek, anaerobik koşullarda (Oxoid anaerobik sistem) 30 °C'de 48 saat inkübasyona tabi tutuldu. Besiyerinde rengin maviye dönüşümü pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Kempler and McKay 1980).

## **Sitrat Fermentasyonu Besiyeri**

### **Temel Besiyeri**

Rekonstitüt yağsız süt	10	mL
Pepton (süt protein hidrolizatı)	2.5	g
Dekstroz	5	g
Agar	15	g
Destile su	970	mL
pH $6.6 \pm 0.02$ (sterilizasyondan önce)		

Ortam,  $115^{\circ}\text{C}$ 'de 12 dakika sıcaklık uygulanarak sterilize edildi.

### **Çözelti A**

Potasyum ferri siyanat	10	g
Destile su	1000	mL

### **Çözelti B**

Ferrik sitrat	1	g
Sodyum sitrat	1	g
Destile su	40	mL

Sterilize edilen temel besiyeri,  $100^{\circ}\text{C}$  su banyosunda 30 dakika süre ile tutulan ve  $55^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulan A ve B çözeltilerinin her birinden, litreye 10 mL olacak şekilde ilave edilerek karıştırıldı ve petrilere döküldü.

### **3.2.3. Laktokok suşlarının laktik asit üretim düzeylerinin belirlenmesi**

Bakterilerin laktik asit üretim düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, 18 saatlik aktif kültürlerden skim milk ortamlarına % 1 oranında inokülasyonlar yapıldı ve bu ortamlar  $30^{\circ}\text{C}$ ' de 6 ve 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bu inkübasyon süreleri sonunda pH

ölçümleri yapıldı. Ayrıca 24 saatlik örneklerde suşların oluşturduğu laktik asit miktarı titrasyon asitliği cinsinden hesaplandı.

Değerlendirme yapılırken, skim milk besiyerinin başlangıç pH değeri ile inkübasyon sonrası oluşan pH değerleri arasındaki fark ( $\Delta$ pH) dikkate alındı. Üretilen laktik asit miktarı ise, aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Bradley *et al.* 1992).

$$\% \text{ Laktik Asit} = \frac{[\text{Harcanan NaOH miktarı(ml)}] \times [\text{NaOH'ın Normalitesi}]}{\text{Örnek Miktarı (mL)}}$$

#### 3.2.4. Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosin üretim özelliğinin tanısında, van Belkum *et al.* (1989) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Test edilecek laktokok suşları M17 broth ortamında 30 °C'de 24 saat geliştirildikten sonra, M17 agar ortamlarına aktarıldı ve 30 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre sonunda gelişen kolonilerden steril kürdan aracılığıyla M17 agar ortamına, bir petride beş farklı laktokok suşu olacak şekilde nokta ekim yapıldı ve 30 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Denenen laktokok suşları içerisinde, antimikrobiyel aktiviteye sahip olanları tespit etmek amacıyla, bölüm 3.1.1.'de verilen indikatör bakterilerin tümü kullanıldı. MRS broth, LB broth ve M17 broth ortamlarında geliştirilen indikatör bakteriler, % 0.7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar (MRS, LB ve M17) ortamlarına inoküle edilerek, nokta ekim yapılan M17 agar ortamı üzerine ikinci tabaka halinde döküldü ve homojen bir şekilde yayıldı. Daha sonra petriyer indikatör bakterilerin gelişimi için uygun sıcaklıkta 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda laktokok suşlarının indikatör bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları çap olarak (mm) belirlendi (van Belkum *et al.* 1989).



### **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 <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5	g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> 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.

### **Luria Bertani Broth (LB)**

Tripton	10	g
Maya ekstraktı	5	g
NaCl	10	g
Destile su	1000	mL

pH 7.0 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam, 121 °C'de 15 dakika sıcaklık uygulanarak sterilize edildi.

### 3.2.4.1. Proteolitik enzim uygulaması

Üretilen antimikrobiyel maddenin protein doğasında olup olmadığının belirlenmesi için, öncelikle indikatör bakterilere karşı zon veren *L. lactis* suşları, M17 broth ortamında 30 °C'de 18 saat süreyle geliştirildi. Hazırlanan kültür ortamları 6000 devirde 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutularak çöktürüldü. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek yeni tüplere aktarılan kültür üst sıvılarının pH'sı, 6N NaOH kullanılarak 6.5-7.0 arasına ayarlandı ve bu ortamlar 0.45 µm por çapında membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilmek suretiyle sterilize edildi. Nötralize edilmiş steril kültür üst sıvılarına son enzim konsantrasyonu 1mg/mL olacak şekilde proteinaz K (Sigma Chem. Co., USA) aktarıldı ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda enzim aktivitesi 100°C'de 5 dakika sıcaklık uygulaması ile sonlandırıldı. Enzim ilave edilmeyen örnekler kontrol olarak kullanıldı (van Belkum *et al.* 1989, Franz *et al.* 1997).

Enzim uygulanan ve uygulanmayan nötralize edilmiş kültür üst sıvılarında antimikrobiyel aktivite; test edilen *L. lactis* suşuna en yüksek düzeyde duyarlılık gösteren indikatör bakterilere karşı, kuyu diffüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Kültür üst sıvıları kuyucuklara 100 µL olacak şekilde aktarıldı (Franz *et al.* 1997).

### 3.2.4.2. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi

#### 3.2.4.2.1. pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

30 °C'de 18 saat geliştirilen *L. lactis* kültürleri 6000 devirde 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu ve kültür üst sıvılarının pH'ları, 6 N NaOH veya 6 N HCl kullanılarak 2.0-11.0 değerleri arasında ayarlandı. pH'ları ayarlanan kültür üst sıvıları, 0.45 µm por çaplı membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilerek sterilize edildi. Bu şekilde hazırlanan ortamlar +4 °C'de 24 saat bekletildi. pH değişimlerinin bakteriyosinlerin inhibisyon düzeyleri üzerindeki etkisi; membran filtrelerden geçirildikten sonra hiçbir işleme tabi tutulmayan kültür üst sıvılarının inhibisyon etkinliklerinin, pH düzeyleri

ayarlanan kültür üst sıvılarının inhibisyon etkinlikleri ile karşılaştırılması sonucu tanımlandı.

Değişik pH düzeylerinde bakteriyosin aktivitelerindeki değişmeler, duyarlı indikatör bakterilere karşı kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak saptandı. Bakteriyosin aktiviteleri; inhibisyon zonu alınan en yüksek dilüsyon oranının, 1000/aktarılan miktar ile çarpımından elde edilen arbitrary ünite (AU) cinsinden hesaplandı (Franz *et al.* 1997).

#### **3.2.4.2.2. Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi**

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 süreyle bekletilmesinden sonra, bu ortamlardan alınan örneklerin duyarlı indikatör bakterilere denemesi suretiyle saptandı. Kontrol olarak sıcaklık uygulanmamış kültür üst sıvıları kullanıldı. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerinde yarattığı etki, kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi (Franz *et al.* 1997).

#### **3.2.4.2.3. Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Bakteriyosin aktivitesi üzerine değişik enzimlerin etkisi; pH ve sıcaklığın etkisinin saptandığı testlerde olduğu gibi, kültür üst sıvıları kullanılarak tanımlandı. Nötralize edilmiş ve nötralize edilmemiş kültür üst sıvılarına, son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde tripsin (pH 7.0 Merck, Germany),  $\alpha$ -kemotripsin (pH 7.0 sigma Chem. Co., USA), pepsin (pH 3.0 sigma Chem. Co., USA),  $\alpha$ -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 edildi ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Enzim aktiviteleri, 100 °C'de 5 dakika ısı uygulaması ile sonlandırıldı. Denemelerde kontrol olarak, enzim muamele edilmemiş kültür üst sıvıları kullanıldı. Bakteriyosin aktiviteleri, kritik dilüsyon yöntemi esas alınarak saptandı (Franz *et al.* 1997).

### 3.2.5. Laktokok suşlarının faj duyarlılıklarının belirlenmesi

#### 3.2.5.1. Faj titresinin yükseltilmesi

Faj duyarlılık testlerinde, titreleri  $10^7$  plak oluşturma birimi (pfu/mL) ve daha yukarısına yükseltilecek faj süspansiyonları kullanıldı. 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 karıştırıldı ve  $30^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika tutularak adsorbsiyonun tamamlanması beklendi. Adsorbsiyonun gerçekleştiği faj-bakteri karışımları, 10 mL steril M17 broth ortamlarına aktarıldı ve  $30^\circ\text{C}$ 'de 18 saat inkübe edildi. Bu süre bitiminde ortamlar 6000 devir/dk hızla 15 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutuldu ve tüplerde oluşan üst sıvılar, steril 0.45  $\mu\text{m}$  por çapında membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilmek suretiyle faj süspansiyonları elde edildi. Söz konusu faj süspansiyonları homolog konakçı suşlara toplam 3 pasaj denedikten sonra, faj titreleri saptandı.

Faj titresinin belirlenmesi çift tabaka agar yöntemine göre yapıldı (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 sağlandı. 3 saatlik M17 broth kültürlerinden M17 yumuşak agar içine 0.1 mL ilave edilip köpürmeyecek bir şekilde karıştırıldı ve petri plağına, homojen yayılmasına özen gösterilerek, döküldü. Katılmasına için bir süre beklendikten sonra, faj süspansiyonlarından ve hazırlanan faj seyreltilerinin herbirinden, bölümlere ayrılan petri plaklarına 10'ar  $\mu\text{L}$  damlatma yapıldı.  $30^\circ\text{C}$ 'de 18 saat inkübe edilen ortamlarda, damlatılan bölgelerdeki lize plakları incelenerek faj titreleri belirlendi.

**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 aktarıldı (15-20 mL) ve  $22-25^\circ\text{C}$ 'de 18 saat tutuldu. Üst tabaka ortamı, M17 alt tabaka içeriklerinin tümünün katılması ile hazırlandı. % 0.45 oranında agar içeren üst

tabaka, 3 mL'lik porsiyonlar halinde 121 °C'de 15 dakika sıcaklık uygulaması ile sterilize edildi (Terzaghi and Sandine 1975).

### **3.2.5.2. Laktokok suşlarının 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 belirlendi. Hazırlanan 3 saatlik bakteri kültürlerinden yumuşak agar ortamına 0.1 mL aktarılıp karıştırıldıktan sonra, alt tabaka M17 agar üzerine döküldü. Yumuşak agarın homojen bir şekilde alt tabaka üzerine yayılması sağlanıp, katılaşması için bir süre beklendi. Bu süre sonunda test edilecek faj lizatları, 10 µL olacak şekilde ortama damlatıldı. Test ortamları 30 °C'de 18 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra, faj plak oluşumuna ve faj plak etkinliği düzeylerine göre, suşlar duyarlı ya da dirençli olarak tanımlandı (Terzaghi and Sandine 1975).

### **3.2.6. Laktokok suşlarının diasetil üretim düzeylerinin belirlenmesi**

Araştırmada kullanılan laktokok suşlarının diasetil üretim düzeylerinin belirlenmesi amacıyla King (1948) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemle göre, 18 saatlik aktif kültürlerden skim milk ortamına %1 oranında inokülasyonlar yapıldı ve kültürler 30 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda her bir örnekten 1'er mL hacimler eppendorf tüplerine alındı ve üzerlerine 0.5 mL  $\alpha$ -naftol ( % 1) ve 0.5 mL KOH (% 16) ilave edilerek 30 °C'de 10 dakika süre ile bekletildi. Bu süre sonunda tüpteki sıvı yüzeyinde kırmızı halka oluşumuna göre değerlendirme yapıldı.

### **3.2.7. Laktokok suşlarının proteolitik aktivite düzeylerinin belirlenmesi**

Laktokok suşlarının proteolitik aktivite düzeyleri, gelişme ortamında meydana gelen tirozin miktarının spektrofotometrik olarak ölçümü ile tespit edildi. Bu amaçla Citti *et al.* (1963) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Laktokok suşları, Elliker broth ortamında 30

°C'de 24 saat süre ile inkübasyona tabi tutulduktan sonra, bu aktif kültürlerden skim milk ortamına % 1 oranında inokülasyon yapıldı. Bu ortamlarda 30 °C'de 24 saat geliştirilen kültürlerden, 2'şer mL hacimdeki örnekler steril erlenlere aktarıldı ve 1 mL destile su ilave edilerek karıştırıldı. Analiz için hazırlanan bu örneklere 10 mL çözelti A uygulamasından (10 dakika) sonra, filtrasyon işlemi yapıldı (Whatman No.40) ve filtratlar 5 mL'lik hacimler halinde ayrı erlenlere alındı. Bunların üzerine 10 mL B çözeltisi ve 3 mL C çözeltisi ilave edilip, mavi renk oluşumu için 5 dakika beklendi. Spektrofotometrik ölçümler, 1 cm ışık yoluna sahip küvetler kullanılarak 650 nm dalga boyunda yapıldı (Shimadzu UV-1700 spectrophotometer). Elde edilen değerler tirozin standardı sonuçları ile karşılaştırıldı ve tirozin eşdeğeri olarak verildi. Örneklerin okunmasında şahit olarak, steril reconstitute skim milk besiyerinden alınan (2 mL) ve yukarıda belirtilen işlemler uygulanarak elde edilen karışım kullanıldı.

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

**B Çözeltisi:** 150 g sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ve 20 g tetrasodyum-difosfat 1000 mL destile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

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

**Tirozin Standart Çözeltisinin Hazırlanması:** 100 mg tirozin, 250 mL destile su içerisinde çözüldü. Tirozin çözeltisinden 2.5, 5, 10, 15, 20 ve 30 mL hacimlerde alındı ve ayrı ayrı her biri 100 mL' ye tamamlandı. Bu çözeltilerden 5'er mL alınarak erlenlere aktarıldı. Çözeltilerin üzerine 1'er mL destile su ilave edilerek hacimleri 6 mL' ye tamamlandı. Hazırlanan standart çözelti örneklerinin diğer işlemleri, 3.2.7.' de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

### 3.2.8. Laktokok suşlarının plazmid içeriklerinin belirlenmesi

#### 3.2.8.1. Plazmid izolasyonu

M17 broth besiyerinde 30 °C'de 18 saat geliştirilen *L. lactis* kültürlerinden, 10 mL'lik M17 broth ortamlarına birer mL'lik inokülasyonlar yapıldı ve tüpler 30 °C'de 3-3.5 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre bitiminde santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri, 6000 devirde 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Hücre çökeltisi kurutulduktan sonra, 379 µL sakkaroz tamponunda çözüldü ve steril eppendorf tüplerine aktarıldı. 37 °C'ye kadar ısıtılan bu ortama, 96.5 µL lizozim çözeltisi ilave edilerek 37 °C su banyosunda 5 dakika tutuldu. 48.2 µL Tris-EDTA-1 uygulamasından sonra, eppendorf tüplerine % 20 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 27.6 µL aktararak karıştırıldı. Bu aşamada ortamda viskozitenin artışı, lizozin başladığını göstermektedir. Lizozin tamamlanması için, eppendorf tüpleri 37 °C su banyosunda 10 dakika süre ile tutuldu. Bu süre sonunda tüpler mekanik karıştırıcıda ve yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA'nın kırılması sağlandı. Ortama, yeni hazırlanmış 3 N NaOH çözeltisinden 27.6 µL ilave edildi ve tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dakika süre ile yavaş bir şekilde çevrilerek kromozomal DNA'nın alkali denatürasyon koşulları oluşturuldu. Ortam pH'sının uygulama sırasında 12.1 – 12.3 arasında olup olmadığı kontrol edildi. Denatürasyon aşamasının sonunda eppendorf tüplerine 49.6 µL 2 M Tris-HCl çözeltisi aktararak, 3 dakika süre ile yine düz bir zeminde karıştırıldı. Ortam pH'sının 8.5-9.0 arasına düşüşü ile nötralizasyonun sağlandığı belirlendi. Eppendorf 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 uygulandı. Tüplerde oluşan üst faz, mikropipet ile yeni eppendorf tüplerine aktarıldı ve deproteinasyonun sağlanması için kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisinden 700 µL ilave edildi. Tüpler +4 °C'de 15000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek üst faz alındı ve eşdeğer hacimde izopropanol uygulandı. Ekstraktlar – 20 °C'de 1 gece bekletildi ve plazmid DNA, 15000 devirde 20 dakika santrifüj edilmek suretiyle çöktürüldü. Son aşamada sıvı faz akıtılarak DNA çökeltisi kurutuldu. Çökeltiler, 20 µL Tris-EDTA-2 içerisinde çözüldü ve elektroforez

uygulamasından önce RNaz A stok çözeltisinden 2 µL ilave edilerek 37 °C’de 45 dakika inkübe edildi (Anderson and McKay 1983).

### **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 Çözeltisi**

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 Çözeltisinin Hazırlanışı:** 100 g fenol üzerine 20 mL destile su ve 3 g NaCl aktarılarak 45 °C'deki su banyosunda çözüldü. Ortama 0.1 g hidroksiguinolin ilave edildi ve karıştırılarak oda sıcaklığında tutuldu.

**RNaz A Cözültisinin Hazırlanışı:** 5 mL steril destile su içinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat cözültisinin pH'sı, asetik asit ile 5'e ayarlandı ve üzerine 5 mg RNaz A ilave edildi. Kaynar su içerisinde 5 dakika tutulduktan sonra, ortam  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### **3.2.8.2. Elektroferez**

DNA örneklerinin elektroferezi, % 0.7 agaroz içeren jellerde yapıldı (Meyers *et al.* 1976). Yatay ve dikey jel sistemleri için agaroz, 100 mL tris-asetat elektroferez tamponu içerisinde ve kaynar su banyosunda cözüldü.  $45^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulan ortam elektroferez plakalarına 30-50 mL olacak şekilde aktarıldı ve jel tarakları yerleştirilerek 60 dakika bekletildi. Bu süre sonunda tampon cözelti, jeli kapatacak şekilde elektroferez tanklarına döküldü ve jellerin zedelenmemesine dikkat edilerek, taraklar çıkartıldı.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 45 dakika inkübe edilen DNA örnekleri su banyosundan alınarak, 2  $\mu\text{L}$  marker boya cözeltisi ile karıştırıldı ve mikropipet aracılığı ile jel kuyucuklarına aktarıldı. Elektroferez, 100 voltta 3-3.5 saat süreyle yapıldı. Marker boyanın jel sistemleri terk etmesinden sonra, elektrik akımı kesildi ve ortamdan alınan jeller, kullanılan elektroferez tamponunun yeni hazırlanmış 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  etidyum bromit içeren cözeltisinde 1 saat boyandı. Boyama işlemi bitiminde jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışıktta incelendi ve Kodak Gel Logic 200 Imaging System kullanılarak fotoğrafları alındı (Macrina *et al.* 1982).

