

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Lactococcus lactis* SUŞLARINDA İNKÜBASYON
SICAKLIĞI VE SÜRESİNİN PLAZMİD STABİLİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

EMRE UĞUZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2006

Her hakkı saklıdır

.....danışmanlığında,
tarafından hazırlanan “.....” adlı tez çalışması/...../.....
tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü Anabilim Dalı’nda
(**YÜKSEK LİSANS TEZİ**) olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

Üye :

Üye :

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr.Ülkü MEHMETOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Lactococcus lactis SUŞLARINDA İNKÜBASYON SICAKLIĞI VE SÜRESİNİN PLAZMİD STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Emre UĞUZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada, farklı inkübasyon ve sıcaklık sürelerinin *L. lactis* suşlarında plazmid stabilitesi üzerine etkileri araştırıldı. Optimum gelişme koşullarında yürütülen plazmid analizleri sonucunda; *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunun büyüklükleri değişen 9 adet (5.7-23.6 kb), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunun 9 adet (2.8-24.0 kb) ve *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunun 8 adet (5.2-22.2 kb) plazmid içerdiği saptandı. Plazmid stabilitesi üzerinde en yüksek etkinliğe sahip sıcaklık *L. lactis* subsp. *lactis* U29 ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşları için 40°C, *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 için ise 35°C olarak belirlendi. Bu bakterilerde plazmid kayıplarının gerçekleştiği inkübasyon sıcaklıklarında en etkin süre 72 saat olarak tanımlandı. 82 adet faj ile yürütülen duyarlılık testleri sonucu; *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşu 12, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşları ise 9 farklı fajı karşı duyarlı bulundu. Bu bakterilerde asit üretim düzeyleri 24 saat sonunda % 0.690-0.885 ve proteolitik aktiviteleri ise 0.0141-0.0200 mg Tyr/L arasında saptandı.

2007, 77 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Lactococcus lactis*, inkübasyon sıcaklığı, süre, plazmid stabilitesi

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF INCUBATION TEMPERATURE AND TIME ON PLASMID STABILITY IN *Lactococcus lactis* STRAINS

Emre UĞUZ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, the effects of different incubation temperature and time on the plasmid stability in *L. lactis* strains were searched. Through the plasmid analyses performed under optimum conditions; it was determined that *L. lactis* subsp. *lactis* U29 harbored 9 plasmids (5.7-23.6 kb), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 harbored 9 plasmids (2.8-24.0 kb) and *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 harbored 8 plasmids (5.2-22.2 kb). The most effective temperature on the plasmid stability was detected as 40°C for *L. lactis* subsp. *lactis* U29 and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 and as 35°C for *L. lactis* subsp. *cremoris* U70. Moreover, 72 hour was identified as the most influential incubation time among the incubation temperatures where plasmid missings were occurred. According to the phage susceptibility tests carried with 82 phages; while *L. lactis* subsp. *lactis* U29 was found to be sensitive against 12 phages, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 and *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 strains were 9 phages. At these strains acid production levels were measured at the end of 24 hour incubation between 0.690-0.885 % and proteolytic activity between 0.0141-0.0200 mg Tyr/L.

2007, 77 pages

Key Words: *Lactococcus lactis*, incubation temperature, time, plasmid stability

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bana olanaklar sunan, beni yönlendiren ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e, beni her konuda destekleyen laboratuvar arkadaşlarım Dr. Yasin TUNCER, Banu ÖZDEN ve Ömer ŞİMŞEK'e, işlerimi hafifleterek bana çalışmam için zaman kazandıran Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Hematoloji Laboratuvarı sorumlusu Sayın Uzm. Dr. Klara DALVA'ya, çalışma arkadaşlarım Tarkan ÇEVİRGEN, Nilüfer GÜVEN, Hale AKFIRAT, Esin SERBEST, Deniz TOPDAĞI, Nimet ATILGAN ve Nuray AĞBAŞ'a, çalışmalarım süresince pek çok zorluğu birlikte aştığım, bana her konuda yardımcı olan hayat yolculuğundaki yoldaşım, eşim Mehtap KULAKSIZ UĞUZ'a, yola devam edemeyeceğimi düşündüğüm bir anda yardımlarıyla beni kolumdan tutarak yeniden çalışmaya yönlendiren kardeşim Ebru UĞUZ'a, desteğini her zaman yanımda hissettiğim kardeşim Elif UĞUZ'a, anlayışlarını ve bilgeliklerini benden esirgemeyen anneme ve anneanneme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Emre UĞUZ

Ankara, Ocak 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 <i>Lactococcus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	3
2.2 Laktokok Plazmidlerinin Genel Özellikleri.....	4
2.2.1 Laktokok plazmidleri tarafından kodlanan endüstriyel özellikler.....	5
2.2.1.1 Proteolitik aktivite.....	5
2.2.1.2 Laktoz fermentasyonu.....	5
2.2.1.3 Faj dirençlilik.....	6
2.2.1.4 Bakteriyosin üretimi ve dirençlilik.....	6
2.2.1.5 Sitrat fermentasyonu.....	7
2.3 Laktokok Plazmidlerinin Stabilitelerini Etkileyen Çevresel Faktörler.....	7
2.3.1 Hücresel faktörler (iç çevresel faktörler).....	7
2.3.2 Dış çevresel faktörler.....	11
2.3.2.1 Laktokoklarda plazmid stabilitesi üzerine ortam sıcaklığının etkisi...	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1 Materyal.....	14
3.1.1 Bakteriler ve fajlar.....	14
3.2 Yöntem.....	14
3.2.1 Çalışılan bakterilerin ve fajların gelişme ortamları.....	14
3.2.2 Laktik asit üretiminin belirlenmesi.....	17
3.2.3 Proteolitik aktivite testi.....	17
3.2.4 Laktokok suşlarının antibakteriyel aktivitelerinin tanımlanması.....	18
3.2.5 Diasetil üretiminin belirlenmesi.....	19

3.2.6 Faj biyodenemeleri.....	19
3.2.6.1 Faj titresinin yükseltilmesi.....	19
3.2.6.2 Bakterilerin faj duyarlılıklarının belirlenmesi.....	20
3.2.7 Stabilite testleri, plazmid izolasyonu ve elektroforez.....	21
3.2.7.1 Sıcaklık stabilite testleri ve plazmid izolasyonu.....	21
3.2.7.2 Elektroforez.....	23
3.2.8 Plazmid büyüklüklerinin belirlenmesi.....	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	26
4.1 Sıcaklık Uygulamalarının <i>Lactococcus lactis</i> Suşlarında Plazmid Stabilitesi Üzerine Etkisi.....	26
4.2 Türkiye Kökenli <i>L. lactis</i> Suşlarının Faj Dirençlilik Düzeyleri.....	49
4.3 Laktokok Suşlarının Endüstriyel Açından Önem Taşıyan Metabolik Özellikleri.....	60
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	78

SİMGELER DİZİNİ

cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
<i>dso</i>	Çift Zincir Replikasyon Orijini
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
g	Gram
HSP	Isı Şok Proteini
Kb	Kilobaz
LAB	Laktik Asit Bakterisi
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
nm	Nanometre
N	Normal
pfu	Plak Oluşturma Birimi
<i>rep</i>	Replikasyon
RCR	Dönen Zincir Replikasyonu
RNA	Ribonükleik Asit
<i>sso</i>	Tek Zincir Orijini
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	Triklor Asetik Asit
Tyr	Tirozin
UV	Ultraviyole
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 15°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29 suşu plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.2 15°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.3 15°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.4 20°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.5 20°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.6 20°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.7 25°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.8 25°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.9 25°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.10 30°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.11 30°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.12 30°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.13 35°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.14 35°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.15 35°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	46

Şekil 4.16 40°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.17 40°C sıcaklık uygulamasının <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>L. lactis</i> suşlarında replikasyon fonksiyonlarını tanımlayan plazmidler.....	10
Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları.....	50
Çizelge 4.2 Laktokok suşlarının diasetil üretme özellikleri.....	63
Çizelge 4.3 Laktokok suşlarının laktik asit üretim düzeyleri.....	64
Çizelge 4.4 Laktokok suşlarının proteolitik aktivite düzeyleri.....	65
Çizelge 4.5 Laktokok suşlarının antibakteriyel aktivite özellikleri.....	66

1. GİRİŞ

Süt endüstrisinde kullanılan starter kültürlerin ana bileşenlerini teşkil eden *Lactococcus* cinsi üyelerinde (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*); konjugal hareketlilik, laktoz fermentasyonu, kazein katabolizması, faj dirençlilik, sitrattan diasetil ve asetoin oluşturma, bakteriyosin üretimi ve dirençlilik, metal iyonlarına dirençlilik, antibiyotiklere dirençlilik ve ekzopolisakkarit üretimi gibi starter kültür performansı üzerinde doğrudan etkili olan metabolik özelliklerinin plazmidler tarafından kodlandığının belirlenmesi, plazmid biyolojisini önemli bir araştırma alanı haline getirmiştir.

Başta 1000'in üzerinde peynir türü olmak üzere; ekşi krema, yağlı süt, kefir ve quark gibi bir çok fermente gıdanın üretiminde kullanılan laktokokkal kültürlerin geleneksel fermentasyon süreçlerindeki temel fonksiyonu, asit oluşturma yetenekleridir. Ancak endüstriyel fermente gıda üretiminin gelişimine paralel olarak; üretim süreçlerinin optimizasyonu ve yüksek kalitede ürün standardizasyonu yanında, ürünün patojen ve gıda bozucu mikroorganizmalardan korunması gereksinimleri doğmuştur. Bu doğrultuda, söz konusu fonksiyonları sağlamaya yardımcı bakteriyosin üretimi, faj dirençlilik, ekzopolisakkarit üretimi ve proteolitik aktivite yetenekleri de starter kültür suşlarında aranan nitelikler haline gelmiştir. Starter kültür suşlarında endüstriyel üretim süreçleri için aranan bir diğer önemli özellik ise, genetik stabiliteLERİDİR. Zira daha önce ifade edildiği gibi, fermente gıdaların yapısal ve aromatik özellikleri üzerinde etkili fonksiyonların büyük çoğunluğu, laktokok starter kültür suşlarında plazmidler tarafından kodlanmaktadır.

Plazmidler; özellikle iç ve dış çevresel koşulların etkisi altında, replikasyon fonksiyonlarının bloke edilmesi sonucu, ardışık döllere geçmesi engellenen genetik yapılarıdır. Fermente süt ürünlerinin üretimi esnasında *L. lactis* suşlarının karşılaştığı en ciddi stres koşulu sıcaklık değişimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle endüstriyel gıda üretiminde kullanılacak starter kültür suşları, yüksek ve kaliteli ürün verimini sağlayan özelliklere sahip olmaları yanında, bu özelliklerini değişik ortam sıcaklıklarında sürdürebilme yeteneği de içermelidirler. Diğer yandan, plazmidleri

giderilmiş laktokok suşlarının oluşturulması; starter kültür suşu geliştirme programları ve genetik analiz çalışmalarının temel hareket noktasını teşkil etmektedir. Bu türev suşların elde edilebilmesi için, çalışılacak bakterilerde öncelikle etkin kimyasal ve fiziksel plazmid giderme ajanlarının tanımlanması gerekmektedir.

Bu bilimsel ve teorik gereksinimler çerçevesinde planlanan çalışmada; farklı sıcaklık düzeylerinde ve sürelerde inkübe edilen *L. lactis* suşlarında plazmid değişimleri araştırılarak, genetik stabilite üzerinde inkübasyon sıcaklığının oluşturduğu etkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Lactococcus* Cinsinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB); spor oluşturmeyen, asit toleran, çubuk ve kok morfolojisinde ve karbonhidratların fermentasyonu sonucu ana son ürün olarak laktik asit üreten özel bir Gram-pozitif bakteri grubudur (Ross *et al.* 2002). LAB grubu içerisinde yer alan *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinsi üyeleri gıda ve yem fermentasyonlarında çok eski bir kullanım geleneğine sahiptir (Carr *et al.* 2002). Bu bakterilerin aktiviteleri sonucu fermentasyon ortamlarında oluşturulan; bakteriyosinler, karbondioksit, hidrojen peroksit ve organik asitler gibi bileşikler, patojen ya da bozulma etkeni organizmaların gelişimlerini engellemek suretiyle ürünün raf ömrü ve güvenilirliğini artırmaktadır (Teuber 1990, Forde and Fitzgerald 2003).

Çok yönlü taksonomik çalışmalar (% G+C oranları, enzimatik analizler, lipit ve lipotaykoik asit kompozisyonu, immünolojik karakteristikler, 16S rDNA analizleri gibi) sonucunda *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinin ortak özellik gösteren türleri *Lactococcus* cinsi altında toplanmıştır. Bu cins; *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. raffinolactis*, *L. lactis* ve *L. plantarum* olmak üzere beş türden oluşmaktadır. Gıda fermentasyonları açısından önem taşıyan tek tür *L. lactis*'dir. *L. lactis*'in iki alt türü (*L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*) ile bir biyovaryetesi (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) starter kültür suşları olarak kullanılmaktadır. Bu türün laktoz fermentasyon yeteneği içermeyen üyesi *L. lactis* subsp. *hordniae* ise, gıda fermentasyonları açısından önem taşımamaktadır (Holt *et al.* 1994, Boumerdassi *et al.* 1997, Carr *et al.* 2002, de Vos and Hugenholtz 2004).

Katalaz negatif, mikroaerofilik ve N grup antijenik yapıda tanımlanan *Lactococcus* cinsi üyeleri, genellikle hemolitik reaksiyon göstermemektedir. Ancak bazı *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında zayıf α -hemoliz belirlenebilmektedir. Bu bakterilerin en iyi geliştiği ortam sıcaklığı 30°C'dir. Ayrıca hiçbir üyesi 10°C'nin altında, 45°C'nin üzerinde, % 6.5 NaCl varlığında ve pH 9.6 ve yukarısında gelişme yeteneği içermemektedir.

İzolasyon kaynakları; çiğ süt, süt ürünleri, bitkiler, steril olmayan dondurulmuş ve kurutulmuş gıdalar yanında, nadiren (*L. piscium* gibi) hayvanlar da olabilmektedir (Caplice and Fitzgerald 1999, Nomura *et al.* 1999, de Vos and Hugenholtz 2004).

Gıda fermentasyonlarında kullanılan *L. lactis* alt türleri ve biyovaryetesinin fenotipik olarak birbirinden ayrılmasında; 40°C inkübasyon sıcaklığında ve % 4 NaCl varlığında gelişebilme, arjinin hidrolizi sonucu amonyak oluşturma ile sitrat ve riboz fermentasyonu özellikleri kullanılmaktadır. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'in ayırıcı özelliği, sitrat fermentasyonu sonucunda tereyağının tipik aroma bileşikleri olan diasetil ve asetoin oluşturmalarıdır. *L. lactis* subsp. *lactis* alt türü ise; 40°C'de, % 4 NaCl içeren ortamlarda gelişebilme yanında, riboz fermentasyonu ve arjininden amonyak oluşturma yeteneği ile *L. lactis* subsp. *cremoris*'den ayrılmaktadır. Bu alt türler ve biyovaryete insan ve hayvan tüketimi açısından güvenilir organizmalar sınıfında tanımlanmaktadır (Boumerdassi *et al.* 1997, Forde and Fitzgerald 2003, Koort 2006).