#### **TRİS-Asetat Tampon**

Tris	4.84	g
Sodyum asetat	4.08	mL
EDTA	0.37	mL
Destile su	1000	mL
pH $8.0 \pm 0.02$		

### **Marker Boya**

Bromfenol blue	0.25	g
Sakkaroz	40	g
Destile su	100	mL

### **3.2.8.3. Plazmidlerin 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 yararlanıldı (Macrina *et al.* 1978, Southern 1979, Schaffer and Sderoff 1981). Marker ccc DNA moleküllerinin agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile, bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğrileri çıkarıldı. İstatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek, bakterilerden izole edilen plazmidlerin büyüklükleri saptandı (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)

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

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

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

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

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

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

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

$\alpha$  = Moleküler büyüklüğü bilinmeyen plazmidin jel üzerindeki göçü (mm)

### **3.2.9. *L. lactis* suşlarında endüstriyel özelliklerin stabilitesinin belirlenmesi**

Bakteriyosin üretme, laktöz fermentasyonu ve proteolitik aktivite gibi endüstriyel öneme sahip özelliklerin *L. lactis* suşlarındaki stabilitesi; denenen suşların her birinin % 10 rekonstitute skim milk (Oxoid Ltd., England) ortamında 10 pasaj (~ 70 jenerasyon) geliştirilmesinden sonra, seçilen kolonilerin bu özellikler bakımından tekrar test edilmesi suretiyle saptandı (Coakley *et al.* 1997). Bu özellikleri sürdüren kolonilerin popülasyondaki oranı, yüzde stabilite cinsinden ifade edildi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Laktokok Suşlarının Tanısı

Araştırmada kullanılan laktokok suşları, Türkiye'nin çeşitli illerinden sağlanan çiğ süt örneklerinden izole edildi (Çizelge 4.1.). Aseptik koşullara dikkat edilerek alınan ve laboratuvara getirilen çiğ süt örneklerinin steril fizyolojik tuzlu su (% 0.85 NaCl) içerisine  $10^{-7}$  düzeyine kadar seri dilüsyonları hazırlandı. Her bir dilüsyon tüpünden Neutral Red Chalk Lactose Agar (NRCLA) besiyeri üzerine yayma yöntemiyle ekimler yapılarak petri plakları 30 °C' de 48 saat inkübasyona tabi tutuldu. *Lactococcus* cinsi üyeleri NRCLA ortamında üreme gösterdiklerinde, koyu kırmızı renkte koloniler oluşturmakta ve besiyerinde bulunan kalsiyum karbonatın ( $\text{CaCO}_3$ ) nötralizasyonu sonucu kolonilerin çevresinde berrak zonlar meydana gelmektedir. Bu özellikteki koloniler içerisinde; Gram-pozitif, kok morfolojisine sahip, Elliker broth ortamında 30 °C inkübasyon sıcaklığında gelişme gösteren, ancak aynı ortamda 45 °C inkübasyon sıcaklığı, % 6.5 oranında NaCl ilavesi (30 °C) ve ortam pH sının 9.6 düzeyine çıkarılması (30 °C) gibi 3 bağımsız koşulda da üremeyenler ile *L. lactis* alt türlerinin tanı testlerine devam edildi.

İzolatların alt tür düzeyinde tanısında, *L. lactis* subsp. *lactis*'in arjininden amonyak oluşturma, 40 °C inkübasyon sıcaklığında ve % 4 oranında NaCl ilave edilmiş Elliker broth'ta gelişme (30 °C) özelliği ile *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'in sitrat fermentasyonu yeteneğinden yararlanıldı. Bu testlerde negatif sonuç veren suşlar ise, *L. lactis* subsp. *cremoris* olarak tanımlandı. Ancak MBLC38 ve MBLC50 kodlu suşlar, *L. lactis* subsp. *lactis* suşları gibi 40 °C' de gelişmesine rağmen, diğer tüm fenotipik karakteristikleri *L. lactis* subsp. *cremoris* suşları ile benzer bulundu (Çizelge 4.2.). Corroler *et al.* (1999) tarafından yürütülen bir çalışmada, bütün tanısal kriterleri *L. lactis* subsp. *cremoris* ile uyum gösteren, ancak 40 °C' de üreme yeteneğine sahip CNRZ109 suşu, *L. lactis* subsp. *cremoris* olarak tanımlanmıştır. Bu veriye dayanılarak MBLC38 ve MBLC50 izolatları da atipik *L. lactis* subsp. *cremoris* suşları olarak tanımlandı. MBL34 kodlu bakteri ise; % 4 NaCl ortamında (30 °C) gelişebilme, sitrat fermentasyon yeteneği ve arjininden amonyak oluşturma karakteristikleri ile tanımlanan diğer alt türlerden farklı özellikler gösterdi. Bu suşun atipik bir *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* olması güçlü bir olasılıktır. Ancak suşun kesin tanısının yapılabilmesi için ileri moleküler genetik

ve biyokimyasal testlere gereksinim vardır. Diğer 49 izolatın; 30 adedinin *L. lactis* subsp. *lactis*, 15 adedinin *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve 4 adedinin de *L. lactis* subsp. *cremoris* olduğu belirlendi (Çizelge 4.2.).

Türkiye'nin değişik bölgelerinden sağlanan çiğ süt örneklerinden izole edilen laktokoklar içerisinde tanımlanan *L. lactis* türleri arasındaki oran, literatür verileri ile paralellik göstermiştir. Değişik ekosistemlerde yürütülen çalışmaların tümünde; doğal ortamlarda *L. lactis* subsp. *cremoris*'in, *L. lactis* subsp. *lactis*'e kıyasla çok daha düşük oranda bulunduğu saptanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'in ise, sadece sitrata fermente edebilme yeteneği içermesi ile *L. lactis* subsp. *lactis*'den ayrılması ve bu özelliğin plazmid kodlu olmasından dolayı kendiliğinden kaybı sonucu sıklıkla *diacetylactis*'in *lactis*'e dönüşümünün gerçekleşmesi, aynı kıyasın bu biyovaryete için yapılmasını engellemektedir (Bradley *et al.* 1992, Mannu *et al.* 2000, Delgado and Mayo 2004, Ward *et al.* 2004, Le Loir *et al.* 2005).

Son yıllarda laktokoklar üzerinde yürütülen sınıflandırma çalışmaları sonucu, bu bakterilerin, klasik fenotipik sınıflandırma kriterlerine uymayan çok sayıda atipik üyesi tanımlanmıştır (Stiles *et al.* 1997, Carr *et al.* 2002, Le Loir *et al.* 2005). Araştırmamızda da izolatlar içerisinde değişik fenotipik özellikleri bakımından 3 adet atipik *L. lactis* suşu belirlendi. Bu bulgular, laktokokların sınıflandırılmasında, klasik tanı testleri yanında moleküler testlerin de kullanılmasının zorunlu olduğuna işaret etmektedir.

**Çizelge 4.1.** Araştırmada kullanılan laktokok suşlarının izolasyon materyalleri ve izolasyon materyallerinin sağlandığı bölgeler

<b>Bakteri Kod No</b>	<b>İzolasyon Materyali</b>	<b>Yöre</b>
MBLL1	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)
MBLL3	Çiğ süt	Burdur (Seydiköy)
MBLD4	Çiğ süt	Burdur (Seydiköy)
MBLD5	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL6	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLD7	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL8	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL9	Çiğ süt	Ankara (Çubuk)
MBLD10	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL11	Çiğ süt	Ankara (Çubuk)
MBLL12	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)
MBLL14	Çiğ süt	Ankara (Altındağ)
MBLC15	Çiğ süt	Burdur (Varollar)
MBLL16	Çiğ süt	Ankara (Altındağ)
MBLL17	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL18	Çiğ süt	Ankara (Altındağ)
MBLD19	Çiğ süt	Burdur (Seydiköy)
MBLD21	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL25	Çiğ süt	Burdur (Seydiköy)
MBLL26	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL27	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)
MBLD29	Çiğ süt	Ankara (Altındağ)
MBLL30	Çiğ süt	Ankara (Altındağ)
MBLL32	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)
MBL34	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)

Çizelge 4.1. (devam)

<b>Bakteri Kod No</b>	<b>İzolasyon Materyali</b>	<b>Yöre</b>
MBLD35	Çiğ süt	Burdur (Seydiköy)
MBLD36	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)
MBLL37	Çiğ süt	Antalya (Bozova)
MBLC38	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)
MBLL40	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL43	Çiğ süt	Burdur (Seydiköy)
MBLL44	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)
MBLL45	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL46	Çiğ süt	Burdur (Seydiköy)
MBLC47	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)
MBLC50	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLD51	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL52	Çiğ süt	Nevşehir (Avanos)
MBLD54	Çiğ süt	Ankara (Altındağ)
MBLD55	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)
MBLL56	Çiğ süt	Kayseri
MBLL57	Çiğ süt	Kayseri
MBLL58	Çiğ süt	Burdur (Varollar)
MBLD59	Çiğ süt	Burdur (Varollar)
MBLL60	Çiğ süt	Burdur (Seydiköy)
MBLL61	Çiğ süt	Burdur (Seydiköy)
MBLL62	Çiğ süt	Kayseri
MBLD63	Çiğ süt	Kayseri
MBLL64	Çiğ süt	Kayseri
MBLL65	Çiğ süt	Nevşehir (Acıgöl)



Çizelge 4.2. Laktokok suşlarının tanısı

Morfolojik, Biyokimyasal ve Kültürel Özellikler	Bakteri Kod No																
	MBLL1	MBLL3	MBLL6	MBLL8	MBLL9	MBLL11	MBLL12	MBLL14	MBLL16	MBLL18	MBLL25	MBLL26	MBLL27	MBLL30	MBLL32	MBLL37	MBLL40
<b>Bakteri Morfolojisi</b>	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
<b>Gram Boyama</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Katalaz Testi</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Arjininden Amonyak Oluşumu</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Sitrat Kullanımı</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Elliker Broth'da Gelişme</b>	<b>30°C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>40°C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>45°C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>% 6.5 NaCl-30°C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>% 4 NaCl-30°C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>pH 9.6-30°C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

K: Kok

Çizelge 4.2. (devam)

Morfolojik, Biyokimyasal ve Kültürel Özellikler	Bakteri Kod No																
	MBLL43	MBLL44	MBLL45	MBLL46	MBLL52	MBLL56	MBLL57	MBLL58	MBLL60	MBLL61	MBLL62	MBLL64	MBLL65	MBLD4	MBLD5	MBLD7	MBLD10
<b>Bakteri Morfolojisi</b>	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
<b>Gram Boyama</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Katalaz Testi</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Arjininden Amonyak Oluşumu</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Sitrat Kullanımı</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<b>Elliker Broth'da Gelişme</b>	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	% 6.5 NaCl-30°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	% 4 NaCl-30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	pH 9.6-30°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

K: Kok

Çizelge 4.2. (devam)

Morfolojik, Biyokimyasal ve Kültürel Özellikler	Bakteri Kod No															
	MBLD17	MBLD19	MBLD21	MBLD29	MBLD35	MBLD36	MBLD51	MBLD54	MBLD55	MBLD59	MBLD63	MBLC15	MBL34	MBLC38	MBLC47	MBLC50
<b>Bakteri Morfolojisi</b>	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
<b>Gram Boyama</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Katalaz Testi</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Arjininden Amonyak Oluşumu</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Sitrat Kullanımı</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<b>Elliker Broth'da Gelişme</b>	<b>30°C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>40°C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
	<b>45°C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>% 6.5 NaCl-30°C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>% 4 NaCl-30°C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<b>pH 9.6-30°C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

K: Kok

#### 4.2. *L. lactis* Suşlarının Laktik Asit Üretim Düzeyleri

Araştırma kapsamında tanımlanan *L. lactis* suşlarında incelenen ilk endüstriyel özellik, laktik asit üretim düzeyleri olmuştur. *L. lactis* suşlarının laktozdan laktik asit oluşturma yetenekleri; bu bakterilerin skim milk ortamında, 30 °C'de 6 saat ve 24 saat gelişmeleri sonucu oluşturdukları laktik asit değerleri ölçülerek tespit edildi. Bu değerlere göre; 6 saatlik inkübasyon süresi sonunda  $\Delta$ pH düzeylerinde meydana getirdikleri değişim 1.00'in altında olanlar düşük düzeyde, 1.00-1.50 arasında olanlar orta düzeyde, 1.50'den yüksek olanlar ise yüksek düzeyde asit üreten suşlar olarak tanımlandı (Bradley *et al.* 1992, Karakuş 1994, Durlu-Özkaya 2001). Suşlarda inkübasyon süresine bağlı laktik asit üretimi değişimi; 6 saat sonunda elde edilen değerlerin, 24 saat sonunda elde edilen değerler ile kıyaslanması sonucu belirlendi.

Denemede kullanılan *L. lactis* suşlarının skim milk ortamında 30 °C'de 6 saat inkübasyonu sonucunda saptanan  $\Delta$ pH değerleri, 0.05-1.55 arasında değişim gösterdi. Yüksek asit üretim özelliği için sınır alt değer olan  $\Delta$ pH 1.55 düzeyinde laktik asit üretimi, yalnız *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda tanımlandı. Diğer yandan, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL52 ile *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MBLD5 ve MBLD55 suşları için sırasıyla 0.76, 0.74 ve 0.83  $\Delta$ pH değerleri saptandığından, bu suşlar da orta düzeye yakın laktik asit oluşturma yetenekleri ile diğerlerinden ayrıldı. Bu değerlerin altında kalan 46 suş ise düşük düzeyde laktik asit üreticisi olarak değerlendirildi (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.1.).

Endüstriyel fermentasyonlarda kullanılan laktokok starter kültür suşlarında hızlı asit oluşturma yeteneği; hammaddeye % 1 oranında bakteri inokülasyonu esas alınarak, bakteriyel üremenin durma fazına ulaştığı ortalama süreye göre (6 saat) değerlendirilmektedir (Durlu-Özkaya *et al.* 2001, Madera *et al.* 2003, Ziadi *et al.* 2005). Hızlı asit oluşturma yeteneğindeki suşlar, süt pH'sını hızlı bir şekilde düşürmekte ve kısa sürede pıhtı oluşumuna yol açmaktadır. Böylece fermente ürünün nihai aroma, yapı ve tat özelliklerinin kazanılması için gerekli reaksiyonlar başlatılmaktadır. Bu nedenlerle, starter kültür olarak kullanılacak laktokok suşlarında hızlı asit oluşturma yeteneği, endüstriyel açıdan değer taşımaktadır (Ross *et al.* 2002, Boonmee *et al.* 2003, Lee *et al.* 2005). Doğal koşullarda laktokok suşları genellikle çok hızlı asit oluşturma yeteneği içermezler. Yüksek asit oluşturma yeteneğine sahip suşlar, genellikle fermentasyon süreçlerine adapte olmuş

suşlardır (Madera *et al.* 2003, Lee *et al.* 2005). Bizim araştırmamızda belirlenen düşük laktik asit üretim düzeyleri de bu literatür verilerini desteklemektedir. Araştırmada tanımlanan MBLL9, MBLL52, MBLD5 ve MBLD55 suşları, yalnız laktik asit üretim özellikleri dikkate alındığında, endüstriyel kullanımlar için uygun olarak değerlendirilebilir. Kalan 46 *L. lactis* suşu için ise, ancak diğer endüstriyel özellikleri de dikkate alınarak sağlıklı bir değerlendirme yapılabilir. Zira yüksek asit üretme yeteneğinde olan ancak faj dirençlilik, bakteriyosin üretimi ve proteolitik aktivite gibi diğer endüstriyel özellikleri uygun olmayan suşların, karışık kültürler halinde starter preparatları hazırlanmaktadır. Özetle, hızlı asit üreten suşlar ile birlikte; faj dirençli, bakteriyosin üreten ve proteolitik aktiviteleri yüksek suşlar kombine edilmek suretiyle ideal starter aktiviteleri sağlanabilmektedir (Ross *et al.* 2002, Madera *et al.* 2003, Ziadi *et al.* 2005).

Starter kültürlerin asit üretme yetenekleri, üretilecek fermente süt ürününün karakteristikleri de dikkate alınarak tanımlanmaktadır. Özellikle olgunlaşma süresi uzun olan sert ve yarı-sert peynir türlerinde hızlı asitlik gelişimi, kontrolsüz bakteri parçalanmasını ve proteolitik enzimlerin zamansız ortama salınımını hızlandıracağı için başlangıçta tercih edilmez. Bunun yerine yavaş ya da orta düzeyde asit üretme özelliğindeki starter kültür suşları kullanılır (Cock and de Stouvenel 2006). Bu nedenle *L. lactis* suşlarının asit oluşturma özellikleri 24 saat sonunda da belirlendi (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.1.). Bu çalışma sonucunda, tüm suşlar için 6 saat sonunda tespit edilen  $\Delta$ pH değerlerinin, 24 saat sonunda 0.10-1.68 arasında arttığı ve % 0.23-1.08 laktik asit oranlarına ulaşıldığı saptandı. Bu değerler dikkate alınarak; özellikle *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL6, MBLL25, MBLL43, MBLL44 ve MBLL65 yanında *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MBLD55 suşunun da endüstriyel fermentasyonlar için yardımcı suş potansiyeli taşıdığı söylenebilir.

Türkiye kökenli laktokoklarda genellikle düşük laktik asit üretim düzeylerinin saptanması, büyük bir olasılıkla bu suşların endüstriyel üretim süreçlerine adapte olmamasından kaynaklanmaktadır. Söz konusu bakterilerde laktoz metabolizmasının regülasyonunun detaylandırılması ile bu tespiti destekleyen moleküler deliller sağlanacaktır.