2.2 Laktokok Plazmidlerinin Genel Özellikleri

Laktokok plazmidleri; tür içi ve türler arası genetik materyal değişimi yetenekleri sayesinde genom elastisitesi sağlamaları nedeni ile, bu cinsin evriminde büyük önem taşımaktadır. Bu suşlar; süt ortamında dominant flora haline geçmelerini sağlayan metabolik özellikleri kodlayan plazmidlerin yanında, kriptik plazmidler de içermektedir (Leenhouts and Venema 1993, del Solar *et al.* 1998). Kriptik plazmidler, özellikle genetik analiz ve gıda düzeyli vektör geliştirme çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Plazmidlerin buldukları bakterilerde stabil yapılar olmamaları, replikasyon fonksiyonlarının analizi ile kopya sayılarının yükseltilmesi ya da kromozoma entegrasyon stratejilerinin geliştirilmesi zorunluluğunu doğurmuştur. Her iki yönde de geliştirilmiş laktokok vektörleri, günümüzde bilimsel ve endüstriyel çalışmalarda kullanılmaktadır (Barriaut and Sylvestre 1999, Perez-Arellano *et al.* 2001). Laktokoklarda, büyüklükleri 1-100 kb arasında değişen ve suş başına sayısı 1-14 olabilen plazmidlerin stabilitesi, yapısal ya da ayrışma özelliklerine bağlı olarak değişim göstermektedir. Genellikle plazmid büyüklüğü arttıkça kopya sayısı düşmekte ve buna

bağlı olarak plazmid stabilitesi azalmaktadır. Laktokokların birçok metabolik özelliğini kodlayan 20 kb'den büyük plazmidler bu genel kural çerçevesinde davranış göstermektedir. Ancak laktoz plazmidleri, büyük plazmidler olmalarına rağmen, yüksek stabilite içerir. Diğer yandan, teta tip replikasyon orjinine sahip laktokok plazmidlerinin, dönen zincir replikasyon orjinine sahip plazmidlere oranla daha yüksek ayrışma stabilitesi gösterdiği belirlenmiştir (Grohmann *et al.* 2003, Teuber *et al.* 2003). Laktokok plazmidleri, % 30-40 arasında G+C içeriğine sahip bulunmuştur. Laktokok genomlarının % G+C oranlarının (% 36-38) içerdikleri plazmidlerden farklı oluşu, plazmidlerin lateral gen transferi yolu ile kazanıldığına işaret etmektedir (Mills *et al.* 2006).

2.2.1 Laktokok plazmidleri tarafından kodlanan endüstriyel özellikler

2.2.1.1 Proteolitik aktivite

Etkin bir süt endüstrisi starter kültürün performansı, kazein ve diğer süt proteinlerini katabolize etme yeteneği ile doğrudan ilişkilidir. *Lactococcus* cinsi üyelerinde süt proteinlerinin proteolitik sistem aracılığı ile küçük peptitlere ve amino asitlere yıkılması; prtP ve prtM genlerinin kodladığı P-I ve P-III tip proteinaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Chopin 1993, Guldfeldt *et al.* 2003). Hücre sitoplazması ve duvarında lokalize olan proteinazların (laktosepinler) gen kodu, aynı suşta plazmid ve kromozomal DNA üzerinde bulunabilmektedir. Bu karmaşık sistemlerin genetik yapısı, bazı suşlarda laktoz plazmidleri ile kombine olmuş durumdadır (Flambard *et al.* 1998, Malone *et al.* 2002, Guldfeldt *et al.* 2003).

2.2.1.2 Laktoz fermentasyonu

Laktokoklarda süt şekeri olan laktoz; genellikle plazmid kodlu fosfo- β -galaktozidaz enziminin kullanımını esas alan ve bakterilerde yaygın olmayan fosfoenol pirüvata bağlı fosfotransferaz sistemi ile birlikte tanımlanan yolla, metabolize edilmektedir (van Rooijen *et al.* 1992). Laktoz fermentasyonu sonucu üretilen laktik asit, ortamın pH'sını hızla düşürerek, patojen ya da bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişimini engeller.

Laktik asit, sütte pıhtı oluşumunun yanında, fermente gıdanın temel yapısal ve aromatik bileşenlerinin gelişimi üzerinde de doğrudan etki etmektedir (Perez *et al.* 2003). Laktokoklarda laktoz metabolizmasını yöneten plazmidlerin genellikle konjugatif özellikte olması; starter kültür suşlarının yatay gen transferi yolu ile arzu edilen yönde değiştirilmesine olanak tanımaktadır (Medina *et al.* 2001, Cock and de Stouvenel 2006).

2.2.1.3 Faj dirençlilik

Laktokoklarda plazmidler tarafından kodlanan en kritik endüstriyel özelliklerden biri de, fajlara karşı geliştirilen dirençlilik mekanizmalarıdır. Bu sayede süt fermentasyonlarının doğası gereği çok yaygın bir şekilde rastlanan faj kontaminasyonları sonucu starter kültürlerin parçalanması ve bu yolla oluşan ürün kayıpları engellenmektedir (Daly *et al.* 1996, Forde *et al.* 1999, Moineau 1999). Laktokoklarda genellikle plazmidler tarafından kodlanan dört farklı faj dirençlilik mekanizması (faj adsorbsiyonunun engellenmesi, faj DNA girişinin engellenmesi, restriksiyon/modifikasyon ve abortif enfeksiyon) tanımlanmıştır. Bu dirençlilik sistemlerine ait plazmidlerin konjugatif yolla aktarımı ile geliştirilmiş laktokok suşları, endüstriyel starter kültür olarak kullanılmaktadır (Akçelik and Tunail 1992, Walker and Klaenhammer 2003, Chopin *et al.* 2005, Mills *et al.* 2006).

2.2.1.4 Bakteriyosin üretimi ve dirençlilik

Bakteriyosinler, ribozomal sentezli inhibitör polipeptitler olarak tanımlanmaktadır. İnhibitör etkileri, bakteriyosidal ya da bakteriyostatik yolla olabilmektedir (Ross *et al.* 2002). Bu polipeptitler, gıda bozulmalarını engelleme ve gıda kökenli patojenlerin gelişimini inhibe etme özellikleri ile büyük önem taşımaktadır. Bugüne kadar, laktokoklarda tanımlanan I. II. ve III. grup bakteriyosinlerin bir çok üyesinin yapısal ve regülatör proteinlerinin gen kodunun plazmidler üzerinde taşındığı belirlenmiştir. Nisin gibi kromozomal DNA kökenli bakteriyosin genlerinin de konjugatif transpozonlar aracılığı ile plazmidlere ya da popülasyondaki diğer suşlara aktarımı, bu özelliğin istenilen yönde düzenlenmesine olanak tanımaktadır (Jack *et al.* 1995, Scannell *et al.* 2002, Chen and Hoover 2003, Beasley and Saris 2004, Lunde *et al.* 2005).

2.2.1.5 Sitrat fermentasyonu

Lactococcus cinsine ait bakteriler içerisinde yalnız *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* sitratın fermentasyonu sonucunda diasetil ve asetoin oluşturma yeteneğine sahiptir. Diasetil; taze peynirler, krema, tereyağı ve yağlı süt ürünleri gibi fermente ürünlerin karakteristik aroma ve tat bileşimidir (Verhue and Tjan 1991). Bugüne kadar genetik analize tabi tutulan tüm *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşlarında, sitrat fermentasyonu yeteneğinin temel enzimi olan sitrat permeaz geninin 8.0 kb büyüklükteki plazmid tarafından kodlandığı saptanmıştır (Swindell *et al.* 1996, Martin *et al.* 2004).

2.3 Laktokok Plazmidlerinin Stabilitesini Etkileyen Çevresel Faktörler

2.3.1 Hücresel faktörler (iç çevresel faktörler)

Laktokok plazmidlerin stabilitesi üzerine etkili iç çevresel (hücresel) faktörler; plazmid replikasyon tipi, kopya sayısı, kodladığı metabolik özellik, fiziksel büyüklüğü ve lokasyonu ile konjugatif yetenek içerip içermemesi olarak tanımlanmaktadır (van Belkum *et al.* 1989, Daly *et al.* 1996, Coakley *et al.* 1997).

Laktokok plazmidleri üzerinde yürütülen çalışmalar sonucu, iki farklı tip replikon tanımlanmıştır. Birinci tip, kromozomal DNA replikasyonu ile aynı mekanizmaya sahip teta replikonlarıdır. İkinci tipte ise, döner zincir replikasyonu (RCR) mekanizmasına sahip plazmidler yer almaktadır. RCR mekanizmasına sahip plazmidlerin hiçbirinde kopya sayılarını ardışık döllere eşit miktarlarda aktarmayı kontrol eden segregasyonel genler tanımlanmamıştır (Kiewiet *et al.* 1993, Daly *et al.* 1996, Meijer *et al.* 1998) (Çizelge 2.1). Bu nedenle laktokokkal RCR plazmidlerinin stabilitesinde ön koşul, replikasyonun hatasız meydana gelmesidir. RCR plazmidleri, replikasyon (*rep*) genleri ve çift zincir replikasyon orijini (*dso*) genleri yanında, optimal aktiviteleri için bir tek zincir orijin (*sso*) bölgesine de gereksinim duymaktadır. *sso* gen bölgelerinde meydana gelen delesyonlar, replikasyon ortamında ssDNA (tek zincir) ara ürünlerinin biriktirilmesine yol açarak, eksiksiz replikasyonun oluşumunu engellemekte ve plazmid

stabilite düzeyi düşmektedir (Kiewiet 1998, Madera *et al.* 2003). Bugüne kadar 14 üyesi tanımlanmış olan teta replikasyon tipine sahip laktokok plazmidleri üzerinde yürütülen çalışmalarda, söz konusu plazmidlerin yüksek düzeyde korunmuş replikonlar olduğu saptanmıştır. Özellikle sınırlı konakçı dizgesi içermeleri, bu plazmidleri ideal gıda düzeyli vektörler haline getirmektedir. Çok sayıda teta tip replikasyon orijini içeren laktokokkal plazmidin, replikasyon orijin bölgelerinde, ters tekrar seriler (iteronlar) korunmuş diziler halinde bulunmaktadır. Bu serilerde meydana gelen delesyon tip mutasyonların, teta plazmidlerin kopya sayısında artışa yol açtığı deneysel olarak belirlenmiştir. Genelde teta tip replikonlar RCR plazmidlere göre daha stabildir (Kiewiet 1998, de Angelis *et al.* 2001, Cotter *et al.* 2003).

Plazmid stabilitesini etkileyen bir diğer yapısal özellik, plazmid kopya sayısı genleridir. Laktokok plazmidlerinin kopya sayısı ile moleküler büyüklükleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda, genellikle fiziksel büyüklük arttıkça kopya sayısının düştüğü belirlenmiştir. Düşük kopya sayısı, bölünme esnasında meydana gelen ayrışma hataları (segregasyonel instabilite) ile birlikte, ardışık döllerde plazmid varlığının sürmesini engellemektedir. Düşük kopya sayısına sahip plazmidlerde ancak kromozomal DNA ile paralel işlev gören bir ayrışma süreci, stabiliteyi sağlayabilmektedir. Yüksek kopya sayılı plazmidlerde ise ayrışma hataları bile plazmid stabilitesini etkilememektedir (Leroy and de Vuyst 2004).

Plazmidlerin kodladığı fonksiyonların hücre için önemi, bu plazmidlerin stabilitesini doğrudan etkilemektedir. Değişik araştırmalarda; yüksek kopya sayısına ya da moleküler büyüklüğe sahip çoğu laktokok plazmidinin, hücre gelişimi için çok önemli olduğu saptanmıştır. Bu plazmidlerde, laktöz metabolizması ve proteolitik aktivite gibi hücre gelişim üzerinde etkili metabolik özelliklerin gen kodu yer almaktadır. Kaybı halinde hücrenin gelişimini önemli ölçüde sınırlayacak olan bu metabolik plazmidler, evrimsel süreçte kromozomal DNA ayrışması ile senkronize edildiklerinden, yüksek stabilite oranı içermektedir (Kobayasi *et al.* 2002, Madera *et al.* 2003, Martin *et al.* 2004). Laktokoklarda nadir olarak rastlanmakla birlikte, epizomal karakterdeki plazmidler yüksek stabiliteye sahiptir. Bu bakterilerde plazmid entegrasyon fonksiyonları, transpozan kökenli ters tekrar serilerden kaynaklanmaktadır (Nga 2005).

Laktokoklarda tanımlanan konjugatif plazmidlerde aktarım oranı, verici hücre başına 10^{-2} gibi yüksek oranlarda meydana gelebilmektedir. Bu bakterilerde konjugatif plazmidlerin; laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite, bakteriyosin üretilmesi, faj dirençlilik ve ekzopolisakkarit üretimi gibi metabolik özellikleri kodladığı bilinmektedir (Coakley *et al.* 1997, Mills *et al.* 2002, Leroy and de Vuyst 2004). Bu plazmidlerin kendi aktarımlarını sağlama yetenekleri, populasyon içerisindeki frekanslarını artırmakta ve stabilitelelerini garanti altına almaktadır. Diğer yandan konjugasyon, gıda düzeyli genetik manüplasyon olarak tanımlandığından, endüstriyel starter kültür geliştirme programlarında yegane aktarım mekanizması haline gelmiştir (Mills *et al.* 2006).

Çizelge 2.1 *L. lactis* suşlarında replikasyon fonksiyonlarını tanımlayan plazmidler
(Kiewiet *et al.* 1993)

Replikon	Büyükük (kb)	Bakteri
RCR* Plazmidleri		
pWV01	2.2	<i>L. cremoris</i> Wg2
pSH71	2.0	<i>L. lactis</i> 712
pD125	5.5	<i>L. lactis</i> 5136
pWC1	2.8	<i>L. lactis</i> T1
Teta Plazmidleri		
pCL305	8.7	<i>L. lactis</i> UC317
pSL2	7.8	<i>L. diacetylactis</i> B2
pSK11	47	<i>L. cremoris</i> SK11
pWV02	3.8	<i>L. cremoris</i> Wg2
pWV04	19	<i>L. cremoris</i> Wg2
pWV05	27	<i>L. cremoris</i> Wg2
pIL7	31	<i>L. lactis</i> IL594
pUCL22	55	<i>L. lactis</i> CNRZ270
pVS40	7.8	<i>L. diacetylactis</i> SSD207
pCI528	46	<i>L. cremoris</i> UC503
pCT1138	8.3	<i>L. diacetylactis</i> K2
pJW563	11.5	<i>L. cremoris</i> W65
pND611	16.2	<i>L. lactis</i> W12
pAG712	15.5	<i>L. lactis</i> C2

*RCR : Dönen zincir replikasyonu

2.3.2 Dış çevresel faktörler

Laktokok suşları için stres koşulu oluşturacak her türlü dış çevresel faktörün plazmid stabilitesini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Özellikle endüstriyel üretim süreçlerinde kullanılan hammadde, ortamın pH'sı, azot ve karbon kaynakları başta olmak üzere; makro ve mikro besinlerin arzı, ozmotik dengeyi değiştiren faktörler (tuz konsantrasyonu, özellikle yarı sert peynir üretiminde bu açıdan kritik öneme sahiptir) ve ortam sıcaklığı, plazmid stabilitesini etkileyen başlıca dış çevresel faktörlerdir (Elliott *et al.* 1991, del Solar *et al.* 1998).

Laktokoklarda bulunan laktoz plazmidi dışındaki plazmidlerin hiçbiri, bu bakterilerde yaşamsal önem taşımamaktadır. Bu nedenle spesifik gelişme hızını sınırlayan ya da durduran çevresel faktörler oluştuğunda, ilave metabolik yükten kurtulmak için plazmid replikasyon fonksiyonları bloke edilmekte ve plazmid kopyalarının ardışık döllere aktarımı engellenmektedir (Kobayasi *et al.* 2002, Cotter *et al.* 2003, Lee 2005). Depolama sıcaklıkları -20°C ve +4°C olarak seçilen laktokok starter kültür suşları ile yürütülen çalışmalarda, 15 gün inkübasyon süresi sonunda plazmid stabilitesinin % 15-40 arasında düştüğü belirlenmiştir. pH stresine 2 saat süreyle maruz bırakılan hücrelerde, alt türe bağlı olarak değişmekle birlikte, bu oran % 7-28 düzeyinde tanımlanmıştır (Lee 2005). Lale ve Akçelik (2004) tarafından yürütülen çalışmada, tuz stresi altında plazmid stabilitesindeki düşmeler % 2-17 değerleri arasında tespit edilmiştir. Tüm laktokok suşlarında azot kaynakları bakımından limitleme, doğal üreme ortamlarında, sıcaklık ile birlikte en fazla karşılaşılan stres faktörlerinden biridir. Besinsel limitlenme koşullarında plazmid kaybı, süreye bağlı olarak, plazmid içermeyen türev suşların oluşumu ile sonuçlanabilmektedir (Dmowski *et al.* 2006, Mills *et al.* 2006).

2.3.2.1 Laktokoklarda plazmid stabilitesi üzerine ortam sıcaklığının etkisi

Starter kültürlerin taşınması ve saklanması, üretilen fermente ürünlerin pazara ulaştırılmasına kadar olan süreçlerin tümünde, bakteriler üzerinde en yüksek etkinliğe sahip stres faktörlerinin başında ortam sıcaklığı gelmektedir (Whitaker and Batt 1991). Starter kültürlerin saklanması ve taşınmasında kullanılan düşük sıcaklık uygulamaları, bakterilerin biyolojik aktivitelerinin yavaşlamasına ve plazmid stabilite fonksiyonlarının kaybına yol açmaktadır. *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 1363 suşunda, 4°C'de 28 gün inkübasyon sonunda canlı bakteri sayısının % 30 oranında düştüğü ve plazmid içeriklerinde belirgin değişimlerin meydana geldiği saptanmıştır (Panoff *et al.* 1994). Aynı suş ile yürütülen bir başka araştırmada, dondurma-çözme döngüsünün hücre canlılığı ve plazmid stabilitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bakteri kültürleri -18°C'de bir ay süreyle dondurulmuş halde saklandıktan sonra, 8°C'de 48 saat ön inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Yapılan canlı bakteri sayımları ve plazmid analizleri; canlı bakteri sayısının % 25, laktoz plazmidi kaybının ise % 17 gibi yüksek oranlarda gerçekleştiğini göstermiştir (Sanders 1988). Laktokok suşlarında dondurma ve 4-20°C'ler arasında düşük sıcaklık uygulamalarına karşı yüksek hücresel dayanıklılık, bu suşların soğuk şokuna karşı güçlü yanıt oluşturacak elastik genetik sistemler içermesinden kaynaklanmaktadır. Soğuk şoku proteinleri kodlayan plazmidlerin bu koşullarda stabilitesi artarken, diğer plazmidlerin eliminasyonu gerçekleşmektedir. Bu bakterilerde *cspA*, *cspB*, *cspC*, *cspD* ve *cspE* olarak adlandırılan beş adet soğuk şokuna dayanıklılığı kontrol eden gen tanımlanmıştır. Değişik *L. lactis* suşlarında -18°C, -4°C, 4°C ve 20°C şok uygulamalarında (2 saat) söz konusu genlerin ifadesinin sırasıyla 60, 40, 15 ve 7 kat arttığı belirlenmiştir. Gen ifade düzeyleri, şok yanıtı oluştuktan sonra stabilite kazanmıştır (Wouters *et al.* 1998, Wouters *et al.* 1999). Özellikle transkripsiyonel regülasyonunun ortam sıcaklığından bağımsız olduğu tanımlanan *cspE* geni ürünü üzerinde yürütülen çalışmalarda; bu genin, protein katlanması fonksiyonlarına sahip bir şaperon olduğu tespit edilmiştir (Wouters *et al.* 1999).

Endüstriyel üretim süreçlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları, bazı koşullarda kaçınılmazdır, bu nedenle de süt fermentasyonlarında starter kültürler için karakteristik bir stres faktörü özelliği taşımaktadır. *L. lactis* kültürlerinin 42°C ortam sıcaklığında

hücrel gelişimi gerçekleştiremediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bu sıcaklıkta tutulan hücrelerin, ortam sıcaklığı tekrar 30°C'ye getirildiğinde üreme hızlarının düştüğü ve ancak 48 saatte optimum gelişme hızına ulaştıkları saptanmıştır. Bu hücrelerin plazmid analizleri; laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite ve bakteriyosin üretimini kontrol eden plazmidlerin stabilitesinin sırasıyla % 7, % 20 ve % 35 oranında düştüğünü göstermiştir (Hartke *et al.* 1997, Duwat *et al.* 1999). *L. lactis* subsp. *lactis* C2 suşu ile yürütülen sıcaklık stresi çalışmalarda, bu bakterinin önce 42°C'de 10 dakika ve ardından 50°C'de 2 saat inkübe edilmesi durumunda yaşamda kalma oranının 1000 kez düştüğü ve tüm plazmidleri kaybeden suş oranının popülasyonda % 12 gibi çok yüksek seviyelere ulaştığı saptanmıştır (Kobayasi *et al.* 2002). Değişik araştırmacılar, genellikle 30°C ile 35°C arasındaki sıcaklıklarda ve uzayan inkübasyon sürelerinde, laktokok plazmid stabilitesinin, diğer artan sıcaklık uygulamalarına oranla daha yüksek olduğuna işaret etmiştir. Bu bulguların hücrel süreçlerde oluşan yanıtlar ile ilgisi üzerine yürütülen çalışmalarda; 30°C ve 35°C inkübasyon sıcaklıklarında stres yanıtını oluşturan proteinlerin, daha yüksek sıcaklık değerlerine oranla, ifade düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır (Balasubmaranyam and Varadaraj 1998, Lee and Moon 2003). Sıcaklık stresi altında farklı *L. lactis* suşlarının incelenmesi sonucu, bu bakterilerin DnaK, DnaJ, GroEL, GroES ve GrpE gibi tipik ısı şok (HSP) proteinlerini ürettiği belirlenmiştir. Bu proteinler şaperon fonksiyonlarına sahip bulunmuştur. Şaperonlar, doğal ya da denatüre proteinlerin katlanması (uzaysal konfigürasyonlarının sağlanması) ve aktif forma sokulmalarından sorumlu enzimatik yapılardır. Söz konusu proteinlerin laktokok suşlarındaki genetik determinantları üzerinde yürütülen çalışmalarda, soğuk şok proteinlerinde olduğu gibi, genellikle kromozomal DNA tarafından kodlandıkları belirlenmiştir. Bazı nadir durumlarda bu proteinlerin regülasyonunun plazmid varlığına bağlı olarak değiştiği de saptanmıştır. Ancak plazmid kökenli bir regülatör gen henüz tespit edilememiştir (Thompson *et al.* 1999, Cotter *et al.* 2003, Labrie *et al.* 2005).

Halen *L. lactis* suşlarında yüksek sıcaklık stresine karşı oluşturulan yanıtın sorumlu bir merkezi regülasyon sisteminin tanımlanamamış oluşu, yüksek sıcaklık direnci kazandırılan endüstriyel suşların kullanımını kısıtlayan ana sorundur. Bu nedenle laktokoklarda yüksek sıcaklık uygulamalarına karşı oluşturulan hücrel yanıtlar üzerindeki çalışmalar, yoğun bir şekilde sürdürülmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriler ve fajlar

Araştırmanın ana biyomateryalini oluşturan 3 *Lactococcus lactis* suşu (*L. lactis* subsp. *lactis* U29, *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 ve *L. lactis* subsp. biovar. *diacetylactis* U52) ile diğer laktokok türleri, 82 adet laktokok fajı ve 23 adet indikatör bakteri, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan temin edildi.

L. lactis suşları M17 broth besiyerinde % 20 oranında steril gliserol ilave edilerek -20°C’de saklanırken, fajlar yine M17 broth besiyerinde % 40 oranında steril gliserol ilave edilerek -20°C’de korundu. Çalışma materyalleri, gliserol ilave edilmemiş M17 broth ortamında, haftalık transferler yapılarak +4°C’de muhafaza edildi.

3.2 Yöntem

3.2.1 Çalışılan bakterilerin ve fajların gelişme ortamları

Bakterilerin geliştirilmesinde; *Lactococcus* suşları için M17, GM17 (laktoz yerine glukoz ilave edilen M17 besiyeri) ve Elliker broth ve agar, *Pediococcus* ve *Lactobacillus* suşları için MRS broth ve agar ve *Enterococcus*, *Listeria*, *Escherichia*, *Salmonella* ve *Staphylococcus* suşları için ise LB broth ve agar besiyeri kullanıldı.

M17 Broth ve Agar

Polipepton	5	g
Fitopepton	5	g
Maya ekstratı	2.5	g
Et ekstratı	5	g
β -disodyum gliserofosfat	19	g
Laktoz (%10)	50	mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (1 M)	1	mL
Askorbik asit	0.5	g
Agar	15	g
Destile su	950	mL

pH 7.15 \pm 0.02 (sterilizasyondan önce)

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

De Man Rogosa and Sharpe (MRS) Broth (Difco Manual, 1984)

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

pH 5.7 \pm 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam içerikleri 1000 mL destile su içerisinde çözüldü ve 118°C’de 15 dakika sıcaklık uygulanarak sterilize edildi.

Luria Bertani (LB) Broth (Difco Manual, 1984)

Tripton	10	g
Maya ekstratı	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.

Elliker Broth (Difco Manual, 1984)

Tripton	20	g
Maya ekstratı	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)

Jelatin, 100 mL destile su içerisinde kaynar su banyosunda eritildikten sonra soğutularak besiyeri ortamına ilave edildi. Ortam 121°C’de 15 dakika tutularak sterilizasyon gerçekleştirildi.

3.2.2 Laktik asit üretiminin belirlenmesi

Bakterilerin laktik asit üretiminin belirlenmesi için 18 saatlik aktif kültürlerden skim milk ortamlarına % 1 oranında inokülasyonlar yapıldı ve bu ortamlar 30°C’de 6 ve 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bu inkübasyon süreleri sonunda pH ölçümleri gerçekleştirildi. 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 (Δ pH) dikkate alındı. Üretilen laktik asit miktarı ise aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Bradley *et al.* 1992).

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

3.2.3 Proteolitik aktivite testi

Laktokok suşlarının proteolitik aktivite düzeyleri, gelişme ortamında meydana gelen tirozin miktarının spektrofotometrik olarak ölçümü ile tespit edildi. Bunun için 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 ve 30°C’de 24 saat süreyle geliştirilen kültürlerden, 2’şer mL hacimdeki örnekler steril erlenlere aktarıldı ve üzerine 1 mL destile su ilave edilerek karıştırıldı. Analiz için hazırlanan bu örneklere 10 mL çözelti A uygulandı ve 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Ardından Whatman No. 40 filtre kağıdı kullanılarak filtrasyon işlemi yapıldı. 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

standartı sonuçlarıyla karşılaştırıldı ve tirozin eşdeğeri olarak verildi. Örneklerin okunmasına şahit olarak 2 mL'lik steril reconstitute skim milk besiyerinden alınan ve yukarıda belirtilen işlemler uygulanarak elde edilen karışım kullanıldı.

A Çözeltisi: 0.72 N triklor asetik asit (TCA)

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

C Çözeltisi: Kullanılmadan hemen önce 1 birim Folin-Ciocalteu (Merck – Germany) çözeltisi, 2 birim destile suyla 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 hacimler 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 3.2.3.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.2.4 Laktokok suşlarının antibakteriyel aktivitelerinin tanımlanması

Laktokok suşlarının antibakteriyel aktivitelerinin tanısında van Belkum *et al.* (1989) tarafından önerilen yöntemden yararlanıldı. Test edilecek laktokok suşları M17 broth ortamında 30°C'de 24 saat geliştirildikten sonra, M17 agar ortamına aktarıldı ve 30°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre sonunda, gelişen kolonilerden steril kürdan aracılığıyla M17 agar ortamına nokta ekimi yapıldı ve 30°C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Denenen laktokok suşları içerisinde antimikrobiyel aktiviteye sahip olanları tespit etmek amacıyla 23 adet indikatör bakteri kullanıldı. MRS broth, LB broth, Elliker broth ve M17 broth ortamlarında geliştirilen indikatör bakteriler % 0.7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar (MRS, LB, Elliker ve M17) ortamlarına inoküle edilerek nokta ekimi yapılan M17 agar ortamı üzerine ikinci tabaka halinde döküldü ve homojen bir şekilde yayıldı. Daha sonra petrilere indikatör bakterilerin

gelişimi için uygun sıcaklıklarda 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda laktokok suşlarının indikatör bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları değerlendirildi.

3.2.5 Diasetil üretiminin belirlenmesi

Araştırmada kullanılan laktokok suşlarının diasetil üretim düzeylerinin belirlenmesi için King (1948) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Buna göre 18 saatlik aktif kültürlerden skim milk ortamına % 1 oranında inokülasyonlar yapıldı ve kültürler 30°C'de 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda her bir örnekten 1'er mL eppendorf tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 0.5 mL % 1'lik α -naftol ve 0.5 mL % 16'luk KOH ilave edilerek 30°C'de 10 dakika süre ile bekletildi. Bu süre sonunda tüpteki sıvı yüzeyinde kırmızı halka oluşumuna göre değerlendirme yapıldı.

3.2.6 Faj biyodenemeleri

3.2.6.1 Faj titresinin yükseltilmesi

Faj duyarlılık testlerinde, titreleri 10^7 plak oluşturma birimi (pfu/mL) ve daha yukarısına 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 1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi steril bir tüp içerisinde karıştırıldı ve adsorbsiyonun tamamlanması için 30°C'de 15 dakika bekletildi. Adsorbsiyonun gerçekleştiği faj-bakteri karışımları üzerine 10 mL steril M17 broth besiyeri aktarıldı ve 30°C'de 18 saat inkübe edildi. Bu süre bitiminde ortamlar 6000 devir/dk. hızda 10 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutuldu ve tüplerde oluşan üst sıvılar steril 0.45 μm por çapında membran filtreden (Sartorius, Germany) geçirilerek faj süspansiyonları elde edildi. Elde edilen faj süspansiyonları ile yukarıda anlatılan işlemler 3 defa daha tekrarlandıktan sonra, duyarlı bakteriler kullanılmak suretiyle faj titreleri saptandı.

Faj titresinin belirlenmesi, çift tabaka agar yöntemine göre yapıldı. 9 mL'lik steril fizyolojik tuzlu su bulunan tüplere aseptik koşullarda steril pipet yardımıyla faj

süspansiyonlarından 1 mL aktararak 10^{-6} düzeyine kadar seyreltiler hazırlandı. M17 broth besiyerinde 3 saat geliştirilen konakçı kültürlerinden M17 yumuşak agar içerisine 0.1 mL ilave edilerek karıştırıldı ve petri plağına homojen bir şekilde yayıldı. Katılma gerçekleşikten sonra, faj süspansiyonlarından ve hazırlanan faj seyreltilerinin her birinden petri plakları üzerinde ayrılan bölümlere 10 µL damlatma yapıldı. 30°C’de 18 saat inkübe edildikten sonra damlatılan bölgelerde lize plakları incelenerek faj titreleri hesaplandı (Terzaghi and Sandine 1975).

Cift tabaka M17 agar ortamlarının hazırlanması: Faj biyodenemelerinde çift tabaka halinde hazırlanan M17 agar besiyeri kullanıldı. M17 alt tabaka agar ortamına ayrı sterilize edilen 1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 10 mL/L ilave edilerek 15-20 mL olacak şekilde petrilere aktarıldı ve 22-25°C’de 18 saat bekletildi. Üst tabaka ortamı, M17 alt tabaka içeriklerinin tümünün katılması ile hazırlandı. % 0.45 oranında agar içeren yumuşak üst tabaka, 3 mL’lik porsiyonlar halinde tüplere dağıtılıp 121°C’de 15 dakika süre ile sterilize edildi (Terzaghi and Sandine 1975).

3.2.6.2 Bakterilerin faj duyarlılıklarının belirlenmesi

Titreleri 10^7 pfu/mL ve yukarısına yükseltilecek faj süspansiyonlarının laktokok suşlarına karşı etkinlikleri çift tabaka agar yöntemine göre belirlendi. 3 saatlik bakteri kültürlerinden yumuşak agar ortamına 0.1 mL aktarılıp karıştırıldıktan sonra, bu ortam alt tabaka M17 agar üzerine döküldü. Yumuşak agarın homojen bir şekilde petri plağı yüzeyine dağıtılması sağlanıp bir süre katılması beklendi. Test edilecek faj süspansiyonlarından 10 µL hacimler petri plaklarında belirlenen bölgelere damlatıldı. Bu ortamlar 30°C’de 18 saat tutuldu ve faj plak oluşumu esasına göre suşlar duyarlı ya da dirençli olarak tanımlandı (Terzaghi and Sandine 1975).