**Çizelge 4.3.** *L. lactis* suşlarının skim milk besiyerine %1 inokülasyonu ile elde edilen  $\Delta$ pH ve hesaplanan % laktik asit değerleri

Bakteri Kod No	$\Delta$ pH (6saat)	$\Delta$ pH (24saat)	% Laktik Asit (24saat)
MBLL1	0.33	0.63	0.31
MBLL3	0.29	0.74	0.30
MBLL6	0.61	2.03	0.89
MBLL8	0.27	1.79	0.66
MBLL9	1.55	2.25	0.92
MBLL11	0.23	0.35	0.32
MBLL12	0.18	0.40	0.29
MBLL14	0.25	0.97	0.54
MBLL16	0.21	0.94	0.40
MBLL18	0.24	1.75	0.76
MBLL25	0.25	1.93	0.84
MBLL26	0.31	1.87	0.86
MBLL27	0.28	1.47	0.66
MBLL30	0.23	0.73	0.40
MBLL32	0.23	0.38	0.30
MBLL37	0.28	0.65	0.40
MBLL40	0.33	1.85	1.01
MBLL43	0.46	1.97	1.08
MBLL44	0.49	1.90	0.95
MBLL45	0.12	0.84	0.40
MBLL46	0.62	1.74	0.82
MBLL52	0.76	1.72	0.78
MBLL56	0.34	0.99	0.50
MBLL57	0.40	1.74	0.68
MBLL58	0.13	1.74	0.83
<i>L. lactis</i> IL1403	0.16	0.47	0.32
<i>L. lactis</i> SIK83	0.13	1.44	0.56

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

Çizelge 4.3. (devam)

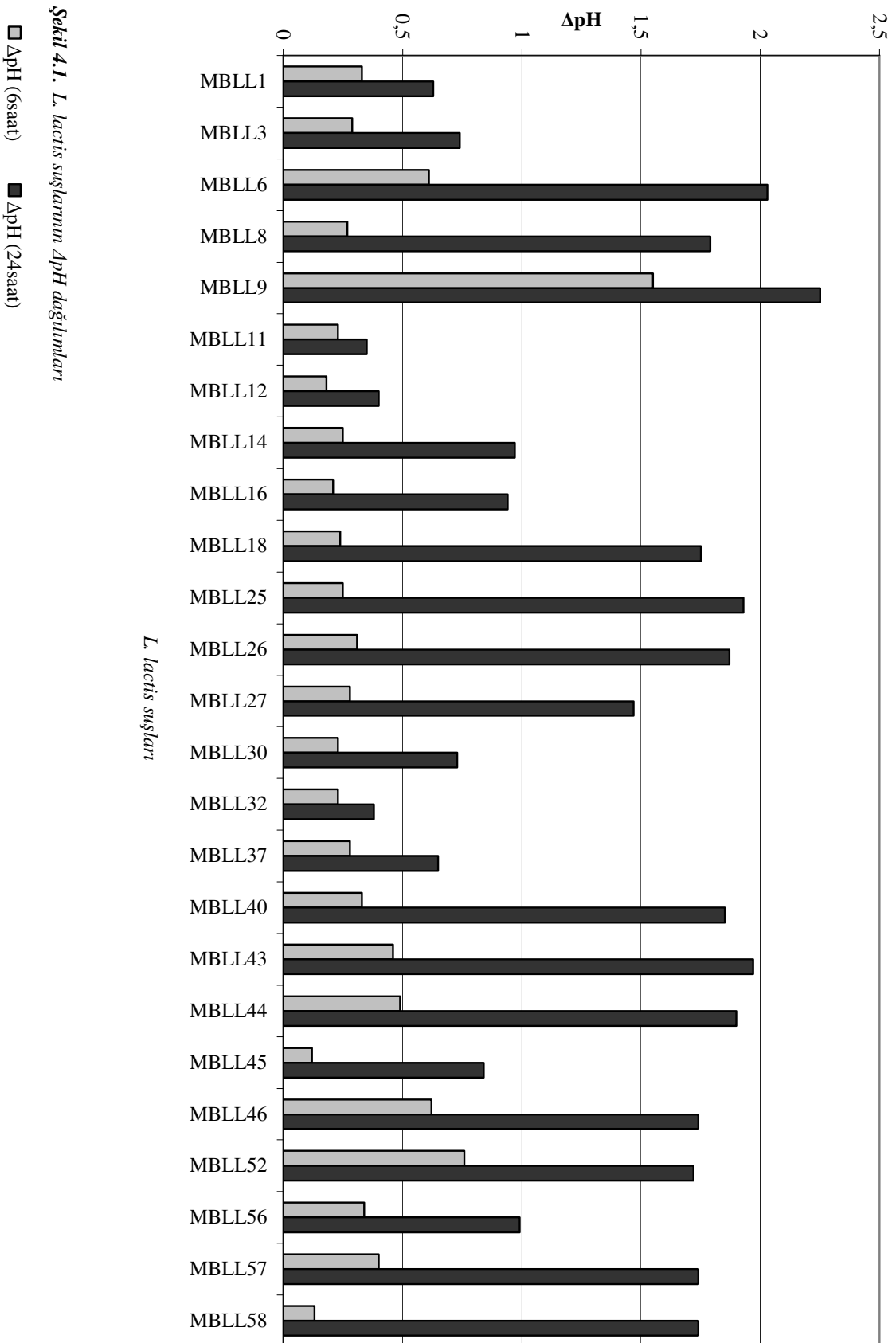
Bakteri Kod No	$\Delta$ pH (6saat)	$\Delta$ pH (24saat)	% Laktik Asit (24saat)
MBLL60	0.39	1.93	0.99
MBLL61	0.38	1.80	0.76
MBLL62	0.46	2.01	0.88
MBLL64	0.15	1.42	0.60
MBLL65	0.51	1.97	0.93
MBLD4	0.50	1.42	0.60
MBLD5	0.74	1.34	0.56
MBLD7	0.62	1.77	0.79
MBLD10	0.61	1.60	0.77
MBLD17	0.52	1.76	0.75
MBLD19	0.44	0.69	0.37
MBLD21	0.61	1.69	0.81
MBLD29	0.48	1.83	0.84
MBLD35	0.39	0.77	0.39
MBLD36	0.22	0.51	0.33
MBLD51	0.46	1.34	0.64
MBLD54	0.29	1.00	0.48
MBLD55	0.83	2.14	1.06
MBLD59	0.39	0.98	0.54
MBLD63	0.36	1.28	0.58
MBLC15	0.05	0.15	0.23
*MBL34	0.18	1.00	0.50
MBLC38	0.32	1.20	0.56
MBLC47	0.56	1.25	0.56
MBLC50	0.49	1.43	0.68
<i>L. lactis</i> IL1403	0.16	0.47	0.32
<i>L.lactis</i> SIK83	0.13	1.44	0.56

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

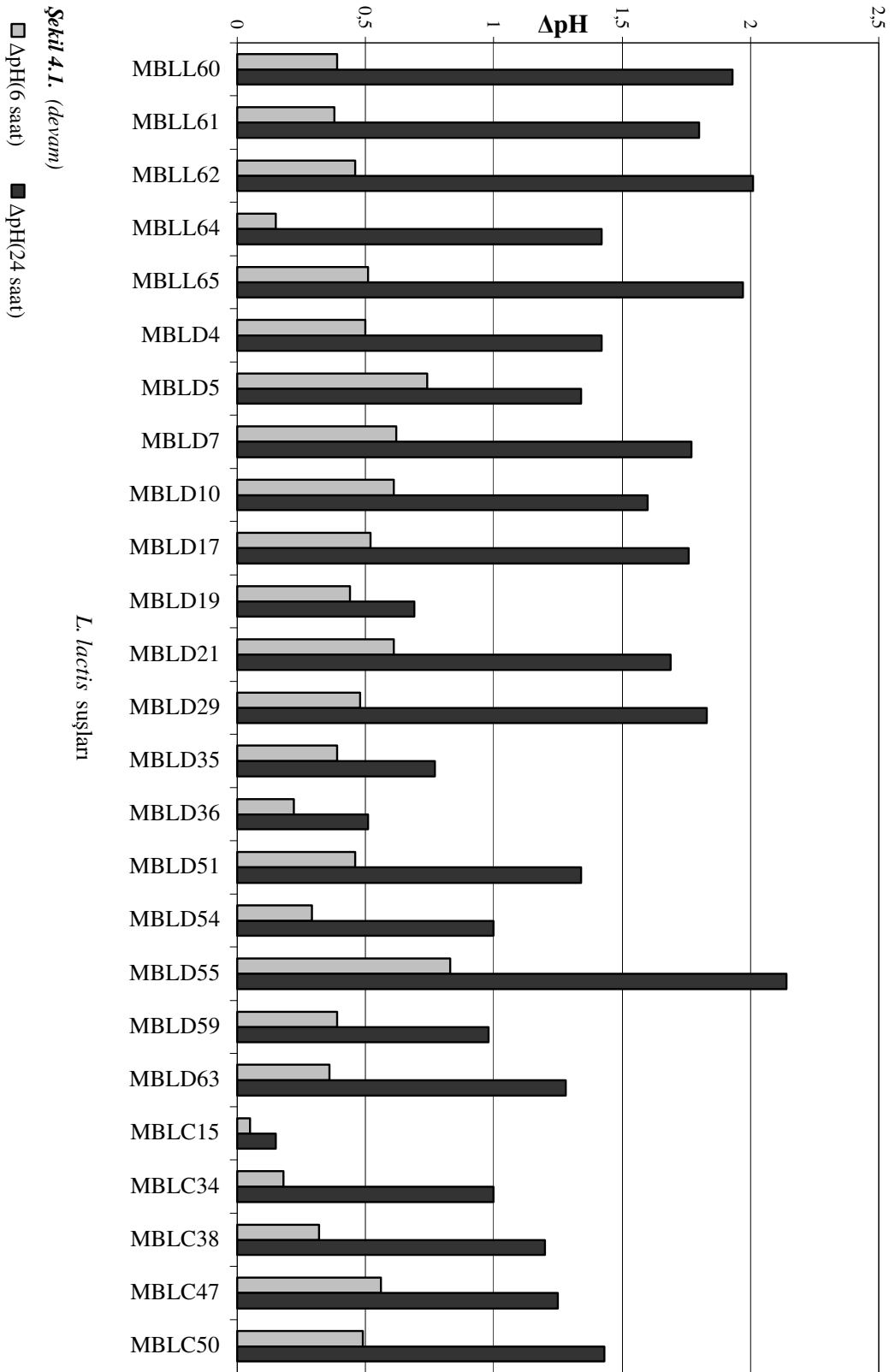
MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

\*MBL: Alt tür düzeyinde tanısı henüz yapılmadı







### 4.3. *L. lactis* Suşlarının Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

*L. lactis* suşlarında bakteriyosin üretim özelliklerinin tanımlanması amacı ile, ilk aşamada, bu suşların 23 farklı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriye karşı antibakteriyel etkinlikleri araştırıldı. Denemede kullanılan toplam 50 adet *L. lactis* suşu içerisinde 24 adeti (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1, MBLL3, MBLL6, MBLL8, MBLL9, MBLL10, MBLL11, MBLL14, MBLL16, MBLL18, MBLL37, MBLL40, MBLL46, MBLL57 ve MBLL58, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MBLD4, MBLD5, MBLD7, MBLD17, MBLD21, MBLD29, MBLD36 ve MBLD51 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* MBLC38) en az bir indikatör bakteriye karşı inhibisyon zonu oluşturma yeteneğinde bulundu. Antibakteriyel etkinlik gösteren suşlardan *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL3, MBLL6, MBLL8, MBLL11, MBLL14, MBLL16, MBLL18 ve MBLL40 ile *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MBLD4, MBLD5, MBLD7, MBLD10, MBLD17, MBLD21, MBLD29, MBLD51 ve MBLD58, yalnız nisin duyarlı *Listeria innocua* suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturdu. Diğer 7 adet *L. lactis* suşunun ise, birden fazla Gram-pozitif indikatör bakteriye karşı etkinlik gösteren ve birbiri ile tam benzerlik içermeyen bir aktivite spektrumuna sahip olduğu belirlendi. *L. lactis* suşlarının ürettiği antibakteriyel maddeler, denemede kullanılan hiç bir Gram-negatif bakteriye karşı inhibisyon etkinliği içermedi. Birden fazla indikatör bakteriye karşı inhibisyon etkinliği gösteren *L. lactis* suşları içerisinde en geniş konakçı spektrumu, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MBLD36 ve *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL57 suşları için belirlendi. Bu bakteriler, denemede kullanılan 23 indikatör bakterinin 18 adetine karşı, değişik düzeylerde inhibitör etkiye sahip bulundu. Yedi adet *L. lactis* suşu içerisinde, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL46 suşu da en düşük konakçı dizgesi içeren suş olarak tanımlandı. Bu suş yalnız 4 adet indikatör bakteriye karşı inhibisyon etkinliği gösterdi (Çizelge 4.4.).

*Lactococcus* cinsine ait bakteriler üzerinde yürütülen çalışmalarda, bu suşların sahip olduğu antimikrobiyel aktivitelerin; bakteriyosinler dışında, metabolizmaları sonucunda üretilen organik asitler, diasetil, asetoin ve hidrojen peroksit gibi diğer bileşiklerden de kaynaklanabileceği belirlenmiştir (Davey 1984, Venema *et al.* 1995, Moreno *et al.* 1999). Söz konusu bakterilerde antimikrobiyel aktivite, bu bileşiklerin tek tek ya da kombine etkileri sonucunda ortaya çıkabilmektedir (Moreno *et al.* 2000). Bakteriyosinler kısaca, protein yapıda olan antibakteriyel bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle

aktiviteleri proteolitik enzim uygulamasından etkilenmektedir. Bugüne dek yürütülen çalışmalarda; tanımlanan tüm laktokok bakteriyosinlerinin, proteinaz K uygulaması ile kısmen ya da tamamen aktivitelerini kaybettikleri belirlenmiştir (Jack *et al.* 1995, Ross *et al.* 2002, Chen and Hoover 2003, O'Sullivan *et al.* 2003a). Bu bilgiler ışığında; araştırmamızda Gram-pozitif indikatör bakterilere karşı inhibitör etki gösteren 24 adet *L. lactis* suşunun ürettikleri antimikrobiyel maddelerin bakteriyosin karakteri taşıyıp taşımadığı, proteinaz K uygulaması ile tanımlandı. Proteinaz K uygulaması ile nötralize kültür üst sıvılarında inhibisyon etkinliği tamamen kaybolan 3 adet suş (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1, MBLL9 ve MBLL57) bakteriyosin üreticisi olarak tanımlandı. Diğer suşlarda ise bu uygulama sonucunda, herhangi bir antibakteriyel etki değişimi meydana gelmedi (Çizelge 4.5.). Bu bulgular; MBLL1, MBLL9 ve MBLL57 dışında kalan antibakteriyel aktiviteye sahip diğer 21 *L. lactis* suşunun, söz konusu aktivitelerinin bakteriyosinlerden kaynaklanmadığına işaret etmektedir.

Bakteriyosin üreticisi olarak tanımlanan *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1, MBLL9 ve MBLL57 suşlarının ürettikleri bakteriyosinlerin kısmi karakterizasyonu; bu bakteriyosinlerin, değişik enzimler yanında, farklı pH ve sıcaklık uygulamalarına karşı verdikleri yanıtlar esas alınarak yapıldı. Kritik seyreltme yöntemi kullanılarak yürütülen testler sonucunda, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1 suşunun ürettiği bakteriyosinin aktivitesi 3200 AU/mL (Arbitrary Unit) olarak tespit edildi. MBLL1 bakteriyosini pH 2-8 arasında aktivite kaybına uğramazken, pH 9 değerinde % 50 oranında aktivite kaybı meydana geldi. pH 10 ve 11 değerlerinde ise daha ileri düzeyde aktivite kaybı belirlenmedi (Çizelge 4.6.). Enzim uygulamaları; MBLL1 bakteriyosininin proteinaz K dışında,  $\alpha$ -kemotripsine de duyarlı olduğunu, ancak diğer enzim muamelelerinden etkilenmediğini gösterdi (Çizelge 4.7.). Bu bakteriyosinin, özellikle amilaz ve lipaz enzim muamelelerine karşı dirençli olması, karbonhidrat ya da lipit yan grupları içermediğinin güçlü kanıtıdır. Beş farklı sıcaklık uygulaması sonucunda; MBLL1 bakteriyosininin 100 °C uygulamalarına karşı tamamen dirençli olduğu, 121 °C'de 15 dk muamelesi ile ise % 50 oranında aktivite kaybına uğradığı belirlendi (Çizelge 4.7.). Konakçı etkinliği yanında, enzim, pH ve sıcaklık uygulamalarına verdiği yanıtlar esas alındığında; *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1 suşunun ürettiği bakteriyosinin, laktokokların ürettiği bir bakteriyosin olan laktisin 481'e (Piard *et al.* 1992, de Vuyst and Vandamme 1994, O'Sullivan *et al.* 2003a, Le Loir *et al.* 2005) büyük oranda benzediği saptandı.

*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda bakteriyosin aktivitesi 200 AU/mL düzeyinde saptandı. pH değişimlerinin MBLL9 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesi üzerinde etkisinin araştırıldığı denemeler sonucunda; pH 2 ve 3 değerlerinde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği (800 AU/mL), pH 4 ve 5 değerleri için bu aktivitenin 400 AU/mL ve pH 6, 7 ve 8 için ise 200 AU/mL düzeyinde olduğu tespit edildi. pH 9'da ve daha yüksek değerlerde söz konusu bakteriyosin aktivite göstermedi (Çizelge 4.6.). MBLL9 bakteriyosini, MBLL1 bakteriyosininde olduğu gibi, yalnız  $\alpha$ -kemotripsin ve proteinaz K uygulaması sonucu duyarlı bakterilere karşı inhibisyon etkinliğini kaybetti. 100 °C ve 121 °C sıcaklık uygulamaları sonucu; MBLL9 bakteriyosininin 5, 10 ve 15 dk süreyle 100 °C sıcaklığa maruz bırakılmasının herhangi bir aktivite kaybına yol açmadığı, bu sıcaklıkta 20 dk ve 121 °C'de 15 dk muamele edilmesi halinde ise % 50 aktivite kaybına uğradığı saptandı (Çizelge 4.7.). İncelenen tüm biyolojik özellikleri ve literatür verileri (de Vuyst and Vandamme 1994, O'Sullivan *et al.* 2003a, Le Loir *et al.* 2005) dikkate alındığında, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin de büyük bir olasılıkla laktisin 481 olduğu ortaya çıkmaktadır.

Son bakteriyosin üreticisi olan *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL57 suşunun, nötralize edilmiş kültür üst sıvılarında ürettiği bakteriyosinin aktivitesi 6400 AU/mL olarak belirlendi. Bu bakteriyosinin en yüksek antibakteriyel aktiviteyi pH 2, 3 ve 4 değerlerinde gösterdiği (12800 AU/mL) ve pH 4, 5, 6, 7 ve 8 değerlerinde ise söz konusu aktivitenin 6400 AU/mL düzeyine düştüğü saptandı. pH 9, 10 ve 11 değerlerinde ise bakteriyosin aktivitesi, sırasıyla 3200, 1600 ve 800 AU/mL olarak belirlendi (Çizelge 4.6.). *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL57 bakteriyosini, diğer iki suş tarafından üretilen bakteriyosinden farklı olarak,  $\alpha$ -kemotripsin ve proteinaz K yanında lipaz ve  $\alpha$ -amilaz uygulamalarından da etkilendi. Proteinaz K uygulaması ile tamamen aktivitesini kaybederken,  $\alpha$ -kemotripsin ve lipaz uygulamaları sonucunda 3200 AU/mL ve  $\alpha$ -amilaz uygulaması sonucunda ise, 800 AU/mL düzeyinde bakteriyosin aktivitesi tespit edildi (Çizelge 4.7.). Bazı laktokok bakteriyosinlerinin  $\alpha$ -amilaz ve lipaz enzimlerine karşı değişik düzeylerde duyarlılık gösterdiği farklı araştırmalarda saptanmıştır. Araştırmacılar bu durumu; bakteriyosinin protein yapısının agregasyonunda, lipit ya da karbonhidrat çapraz köprülerinin görev alması ile açıklamıştır. Üretim ortamında salgılanan bakteriyosinin agregasyonu, inhibisyon etkinliğini yükseltmektedir (Jack *et al.* 1995, Cleveland *et al.* 2001, Guinane *et al.* 2005). Bizim çalışmamızda da MBLL57 bakteriyosininin  $\alpha$ -amilaz ve lipaz muamelesinden etkilenmesi,

bu bakteriyosinin agregasyonunda karbonhidrat ve lipit yan gruplarının birlikte rol aldığına işaret etmektedir. İleri kimyasal analizler bu öngörüğü açıklığa kavuşturacaktır. MBLL57 bakteriyosini 100 °C sıcaklık uygulamalarına karşı tamamen direnç gösterirken, 121 °C'de 15 dk sonunda % 98.5 oranında aktivite kaybına uğradı (Çizelge 4.7.). Bu veriler, denemelerde şahit olarak kullanılan nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83 suşu ile uyum gösterdi (Çizelge 4.6. ve 4.7.). Araştırmada elde edilen sonuçlar literatür verileri ile (Franz *et al.* 1997, Ross *et al.* 1999, McAuliffe *et al.* 2001, Takala *et al.* 2004, Liu *et al.* 2005) birlikte yorumlandığında, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL57 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin nisin davranışı gösterdiği tespit edildi.