3.2.7 Stabilite testleri, plazmid izolasyonu ve elektroforez

3.2.7.1 Sıcaklık stabilite testleri ve plazmid izolasyonu

GM17 broth besiyerinde 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C inkübasyon sıcaklıklarında 24, 48 ve 72 saat geliştirilen *L. lactis* kültürlerinden, 10 mL'lik GM17 broth besiyerlerine 1'er mL inokülasyonlar yapılarak tüpler 30°C'de 3-3.5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bitiminde santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri 6000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre çökeltisi kurutulduktan sonra, 380 µL sakkaroz tamponunda çözüldü. Bu ortam su banyosunda 37°C'de 5 dakika bekletildi. Üzerine 96.5 µL lizozim ilave edilerek tekrar su banyosunda 37°C'de 5 dakika tutuldu. Lizozim uygulanan hücre çözeltilisine 48.5 µL Tris-EDTA-1 (pH 8.0) ve 28 µL % 20'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) (pH 8.0) ilave edildi. Lizozin tamamlanması için santrifüj tüpleri 37°C su banyosunda 10 dakika tutuldu. Hücre lizozinin gerçekleştiği tüp içerikleri, mekanik karıştırıcıda ve yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA'nın kırılması sağlandı. Ortama taze olarak hazırlanmış 3N NaOH çözeltisinden 28 µL ilave edilerek tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dakika süre ile ve aralıklarla karıştırıldı. Denatürasyon aşamasının sonunda santrifüj tüplerine 50 µL 2M Tris-HCl (pH 7.0) çözeltisi eklenerek 3 dakika süre ile aralıksız, düz bir zeminde karıştırıldı. Bu ortama 4°C'de saklanan 5M NaCl çözeltisinden 72 µL ve %3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 µL ilave edilerek, 4°C'de 12500 devirde 20 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Oluşan üst faz, mikropipet yardımıyla yeni tüplere aktarıldı. Bu ortama deproteinasyonun sağlanması için, 700 µL kloroform/izoamilalkol (24:1) uygulaması yapıldı. 4°C'de 12500 devirde 15 dakika santrifüj işleminden sonra oluşan üst faz yeni tüplere alınarak, üzerine eşdeğer hacimde etil alkol eklendi. Etil alkol ilave edilen tüpler - 20°C'de bir gece bekletildi ve 4°C'de 12500 devirde 20 dakika santrifüj edildi. Sıvı faz dökülerek çökelti kurutuldu. Kuruyan çökelti 20 µL Tris-EDTA-2 (pH 7.5) içerisinde çözüldü ve RNaz A stok çözeltisinden 2 µL ilave edilerek 37°C'de su banyosunda 45 dakika inkübe edildi (Anderson and McKay 1983).

Sakkaroz Cözeltisi

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

Lizozim Cözeltisi

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		

SDS Cözeltisi

Tris	0.6	g
EDTA	0.74	g
SDS	20	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		

Tris-EDTA-2

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

%3 NaCl ile Dozurulmuş Fenol Cözeltisinin Hazırlanışı: 100 g fenol üzerine 20 mL destile su ve 3 g NaCl aktararak 45°C'deki su banyosunda çözüldü. Ortama 0.1 g hidroksiguinolin ilave edilip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında tutuldu.

RNaz A Cözeltisi: 5 mL steril destile su içerisinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat cözeltisinin pH'sı, asetik asit ile 5'e ayarlandı ve üzerine 5 mg RNaz A (Sigma, Chem.Co., USA) ilave edildi. Kaynar su içerisinde ortam 5 dakika tutulduktan sonra -20°C'de saklandı.

3.2.7.2 Elektroforez

Plazmid DNA örneklerinin elektroforezi, % 0.7 agaroz oranı ile hazırlanan jellerde gerçekleştirildi (Meyers *et al.* 1976). Yatay jel sistemleri için agaroz, kullanılan jel plaka sisteminin büyüklüğüne göre 30-35 ya da 150-200 mL tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde, kaynar su banyosunda çözüldü. 45°C'ye kadar soğuması beklenen ortam elektroforez plaklarına döküldü ve jel tarakları yerleştirilerek, 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına jelin üzerini kapatacak biçimde tampon cözeltisi ilave edildi ve jelin zedelenmemesine dikkat edilerek taraklar ortamdaki alındı. RNaz uygulanan DNA örnekleri su banyosundan alınarak, 2 µL marker boya cözeltisiyle karıştırıldı ve mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına 20'şer µL olacak şekilde aktarıldı. Elektroforez işlemi, 100 voltta ve marker boya jel sistemini terk edinceye kadar sürdürüldü. Ardından elektrik akımı kesildi ve ortamdaki alınan jeller, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanan 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren cözeltisinde 15-20 dakika bekletildi. Boyama işleminin sonunda jeller 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışık altında incelendi (Macrina *et al.* 1982). Fotoğrafların

çekiminde Kodak Gel Logic 200 jel dökümasyon sistemi (Eastman Kodak Co., USA) kullanıldı.

Tris-Asetat Tampon

Tris	4.84	g
Sodyum asetat	4.08	g
EDTA (0.5 M)	0.37	g
Destile su	1000	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Marker Boya

Brom fenol blue	0.25	g
Sakkaroz	40	g
Destile su	100	mL

3.2.8 Plazmid büyüklüklerinin belirlenmesi

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

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

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

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

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

Y = Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

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

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

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

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

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

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

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

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

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Sıcaklık Uygulamalarının *Lactococcus lactis* Suşlarında Plazmid Stabilitesi Üzerine Etkisi

Denemede kullanılan doğal *L. lactis* suşları ile optimum gelişme koşullarında (GM17 broth besiyerinde ve 30°C inkübasyon sıcaklığında) yürütülen plazmid analizleri sonucunda, *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunun, büyüklükleri 5.7 ile 23.6 kb arasında değişen 9 adet; *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunun, büyüklükleri 2.8 ile 24.0 kb arasında değişen 9 adet ve *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunun ise büyüklükleri 5.2 ile 22.2 kb arasında değişen 8 adet plazmid içerdiği belirlendi (Şekil 4.10-4.12). Genellikle laktoz fermentasyonu, bakteriyosin üretimi ve dirençlilik, proteolitik aktivite, diasetil ve asetoin üretimi ve faj dirençlilik gibi endüstriyel gıda üretimleri açısından büyük önem taşıyan özelliklerin gen kodunun plazmidler üzerinde taşındığının belirlenmesi, laktokok plazmidlerini hem bilimsel hem de endüstriyel açıdan çok önemli hale getirmiştir. Belirgin bir fenotipi kodlayan plazmidlerin genetik analizi, starter kültür suşu geliştirme çalışmalarının temel hareket noktasını teşkil etmektedir. Zira bu özelliklere ait gen bölgelerinin tanımlanması, genetik aktarım yeteneklerinin araştırılması ve stabilite kriterlerinin (kopya sayısı genleri, plazmid uyumsuzluk grupları ve kromozomal entegrasyon yetenekleri gibi) belirlenmesi, suşların genetik açıdan arzu edilen yönde düzenlenmelerini beraberinde getirmektedir. Diğer yandan, laktokoklarda belirgin bir fenotipi kodlamayan kriptik plazmidlerin tanımlanması da, özellikle genetik analiz ve gen mühendisliği çalışmalarının temel araçları olan vektörlerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Duan *et al.* 1999, Stepanek *et al.* 2005). Yukarıda özetlenen nedenlerle laktokoklarda plazmid içerikleri detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, laktokokların; büyüklükleri 1-100 kb arasında değişen ve sayıları suş başına 1-14 adet olabilen değişik plazmidler içerebildiğine işaret etmektedir (Leenhouts *et al.* 1990, Horng *et al.* 1991, Ross *et al.* 2002, Lee 2005). Bizim çalışmamızda da plazmid sayı ve büyüklükleri bu sınırlar içerisinde tespit edildi. Ancak Türkiye kökenli suşlarda en büyük plazmidin 27 kb civarında olması dikkat çekicidir. Zira genelde laktokok suşlarında bulunan ve en büyük kromozom dışı DNA molekülü olan laktoz plazmidleri, 30 kb'ın üzerinde tespit

edilmiştir (Lundin *et al.* 2005). Bu büyük molekül yapısı laktoz fermentasyonunu kontrol eden operonun büyüklüğünden ve söz konusu plazmidlerin genellikle konjugal transfer genlerini (*tra*) taşımasından kaynaklanmaktadır. Türkiye kökenli laktokok suşlarında laktoz plazmidlerinin tanımlanması ve detaylı analizi, bu farklılığın evrimsel esasının tespiti açısından büyük önem taşımaktadır.

Laktokoklarda hücre içi koşullar dışında, özellikle endüstriyel üretim ve saklama süreçlerinde plazmid stabilitesini etkileyen en önemli parametre ortam sıcaklığıdır (Pillidge *et al.* 2003, Lee 2005). Starter kültürlerin taşınması ve saklanması yanında, üretim ve depolama süreçlerinde de bakteriler değişik sıcaklıklara maruz kalmaktadır. Bu farklı sıcaklık koşullarında plazmid stabilitesinin sürmesi, starter kültür performansı açısından kritik önem taşımaktadır (van Kranenburg and de Vos 1998, Mills *et al.* 2006). Plazmid stabilitesinin en yüksek düzeyde etkilendiği koşullar, bakterilerin gelişebildiği sıcaklık değerleridir. Zira plazmidlerin hücrelerden eliminasyonu, kopya sayılarının düşürülmesi ve replikasyonlarının bloke edilmesi sureti ile gerçekleştirilmektedir (Mills *et al.* 2006). Bu nedenle çalışmamızda; laktokok suşlarının üreyebildiği ve endüstriyel üretim süreçlerinde en fazla karşılaştığı ortam sıcaklık değerlerinin (15-40°C) plazmid stabilitesi üzerindeki etkileri araştırıldı.

Plazmid stabilite testlerinde kullanılan ilk sıcaklık değeri olan 15°C’de, GM17 broth ortamında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda *L. lactis* subsp. *lactis* U29 (Şekil 4.1) ve *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 (Şekil 4.3) suşlarının plazmid içeriklerinde bir değişim meydana gelmedi. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunda ise (Şekil 4.2), kontrol örnek ile bu suşun 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda belirlenen plazmid içeriklerinin tamamen aynı olduğu gözlemlendi. Ancak 72 saat inkübasyona tabi tutulan örneklerde 16.4 kb büyüklükte ilave bir plazmid tespit edildi. Denemelerde beklenen plazmid kaybı yerine ilave bir plazmidin uzayan inkübasyon süreleri sonunda belirlenmesi, bu plazmidin kopya sayısının artırılması ve bu yolla jel sistemlerinde tanımlanabilir hale geçmesinden kaynaklanmaktadır. Kesikli üretimlerde uzayan inkübasyon sürelerinde, suşun üremesi sonucu ortamdaki besin maddelerinin azalması ve metabolitlerin birikimi, başta pH ve toksik atık ürünler olmak üzere, değişik stres koşulları yaratmaktadır. Bakteriler bu stres koşullarına dirençlilik için

değişik yanıt mekanizmaları geliştirmiştir. Adaptif stres yanıtının oluşumu, büyük ölçüde genetik esneklik ile ilişkili olduğundan, bu özelliğin gen kodu genellikle plazmidler üzerinde kodlanmaktadır (Dmowski *et al.* 2006, Mills *et al.* 2006). Bu literatür bilgileri ışığında *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunda 15°C’de 72 saat inkübasyon süresi sonunda doğal suşta belirlenemeyen bir plazmidin saptanması durumu, söz konusu plazmidin stres yanıtından sorumlu olması ile açıklanabilir. Stres koşulu 24 ve 48 saat süreleri sonunda yanıt vermeyi gerektirecek düzeye ulaşmadığından 16.4 kb büyüklükteki plazmid düşük replikasyon etkinliğinde tutulmuş, ancak 72°C’de yaşamda kalabilmek için hızlı bir yanıt gereksinimi ortaya çıktığında replikasyon baskısı kaldırılmış ve kopya sayısı artırılmıştır. Bu şekilde plazmidin fiziksel tespiti mümkün olmuştur. Bu olası mekanizmanın kesinlik kazanabilmesi için, söz konusu plazmidin yanıt oluşturduğu stres koşulunun ve bu koşula bağlı replikasyon fonksiyonlarının belirlenmesi zorunludur.

L. lactis suşlarında inkübasyon sıcaklığının 20°C’ye çıkarılması, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 (Şekil 4.4), *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 (Şekil 4.5) suşlarında; 15°C’den farklı bir plazmid stabilitesine yol açarken, *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunda, 15°C’de olduğu gibi, herhangi bir plazmid değişimine yol açmadı (Şekil 4.6). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunda 24 saat inkübasyon süresi sonunda, paralel çalışmaların birinde 7.7 kb plazmidin kaybolduğu saptandı (Şekil 4.4). Denemelerin bu süre için tekrar edilmesi halinde de aynı durum meydana geldi. Daha sonraki inkübasyon sürelerinde de bu plazmidin sürekli kaybı, 24 saatin söz konusu plazmidin popülasyondan eliminasyonu için kritik bir süre olduğunu işaret etti. İnkübasyon süresi 48 saate çıkarıldığında, 7.7 kb plazmide ilave olarak, 24.0, 18.6, 5.9 ve 4.6 kb plazmidlerin de kaybolduğu saptandı. 20°C’de 72 saat inkübasyon süresi sonunda ise, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunda 48 saat sonunda belirlenen plazmid stabilite düzeyleri ile aynı veriler elde edildi. Bu suşta 15°C’de 72 saat inkübasyon süresi sonunda belirlenen 16.4 kb büyüklükteki plazmid (Şekil 4.2), 20°C’de hiçbir inkübasyon süresi sonunda tanımlanamadı. *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunda 20°C inkübasyon sıcaklığında 24 saat sonunda plazmid içeriklerinde bir değişim meydana gelmedi. Aynı sıcaklıkta 48 saat inkübasyon süresi sonunda 22.2, 18.2 ve 12.0 kb büyüklükteki plazmidler elimine oldu. İnkübasyon süresi 72 saate

çıkarıldığında ise, plazmid içermeyen (tüm plazmidleri giderilmiş) varyantlar meydana geldi (Şekil 4.5).

L. lactis subsp. *lactis* U29 suşunun düşük düzeyde de olsa, plazmid stabilitesini yitirdiği ilk inkübasyon sıcaklığı 25°C olarak tespit edildi. Bu sıcaklıkta 24 ve 48 saatler sonunda plazmid stabilitesi, 15°C ve 20°C inkübasyon sıcaklıklarında olduğu gibi, etkilenmezken; inkübasyon süresi 72 saate çıkarıldığında, 12.3 ve 15.0 kb büyüklükteki plazmidlerin kaybolduğu saptandı (Şekil 4.7). Bu inkübasyon sıcaklığında, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunun 24 saat inkübasyon süresi sonunda belirlenen plazmid profillerindeki tek farklılık, 15°C'de 72 saat inkübasyon süresi sonunda fiziksel olarak tanımlanabilir hale gelen 16.4 kb plazmidin belirlenmesidir (Şekil 4.8). Bu sonuç, 15°C'de 72 saat sonunda oluşan stres koşulunun 25°C'de 24 saatte meydana geldiğine işaret etmektedir. Inkübasyon süresi 48 saate çıkarıldığında 16.4 kb plazmid yanında 24.0 kb plazmid de bu suştan elimine oldu. Bu sıcaklıkta son inkübasyon süresi olan 72 saat sonunda ise, 48 saat sonunda belirlenen plazmid profillerinden farklı olarak, 18.6 kb plazmidin de kaybolduğu saptandı. *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunun 25°C inkübasyon sıcaklığında, inkübasyon sürelerine karşı verdiği yanıtlar incelendiğinde; 24 ve 48 saat sonunda plazmid içeriklerinde hiçbir değişimin meydana gelmediği belirlendi. Ancak inkübasyon süresi 72 saate çıkarıldığında bu suşun içerdiği tüm plazmidler kayboldu (Şekil 4.9).

Laktokoklar için optimum gelişme sıcaklığı olarak tanımlanan 30°C'de suşların plazmid stabilitesi incelendiğinde; *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunun 24 saat inkübasyon süresi sonunda tüm plazmidlerini yüksek kopya sayısında koruduğu tespit edildi. Inkübasyon süresi 48 saate çıkarıldığında bu suşun içerdiği büyük 4 adet plazmidin (23.6, 22.1, 19.6 ve 16.7 kb) stabil kaldığı, ancak kopya sayısının çok düştüğü saptandı. Kopya sayısındaki düşmeler fiziksel tespitte tanımlanan bant zayıflamasıyla karakterize edildi. Diğer plazmidler (15.0, 12.3, 7.7, 7.1 ve 5.7 kb) 48 saat sonunda popülasyondan hazırlanan DNA izolatlarında tanımlanamadı. 30°C'de 72 saat inkübasyon süresi sonunda ise bu suş tüm plazmidlerini kaybetti (Şekil 4.10). Bu sıcaklık değerinde *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşu, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda plazmid stabilitesi bakımından tamamen aynı davranışı gösterdi. Bu süreler

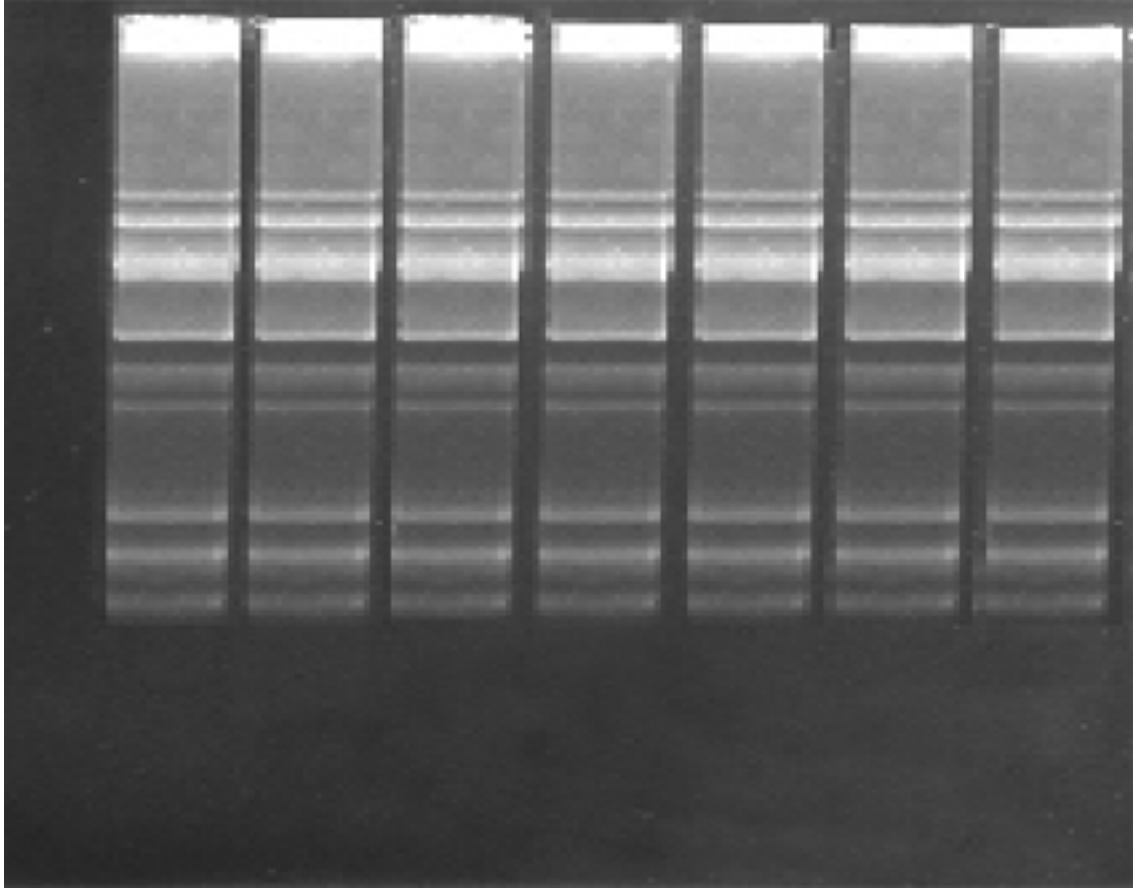
sonunda, 4.6, 5.9, 7.7 ve 18.6 kb büyüklükteki plazmidler elimine oldu. İnkübasyon süresi 72 saate çıkarıldığında bu suşun tüm plazmidleri stabilitesini kaybetti (Şekil 4.11). *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşu 30°C sıcakta 24 ve 48 saat inkübe edildiğinde, plazmid stabilitesini korudu. Tekrarlanan testler de aynı sonuçları verdi. İnkübasyon süresi 72 saate çıkarıldığında ise, hiçbir örnekte plazmid içeriğine rastlanmadı (Şekil 4.12).

35°C inkübasyon sıcaklığında 24 saat tutulan *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suş kültürlerinin plazmid içeriğinde herhangi bir değişim meydana gelmedi. Ancak inkübasyon süresi 48 ve 72 saatlere çıkarıldığında bu suş tüm plazmidlerini kaybetti (Şekil 4.13). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunda 24 saat inkübasyon süresi sonunda 5.9 ve 7.7 kb büyüklükteki iki plazmid kayboldu. 48 saat sonunda bu suşta yalnız 18.6 ve 4.6 kb büyüklükteki plazmidler tanımlandı. Diğer plazmidler ise elimine oldu. Son inkübasyon süresi olan 72 saatte ise, plazmid içermeyen türev meydana geldi (Şekil 4.14). *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunda 24 saat sonunda sadece 6.7 kb büyüklükteki plazmid kaybı belirlendi. 48 saat sonunda bu plazmide ek olarak 5.2, 6.0 ve 9.5 kb plazmidler de suştan elimine oldu. İnkübasyon süresi 72 saate uzatıldığında diğer plazmidler de stabilitesini kaybetti ve plazmid içermeyen türev suş tanımlandı (Şekil 4.15).

Araştırmada kullanılan son sıcaklık değeri olan 40°C’de *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşu gelişmediği için plazmid stabilitesine ait sonuç alınamadı. 40°C inkübasyon sıcaklığında U70’in gelişmemesi tipik bir *L. lactis* subsp. *cremoris* suşu olduğuna işaret etmektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunda bu sıcaklıkta ve 24 saat sonunda plazmid içeriğinde bir değişim meydana gelmedi. Ancak 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda söz konusu suş tüm plazmidlerini kaybetti (Şekil 4.16). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52’de ise, 24 saat inkübasyon süresi sonunda 5.9 ve 7.7 kb büyüklükteki plazmidlerin kaybolduğu saptandı. İnkübasyon süresi 48 ve 72 saatlere çıkarıldığında, U29 suşunda olduğu gibi, plazmid içermeyen türev suş tanımlandı (Şekil 4.17).

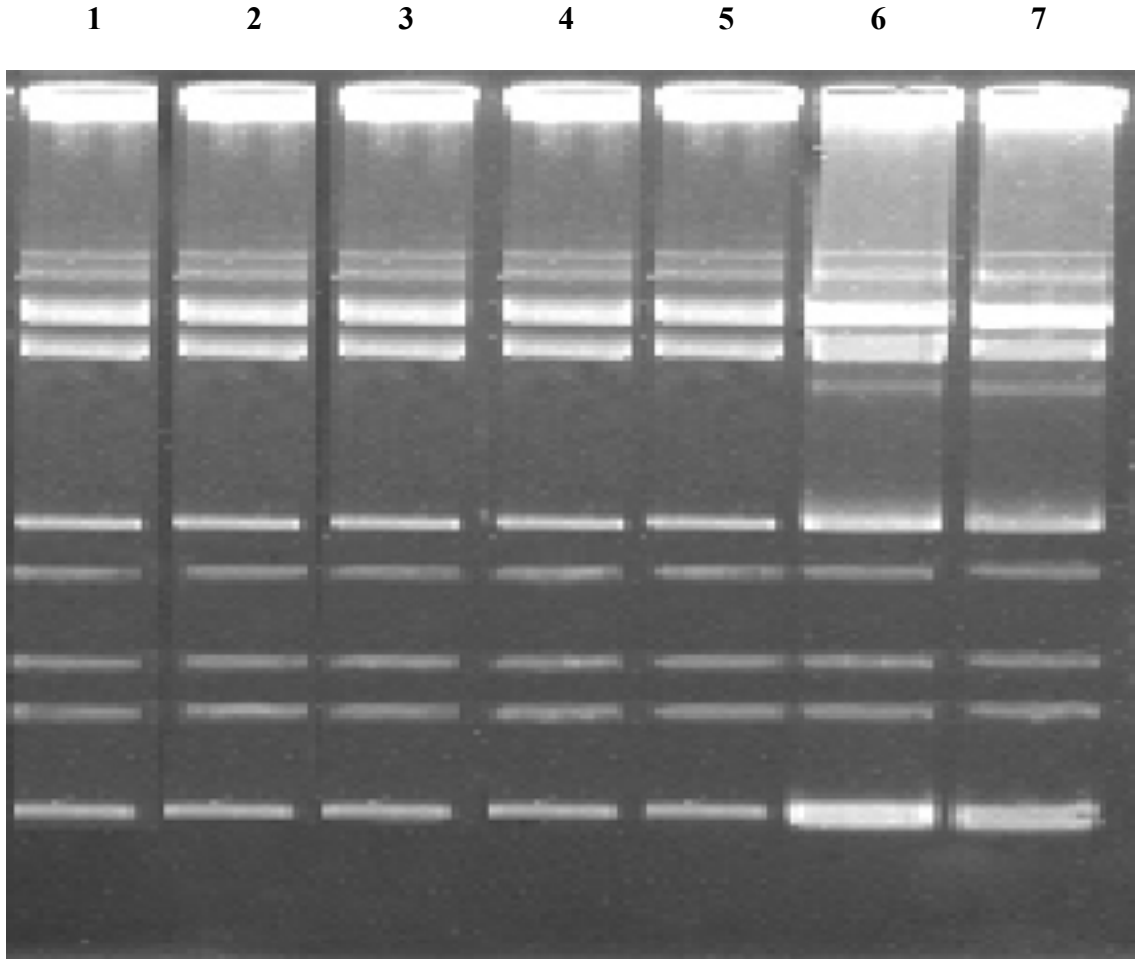
Sıcaklık uygulamalarına karşı plazmid stabilitesi açısından en yüksek düzeyde direnç gösteren suş *L. lactis* subsp. *lactis* U29 olurken, en düşük plazmid stabilitesi (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 ile benzer davranış göstermesine rağmen) *L. lactis* subsp. *cremoris* U70'de belirlendi. Tüm suşların plazmid stabilitesinin en fazla etkilendiği inkübasyon süresi ise, 72 saat olarak saptandı. Bu sonuçlar literatür verileri ile büyük ölçüde benzerlik içermektedir (de Vos *et al.* 1997, Zechner 2000, Grohmann *et al.* 2003, Shareck *et al.* 2004). Ancak Türkiye kökenli suşlarda 15°C, 20°C ve 25°C'de yüksek düzeyde stabilite özelliğinin saptanması, literatür verileri ile zıtlık taşımaktadır. Zira bu güne kadar yürütülen benzer çalışmalarda özellikle 15°C ve 20°C inkübasyon sıcaklıklarında çok kısa inkübasyon sürelerinde bile oldukça yüksek plazmid kayıpları tespit edilmiştir (Martin *et al.* 2004, Simones-Barbosa *et al.* 2004, Haga *et al.* 2006). Türkiye kökenli laktokok suşlarının bir diğer ilginç özelliği de, bu bakteriler için optimum gelişme sıcaklığı olan 30°C'de plazmid stabilitesinin 72 saat inkübasyon süresinde büyük ölçüde kaybolmasıdır. Bu yüksek değişkenlik, söz konusu suşların stres koşullarına düşük düzeyde yanıt oluşturabildiğinin kanıtıdır. Türkiye kökenli suşlarda; endüstriyel üretim süreçleri gibi, yüksek yarışma koşullarının bulunduğu ortamlara adaptasyon henüz gerçekleşmediğinden, stres yanıtının yavaş geliştirilmesi doğaldır. Stres koşullarının letalite altı değerlerinde, suşlarda dirençlilik teşviki yapılarak starter kültür programlarında kullanılacak bakterilerde bu sorun aşılabilir. 35°C ve 40°C'de Türkiye kökenli suşlarda çok yüksek oranda plazmid kaybı meydana geldi. Literatür verilerinde de bu inkübasyon sıcaklıklarında laktokok plazmidlerinin kaybının yüksek olduğu saptanmış ve nedeni sıcaklığa duyarlı plazmid replikasyon karakteristikleri ile açıklanmıştır (Shareck *et al.* 2004, Haga *et al.* 2006). Türkiye kökenli doğal suşlar ve bunların değişik plazmidleri kaybetmiş mutantları, genetik ve biyokimyasal çalışmalar sonucu plazmid stabilitesi ile replikasyon fonksiyonları arasındaki ilişkinin tanımlanması açısından çok önemli bir kaynak teşkil etmektedir. Diğer yandan, bu mutantlarda yürütülecek plazmid tamamlama testleri sonucu; laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite, faj dirençlilik, stres koşullarına dirençlilik ve sitrat fermentasyonu gibi özelliklerin genetik determinantları kolaylıkla tanımlanabilir.

1 2 3 4 5 6 7



Şekil 4.1 15°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşu plazmid stabilitesi üzerine etkisi

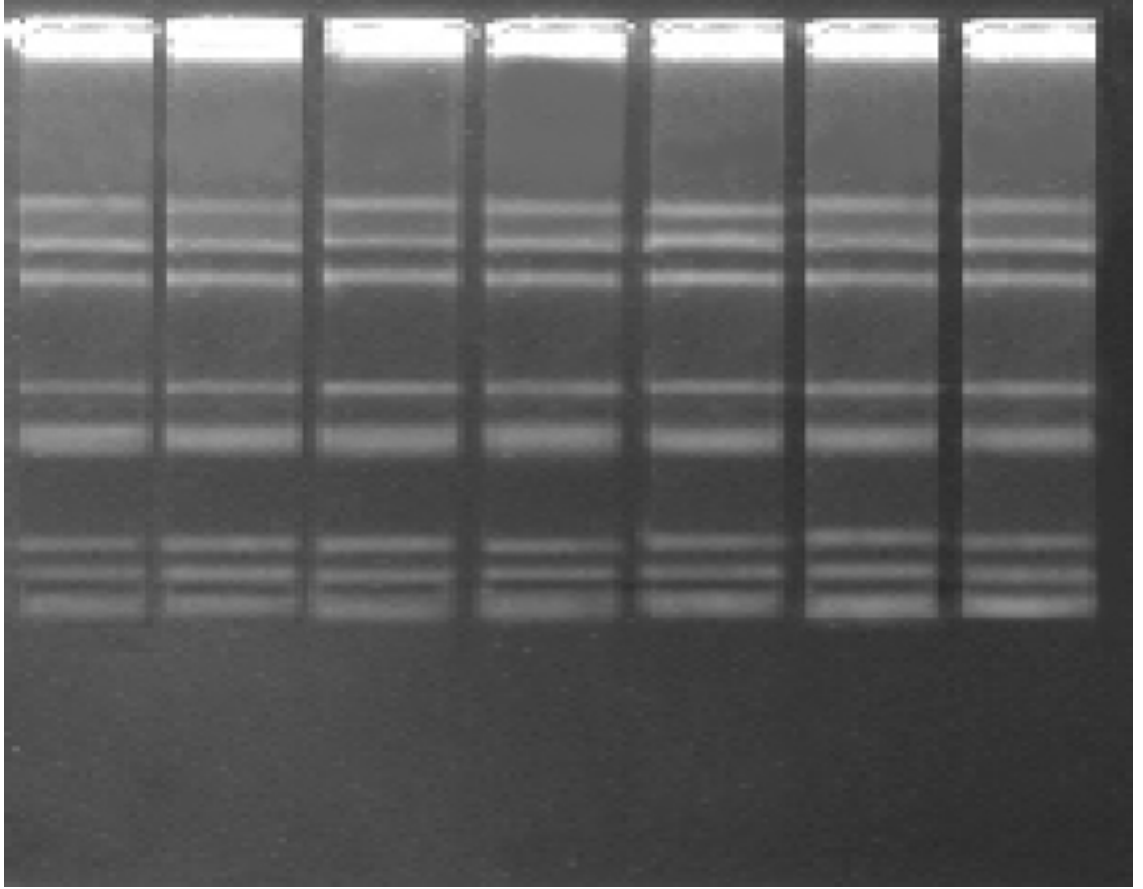
1	<i>L. lactis</i> U29 (Kontrol) (kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
2	24 saat 1. paralel (kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
3	24 saat 2. paralel (kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
4	48 saat 1. paralel (kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
5	48 saat 2. paralel (kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
6	72 saat 1. paralel (kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
7	72 saat 2. paralel (kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7