Laktik asit bakterilerinin başlıca starter kültür aktiviteleri; ürünün yapı, aroma ve tat bileşiklerinin oluşumunda oynadıkları rol ile karakterize edilmektedir. Ürün kalitesi ve miktarı üzerinde doğrudan etki eden bu aktivitelerin yüksek düzeyde etkinlik göstermesi; laktik starterlerin faj dirençlilik, stres koşullarına uyum ve yarışmacı florayı inhibe etme yetenekleri ile bağlantılıdır. Kontaminant ya da yarışmacı floranın inhibisyonu; starter kültürlerin ürettiği diğer antibakteriyel bileşikler yanında, bakteriyosinlerin aktivitesi sonucunda güçlü bir şekilde meydana getirilmektedir. Bu ilave antibakteriyel aktivite, gıda güvenliği açısından kritik bir değer taşıdığından, starter kültür suşlarında tercih edilen bir özellik haline gelmiştir. Diğer yandan bakteriyosinlerin, kimyasal gıda koruyucularına karşı alternatif ajanlar olarak ciddi bir potansiyel içermeleri, onları gıda koruma çalışmalarının odağı haline getirmiştir (Corsetti *et al.* 2004, Le Loir *et al.* 2005). Bugüne kadar laktokokların ürettiği bakteriyosinler içerisinde, yalnız nisin geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bakteriyosinlerin gıda endüstrisinde kullanımında esas teşkil eden özellikleri; konakçı etkinlikleri, pH ve sıcaklık stabiliteyi olarak tanımlanmaktadır. Bu özellikleri bakımından halen bilinen en etkin ve stabil bakteriyosin nisin'dir. Nisin, Gram-pozitif bakteriler yanında, çeşitli fiziksel ve kimyasal etkilerden zarar görmüş Gram-negatif bakterilerin de gelişimini inhibe etme yeteneği içermektedir. Laktokokların ürettiği bakteriyosinler içerisinde gerek konakçı etkinliği ve gerekse stabilite karakteristikleri dikkate alındığında, laktisin 481 bir başka alternatif gıda koruyucusu olarak öne çıkmaktadır (Chen and Hoover 2003, O'Sullivan *et al.* 2003b, Corsetti *et al.* 2004).

Bu araştırmada tanımlanan bakteriyosin üreticisi suşların ürettikleri bakteriyosinlerin nisin ve laktisin 481 karakteristiği göstermesi, starter kültür suşu potansiyellerine işaret

etmektedir. Söz konusu suşların diğ er starter aktivitelerinin de tanımlanması ile, kullanım alanları ve formülasyonları belirlenebilir.

Çizelge 4.4. *L. lactis* suşlarının Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı inhibisyon etkinliği

İndikatör Bakteriler	<i>L. lactis</i> Suşları									
	MBLL1	MBLL3	MBLD4	MBLD5	MBLL6	MBLD7	MBLL8	MBLL9	MBLD10	MBLL11
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LMG2001	-	-	-	-	-	-	-	11mm	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG2003	14mm	-	-	-	-	-	-	13mm	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2088 (laktokokisin G üreticisi)	8mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG2132 (laktisin A+B üreticisi)	14mm	-	-	-	-	-	-	17mm	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	16mm	-	-	-	-	-	-	18mm	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	7mm	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714	10mm	-	-	-	-	-	-	10mm	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2602	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2708	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> LMG2709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> LMG2732	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG2813	18mm	8mm	9mm	8mm	9mm	9mm	7mm	18mm	11mm	9mm
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2907 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2908	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2909	8mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2910 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2911 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG3020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> LMG3022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG3083	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LMG3085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> JC 17 (laktisin 481 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

Çizelge 4.4. (devam)

İndikatör Bakteriler	<i>L. lactis</i> Suşları									
	MBLL12	MBLL14	MBLC15	MBLL16	MBLD17	MBLL18	MBLD19	MBLD21	MBLL25	MBLL26
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LMG2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2088 (laktokokisin G üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG2132 (laktisin A+B üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2602	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2708	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> LMG2709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> LMG2732	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG2813	-	7mm	-	6mm	7mm	8mm	-	7mm	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2907 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2908	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2909	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2910 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2911 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG3020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> LMG3022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG3083	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LMG3085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> JC 17 (laktisin 481 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*



Çizelge 4. 4. (devam)

İndikatör Bakteriler	<i>L. lactis</i> Suşları									
	MBLL27	MBLD29	MBLL30	MBLL32	*MBL34	MBLD35	MBLD36	MBLL37	MBLC38	MBLL40
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LMG2001	-	-	-	-	-	-	8mm	4mm	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG2003	-	-	-	-	-	-	16mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2088 (laktokokisin G üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	6mm	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG2132 (laktisin A+B üreticisi)	-	-	-	-	-	-	2mm	2mm	9mm	-
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	-	-	-	-	-	-	4mm	9mm	9mm	-
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	9mm	11mm	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714	-	-	-	-	-	-	15mm	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2602	-	-	-	-	-	-	3mm	-	12mm	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2708	-	-	-	-	-	-	2mm	-	13mm	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> LMG2709	-	-	-	-	-	-	3mm	2mm	-	-
<i>Bacillus cereus</i> LMG2732	-	-	-	-	-	-	2mm	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG2813	-	7mm	-	-	-	-	4mm	-	8mm	12mm
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2907 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	2mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2908	-	-	-	-	-	-	3mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2909	-	-	-	-	-	-	3mm	8mm	8mm	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2910 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	5mm	-	9mm	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2911 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	2mm	-	9mm	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	2mm	-	9mm	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG3020	-	-	-	-	-	-	3mm	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> LMG3022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG3083	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LMG3085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> JC 17 (laktisin 481 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	4mm	13mm	13mm	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

\*MBL: Alt tür düzeyinde tanısı henüz yapılmadı

Çizelge 4. 4. (devam)

İndikatör Bakteriler	<i>L. lactis</i> Suşları									
	MBLL43	MBLL44	MBLL45	MBLL46	MBLC47	MBLC50	MBLD51	MBLL52	MBLD54	MBLD55
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LMG2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2088 (laktokokisin G üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG2132 (laktisin A+B üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	-	-	-	5mm	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	6mm	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2602	-	-	-	7mm	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2708	-	-	-	6mm	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> LMG2709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> LMG2732	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG2813	-	-	-	-	-	-	8mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2907 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2908	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2909	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2910 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2911 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG3020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> LMG3022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG3083	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LMG3085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> JC 17 (laktisin 481 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

Çizelge 4. 4. (devam)

İndikatör Bakteriler	<i>L. lactis</i> Suşları									
	MBLL56	MBLL57	MBLL58	MBLD59	MBLL60	MBLL61	MBLL62	MBLD63	MBLL64	MBLL65
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LMG2001	-	18mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG2003	-	19mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2088 (laktokokisin G üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG2132 (laktisin A+B üreticisi)	-	16mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	-	12mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714	-	18mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2602	-	7mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2708	-	8mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> LMG2709	-	10mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> LMG2732	-	6mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG2813	-	14mm	4mm	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2907 (laktisin 3147 üreticisi)	-	10mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2908	-	10mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2909	-	6mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2910 (laktisin 3147 üreticisi)	-	10mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2911 (laktisin 3147 üreticisi)	-	8mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	8mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG3020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> LMG3022	-	6mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG3083	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LMG3085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> JC 17 (laktisin 481 üreticisi)	-	14mm	-	-	-	-	-	-	-	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremori*

**Çizelge 4.5.** *L. lactis* suşlarının ürettiği antimikrobiyel maddelerin proteinaz K duyarlılıkları

Bakteri Kod No.	Antimikrobiyel aktivite*	
	Kontrol	Proteinaz K Uygulaması Sonrası
MBLL1	+	-
MBLL3	+	+
MBLD4	+	+
MBLD5	+	+
MBLL6	+	+
MBLD7	+	+
MBLL8	+	+
MBLL9	+	-
MBLD10	+	+
MBLL11	+	+
MBLL14	+	+
MBLL16	+	+
MBLD17	+	+
MBLL18	+	+
MBLD21	+	+
MBLD29	+	+
MBLD36	+	+
MBLL37	+	+
MBL38	+	+
MBLL40	+	+
MBLL46	+	+
MBLD51	+	+
MBLL57	+	-
MBLL58	+	+

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

\*Antimikrobiyel aktiviteler suşların en yüksek düzeyde etki gösterdiği indikatörlere karşı belirlendi.

**Çizelge 4.6.** *L. lactis* suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine pH'nun etkisi

<b>Bakteriyosin Aktivitesi (AU/ml)</b>				
<b>pH</b>	<b>MBLL1</b>	<b>MBLL9</b>	<b>MBLL57</b>	<b>SIK-83</b>
Kontrol	3200	200	6400	6400
2	3200	800	12800	12800
3	3200	800	12800	12800
4	3200	400	12800	12800
5	3200	400	6400	6400
6	3200	200	6400	6400
7	3200	200	6400	6400
8	3200	200	6400	6400
9	1600	0	3200	3200
10	1600	0	1600	1600
11	1600	0	800	800

*AU: Arbitrary Unit*

*MBLL: L. lactis subsp. lactis*

*SIK-83: Nisin üreticisi (L. lactis subsp. lactis)*

**Çizelge 4.7.** *L. lactis* suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine enzim ve sıcaklığın etkisi

UYGULAMA	Bakteriyosin Aktivitesi(AU/ml)			
	MBLL1	MBLL9	MBLL57	SIK-83
Kontrol	3200	200	6400	6400
Tripsin	3200	200	6400	6400
$\alpha$ -Kemotripsin	0	0	3200	3200
Pepsin	3200	200	6400	6400
$\alpha$ -Amilaz	3200	200	800	800
Lipaz	3200	200	3200	3200
Katalaz	3200	200	6400	6400
Lizozim	3200	200	6400	6400
Proteinaz K	0	0	0	0
100 °C' de 5 dk	3200	200	6400	6400
100 °C' de 10 dk	3200	200	6400	6400
100 °C' de 15 dk	3200	200	6400	6400
100 °C' de 20 dk	3200	100	6400	6400
121 °C' de 15 dk	1600	100	100	200

AU: Arbitrary Unit

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

SIK-83: Nisin üreticisi (*L. lactis* subsp. *lactis*)

#### 4.4. *L. lactis* Suşlarının Faj Duyarlılıkları

Araştırmada kullanılan 50 adet *L. lactis* suşlarının faj duyarlılık düzeyleri, 61 adet laktokok fajına karşı belirlendi. Homolog konakçı bakterilerine denenerek titreleri  $10^7$  pfu/mL ve yukarısına çıkarılan fajlar, *L. lactis* suşlarına M17 çift tabaka agar ortamlarında test edildi. Testlerde faj-bakteri dinamik dengesi (pfu/cfu=1) esas alındı ve sonuçlar faj plak oluşumuna göre değerlendirildi. Bu testler sonucunda; 50 adet *L. lactis* suşunun 39 adedi (19 adet *L. lactis* subsp. *lactis*, 15 adet *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, 4 adet *L. lactis* subsp. *cremoris* ve 1 adet tanımlanmamış suş) tüm fajlara karşı direnç fenotipi gösterdi. Direnç fenotipine sahip 2 adet *L. lactis* subsp. *lactis* ve (MBLL56 ve MBLL60) ve 2 adet *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (MBLD54 ve MBLD59) suşunda kendiliğinden indüklenebilen bir lizogenik özellik saptandı. Söz konusu bakterilerde faj ile karşılaştırma yapılmaksızın, çift tabaka agar ortamlarında plak oluşumu belirlendi. Bu suşlar dışında kalan 11 adet *L. lactis* subsp. *lactis* suşunda, 61 faja karşı değişik düzeylerde duyarlılık fenotipi saptandı. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL3 suşu, yalnız  $\Phi$ pll61-52 fajına karşı duyarlı bulundu. En yüksek faj duyarlılık özelliği ise, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL45 suşu için, toplam 6 faja karşı ( $\Phi$ pll67-38,  $\Phi$ pld67-42,  $\Phi$ pld67-45,  $\Phi$ bll36-58,  $\Phi$ bld35-56 ve  $\Phi$ bld67-57) tanımlandı. Duyarlı suşlara karşı en geniş konakçı dizgesi, 6 adet *L. lactis* suşuna karşı litik aktivite gösteren  $\Phi$ pll98-22 fajı için tespit edildi (Çizelge 4.8.).

Tüm dünyada endüstriyel fermente süt üretiminde en temel sorunlardan biri, faj kontaminasyonları sonucu meydana gelen ürün ve zaman kayıplarıdır. Zira starter kültür olarak süt endüstrisinde kullanılan *L. lactis* suşlarında faj dirençlilik fenotipi starter suşu seçim kriteri olmasına rağmen, fermentasyon süreçlerinde çok sık fajlarla karşılaştıklarından, bu bakterilerde duyarlı fenotip dönüşümü meydana gelebilmektedir. Laktokok fajları yüksek genetik elastisiteye sahip olmalarından dolayı, sürekli karşılaştıkları *L. lactis* suşlarının faj direnç sistemini aşacak genetik varyasyonlar üretebilmektedir (Mills *et al.* 2002, Madera *et al.* 2003, Dupont *et al.* 2004). Yaklaşık 100 yıldır gelişmiş ülkelerde laboratuvar suşlarının kontrollü üretimlerle starter kültür suşları olarak kullanıldığı göz önünde bulundurulur ise, faj direnç fenotipinin bu bakterilerde süreklilik arz etmesinin mümkün olmadığı görülecektir. Bu nedenle faj sorununun çözümünde faj direnç fenotipine ilave olarak; faj inhibitör ortamların kullanımı, starter

kültür rotasyonu, hammaddenin ve fabrika ortamının fajlardan arındırılması gibi yöntemler de önerilmektedir (Mills *et al.* 2002, Madera *et al.* 2003, Delgado and Mayo 2004).

Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarında tespit edilen yüksek faj direnç fenotipi, ülkemizde yürütülen daha önceki çalışmaların sonuçları ile paralellik taşımaktadır. Bu çalışmalarda ayrıca, Türkiye kökenli laktokok fajlarının da, dünyada süt endüstrisinde starter kültür suşu olarak kullanılan belli başlı bakteri tiplerine litik etki gösterdiği belirlenmiştir (Akçelik and Tunail 1992, Akçelik 1998b, Akçelik 1999, Akçelik *et al.* 2000, Tuncer and Akçelik 2002, Tükel and Akçelik 2003, Şanlıbaba and Akçelik 2005). Araştırma sonuçları ve yukarıda özetlenen literatür verileri, faj dirençlilik esas alındığında Türkiye kökenli laktokok suşlarının ciddi bir potansiyel taşıdığına işaret etmektedir. Ancak, bu çalışmada kullanılan 50 *L. lactis* suşunun 4 adetinde tanımlanan lizogenik özelliğin, induksiyon çalışmaları ile detaylandırılması, faj dirençlilik fenotipinin kesinliği için zorunludur. Lizogen suşlar, litik fajlara karşı direnç fenotipi içermeye özellikleri ile yanıltıcı olabilir. Zira süt endüstrisinde faj kontaminasyonlarının önemli bir kaynağını da lizogen suşlar teşkil etmektedir. Faj direnç fenotipi esas alınarak seçilen, ancak lizogenik özelliği detaylı bir şekilde araştırılmamış olan *L. lactis* suşlarında, endüstriyel kullanım esnasında meydana gelen induksiyon sonucu salınan fajlar, diğer starter kültür suşları için genellikle litik potansiyel taşımakta ve hızla yayılmaktadır (Madera *et al.* 2003, De Haard *et al.* 2005, Lunde *et al.* 2005).

Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının yüksek düzeyde faj dirençlilik özelliklerinin yapay induksiyon ve genetik prob çalışmaları ile desteklenerek moleküler seviyede tanımlanması, bu bakterileri starter kültür suşu geliştirme programlarının biyomateryali haline getirecektir. Bu sayede de, geleneksel fermente süt ürünlerimize adapte olmuş *L. lactis* suşlarının, endüstriyel üretime uygun starter bakteriler olarak düzenlenmesi olanağı doğacaktır.



**Cizelge 4.8. *L.lactis* suşlarının faj duyarlılıkları**

Bakteri Kod No	Faj Kod No																			
	Φp116-2	Φp1110-5	Φp1147-21	Φp1135-6	Φp1135-8	Φp1136-10	Φp1136-12	Φp1136-14	Φp1136-15	Φp1136-16	Φp1136-17	Φp1136-18	Φp1136-19	Φp1c61-50	Φp1c61-52	Φp1c61-54	Φp1c61-55	Φp1c61-56	Φp1c61-58	Φp1c61-59
MBLL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MBLL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MBLL16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MBLL18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
MBLL37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL44	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MBLL56	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-
MBLL57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

- : Dirençli, + : Duyarlı, \*- : Lizogen

**Çizelge 4.8. (devam)**

Bakteri Kod No	Faj Kod No																			
	Φrpld64-33	Φrpld64-34	Φrpld64-35	Φrpld66-36	Φrpld67-37	Φrpld67-38	Φrpld67-39	Φrpld67-40	Φrpld67-42	Φrpld67-43	Φrpld67-44	Φrpld67-45	Φrpl198-22	Φrpl198-23	Φrpl198-24	Φrpl198-25	Φrpl198-26	Φrpl198-27	Φrpl198-28	Φrpl198-29
MBLL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MBLL16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MBLL18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MBLL25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MBLL26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL27	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MBLL40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL45	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MBLL56	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_	*_
MBLL57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

- : Dirençli, + : Duyarlı, \*\_ : Lizogen

Çizelge 4.8. (devam)

Bakteri Kod No	Faj Kod No																				
	Φp1198-30	Φp1198-31	Φp1198-32	Φb1136-30	Φb1136-33	Φb1136-35	Φb1136-40	Φb1136-48	Φb1136-49	Φb1136-52	Φb1136-58	Φb1135-47	Φb1135-56	Φb1c61-38	Φb1c61-51	Φb1d66-37	Φb1d66-44	Φb1d67-26	Φb1d67-28	Φb1d67-43	Φb1d67-57
MBLL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL14	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MBLL46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL56	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-	*-
MBLL57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

- : Dirençli, + : Duyarlı, \*- : Lizogen

**Cizelge 4.8. (devam)**

Bakteri Kod No	Faj Kod No																				
	Φp116-2	Φp1110-5	Φp1147-21	Φp1135-6	Φp1135-8	Φp1136-10	Φp1136-12	Φp1136-14	Φp1136-15	Φp1136-16	Φp1136-17	Φp1136-18	Φp1136-19	Φp1c61-50	Φp1c61-52	Φp1c61-54	Φp1c61-55	Φp1c61-56	Φp1c61-58	Φp1c61-59	
MBLL60	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	
MBLL61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD54	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	
MBLD55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD59	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	* <sub>1</sub>	
MBLD63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLC15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*MBL34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLC38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLC47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLC50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

\*MBL: Alt tür düzeyinde tamısı henüz yapılmadı

- : Dirençli, + : Duyarlı, \*<sub>1</sub> : Lizogen

**Cizelge 4.8. (devam)**

Bakteri Kod No	Faj Kod No																				
	Φp1d64-33	Φp1d64-34	Φp1d64-35	Φp1d66-36	Φp1d67-37	Φp1d67-38	Φp1d67-39	Φp1d67-40	Φp1d67-42	Φp1d67-43	Φp1d67-44	Φp1d67-45	Φp1198-22	Φp1198-23	Φp1198-24	Φp1198-25	Φp1198-26	Φp1198-27	Φp1198-28	Φp1198-29	
MBLL60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MBLL61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLL65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD54	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MBLD55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLD59	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MBLD63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLC15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*MBL34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLC38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLC47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBLC50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

\*MBL: Alt tür düzeyinde tanısı henüz yapılmadı

- : Dirençli, + : Duyarlı, \*- : Lizogen

**Cizelge 4.8. (devam)**

Bakteri Kod No	Faj Kod No																					
	Φp1198-30	Φp1198-31	Φp1198-32	Φb1136-30	Φb1136-33	Φb1136-35	Φb1136-40	Φb1136-48	Φb1136-49	Φb1136-52	Φb1136-58	Φb1135-47	Φb1135-56	Φb1c61-38	Φb1c61-51	Φb1d66-37	Φb1d66-44	Φb1d67-26	Φb1d67-28	Φb1d67-43	Φb1d67-57	
MBLL60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
MBLL61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLL62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLL64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLL65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD54	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MBLD55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLD59	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MBLD63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLC15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
*MBL34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLC38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLC47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MBLC50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

\*MBL: Alt tür düzeyinde tanıması henüz yapılmadı

- : Dirençli, + : Duyarlı, \*- : Lizogen

#### 4.5. *L. lactis* Suşlarının Diasetil Üretim Özellikleri

Çalışmada kullanılan laktokok suşlarının diasetil üretim düzeyleri, King (1948) tarafından önerilen yöntemle göre belirlendi. % 11'lik steril skim milk besiyerine, % 1 oranında inoküle edilen aktif kültürler, 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresi sonunda diasetil üretim düzeyleri saptandı. Tüp içerisindeki sıvı yüzeyinde görülen kırmızı halkanın renk yoğunluğuna göre yapılan değerlendirmede; kırmızı halka oluşturmayanlar diasetil üretme yeteneğinden yoksun, koyu renkli kırmızı halka oluşturanlar yüksek düzeyde ve daha açık renkli kırmızı halka oluşturanlar ise orta ve düşük düzeyde diasetil üretme yeteneğine sahip suşlar olarak değerlendirildi. Buna göre *Lactococcus lactis* susp. *lactis*. biovar. *diacetylactis* MBLD5, MBLD7, MBLD17, MBLD21 ve MBLD54 yüksek, MBLD10, MBL34 (kesin tanısı yapılmamış olan suş), MBLD51 ve MBLD55 orta ve MBLD4, MBLD19, MBLD29, MBLD35, MBLD36, MBLD59 ve MBLD63 ise düşük düzeyde diasetil üreten suşlar olarak tanımlandı (Çizelge 4.9.).