Şekil 4.2 15°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	<i>L. lactis</i> U52 (Kontrol)	(kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
2	24 saat 1. paralel	(kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
3	24 saat 2. paralel	(kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
4	48 saat 1. paralel	(kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
5	48 saat 2. paralel	(kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
6	72 saat 1. paralel	(kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 16.4, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
7	72 saat 2. paralel	(kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 16.4, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8

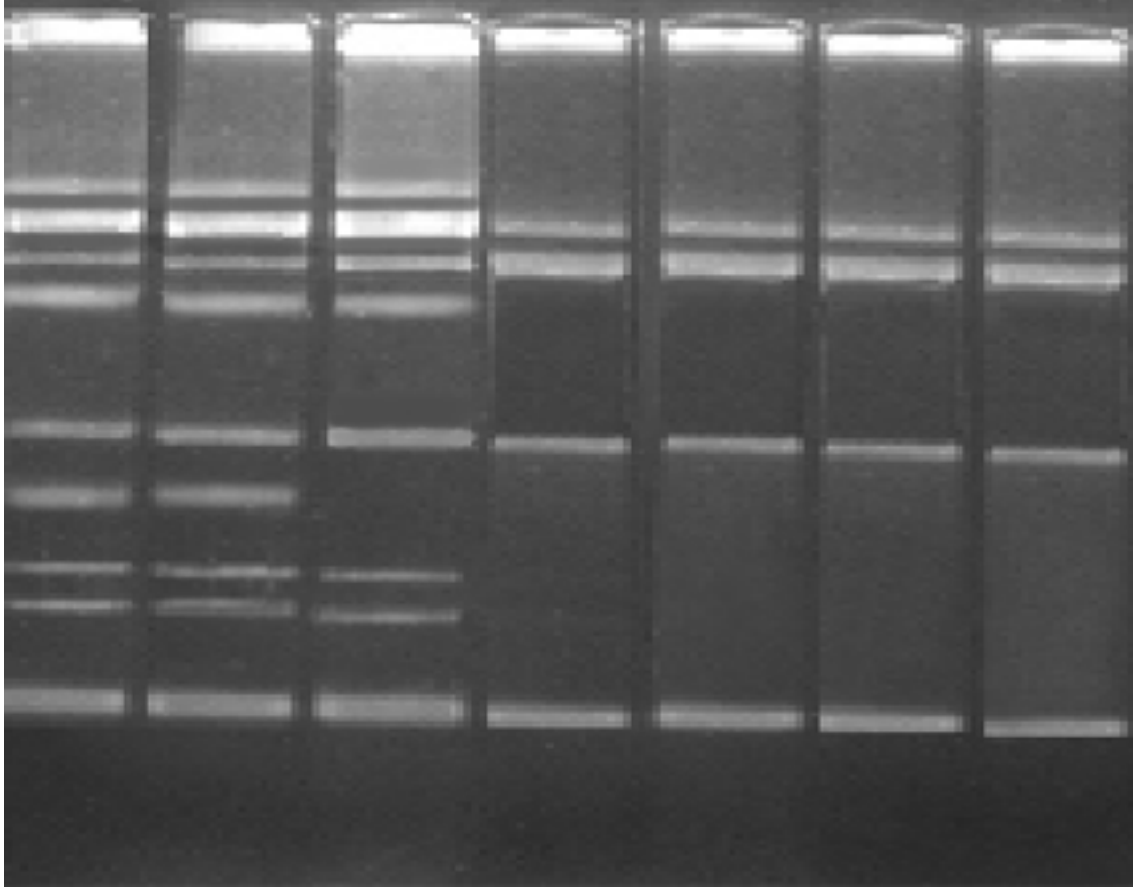
1 2 3 4 5 6 7



Şekil 4.3 15°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

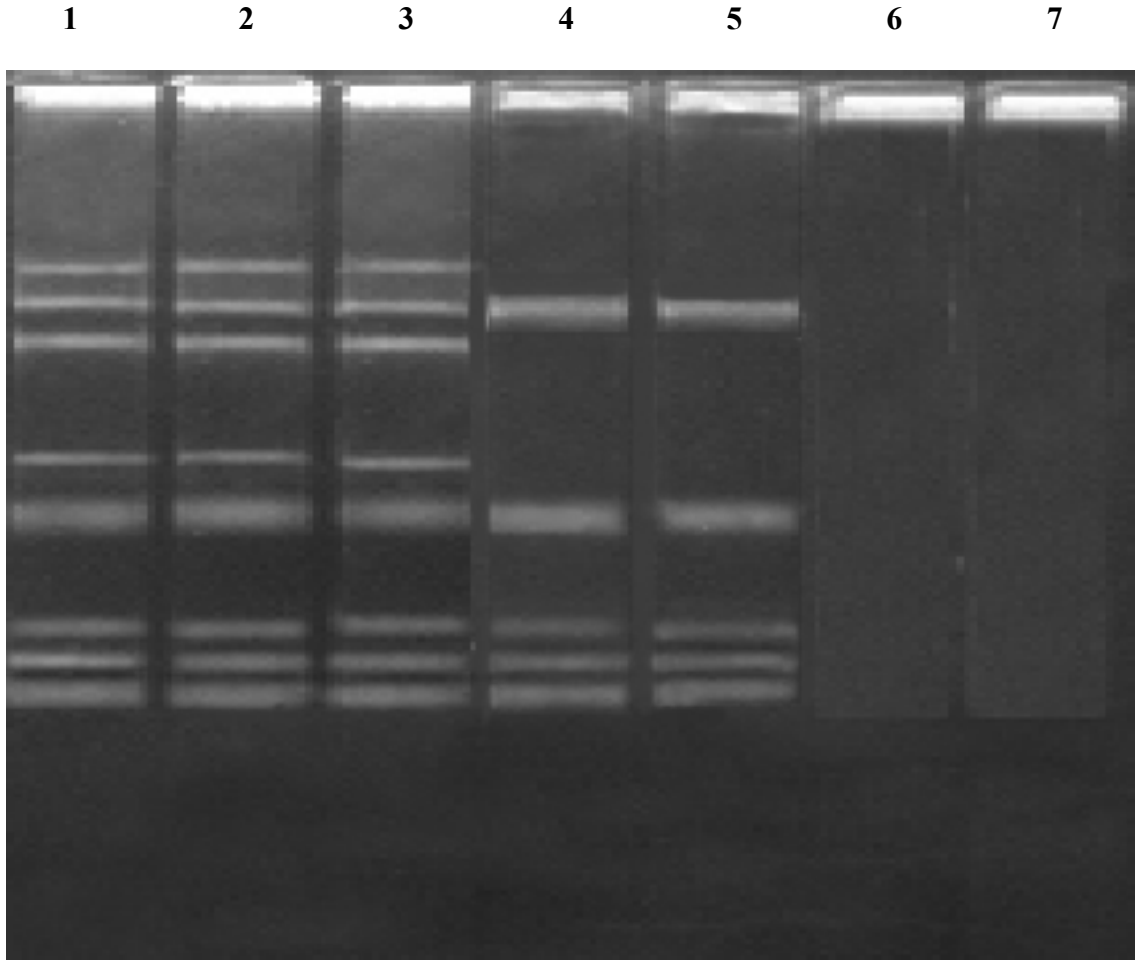
1	<i>L. cremoris</i> U70 (Kontrol)	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
2	24 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
3	24 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
4	48 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
5	48 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
6	72 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
7	72 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2

1 2 3 4 5 6 7



Şekil 4.4 20°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

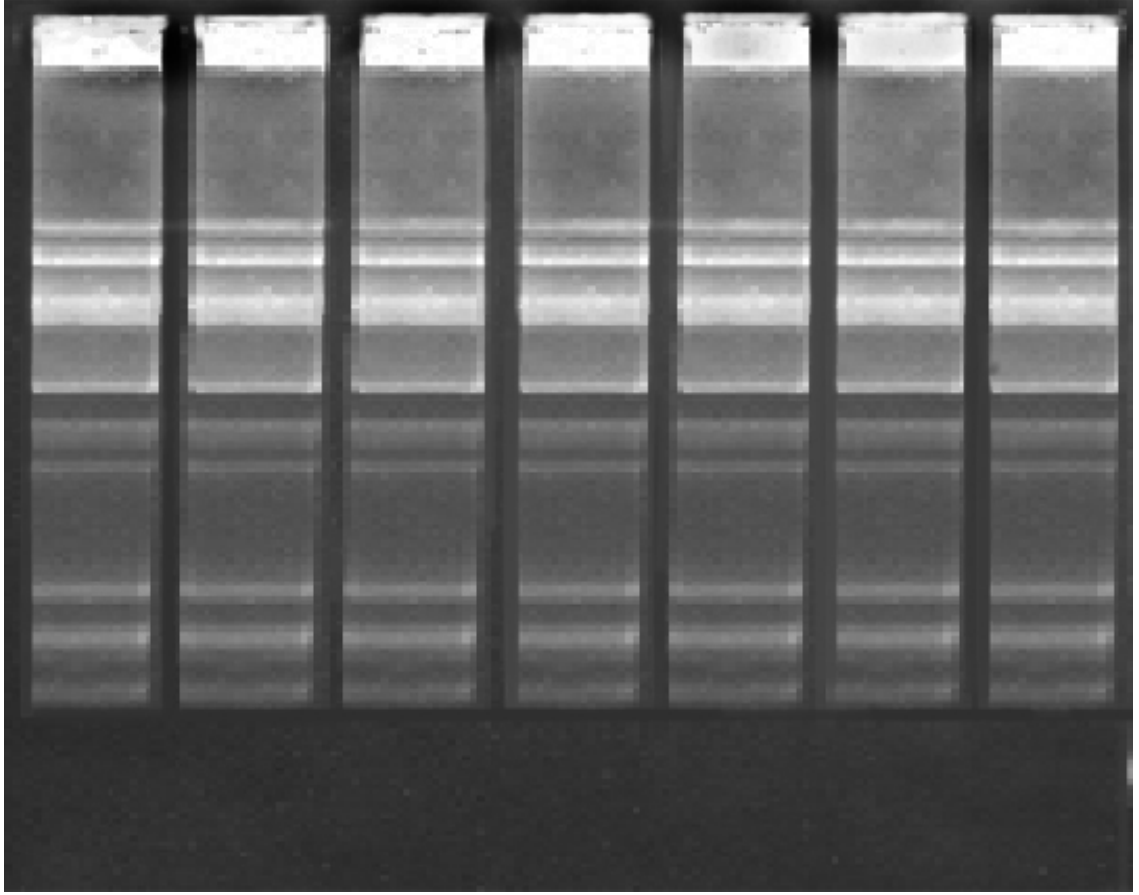
1	<i>L. diacetylactis</i> U52 (Kontrol) (kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
2	24 saat 1. paralel (kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
3	24 saat 2. paralel (kb):	24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 5.9, 4.6, 2.8
4	48 saat 1. paralel (kb):	22.7, 20.5, 8.7, 2.8
5	48 saat 2. paralel (kb):	22.7, 20.5, 8.7, 2.8
6	72 saat 1. paralel (kb):	22.7, 20.5, 8.7, 2.8
7	72 saat 2. paralel (kb):	22.7, 20.5, 8.7, 2.8



Şekil 4.5 20°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	<i>L. cremoris</i> U70 (Kontrol)	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
2	24 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
3	24 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
4	48 saat 1. paralel	(kb): 20.2, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
5	48 saat 2. paralel	(kb): 20.2, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
6	72 saat 1. paralel	(kb): —
7	72 saat 2. paralel	(kb): —

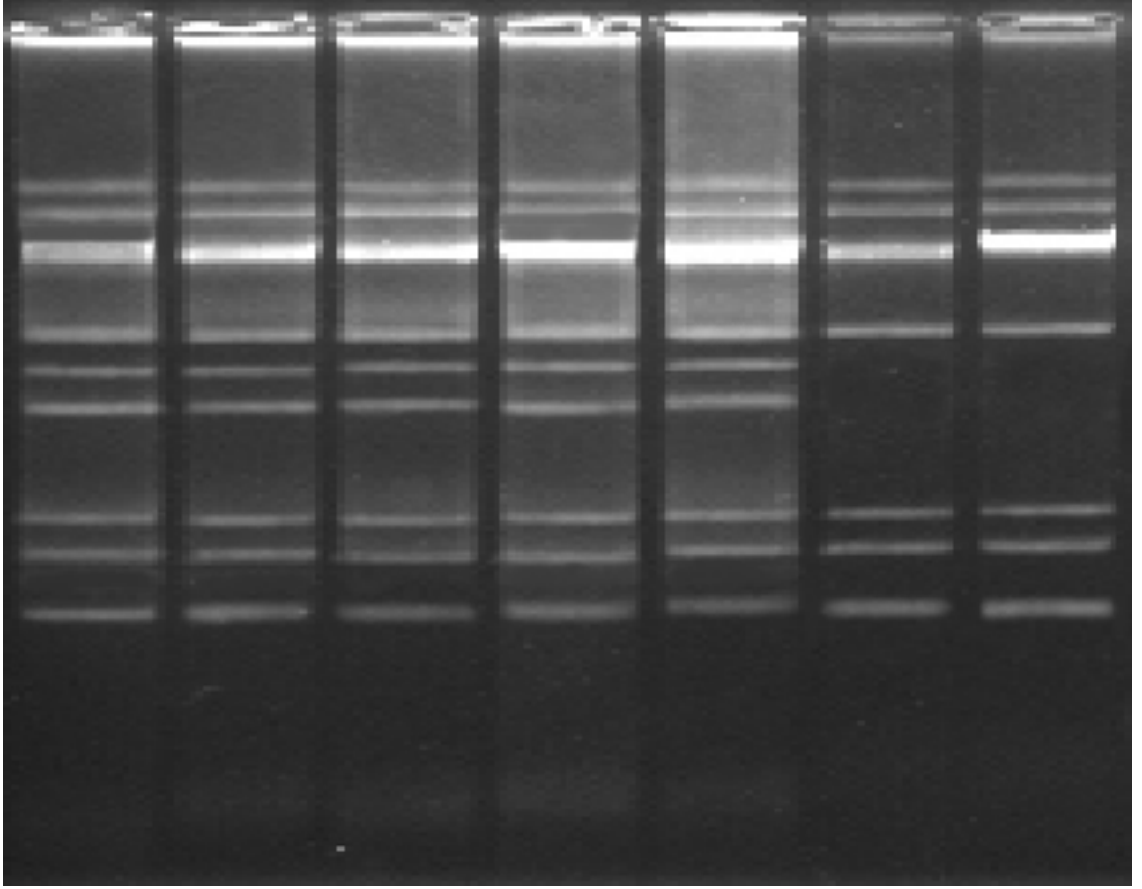
1 2 3 4 5 6 7



Şekil 4.6 20°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

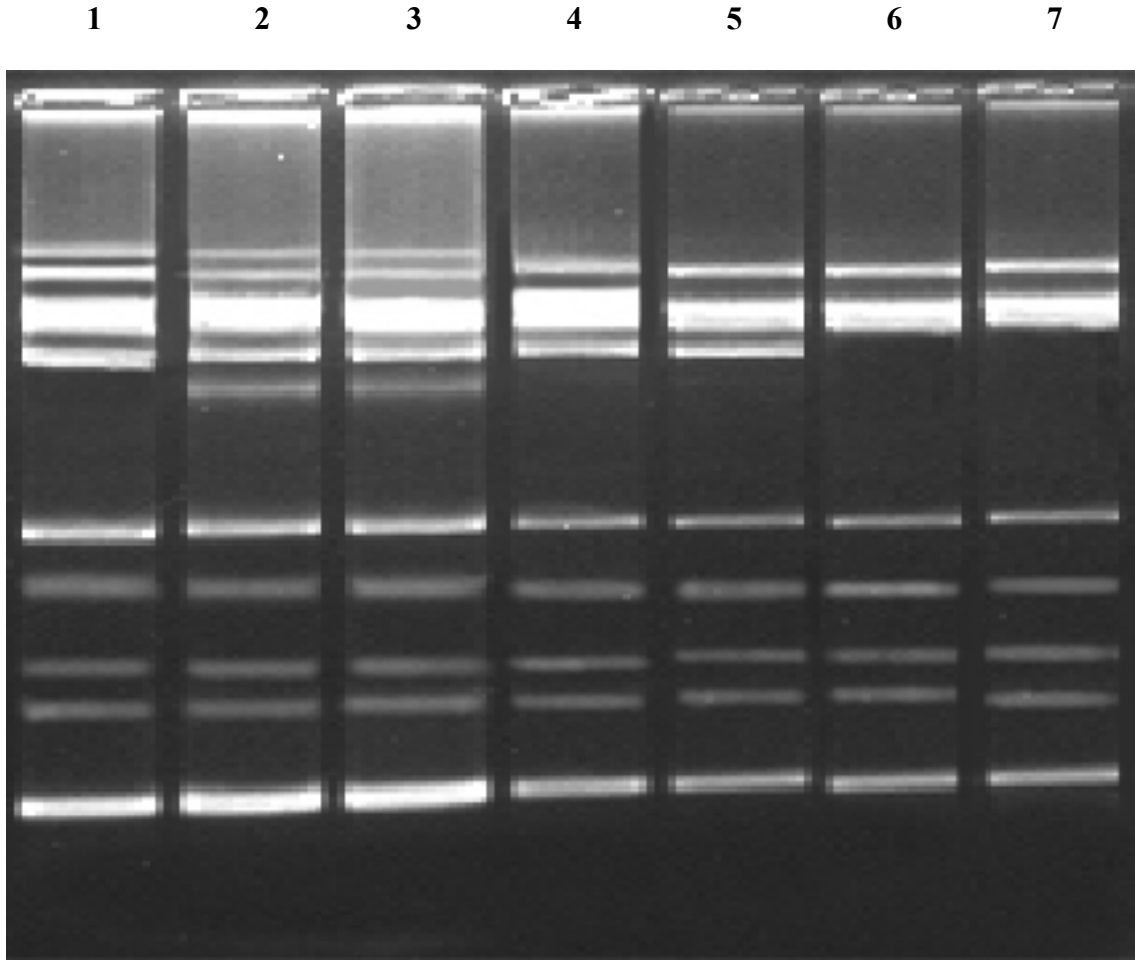
1	<i>L. lactis</i> U29(Kontrol)	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
2	24 saat 1. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
4	24 saat 2. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
4	48 saat 1. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
5	48 saat 2. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
6	72 saat 1. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
7	72 saat 2. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7

1 2 3 4 5 6 7



Şekil 4.7 25°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

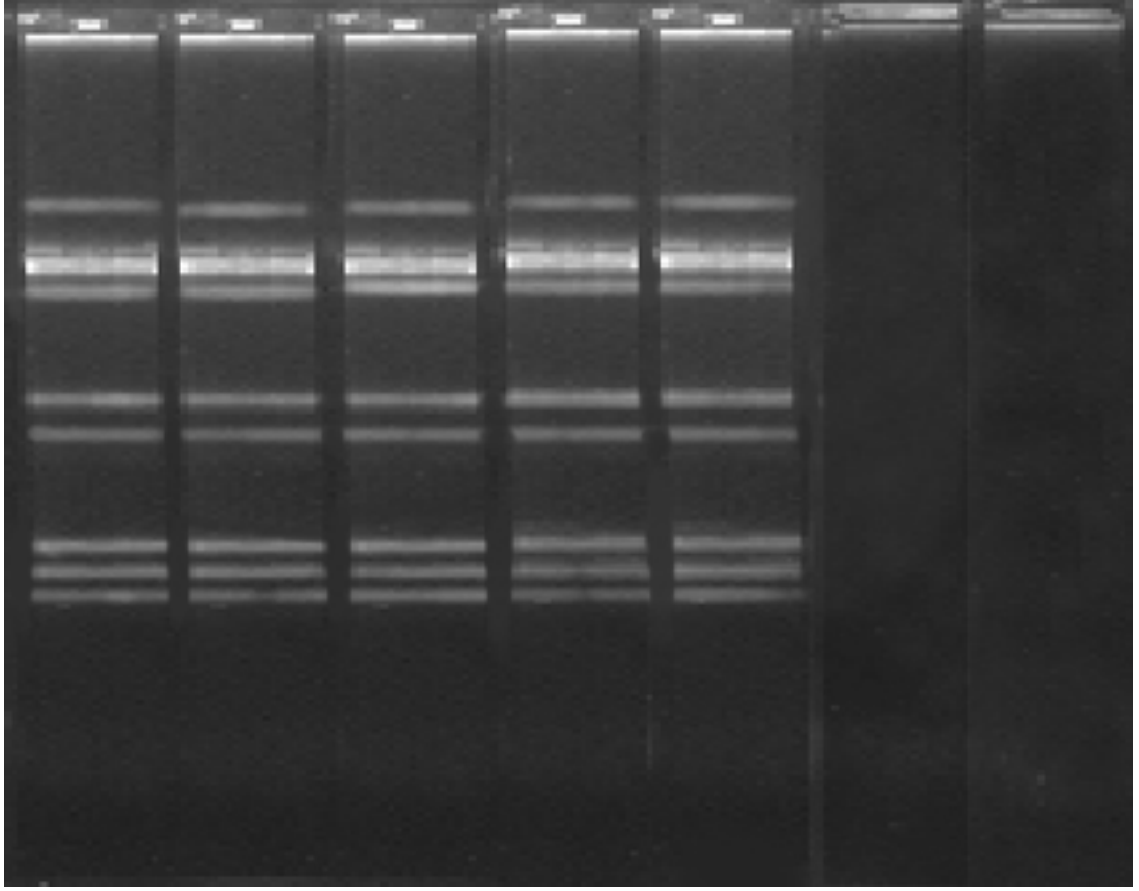
1	<i>L. lactis</i> U29 (Kontrol)	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
2	24 saat 1. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
3	24 saat 2. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
4	48 saat 1. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
5	48 saat 2. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
6	72 saat 1. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 7.7, 7.1, 5.7
7	72 saat 2. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 7.7, 7.1, 5.7



Şekil 4.8 25°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

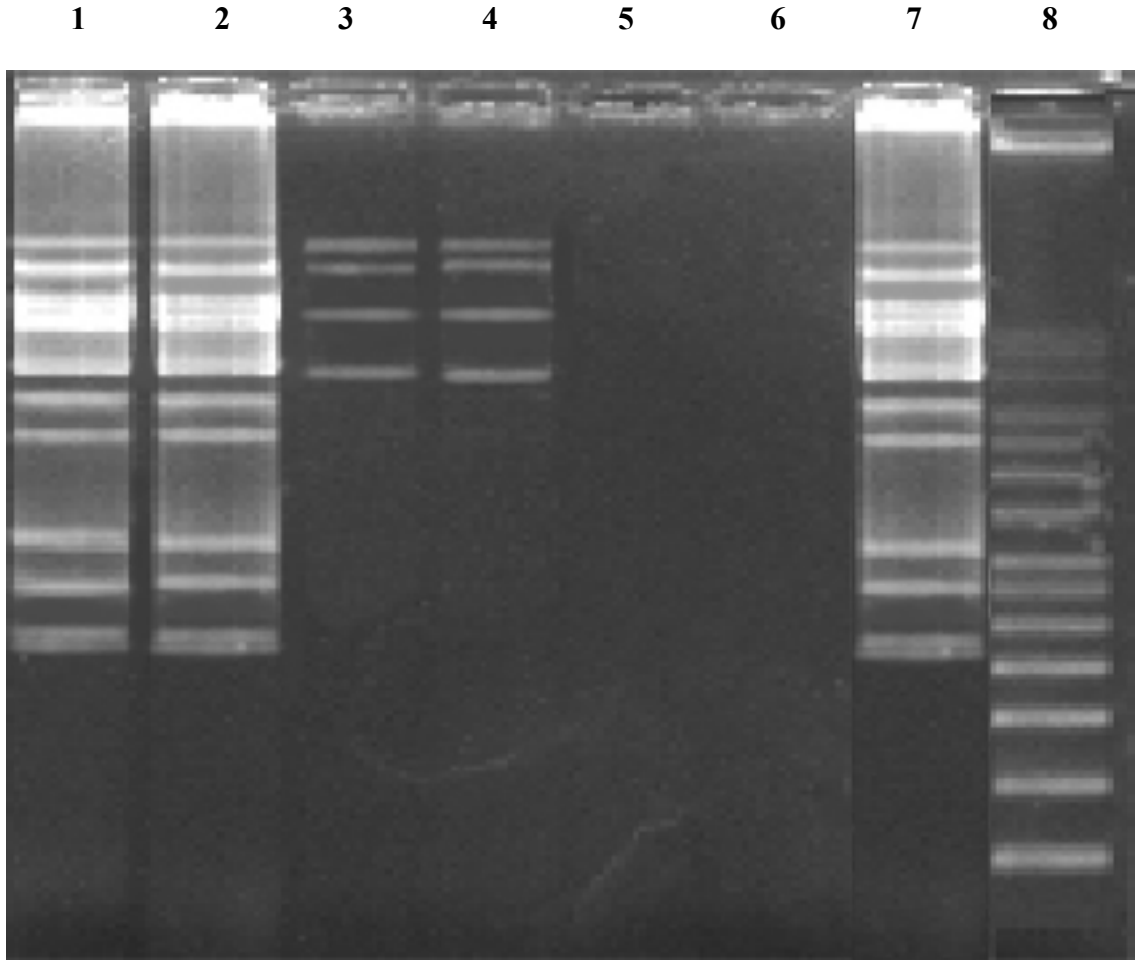
1	<i>L. diacetylactis</i> U52 (Kontrol)	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
2	24 saat 1. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 16.4, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
3	24 saat 2. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 16.4, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
4	48 saat 1. paralel	(kb): 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
5	48 saat 2. paralel	(kb): 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
6	72 saat 1. paralel	(kb): 22.7, 20.5, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
7	72 saat 2. paralel	(kb): 22.7, 20.5, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8

1 2 3 4 5 6 7



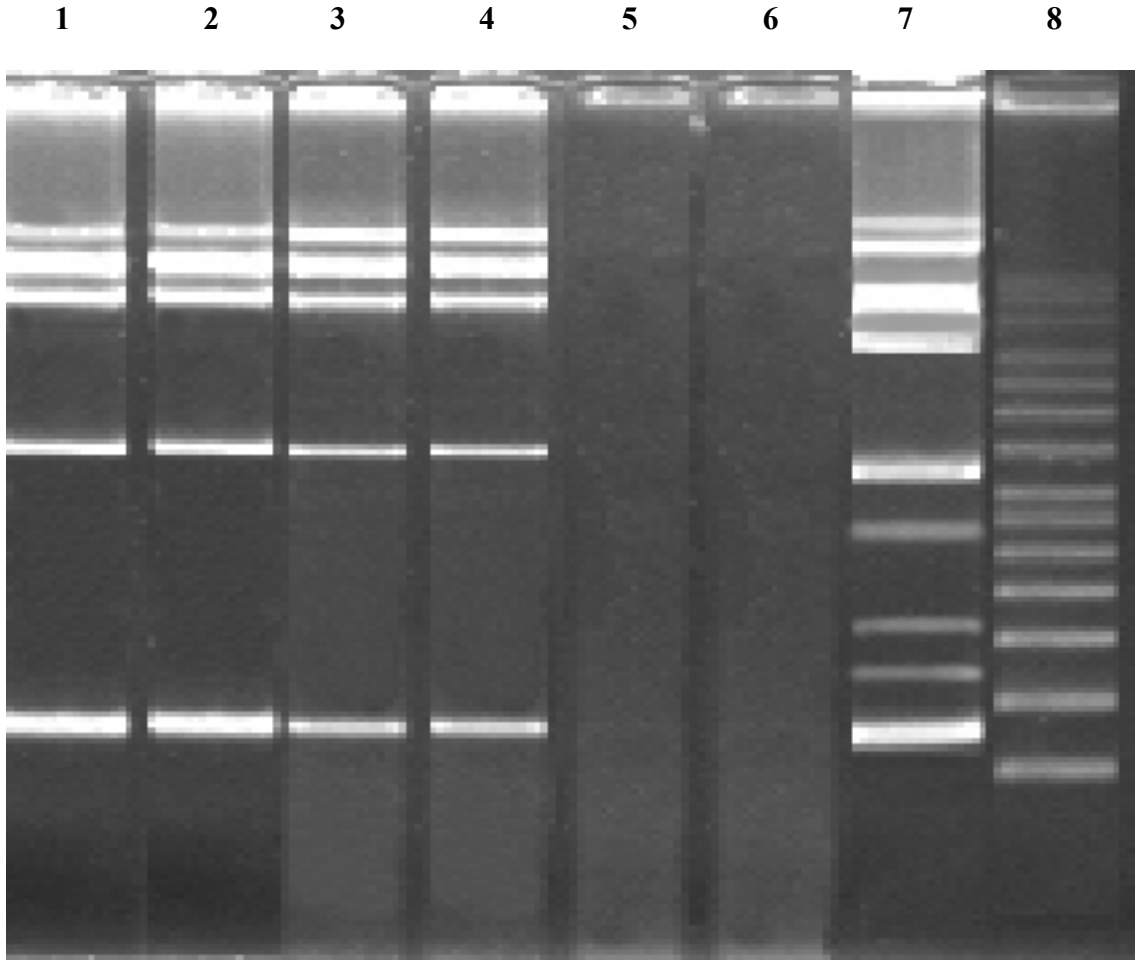
Şekil 4.9 25°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	<i>L. cremoris</i> U70 (Kontrol)	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
2	24 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
3	24 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
4	48 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
5	48 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
6	72 saat 1. paralel	(kb): —
7	72 saat 2. paralel	(kb): —



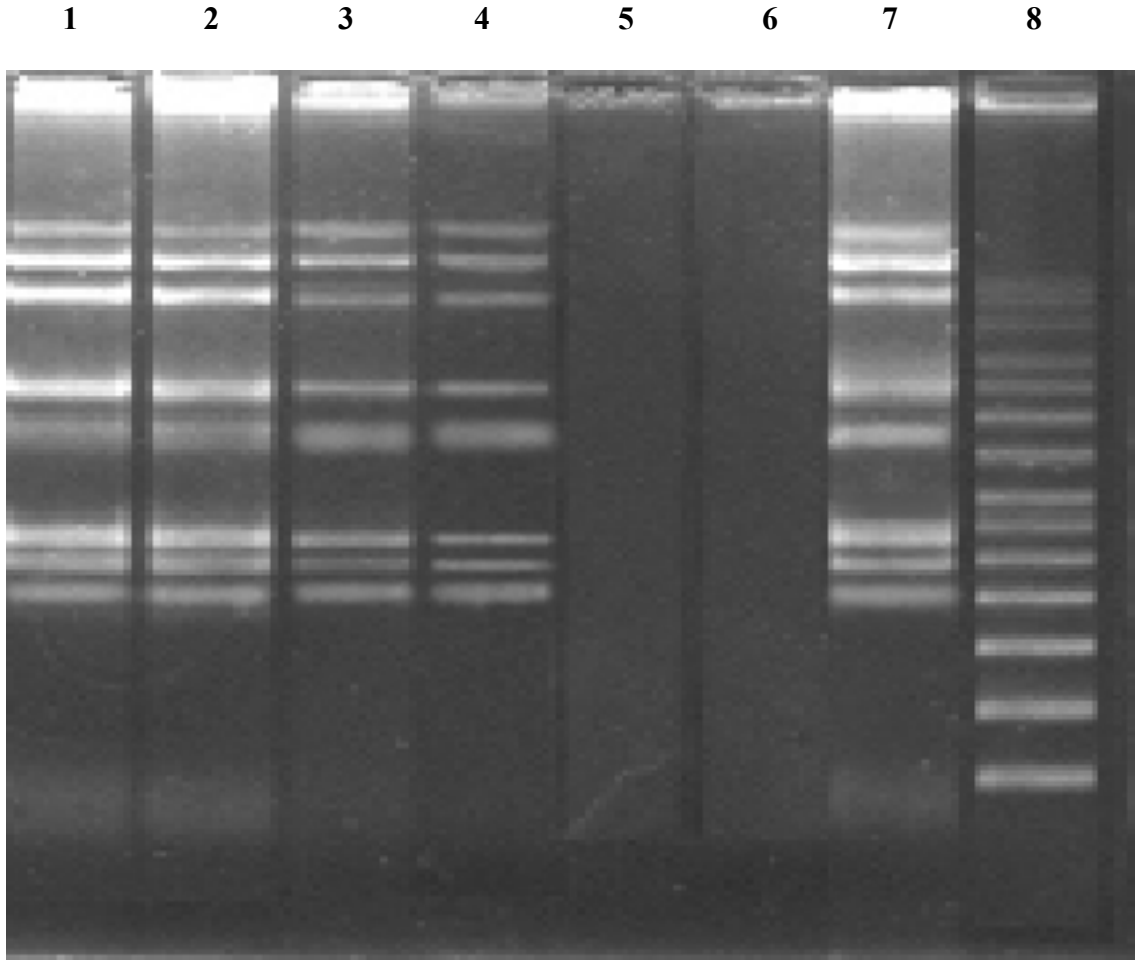
Şekil 4.10 30°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	24 saat 1. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
2	24 saat 2. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
3	48 saat 1. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7
4	48 saat 2. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7
5	72 saat 1. paralel	(kb): —
6	72 saat 2. paralel	(kb): —
7	<i>L. lactis</i> U29 (Kontrol)	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
8	Marker	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.1, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 2.9, 2.1