Laktik asit bakterileri içerisinde; *Lactococcus lactis* susp. *lactis*. biovar. *diacetylactis* ve *Leuconostoc* türleri diasetil oluşturma yeteneği içermektedir. Diasetil; tereyağı, yağlı süt, acı krema ve quark gibi çeşitli fermente süt ürünlerinde son aroma ve tat oluşumuna katkıda bulunan en önemli bileşiklerden biridir. Diasetilin antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu da belirlenmiştir. Ancak diasetilin gıda koruyucusu olarak kullanımı, sahip olduğu kuvvetli aroma ve koruma sağlaması için fazla miktarlara gereksinim duyulması gibi nedenlerle, mümkün değildir. Fermente süt ürünlerinde diasetilin oluşma oranı; gelişme ortamı, sıcaklık, pH ve oksijenin bulunup bulunmadığına bağlı olmakla beraber, esasen üretimde kullanılan suşun özelliklerinden etkilenmektedir. Bu çalışmada tanımlanan diasetil üretim düzeyleri, endüstriyel kullanım için uygunluk taşımaktadır (Bandell *et al.* 1998, Curic *et al.* 1999, Hugenholtz *et al.* 2000, Mauriello *et al.* 2001, Madera *et al.* 2003).

Araştırmada kullanılan ve atipik özelliklerinden dolayı kesin tanısı yapılamayan MBL34 suşunun, orta düzeyde diasetil üretim özelliği, bu izolatın *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* olma olasılığını güçlendirmektedir. Ancak daha önce de ifade edildiği gibi, kesin tanının yapılabilmesi için ileri genetik analizlere gereksinim vardır.

Çizelge 4.9. *L. lactis* suşların diasetil üretim özellikleri

Bakteri Kod No	Diasetil Üretimi
MBLD4	+
MBLD5	+++
MBLD7	+++
MBLD10	++
MBLD17	+++
MBLD19	+
MBLD21	+++
MBLD29	+
*MBL34	++
MBLD35	+
MBLD36	+
MBLD51	++
MBLD54	+++
MBLD55	++
MBLD59	+
MBLD63	+

MBLD: *Lactococcus lactis* susp. *lactis*. biovar. *diacetylactis*

\*MBL: Alt tür düzeyinde tanısı henüz yapılmadı

- : diasetil üretimi yok, + : düşük düzeyde üretim, ++ : orta düzeyde üretim, +++ : yüksek düzeyde üretim



#### 4.6. *L.lactis* Suşlarının Proteolitik Aktivite Düzeyleri

Araştırmada kullanılan 50 adet laktokok suşunun proteolitik aktivite düzeyleri, Citti *et al.* (1963) tarafından önerilen yöntem esas alınarak belirlendi. Test edilen bakterilerden 22 adeti (*Lactococcus lactis* susp. *lactis* MBLL1, MBLL3, MBLL12, MBLL16, MBLL27, MBLL30, MBLL32, MBLL37, MBLL40, MBLL45, MBLL52, MBLL56, *Lactococcus lactis* susp. *lactis*. biovar. *diacetylactis* MBLD7, MBLD29, MBLD35, MBLD36, MBLD51, MBLD54, *Lactococcus lactis* susp. *cremoris* MBLC15, MBLC47, MBLC50 ve *Lactococcus lactis* MBL34) 10 µg Tyr / mL düzeyinin altında tirozin değerine sahip (çok düşük düzeyde proteolitik aktivite yeteneği içeren suşlar), 17 adedi (*Lactococcus lactis* susp. *lactis* MBLL6, MBLL11, MBLL14, MBLL18, MBLL25, MBLL26, MBLL43, MBLL46, MBLL57, MBLL58, MBLL62, MBLL65, *Lactococcus lactis* susp. *lactis*. biovar. *diacetylactis* MBLD4, MBLD10, MBLD19, MBLD55 ve MBLD59) 10.00-23.55 µg Tyr / mL düzeyi arasında tirozin değerine sahip (orta düzeyde proteolitik aktivite yeteneği içeren suşlar) ve 11 adedi de (*Lactococcus lactis* susp. *lactis* MBLL8, MBLL9, MBLL44, MBLL60, MBLL61, MBLL64, *Lactococcus lactis* susp. *lactis*. biovar. *diacetylactis* MBLD5, MBLD17, MBLD21, MBLD63 ve *Lactococcus lactis* susp. *cremoris* MBLC38) 26.60-43.70 µg Tyr / mL düzeyleri arasında tirozin değerine sahip (yüksek düzeyde proteolitik aktivite yeteneği içeren suşlar) olarak saptandı (Çizelge 4.10.).

Proteolitik aktivite, bakterilerin gelişme ortamlarında var olan proteinlerin ve peptitlerin kullanımında anahtar rol oynamaktadır. Laktik asit bakterilerinin tümü, sütte bulunan ana protein olan kazeini parçalayarak, gelişmeleri için zorunlu amino asitleri sağlayabilmektedir. Bu bakterilerde kazein metabolizması; hücre duvarında lokalize olan proteinazlar, oligopeptit transfer sistemi ve hücre içi peptidazlardan meydana gelen karmaşık bir enzim sisteminin kontrolü altındadır. Özellikle hücre duvarı proteinaz sisteminin mutasyonel bozulması ile, söz konusu bakterilerin sütte gelişiminin yavaşladığı saptanmıştır. Proteolitik aktivite sütte gelişim yanında, starter kültür aktivitelerini de önemli ölçüde etkilemektedir. Değişik araştırmacılar, laktik asit bakterilerinin süt ortamlarında gelişirken oluşturduğu proteoliz ürünlerinin; fermente süt ürünlerinin tipik yapı, aroma ve tat bileşiklerinin oluşumuna da katkıda bulunduğunu belirlemişlerdir (Flambard *et al.* 1998, Bruinenberg *et al.* 2000, Guédon *et al.* 2001). Gerek laktik asit bakterilerinin sütte gelişme hızı ve gerekse starter kültürlerin, fermente ürüne özgü tat ve

yapı bileşiklerini oluşturması açısından tespit edilen optimal proteolitik aktivite değeri, 25 µg Tyr / mL ve üzeri olarak tespit edilmiştir. Ancak özellikle 50 µg Tyr / mL üzerinde proteolitik aktivite içeren suşlar, oluşturdukları yüksek miktardaki protein kalıntıları ve amino asitler nedeni ile üründe acı bir tadın gelişimine yol atığından, fermente süt endüstrisinde tercih edilmemektedir (Karakuş 1994, Cogan *et al.* 1997, Atiler *et al.* 2000, Madera *et al.* 2003).

Yukarıda özetlenen literatür verileri dikkate alındığında, araştırmamızda tanımlanan 11 adet suşun (MBLL8, MBLL9, MBLL44, MBLL60, MBLL61, MBLL64, MBLD5, MBLD17, MBLD21, MBLD63 ve MBLC38) proteolitik aktiviteleri bakımından optimal starter kültür karakteriştiği taşıdığı ortaya çıkmaktadır.

Çizelge 4.10. *L. lactis* suşlarının proteolitik aktivite düzeyleri

Bakteri Kod No	Proteolitik Aktivite µg Tirozin (Tyr) / mL
MBLL1	< 10
MBLL3	< 10
MBLL6	11.95
MBLL8	28.80
MBLL9	43.35
MBLL11	20.55
MBLL12	< 10
MBLL14	23.25
MBLL16	< 10
MBLL18	10.00
MBLL25	14.10
MBLL26	20.20
MBLL27	< 10
MBLL30	< 10
MBLL32	< 10
MBLL37	< 10
MBLL40	< 10
MBLL43	14.50
MBLL44	39.00
MBLL45	< 10
MBLL46	20.75
MBLL52	< 10
MBLL56	< 10
MBLL57	21.80
MBLL58	19.55

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

Çizelge 4.10. (devam)

Bakteri Kod No	Proteolitik Aktivite µg Tirozin (Tyr) / mL
MBLL60	33.00
MBLL61	28.30
MBLL62	12.80
MBLL64	26.60
MBLL65	21.15
MBLD4	17.70
MBLD5	43.70
MBLD7	< 10
MBLD10	16.15
MBLD17	35.55
MBLD19	10.35
MBLD21	33.35
MBLD29	< 10
MBLD35	< 10
MBLD36	< 10
MBLD51	< 10
MBLD54	< 10
MBLD55	23.55
MBLD59	21.60
MBLD63	26.65
MBLC15	< 10
*MBL34	< 10
MBLC38	28.50
MBLC47	< 10
MBLC50	< 10
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG 2132**	16.65

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

MBLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

MBLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

\*MBL: Alt tür düzeyinde tanısı henüz yapılmadı

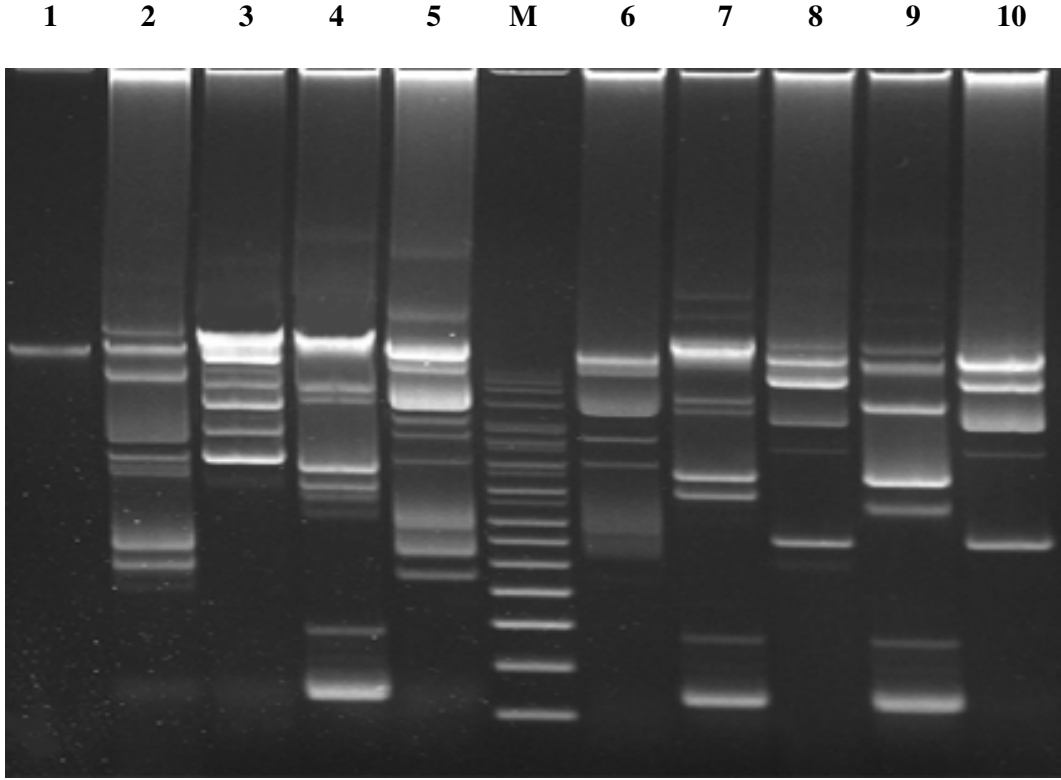
\*\* : Şahit bakteri

#### 4.7. *L. lactis* Suşlarının Plazmid İçerikleri

Tanımlanan *L. lactis* suşlarında, alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak yürütülen plazmid analizleri sonucunda; moleküler büyüklükleri 1.9-29.2 kb (kilobaz) ve sayıları 1-10 adet arasında değişen plazmid içerikleri tanımlandı. Toplam 50 adet laktokok suşu içerisinde *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1 ve MBLL40, *L. lactis* subsp. *lactis*. biovar. *diacetylactis* MBLD54 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* MBLC38, MBLC47 ve MBLC50 suşlarında, tek plazmid içeriği belirlendi. Bu suşlardan *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL40 ile *L. lactis* subsp. *cremoris* MBLC38 (22.7 kb) ve *L. lactis* subsp. *cremoris* MBLC47 ve MBLC50 (17.0 kb) aynı büyüklükte plazmid içeriğine sahip bulundu (Şekil 4.2.).

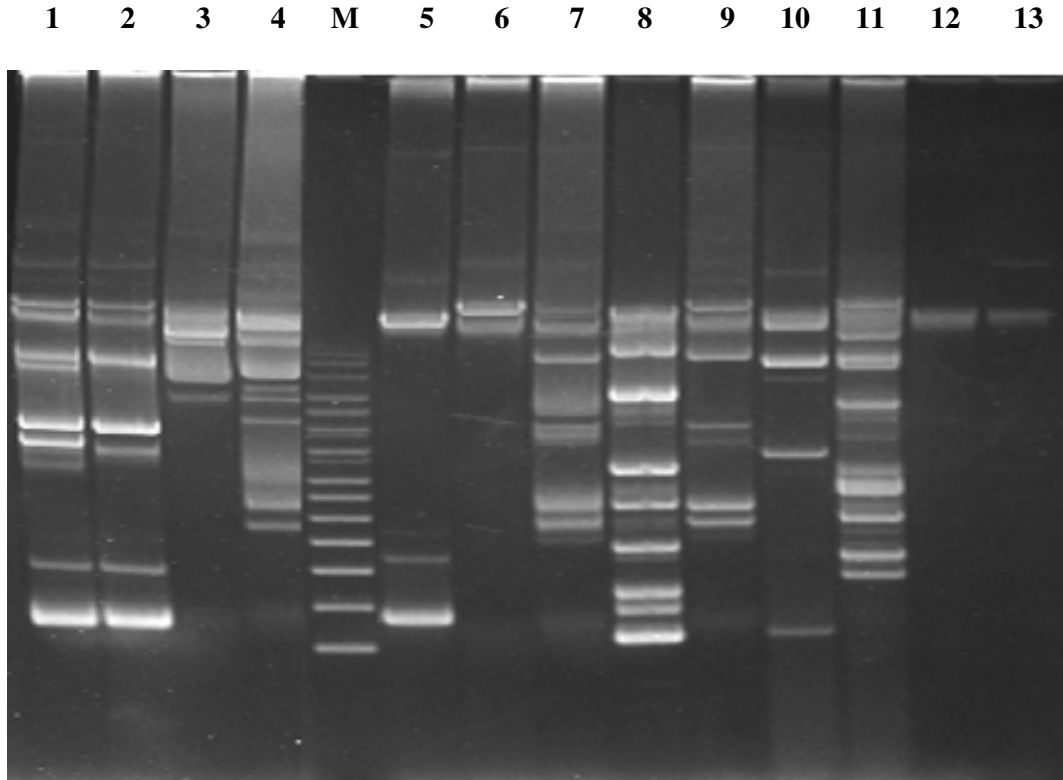
Plazmidler kendi replikasyonlarını yönetme yeteneğinde, kromozom dışı, küçük çevrimsel DNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır. Laktokoklarda, moleküler büyüklükleri 3-130 kb ve sayıları 1-11 adet arasında farklılık gösteren plazmid içerikleri saptanmıştır (Mannu *et al.* 2000, Sánchez *et al.* 2000, Tükel and Akçelik 2000, Sánchez and Mayo 2003). Bu araştırmada elde edilen veriler, yukarıda özetlenen literatür bulguları ile uyum göstermektedir. Laktokoklarda plazmid biyolojisi; bu bakterilerin genetik ve biyokimyasal doğasının tanımlanması, genetik mühendisliği tekniklerinin uygulanması ve evrimlerinin araştırılması açısından büyük önem taşımaktadır. *L. lactis* suşlarında; laktoz ve sitrat fermentasyonu, proteolitik aktivite, ekzopolisakkarit ve bakteriyosin üretimi, fajlara, antibiyotiklere ve ağır metal iyonlarına dirençlilik gibi endüstriyel açıdan kritik önem taşıyan özellikler plazmidler tarafından kodlanmaktadır. Bu nedenle plazmidler, endüstriyel starter kültür suşu geliştirme çalışmalarının ana biyomateriyalini teşkil etmektedir. Diğer yandan, tür içi ve türler arası aktarımlarını yönetme yeteneğindeki metabolik plazmidlerin *L. lactis* suşlarında yaygın oluşu, bu bakterilere çevresel uyumu kolaylaştıracak bir genetik elastisite kazandırmaktadır. Özellikle konjugatif plazmidlerin uyuşma gruplarının tespiti, laktokokların evrimsel ilişkilerinin tanımlanmasında önemli ipuçları sağlamaktadır (Efstathiou and McKay 1976, McKay 1983, Orberg and Sandine 1984, Okamoto *et al.* 1989, Coakley *et al.* 1997, van Kranenburg and de Vos 1998, Pillidge *et al.* 2000, Pillidge *et al.* 2003). *L. lactis* suşlarında ayrıca, tür içi suşların ayrımında plazmid profillerinden yararlanılmaktadır. Zira fizyolojik, biyokimyasal ve kültürel tanı testleri tür içi suşların tanımlanmasında çoğu zaman yeterli olmamaktadır (Émond *et al.* 2001, Klaenhammer *et al.* 2002, Liu *et al.* 2002, Liu *et al.* 2005, Mills *et al.*

2006). Bu araştırmada plazmid profillerinin tanımlanması, özellikle suşların farklılığına işaret etmesi açısından değer taşımaktadır. Tr içerisinde aynı plazmid içeriğine sahip olan *L. lactis* subsp. *cremoris* MBLC47 ve MBLC50 suşlarının (şekil 4.2.), 40  C'de gelişme özellikleri bakımından uygunluk göstermemesi (MBLC50 40  C'de gelişebilmekte, MBLC47 ise gelişememektedir) (izelge 4.2.), bu bakterilerin farklı suşlar olduğuna işaret etmektedir. Diğer tüm tür içi suşlarda plazmid içerikleri, sayı ve büyüklük bakımından değişim göstermiştir. Bu bulgular kültür koleksiyonunun hazırlanması yanında, söz konusu bakterilerde plazmid kodlu özelliklerin tanımlanmasına da esas teşkil edecektir.



**Şekil 4.2.** *L. lactis* suşlarının plazmid içerikleri

1	<i>MBLL1</i>	(kb): 21.7
2	<i>MBLL3</i>	(kb): 24.2, 21.8, 18.1, 10.8, 8.8, 7.8, 5.5, 5.0, 4.6
3	<i>MBLD4</i>	(kb): 23.9, 20.7, 17.1, 14.1, 11.4, 8.6, 7.4
4	<i>MBLD5</i>	(kb): 24.8, 16.5, 14.8, 8.0, 7.2, 3.8, 2.5
5	<i>MBLL6</i>	(kb): 26.7, 21.2, 19.1, 14.8, 12.6, 11.0, 8.4, 6.0, 5.3, 4.8
M	<i>ccc plazmid DNA Marker</i>	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.1
6	<i>MBLL7</i>	(kb): 20.2, 18.7, 13.8, 10.5, 8.1, 5.9
7	<i>MBLL8</i>	(kb): 29.2, 26.4, 21.2, 14.7, 13.5, 7.6, 6.9, 3.6, 2.3
8	<i>MBLL9</i>	(kb): 22.3, 20.0, 17.2, 12.5, 9.4, 5.5, 5.0
9	<i>MBLL10</i>	(kb): 21.7, 19.2, 13.7, 7.4, 6.4, 3.5, 2.3
10	<i>MBLL11</i>	(kb): 19.5, 16.5, 12.4, 9.1, 5.4

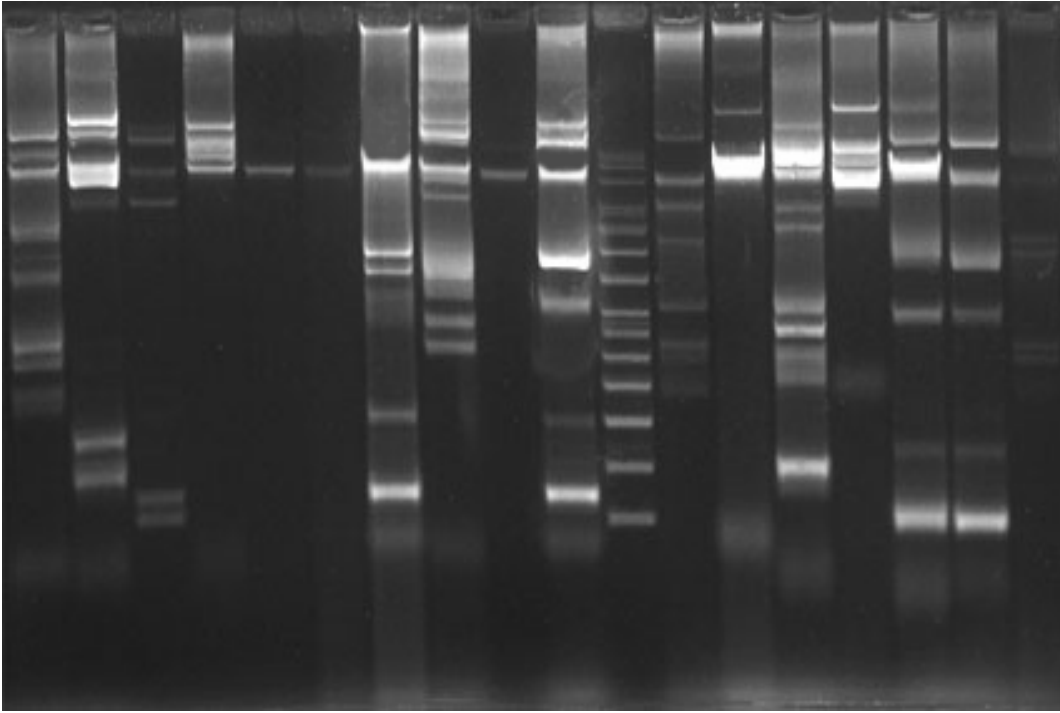


Şekil 4.2. (devam)

1	MBLD17	(kb): 27.5, 23.5, 22.4, 18.4, 17.4, 12.3, 10.7, 9.1, 4.1, 2.7
2	MBLD21	(kb): 27.5, 23.3, 22.0, 17.9, 12.0, 10.0, 4.0, 2.6
3	MBLL25	(kb): 22.3, 20.7, 17.0, 14.3
4	MBLL26	(kb): 21.7, 19.9, 17.0, 15.0, 14.2, 12.6, 8.4, 6.7, 5.6
M	ccc plasmid DNA Marker	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.1
5	MBLD29	(kb): 22.0, 4.4, 2.7
6	MBLL30	(kb): 23.1, 21.6
7	MBLL32	(kb): 23.3, 21.4, 18.4, 14.0, 12.2, 6.8, 5.8
8	MBL34	(kb): 22.5, 19.2, 14.8, 8.8, 6.7, 4.8, 3.3, 2.9, 2.3
9	MBLD35	(kb): 23.5, 21.9, 18.8, 12.4, 11.1, 6.7, 5.9
10	MBLD36	(kb): 27.4, 22.0, 18.1, 16.7, 10.0, 2.4
11	MBLL37	(kb): 23.8, 20.1, 18.1, 14.0, 11.5, 8.8, 7.6, 6.1, 4.5, 3.9
12	MBLC38	(kb): 22.7
13	MBLL40	(kb): 22.7

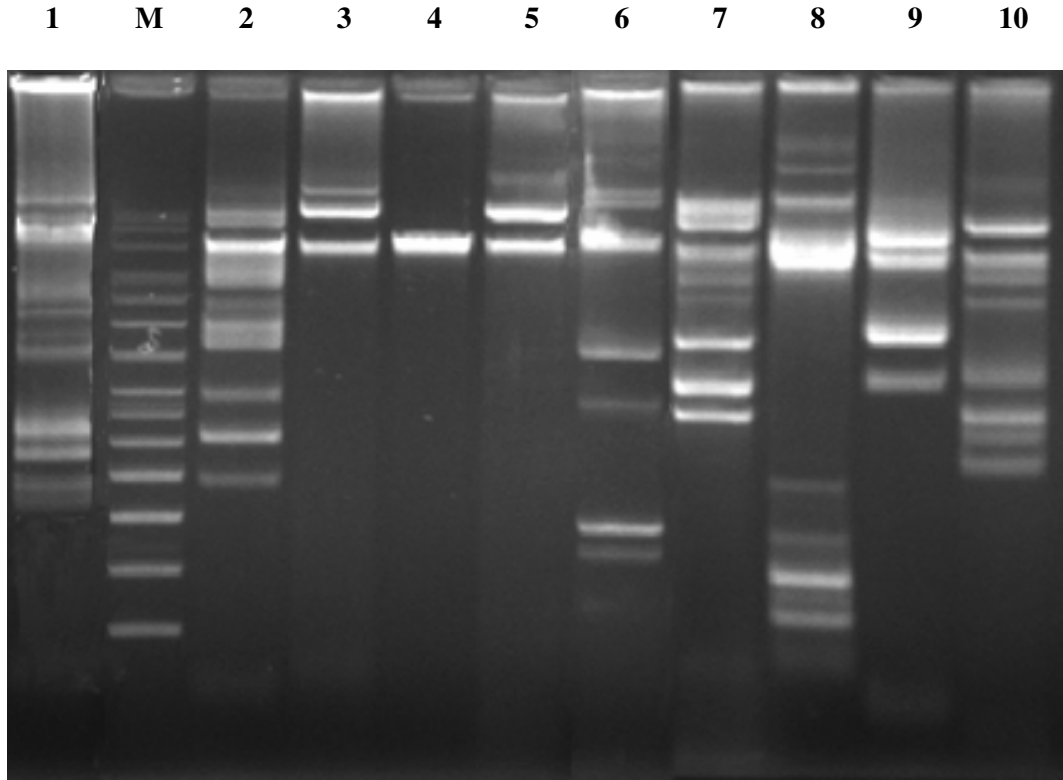


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 16 17



Şekil 4.2. (devam)

1	MBLL43	(kb): 19.6, 18.2, 16.8, 12.3, 9.7, 8.2, 6.4, 5.8, 4.7, 4.3
2	MBLL44	(kb): 20.8, 19.8, 16.8, 14.5, 3.5, 2.8
3	MBLD45	(kb): 19.4, 17.0, 14.7, 2.4, 2.0
4	MBLD46	(kb): 20.4, 19.0, 17.2
5	MBLC47	(kb): 17.0
6	MBLC50	(kb): 17.0
7	MBLD51	(kb): 18.7, 10.1, 8.7, 4.2, 2.5
8	MBLL52	(kb): 19.8, 17.2, 15.4, 9.1, 7.0, 6.3
9	MBLD54	(kb): 16.7
10	MBLD55	(kb): 20.5, 19.8, 17.3, 9.5, 7.5, 4.0, 2.5
M	ccc plasmid DNA Marker	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.1
11	MBLL56	(kb): 19.5, 16.3, 14.4, 11.0, 7.4, 6.4
12	MBLL57	(kb): 21.4, 17.3
13	MBLL58	(kb): 20.5, 17.8, 14.3, 12.3, 7.4, 6.8, 6.1, 5.4, 2.9
14	MBLD59	(kb): 21.8, 19.0, 17.0
15	MBLL60	(kb): 21.9, 19.4, 17.2, 10.6, 7.2, 3.3, 2.0
16	MBLL61	(kb): 19.1, 16.5, 9.6, 7.2, 3.3, 2.0
17	MBLL62	(kb): 18.9, 16.5, 11.3, 10.0, 6.3, 6.0



*Şekil 4.2. (devam)*

1	MBLD19	(kb): 18.9, 17.0, 13.9, 12.8, 10.2, 6.6, 5.7, 4.8, 4.4
M	ccc plazmid DNA Marker	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.1
2	MBLL12	(kb): 17.8, 16.1, 14.7, 13.1, 12.0, 11.1, 8.0, 6.3, 4.9
3	MBLL14	(kb): 19.2, 18.1, 16.1
4	MBLC15	(kb): 16.3
5	MBLL16	(kb): 19.8, 18.0, 16.2
6	MBLL18	(kb): 18.5, 16.3, 9.8, 7.2, 3.6, 3.2
7	MBLL27	(kb): 17.3, 16.4, 14.8, 13.5, 12.5, 9.7, 7.5, 6.3
8	MBLD63	(kb): 21.3, 19.4, 17.6, 14.8, 4.3, 3.2, 2.5, 1.9
9	MBLL65	(kb): 15.3, 10.1, 7.8
10	MBLL64	(kb): 18.5, 16.2, 14.4, 13.5, 12.4, 8.0, 6.3, 5.7, 4.8

#### 4.8. *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 Suşunda Endüstriyel Özelliklerin Stabilitesi

Araştırmada kullanılan Türkiye kökenli *L. lactis* suşları içerisinde; proteolitik aktivite, faj dirençlilik, laktoz fermentasyonu ve laktisin 481 üretimi özelliklerine sahip *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşu, özellikle yüksek proteolitik aktivite ve laktik asit üretme yeteneğinden dolayı, bu özelliklere sahip diğer iki suştan (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1 ve MBLL57) daha güçlü starter kültür potansiyeline sahip olarak değerlendirildi. Starter kültür suşlarında endüstriyel öneme sahip özelliklerin yüksek düzeyde ifadesi yanında bu özelliklerin stabilitesi de, ürünün kalitesi ve ekonomisini doğrudan etkilemektedir (Hugenholtz *et al.* 2000). Bu nedenle söz konusu suşta, endüstriyel öneme sahip özelliklerin stabilitesi araştırıldı. Süt ortamlarında ~70 generasyon (10 pasaj) geliştirilen *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunun bu süre sonunda seçilen 20 adet kolonisinde; faj dirençlilik, proteolitik aktivite, laktik asit ve bakteriyosin üretimi özellikleri tekrar incelenerek, bu özelliklerin fermentasyon süreçlerine uygunluğu % stabilite cinsinden tanımlandı. Stabilite tayininde sürenin ~70 generasyon olarak alınması, fermente süt endüstrisinde genellikle ana starter kültür aktivitesinin bu zaman içerisinde gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır (Martínez-Cuesta *et al.* 2002).

*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşu ile yürütülen stabilite testleri sonucunda; laktoz fermentasyonu ve faj dirençlilik özelliklerinin stabilite oranı % 100, proteolitik aktivite özelliğinin %95 ve laktisin 481 üretiminin ise % 75 olarak belirlendi (Çizelge 4.11.). Laktokoklarda, fermente süt endüstrisi açısından önem taşıyan birçok özelliğin gen kodunun genellikle plazmidler üzerinde bulunması, bu bakterilerde söz konusu özelliklerin stabilite sorununu doğurmaktadır. Endüstriyel üretim süreçlerinde bakteriyel stres koşullarının gelişiminin tam anlamı ile kontrol edilememesi, plazmid stabilitelesini büyük ölçüde etkilemekte ve starter kültür performansı düşmektedir (Allison and Klaenhammer 1998, Helinck *et al.* 2003, Martín *et al.* 2004). Endüstriyel fermentasyon süreçlerine uygunluk esas alındığında, test edilen özelliğin ~70 generasyon sonundaki stabilitesi için en düşük oran % 50 olarak tanımlanmaktadır (Picon *et al.* 2005). Bu veriler, *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda test edilen tüm özelliklerin, endüstriyel kullanım için uygun stabiliteye sahip olduğuna işaret etmektedir. Ancak stabilite bulguları, söz konusu suş ile yürütülecek pilot üretim denemeleri ile desteklenmelidir.

**Çizelge 4.11.** *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşunda endüstriyel özelliklerin stabilitesi

<b>Endüstriyel Özellikler</b>	<b>% Stabilite</b>
Laktoz Fermentasyonu	100
Faj Dirençlilik	100
Proteolitik Aktivite	95
Bakteriyosin Üretimi	75

## 5. SONUÇLAR

1. Araştırmada tanımlanan *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşu; bakteriyosin sentezi (laktisin 481), yüksek düzeyde laktik asit üretimi, proteolitik aktivite ve etkin faj dirençlilik özelliklerine sahip olmasından dolayı, ideal bir starter kültür suşu potansiyeli taşımaktadır.
2. Diğer bakteriyosin üreticisi suşlar (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1 ve MBLL57) çok güçlü antibakteriyel aktivite içermelerinden dolayı, gıda koruma ajanı ya da yardımcı starter kültür suşları olarak kullanılabilir. Özellikle laktisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL1 suşu peynir yapımında duyarlı starter kültür suşları ile birlikte kullanılarak, proteolizin regülasyonu ve dolayısı ile peynir olgunlaşma süresinin kontrolü gerçekleştirilebilir. Nisin üreticisi suş *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL57 ise, karışık starter kültürlerde ya da doğrudan nisin üretimi çalışmalarında kullanılabilir.
3. Türkiye kökenli tüm laktokok suşlarında çok güçlü faj dirençlilik fenotiplerinin saptanması, tüm dünyada süt endüstrisinin en önemli sorunlarından biri olma özelliğini sürdüren faj kontaminasyonlarının çözümüne ve faj-konakçı interaksiyonlarının tanımlanmasına yönelik çalışmalara yeni boyutlar kazandıracaktır.
4. Çalışmadan elde edilen ve starter kültür potansiyelleri, endüstriyel özellikleri esas alınarak tanımlanan suşların, plazmid profilleri çıkarılmak suretiyle kültür koleksiyonları oluşturulmuştur. Bu sayede kültür koleksiyonunda aynı suşların farklı kodlarla tekrarı engellenmiştir. Bu suşlar, starter kültür geliştirme çalışmalarında ve bilimsel araştırmalarda güvenle kullanılabilir.
5. Bu araştırmada tanımlanan *L. lactis* suşlarının starter kültür suşu olarak kullanımları için nihai karar, söz konusu bakterilerin pilot üretim tesislerinde denenmesi suretiyle verilmelidir. Zira endüstriyel üretim süreçlerinde özellikle fermentasyon için önem taşıyan metabolik karakterlerin stabilitesi, küçük ölçek üretim çalışmaları ile büyük oranda farklılık göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Akçelik, M. 1998a. A phage DNA injection-blocking type resistance mechanism encoded by chromosomal DNA in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Milchwissenschaft*, 53; 619-622.
- Akçelik, M. 1998b. Construction of Multiple Phage Resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Advances in Food Sciences (CMTL)*, 20; 101-104.
- Akçelik, M. 1999. The Conjugal Plasmid pLL10236 Encodes Lactose Fermentation Ability, Restriction/Modification Activity and Bacteriocin Production and Immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102. *Food Microbiology*, 16; 487-494.
- Akçelik, M., Şanlıbaba P., Tükel Ç. 2000. Phage Resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Strains Isolated From Traditional Fermented Milk Products in Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, 35; 473-481.
- Akçelik, M., Tunail, N. 1992. A 30 Kd Cell Wall Protein Produced by Plasmid DNA Which Encodes Inhibition of Phage Adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P25. *Milchwissenschaft*, 47; 215-217.
- Allison, G.E. and Klaenhammer, T.R. 1998. Phage resistance mechanism in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 8; 207-226.
- Anderson, E.G. and McKay, L.L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3); 549-552.
- Atilas, M.W., Dudley, E.G. and Steele, J.L. 2000. Gene cloning, sequencing, and inactivation of the branched-chain aminotransferase of *Lactococcus lactis* LM0230. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6); 2325-2329.
- Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. and El-Soda, M. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*, 21; 715-725.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M. and Smit, G. 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal*, 10; 169-179.

- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M. and Smit, G. 2001. Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for gouda-type cheese. *International Dairy Journal*, 11; 51-61.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B.M., Henni, D.E. and Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21; 579-588.
- Bandell, M., Lhotte, M.E., Marty-Teyssset, C., Veyrat, A., Prévost, H., Dartois, V., Diviés, C., Konings, W.N. and Lolkema, J.S. 1998. Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 64; 1594-1600.
- Bassit, N., Boquinen, C-Y., Picque, D. and Corrieu, G. 1993. Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6); 1893-1897.
- Benech, R.O., Kheadr, E.E., Laridi, R., Lacroix, C. and Fliss, I. 2002. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8); 3683-3690.
- Benkerroum, N., Ghouati, Y., Ghalfi, H., Elmejdoub, T., Roblain, D., Jacques, P. and Thonart, P. 2002. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a model cultured milk (Iben) by *in situ* bacteriocin production from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3); 145-151.
- Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S. and Filali-Maltouf, A. 2000. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology*, 89;960-968.
- Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W. and Rogers, P. 2003. Batch and Continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. *Biochemical Engineering Journal*, 14; 127-135.
- Bouchard, J.D., Dion, E., Bissonnette, F. and Moineau, S. 2002. Characterization of the two-component abortive phage infection mechanism AbiT from *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 184(22); 6325-6332.

- Boumerdassi, H., Monnet, C., Desmazeaud, M. and Corrieu, G. 1997. Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6); 2293-2299.
- Boutrou, R., Sepulchre, A., Gripon, J.C. and Monnet, V. 1998. Simple tests for predicting the lytic behavior and proteolytic activity of lactococcal strains in cheese. *Journal of Dairy Science*, 81; 2321-2328.
- Boziaris, I.S. and Adams, M.R. 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. *International Journal of Food Microbiology*, 53; 105-113.
- Bradley, R.L., Arnold, E., Barbano, D.M., Semerad, R.G., Smith, D.E. and Vines, B.K. 1992. Chemical and physical methods. In: Marshall, T.(Ed). *Standart Methods for the Examination of Dairy Products*. American Public Health Association, Washington DC, pp, 433-531.
- Bruinenberg, P.G., de Vos, W.M. and Siezen, R.J. 2000. Deletion of various carboxy-terminal domains of *Lactococcus lactis* SK11 proteinase: Effects on activity, specificity, and stability of the truncated enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7); 2859-2865.
- Bruinenberg, P.G., Vos, P. and de Vos, W.M. 1992. Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strains: Regulation and effect on growth and acidification in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1); 78-84.
- Buist, G., Venema, G. and Kok, J. 1998. Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *Journal of Bacteriology*, 180(22); 5947-5953.
- Campbell, R.C. 1974. *Statistics for biologists*. Cambridge University Pres, Second Edition, 385p.
- Carr, F.J., Chill, D. and Miada, N. 2002. The Lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28; 281-370.
- Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2; 82-100.
- Citti, J.E., Sandine, W.E. and Elliker, P.R. 1963. Some observation on the Hull method for measurement of proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 46; 337-345.
- Cleveland, J. Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71; 1-20.



- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4); 1434-1440.
- Cock, L.S: and de Stouvenel, A.R. 2006. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from sugar cane plants. *Electronic Journal of Biotechnology* [online] , 9(1). January 15.  
<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue1/full/10/>.ISSN:0717-3458.
- Cogan, B.T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C. and Rodriguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64; 409-421.
- Corroler, D., Desmasures, N. and Gueguen, M. 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51; 91-99.
- Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N. and Gueguen, M. 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12); 4729-4735.
- Corsetti, A., Settanni, L. and Van Sinderen, D. 2004. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their *in vitro* and *in situ* activity. *Journal of Applied Microbiology*, 96; 521-534.
- Crow, V.L. and Thomas, T.D. 1984. Properties of a *Streptococcus lactis* strain that ferments lactose slowly. *Journal of Bacteriology*, 157(1); 28-34.
- Curic, M., Stuer-Lauridsen, B., Renault, P. and Nilsson, D. 1999. A general method for selection of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase-deficient *Lactococcus lactis* mutants to improve diacetyl formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3); 1202-1206.
- Davey, G.P. 1984. Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4); 895-896.

- de Fabrizio, S.V., Ledford, R.A., Shieh, Y.S.C., Brown, J. and Parada, J.L. 1991. Comparison of lactococcal bacteriophage isolated in the United States and Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 13; 285-294.
- De Haard, H.J.W. , Bezemer, S., Ledebøer, A.M., Müller, W.H., Boender, P.J., Moineau, S., Coppelmans, M-C. Verkleij, A.J., Frenken, L.G.J. and Verrips, C.T. 2005. Llama antibodies against a lactococcal protein located at the tip of the phage tail prevent phage infection. *Journal of Bacteriology*, 187(13); 4531-4541.
- de la Plaza, M., de Palencia, P.F., Peláez, C. and Requena, T. 2004. Biochemical and molecular characterization of  $\alpha$ -ketoisovalerate decarboxylase, an enzyme involved in the formation of aldehydes from amino acids by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 238; 367-374.
- de Vos, W.M. and Hugenholtz, J. 2004. Engineering metabolic highways in lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology*, 22(2); 72-79.
- de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional, 539, London.
- Delgado, S. and Mayo, B. 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 90; 309-319.
- Delgado, S., Delgado, T. and Mayo, B. 2002. Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *Journal of Food Protection*, 65(10); 1590-1596.
- Diep, D.B. and Nes, I.F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets*, 3; 107-122.
- Dimov, S.G., Ivanova, P.M., Harizonova, N.T., Ivanova, I.V. 2005. Bioactive peptides used by bacteria in the concurrence for the ecological niche: general classification and mode of action (overview). *Biotechnol.& Biotechnol. Eq.*, p; 3-22.
- Domingues, S., Chopin, A., Ehrlich, S.D. and Chopin, M-C. 2004. The lactococcal abortive phage infection system AbiP prevents both phages DNA replication and temporal transcription switch. *Journal of Bacteriology*, 186(3); 713-721.
- Dupont, K., Janzen, T., Vogensen, F.K., Josephsen, J. and Stuer-Lauridsen, B. 2004. Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10); 5825-5832.

- Durlu-Özkaya, F. 2001a. Salamura beyaz peynirden izole edilen bazı laktokok, enterokok ve Laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyogen amin oluşumu açısından karşılaştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Durlu-Özkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. 2001b. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91; 861-870.
- Durmaz, E. and Klaenhammer, T.R. 2000. Genetic analysis of chromosomal regions of *Lactococcus lactis* acquired by recombinant lytic phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3); 895-903.
- Efstathiou, J.D. and McKay, L.L. 1976. Plasmids in *Streptococcus lactis*: Evidence that lactose metabolism and proteinases activity are plasmid linked. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(1); 38-44.
- Elder, J.K. and Southern, E.M. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis (II): comparison of methods for plating mobility of fragment length. *Analytical Biochemistry*, 170; 38-44.
- Elder, J.K., Amos, A, Southern, E.M. and Shippey, G.A. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis (I). *Analytical Biochemistry*, 128; 223-226.
- Émond, É., ÉE, R.L., Drolet, G., Moineau, S. and Lapointe, G. 2001. Molecular characterization of theta replication plasmid and its use for development of a two-component food-grade cloning system for *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4); 1700-1709.
- Exterkate, F.A., Slangen, C. and Siezen, R.J. 2001. Effect of genetically modified *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinases with altered specificity on the course of casein degradation under cheese conditions. *International Dairy Journal*, 11; 363-371.
- Ferchichi, M., Frère, J., Mabrouk, K., Mania, M. 2001. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiology Letters*, 205; 49-55.
- Flambard, B., Helinck, S., Richard, J. and Juillard, V. 1998. The contribution of caseins to the amino acid supply for *Lactococcus lactis* depends on the type of cell envelope proteinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6); 1991-1996.

- Flambard, B., Richard, J. and Juillard, V. 1997. Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6); 2131-2135.
- Forde, A., Daly, C. And Fitzgerald, G.F. 1999. Identification of four phage resistance plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4); 1540-1547.
- Fortier, L-C., Bouchard, J.D. and Moineau, S. 2005. Expression and site-directed mutagenesis of the lactococcal abortive phage infection protein *AbiK*. *Journal of Bacteriology*, 187(11); 3721-3730.
- 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(3); 187-196.
- Gabs, S. and Josephsen, J. 2003. Improvement of phage defence in *Lactococcus lactis* by introduction of the plasmid encoded restriction and modification system *LlaAI*. *Letters in Applied Microbiology*, 36; 332-336.
- Garbutt, K.C., Kraus, J. and Geller, B.L. 1997. Bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis* engineered by replacement of a gene for a bacteriophage receptor. *Journal of Dairy Science*, 80; 1512-1519.
- Ghraiiri, T., Mania, M., Berjeaud, J.M. and Frère, J. 2004. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 97; 621-628.
- Ghraiiri, T., Frère, J., Berjeaud, J.M., Mania, M. 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from *rigouta* cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 105; 389-398.
- Goupil, N., Corthier, G., Ehrlich, S.D. and Renault, P. 1996. Imbalance of leucine flux in *Lactococcus lactis* and its use for the isolation of diacetyl-overproducing strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7); 2636-2640.
- Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, S.D. and Delorme, C. 2001. Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *Journal of Bacteriology*, 183(12); 3614-3622.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. 2005. A Review: Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, 98; 1316-1325.

- Haddad, S., Sodini, I., Monnet, C., Latrille, E. and Corrieu, G. 1997. Effect of citrate on growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in milk. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 48; 236-341.
- Harrigan, F.W. and McCance, E.M. 1966. *Laboratory methods in microbiology*. Academic Press London, New York, 285p.
- Helinck, S., Charbonnel, P., Foucaud-Scheunemann, C., Piard, J.-C. and Juillard, V. 2003. Charged casein-derived oligopeptides competitively inhibit the transport of a reporter oligopeptide by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 94; 900-907.
- Hicks, C.L., Clark-Safko, P.A., Surjawan, I. and O'Leary, J. 2004. Use of bacteriophage-derived peptides to delay phage infections. *Food Research International*, 37; 115-122.
- Hindré, T., Didelot, S., Le Penneec, J-P. Haras, D., Dufour, A. and Vallée-Réher, K. 2003. Bacteriocin detection from whole bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2); 1051-1058.
- Hindré, T., Le Penneec, J-P. Haras, D. and Dufour, A. 2004. Regulation of lantibiotic lactisin 481 production at the transcriptional level by acid pH. *FEMS Microbiology Letters*, 231; 291-298.
- 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, 787p.
- Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., de Vos, W. and Hols P. 2000. *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9); 4112-4114.
- Huggins, R.A. 1984. Progress in dairy starter culture technology. *Food Technology*, 38; 41-50.
- Huot, E., Meghrou, J., Barrena-Gonzalez, C. and Petitdemange, H. 1996. Bacteriocin J46, a new bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46: Isolation and characterization of the protein and its gene. *Anaerobe*, 2; 137-145.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(2); 171-200.

- Joerger, R.D. 2003. Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*, 82; 640-647.
- Josephsen, J., Petersen, A., Neve, H. and Nielsen, E.W. 1999. Development of lytic *Lactococcus lactis* bacteriophages in a Cheddar cheese plant. *International Journal of Food Microbiology*, 50; 163-171.
- Karakuş, M. 1994. Beyaz peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin asit oluşturma ve proteolitik aktiviteleri. *Gıda Dergisi*, 19(4); 237-241.
- Kempler, G.M. and McKay, L.L. 1980. Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(4); 926-927.
- King, N. 1948. Modification of Voges-Preskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbimol plus diacetyl in butter. *Dairy Industries*, 13; 860-866.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, T., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Ovebeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. and Siezen, R. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82; 29-58.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12; 39-86.
- Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S.C., Freitas, D.A., Miyoshi, A., Bermúdez-Humarán, L.G., Nouaille, S., Riberio, L.A., Leclercq, S., Gabriel, J.E., Guimaraes, V.D., Oliveira, M.N., Charlier, C., Gautier, M. and Langella, P. 2005. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial Cell Factories*, 4; 1-13.
- Lee, K. 2005. A media design program for lactic acid production coupled with extraction by electrodialysis. *Bioresource Technology*, 96; 1505-1510.
- Lee, N.K. and Paik, H.D. 2001. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiology*, 18; 17-24.

- Leenhouts, K.J., Gietema, J., Kok, J. and Venema, G. 1991. Chromosomal stabilization of the proteinase genes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9); 2568-2575.
- Liu, C.-Q., Charoechoi, P., Khunajakr, N., Deng, Y.-M., Widodo and Dunn, N.W. 2002. Genetic and transcriptional analysis of a novel plasmid-encoded copper resistance operon from *Lactococcus lactis*. *Gene*, 297; 241-247.
- Liu, C.-Q., Su, P., Khunajakr, N., Deng, Y.-M., Sumual, S., Kim, W.S., Tandianus, J.E. and Dunn, N.W. 2005. Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 98; 127-135.
- Lunde, M., Aastveit, A.H., Blantny, J.M. and Nes, I.F. 2005. Effects of diverse environmental condition on  $\Phi$ LC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2); 721-727.
- Luoma, S., Peltoniemi, K., Joutsjoki, V., Rantanen, T., Tamminen, M., Heikkinen, I. and Palva, A. 2001. Expression of six peptidases from *Lactobacillus helveticus* in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3); 1232-1238.
- 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., García, P., Janzen, T., Rodríguez, A. and Suárez, J.E. 2003. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *International Journal of Food Microbiology*, 86; 213-222.
- Madera, C., Monjardin, C. and Suárez, J.E. 2004. Milk contamination and Resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12); 7365-7371.
- Madsen, S.M., Mills, D., Djordjevic, G., Israelsen, H. and Klaenhammer, T.R. 2001. Analysis of the genetic switch and replication region of a P335-type bacteriophage with an obligate lytic lifestyle on *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3); 1128-1139.
- Mahoningvong, C., Boyce, J.D., Davidson, B.E. and Hillier, A.J. 2001. Sequence analyses and molecular characterization of the *Lactococcus lactis* temperate

- bacteriophage BK5-T. *Applied and Environmental Microbiology*, 67; 3564-3576.
- Malone, A.S., Shellhammer, T.H. and Courtney, P.D. 2002. Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis, and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9); 4357-4363.
- Mannu, L., Paba, A., Pes, M. and Scintu, M.F. 2000. Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 89; 191-197.
- Mao, Y., Muriana, P.M. and Cousin, M.A. 2001. Purification and transcriptional inactivation of lacticin FS92, a broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* FS92. *Food Microbiology*, 18; 165-175.
- Martín, M.G., Sender, P.D., Peirú, S., de Mendoza, D. and Magni, C. 2004. Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complex of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CRL264. *Journal of Bacteriology*, 186(17); 5649-5660.
- Martínez, B., Suárez, J.E. and Rodríguez, A. 1996. Lactococcin 972: a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiology*, 142; 2393-2398.
- Martínez-Cuesta, C., Requena, T. and Peláez, C. 2002. Effect of bacteriocin-induced cell damage on the branched-chain amino acid transamination by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 217; 109-113.
- Martínez-Cuesta, M.C., Requena, T. and Peláez, C. 2001. Use of a bacteriocin-producing transconjugants as starter in acceleration of cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 70; 79-88.
- Mauriello, G., Moio, L., Moschetti, G., Piombino, P., Addeo, F. and Coppola, S. 2001. Characterization of lactic acid bacteria strains on the basis of neutral volatile compounds produced in whey. *Journal of Applied Microbiology*, 90; 928-942.
- McAuliffe, O., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25; 285-308.
- McGrath, S., van Sinderen, D. and Fitzgerald, G.F. 2002. Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12; 3-15.



- McKay, L.L. 1983. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49; 259-274.
- Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S. and Oliver, G. 2001. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. *Journal of Food Protection* 64(4); 559-563.
- Meijer, W., Marugg, J.D. and Hugenholtz J. 1996. Regulation of proteolytic enzyme activity in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1); 156-161.
- 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.
- Micklič, A. and Rogelj, I. 2003. Characterization of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies. *International Journal of Food Science and Technology*, 38; 305-311.
- Mills, S., Coffey, A., O'Sullivan, L., Stokes, D., Hill, C., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. 2002. Use of lacticin 481 to facilitate delivery of the bacteriophage resistance plasmid, pCBG104 to cheese starters. *Journal of Applied Microbiology*, 92; 238-246.
- Mills, S., McAuliffe, O.E., Coffey, A., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. 2006. Plasmids of lactococci-genetic accessories or genetic necessities?. *FEMS Microbiology Reviews*, 30; 243-273.
- Monnet, C., Aymes, F. and Corrieu, G. 2000. Diacetyl and  $\alpha$ -acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* mutants that are deficient in  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12); 5518-5520.
- Moreno, I., Lerayer, A.L.S. and Leitão, M.F.F. 1999. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Revista de Microbiologia*, 30; 130-136.
- Moreno, I., Lerayer, A.L.S., Baldini, V.L.S. and Leitão, M.F., de F. 2000. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31; 184-192.

- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* [online], 7(2). August 15.  
<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue2/full/7/>.ISSN:0717-3458.
- Nomura, M., Kobayashi, M. and Okamoto, T. 2002. Rapid PCR-based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* subspecies. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5); 2209-2213.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 81; 137-145.
- O'Sullivan, L., Ryan, M.P., Ross, R.P. and Hill, C. 2003a. Generation of food-grade lactococcal starters which produce the lantibiotics lacticin 3147 and lacticin 481. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6); 3681-3685.
- O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2003b. A lacticin 481-producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. *Journal of Applied Microbiology*, 95; 1235-1241.
- Okamoto, J., Fujita, Y. and Irie, R. 1989. Diversity in genetic instability of lactose fermentation and proteinase production among lactic streptococci. *Agric. Biol. Chem.*, 53(3); 827-829.
- Orberg, P.K. and Sandine, W.E. 1984. Microscale method for rapid isolation of covalently closed circular plasmid DNA from group N streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(4); 677-680.
- Pérez, G., Cardell, E. and Zárate, V. 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 38; 537-546.
- Piard, J.C., Muriana, P.M., Desmazaud, M.J. and Klaenhammer, T.R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lantibiotic-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1); 279-284.
- Picon, A., de Torres, B., Gaya, P. and Nuñez, M. 2005. Cheesemaking with *Lactococcus lactis* strain expressing a mutant oligopeptide binding protein as a starter

- results in a different peptide profile. *International Journal of Food Microbiology*, 104; 299-307.
- Pillidge, C.J., Collins, L.J., Ward, L.J.H., Cantillon, B.M., Shaw, B.D., Timmins, M.J., Heap, A. and Polzin, K.M. 2000. Efficacy of four conjugal lactococcal phage resistance plasmids against phage in commercial *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* cheese starter strains. *International Dairy Journal*, 10; 617-625.
- Pillidge, C.J., Crow, V.L., Coolbear, T and Reid, J.R. 2003. Exchanging lactocepin plasmids in lactococcal starters to study bitterness development in Gouda cheese: a preliminary investigation. *International Dairy Journal*, 13; 345-354.
- Reddy, M.S., Vedamuthu, E.R., Washam, C.J. and Reinbold, G.W. 1969. Differential agar medium for separating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Applied Microbiology*, 18(5); 755-759
- Ross, P.R., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J. and Hill, C. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76; 337-346.
- Ross, P.R., Morgan, S. and Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79; 3-16.
- Røssland, E., Borge, G.I.A., Langsrud, T. and Sørhaug, T. 2003. Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 89; 205-212.
- Sánchez, C. and Mayo, B. 2003. Sequence and analysis of pBM02, a novel RCR cryptic plasmid from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* P8-2-47. *Plasmid*, 49; 118-129.
- Sánchez, M.M., Delgado, T., Alonso, L. and Mayo, B. 2000. Phenotypic and genetic characterization of a selected set of *Lactococcus lactis* strains isolated from a starter-free farmhouse cheese. *Food Microbiology*, 17; 449-460.
- Sanders, M.E. 1988. Phage resistance in lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70; 411-421.
- Scannell, A.G.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W. and Arendt, E.K. 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins lacticin 3147 and nisaplin. *International Journal of Food Microbiology*, 60; 241-249.
- Schaffer, H.E. and Sederoff, R.R. 1981. Improvement estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 115; 122-133.

- Schleifer, K.H. and Kilpper-Bälz, R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: A review. *System. Appl. Microbiol.*, 10; 1-19.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.*, 6; 183-195.
- Smid, E.J., Poolman, B. and Konings, W.N. 1991. Casein utilization by lactococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9); 2447-2452.
- Southern, E.M. 1979. Measurement of DNA lengths by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 100; 319-323.
- Stiles, M.E. and Holzapel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36; 1-29.
- Sturino, J.M. and Klaenhammer, T.R. 2004. Bacteriophage defence systems and strategies for lactic acid bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 56; 331-378.
- Swindell, S.R., Benson, K.H., Griffin, H.G, Renault, P., Ehrlich, S.D. and Gasson, M.J. 1996. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7); 2641-2643.
- Şanlıbaba, P. and Akçelik, M. 2005. Classification of Virulent Lactococcal Bacteriophages Based on Protein Composition and Restriction Endonuclease Analysis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29; 865-871.
- Takala, T.M., Koponen, O., Qiao, M. and Saris, P.E.J. 2004. Lipid-free NisI: interaction with nisin and contribution to nisin immunity via secretion. *FEMS Microbiology Letters*, 237; 171-177.
- Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29(6); 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* DPC4275 is linked to the formation of the cointegrate plasmid pMRC02. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1); 34-42.
- Tuncer, Y., Akçelik, M. 2002. A Protein Which Masks Galactose Receptor Mediated Phage Susceptibility in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MPL56. *International Journal of Food Science and Technology*, 37; 139-144.

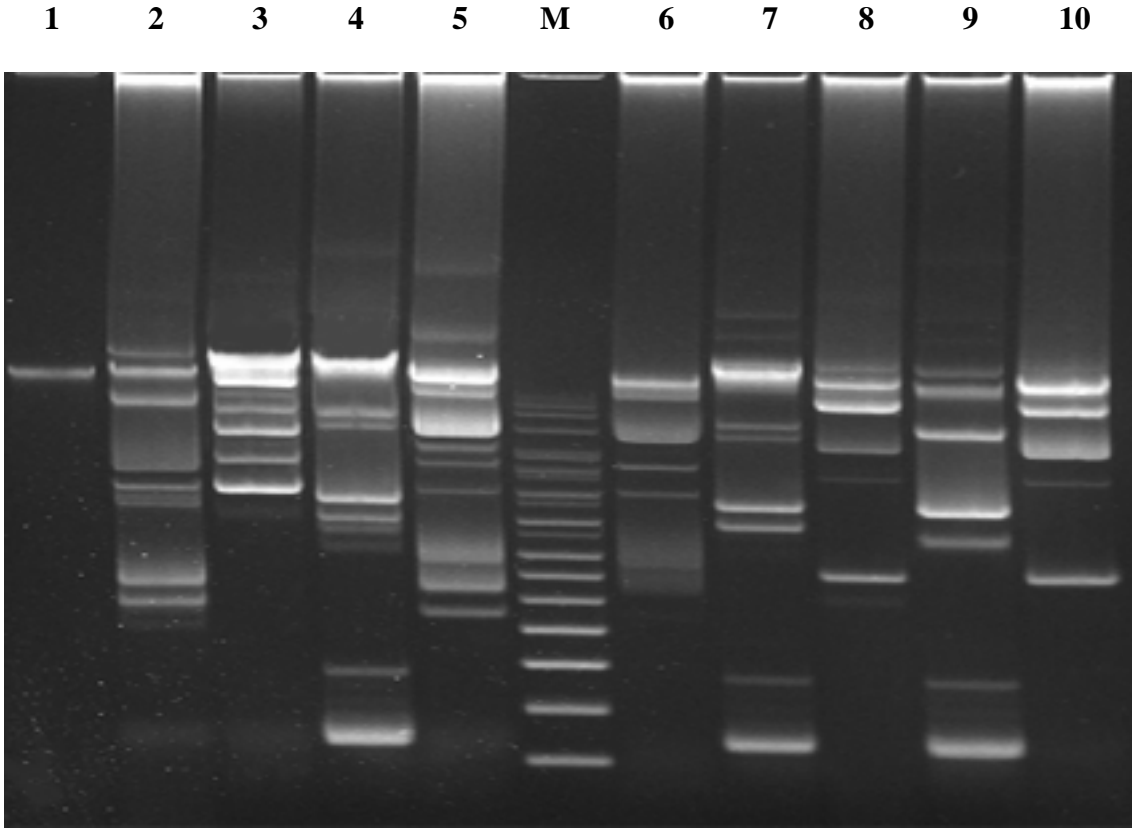
- Tükel Ç. and Akçelik, M. 2000. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşlarında laktoz plazmidlerinin tanımlanması. Tr. J. of Biology , 24: 405-424.
- Tükel, Ç. and Akçelik, M. 2003. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA83 suşunda aktif bir faj dirençlilik sisteminin genetik ve biyokimyasal doğası. Gıda Dergisi, 28; 235-239.
- Twomey, D.P., De Urazza, P.J., McKay, L.L. and O'Sullivan, D.J. 2000. Characterization of AbiR, a novel multicomponent abortive infection mechanism encoded by plasmid pKR223 of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KR2. Applied and Environmental Microbiology, 66; 2647-2651.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. Applied and Environmental Microbiology, 55(5); 1187-1191.
- van der Vossen, J.M.B.M., Kodde, J., Haandrikman, A.J., Venema, G. and Kok, J. 1992. Characterization of transcription initiation and termination signals of the proteinase genes of *Lactococcus lactis* Wg2 and enhancement of proteolysis in *L. lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 58(9); 3142-3149.
- van Kranenburg, R. and de Vos, W.M. 1998. Characterization of multiple regions involved in replication and mobilization of plasmid pNZ4000 coding for exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*. Journal of Bacteriology, 180(20); 5285-5290.
- Venema, K., Venema, G. and Kok, J. 1995. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. Trends in Microbiology, 3; 299-304.
- Verhue, W.M. and Tjan, F.S.B. 1991. Study of the citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* by means of <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. Applied and Environmental Microbiology, 57(11); 3371-3377.
- Ward, L.J.H., Heap, H.A. and Kelly, W.J. 2004. Characterization of closely related lactococcal starter strains which show differing patterns of bacteriophage sensitivity. Journal of Applied Microbiology, 96; 144-148.
- Yarmus, M., Mett, A. and Shapira, R. 2000. Cloning and expression of the genes involved in the production of and immunity against the bacteriocin lacticin RM. Biochimica et Biophysica Acta, 1490; 279-290.
- Yıldırım, Z. and Johnson, M.G. 1998. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. Letters in Applied Microbiology, 26; 297-304.

Ziadi, M., Touhami, Y., Acchour, M., Thonart, Ph. and Hamdi, M. 2005. The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus*. Biochemical Engineering Journal, 24; 141-145.

## ÖZGEÇMİŞ

24.09.1981 Tarihinde Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1998 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. Bir yıllık İngilizce hazırlık öğrenimiyle birlikte 2003 yılında lisans öğrenimini tamamladı. Aynı yıl, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı.

Yayınlanmış bir yayını bulunmaktadır.

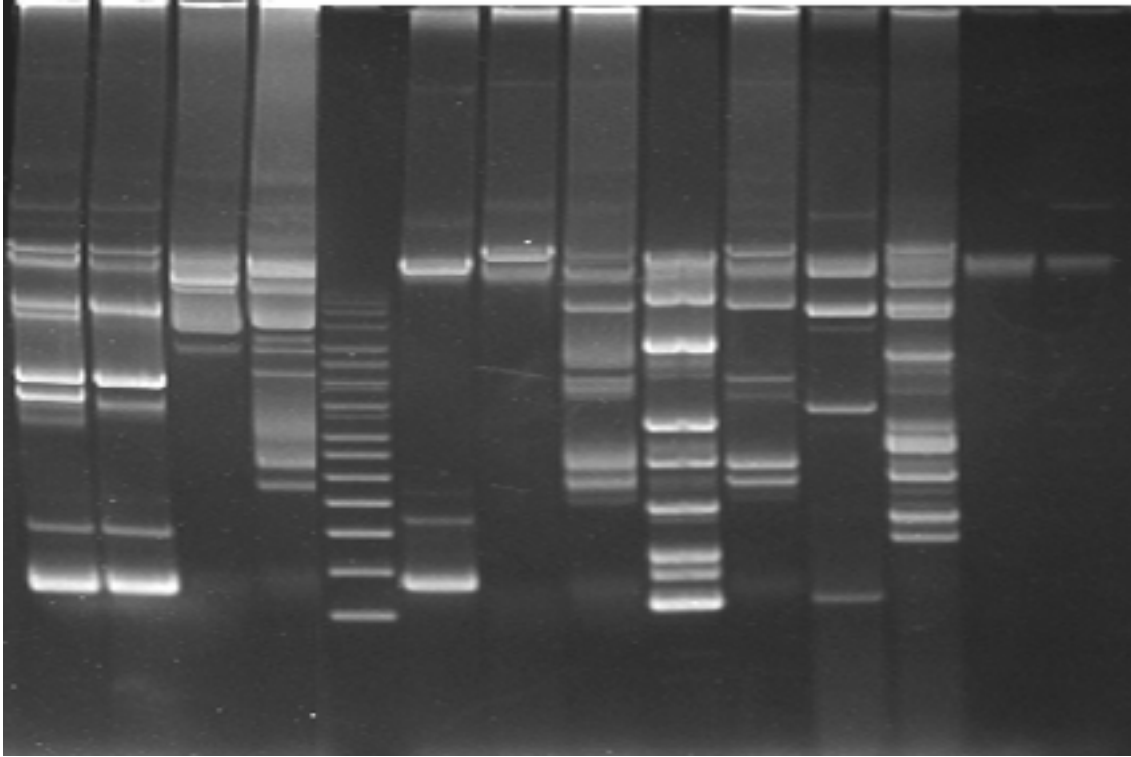


Şekil 4.2. *L. lactis* suşlarının plazmid içerikleri

1	<i>MBLL1</i>	(kb): 21.7
2	<i>MBLL3</i>	(kb): 24.2, 21.8, 18.1, 10.8, 8.8, 7.8, 5.5, 5.0, 4.6
3	<i>MBLD4</i>	(kb): 23.9, 20.7, 17.1, 14.1, 11.4, 8.6, 7.4
4	<i>MBLD5</i>	(kb): 24.8, 16.5, 14.8, 8.0, 7.2, 3.8, 2.5
5	<i>MBLL6</i>	(kb): 26.7, 21.2, 19.1, 14.8, 12.6, 11.0, 8.4, 6.0, 5.3, 4.8
M	<i>ccc plazmid DNA Marker</i>	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.1
6	<i>MBLL7</i>	(kb): 20.2, 18.7, 13.8, 10.5, 8.1, 5.9
7	<i>MBLL8</i>	(kb): 29.2, 26.4, 21.2, 14.7, 13.5, 7.6, 6.9, 3.6, 2.3
8	<i>MBLL9</i>	(kb): 22.3, 20.0, 17.2, 12.5, 9.4, 5.5, 5.0
9	<i>MBLL10</i>	(kb): 21.7, 19.2, 13.7, 7.4, 6.4, 3.5, 2.3
10	<i>MBLL11</i>	(kb): 19.5, 16.5, 12.4, 9.1, 5.4



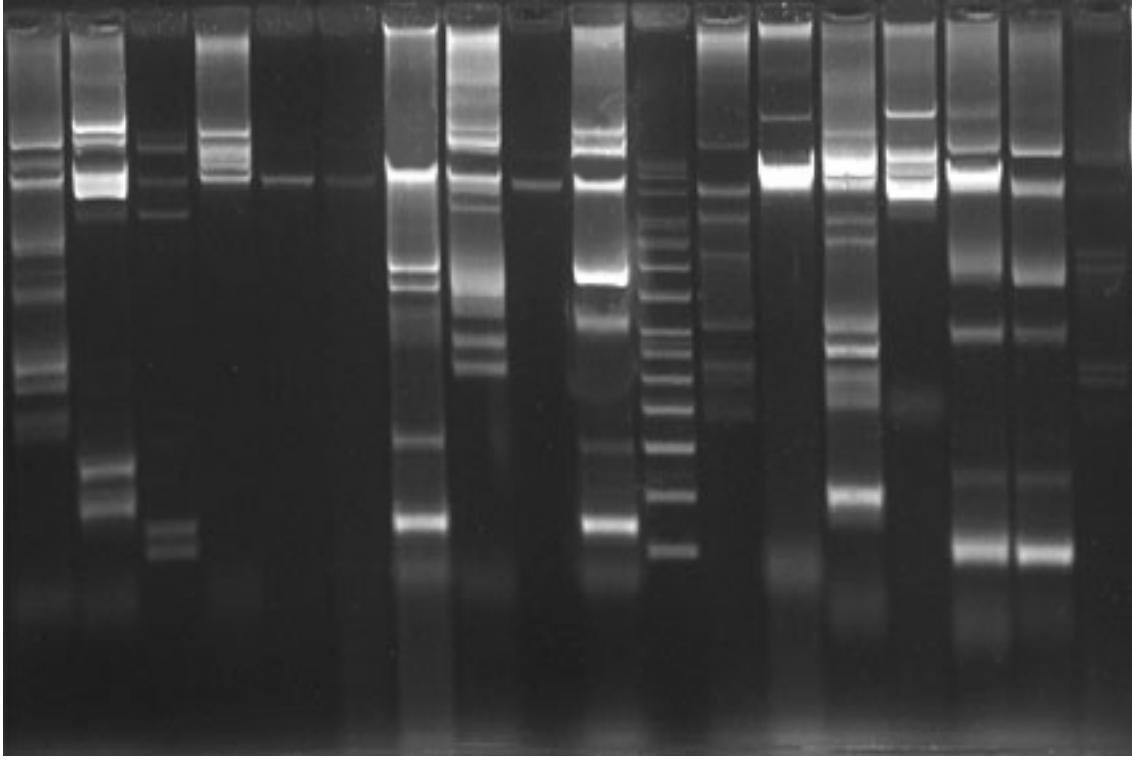
1 2 3 4 M 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Şekil 4.2. (devam)

1	MBLD17	(kb): 27.5, 23.5, 22.4, 18.4, 17.4, 12.3, 10.7, 9.1, 4.1, 2.7
2	MBLD21	(kb): 27.5, 23.3, 22.0, 17.9, 12.0, 10.0, 4.0, 2.6
3	MBLL25	(kb): 22.3, 20.7, 17.0, 14.3
4	MBLL26	(kb): 21.7, 19.9, 17.0, 15.0, 14.2, 12.6, 8.4, 6.7, 5.6
M	ccc plazmid DNA Marker	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.1
5	MBLD29	(kb): 22.0, 4.4, 2.7
6	MBLL30	(kb): 23.1, 21.6
7	MBLL32	(kb): 23.3, 21.4, 18.4, 14.0, 12.2, 6.8, 5.8
8	MBL34	(kb): 22.5, 19.2, 14.8, 8.8, 6.7, 4.8, 3.3, 2.9, 2.3
9	MBLD35	(kb): 23.5, 21.9, 18.8, 12.4, 11.1, 6.7, 5.9
10	MBLD36	(kb): 27.4, 22.0, 18.1, 16.7, 10.0, 2.4
11	MBLL37	(kb): 23.8, 20.1, 18.1, 14.0, 11.5, 8.8, 7.6, 6.1, 4.5, 3.9
12	MBLC38	(kb): 22.7
13	MBLL40	(kb): 22.7

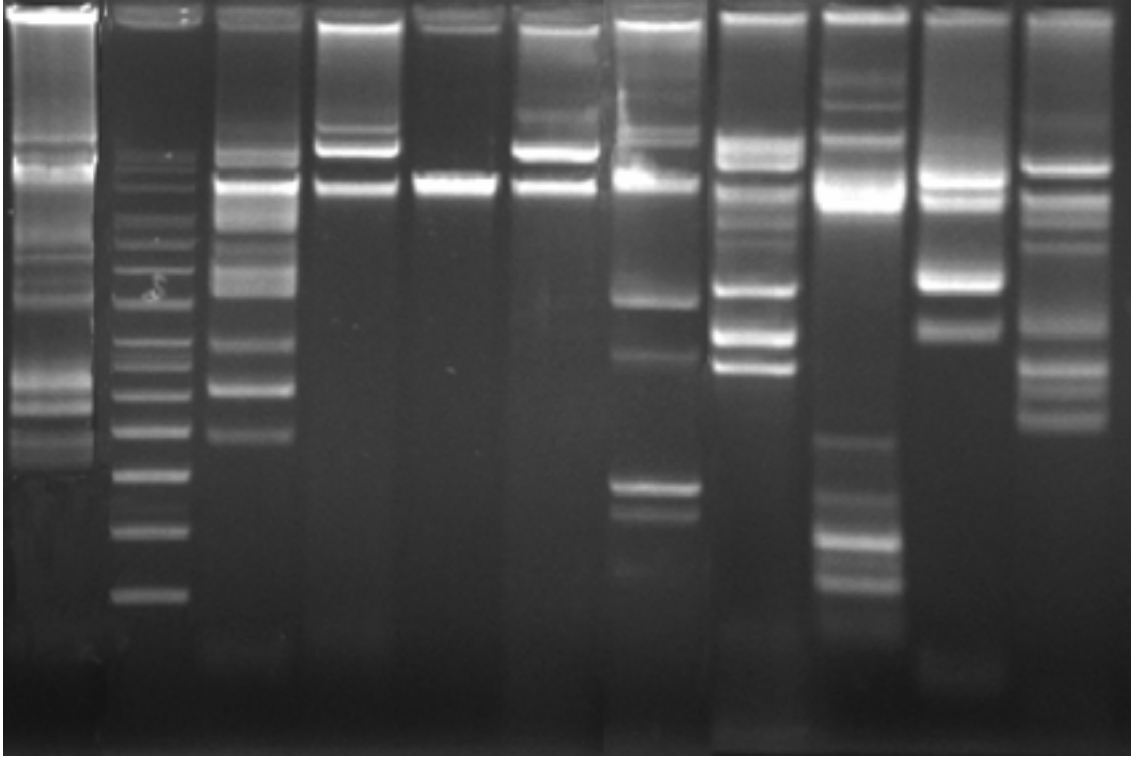
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 16 17



Şekil 4.2. (devam)

1	MBLL43	(kb): 19.6, 18.2, 16.8, 12.3, 9.7, 8.2, 6.4, 5.8, 4.7, 4.3
2	MBLL44	(kb): 20.8, 19.8, 16.8, 14.5, 3.5, 2.8
3	MBLD45	(kb): 19.4, 17.0, 14.7, 2.4, 2.0
4	MBLD46	(kb): 20.4, 19.0, 17.2
5	MBLC47	(kb): 17.0
6	MBLC50	(kb): 17.0
7	MBLD51	(kb): 18.7, 10.1, 8.7, 4.2, 2.5
8	MBLL52	(kb): 19.8, 17.2, 15.4, 9.1, 7.0, 6.3
9	MBLD54	(kb): 16.7
10	MBLD55	(kb): 20.5, 19.8, 17.3, 9.5, 7.5, 4.0, 2.5
M	ccc plasmid DNA Marker	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.1
11	MBLL56	(kb): 19.5, 16.3, 14.4, 11.0, 7.4, 6.4
12	MBLL57	(kb): 21.4, 17.3
13	MBLL58	(kb): 20.5, 17.8, 14.3, 12.3, 7.4, 6.8, 6.1, 5.4, 2.9
14	MBLD59	(kb): 21.8, 19.0, 17.0
15	MBLL60	(kb): 21.9, 19.4, 17.2, 10.6, 7.2, 3.3, 2.0
16	MBLL61	(kb): 19.1, 16.5, 9.6, 7.2, 3.3, 2.0
17	MBLL62	(kb): 18.9, 16.5, 11.3, 10.0, 6.3, 6.0

1 M 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Şekil 4.2. (devam)

1	MBLD19	(kb): 18.9, 17.0, 13.9, 12.8, 10.2, 6.6, 5.7, 4.8, 4.4
M	ccc plasmid DNA Marker	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.1
2	MBLL12	(kb): 17.8, 16.1, 14.7, 13.1, 12.0, 11.1, 8.0, 6.3, 4.9
3	MBLL14	(kb): 19.2, 18.1, 16.1
4	MBLC15	(kb): 16.3
5	MBLL16	(kb): 19.8, 18.0, 16.2
6	MBLL18	(kb): 18.5, 16.3, 9.8, 7.2, 3.6, 3.2
7	MBLL27	(kb): 17.3, 16.4, 14.8, 13.5, 12.5, 9.7, 7.5, 6.3
8	MBLD63	(kb): 21.3, 19.4, 17.6, 14.8, 4.3, 3.2, 2.5, 1.9
9	MBLL65	(kb): 15.3, 10.1, 7.8
10	MBLL64	(kb): 18.5, 16.2, 14.4, 13.5, 12.4, 8.0, 6.3, 5.7, 4.8