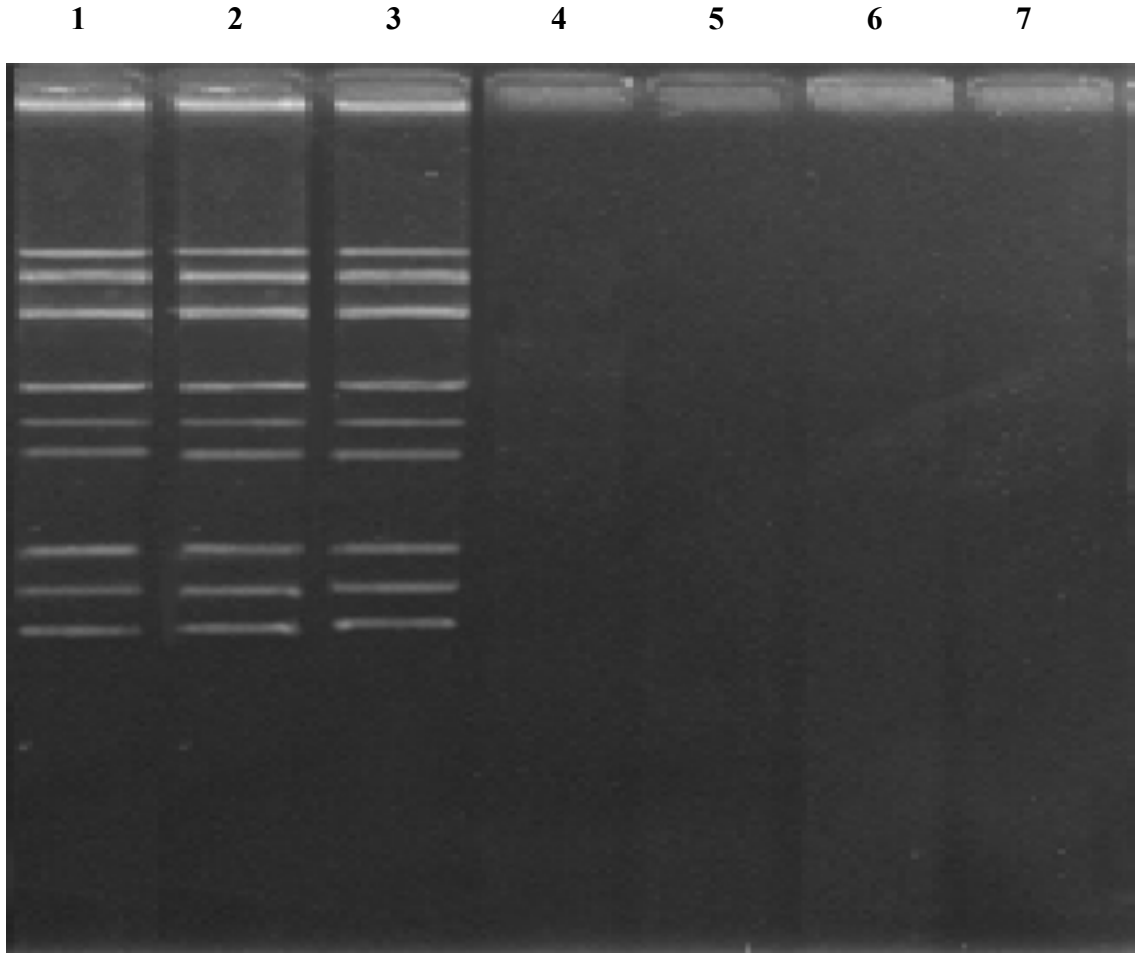
Şekil 4.11 30°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	24 saat 1. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 8.7, 2.8
2	24 saat 2. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 8.7, 2.8
3	48 saat 1. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 8.7, 2.8
4	48 saat 2. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 8.7, 2.8
5	72 saat 1. paralel	(kb): —
6	72 saat 2. paralel	(kb): —
7	<i>L. diacetylactis</i> U52 (Kontrol)	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
8	Marker	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.1, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 2.9, 2.1



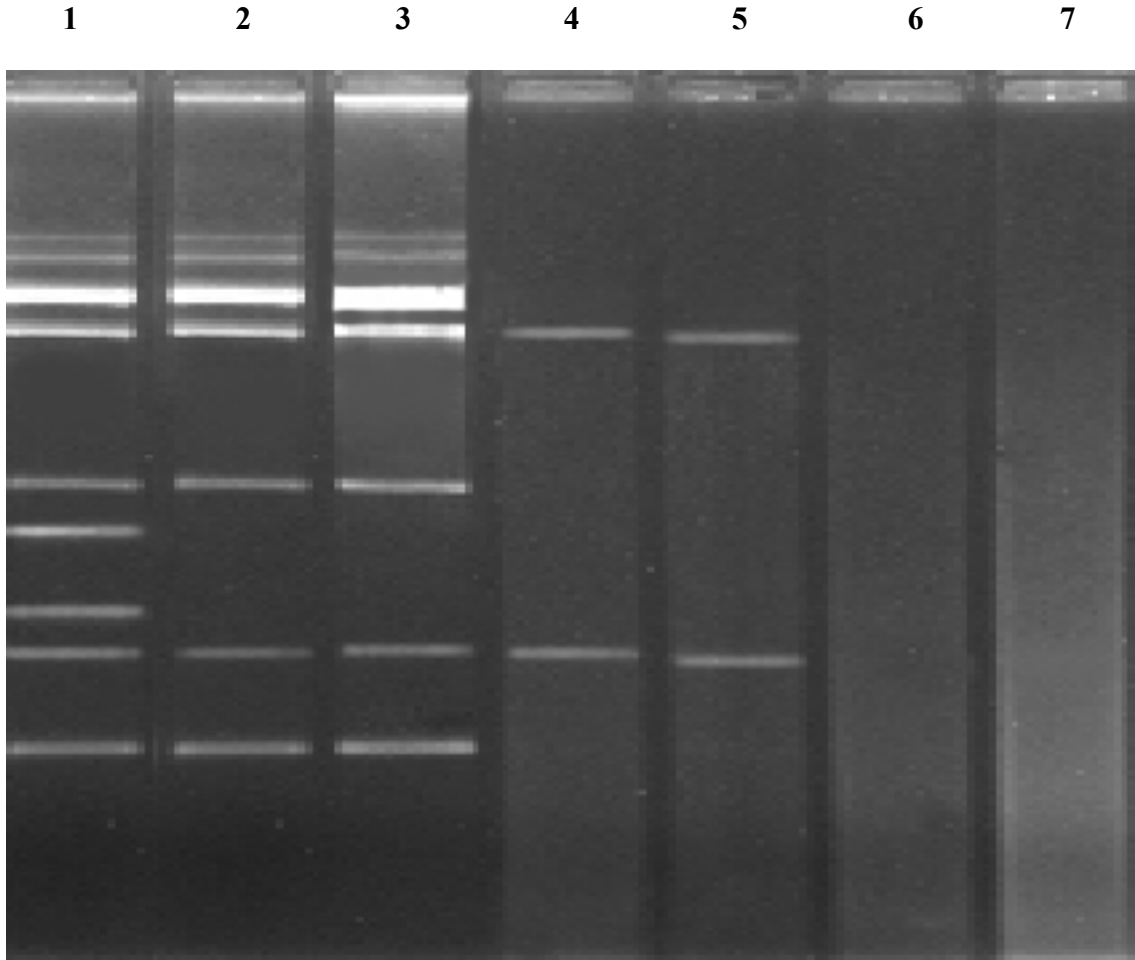
Şekil 4.12 30°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	24 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
2	24 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
3	48 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
4	48 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
5	72 saat 1. paralel	(kb): —
6	72 saat 2. paralel	(kb): —
7	<i>L. cremoris</i> U70 (Kontrol)	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
8	Marker	(kb): 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.1, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 2.9, 2.1



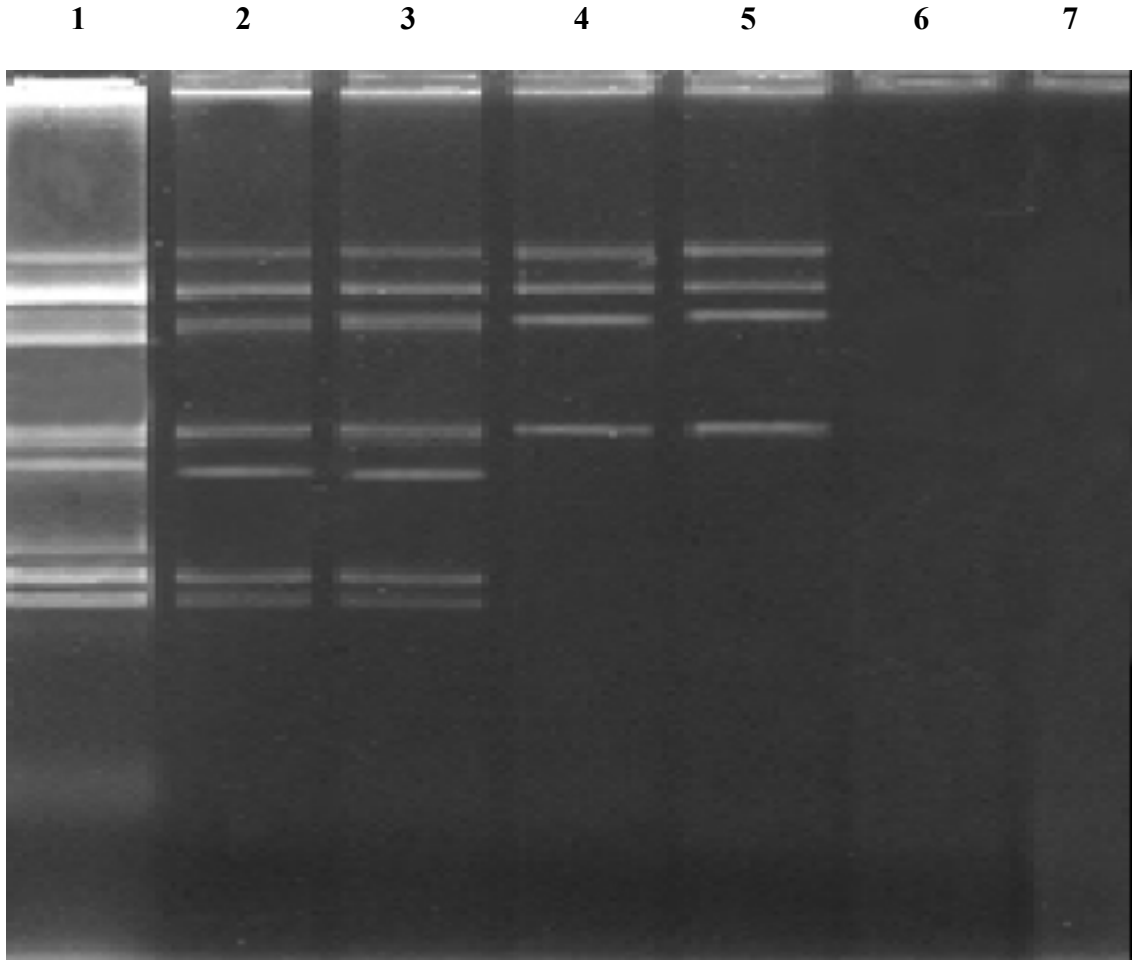
Şekil 4.13 35°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	<i>L. lactis</i> U29 (Kontrol)	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
2	24 saat 1. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
3	24 saat 2. paralel	(kb): 23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
4	48 saat 1. paralel	(kb): —
5	48 saat 2. paralel	(kb): —
6	72 saat 1. paralel	(kb): —
7	72 saat 2. paralel	(kb): —



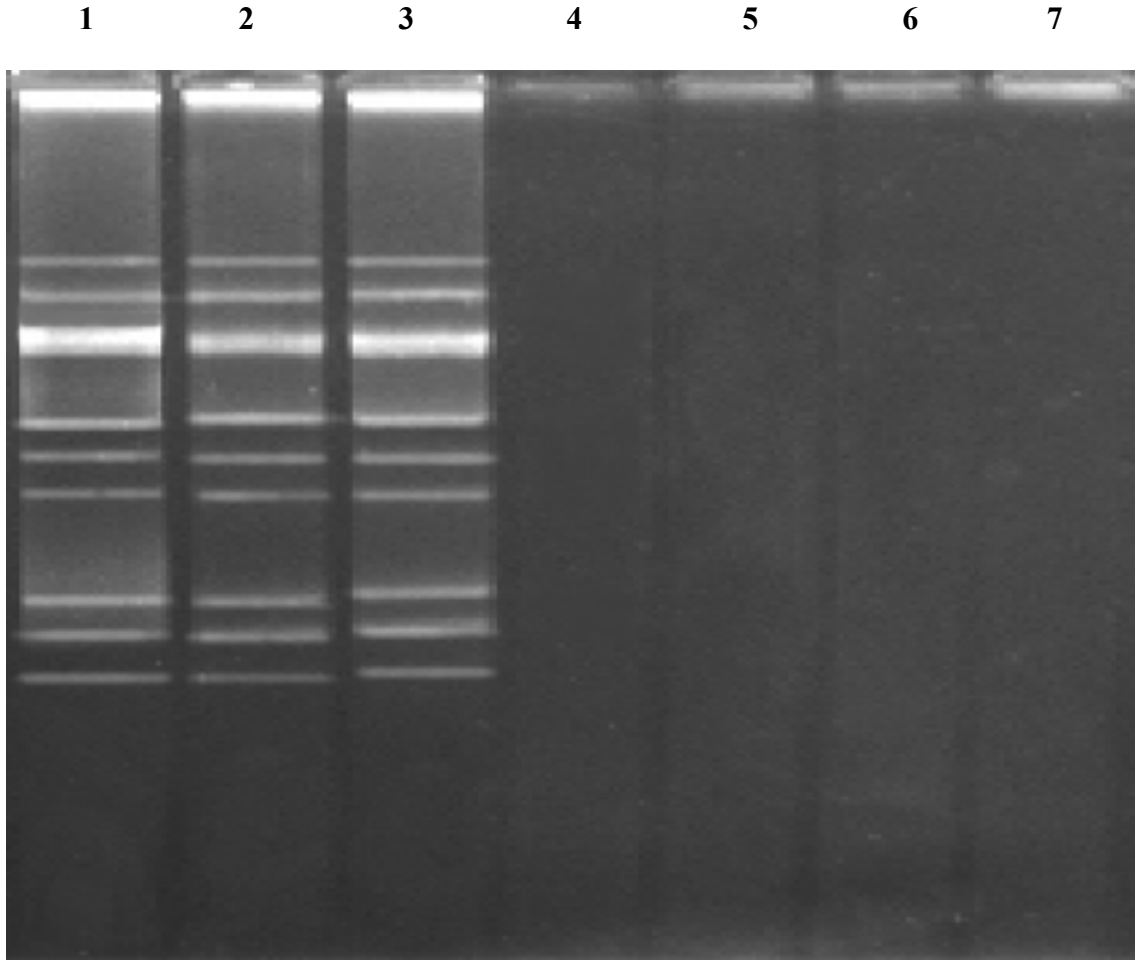
Şekil 4.14 35°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	<i>L. diacetylactis</i> U52 (Kontrol)	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
2	24 saat 1. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 4.6, 2.8
3	24 saat 2. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 4.6, 2.8
4	48 saat 1. paralel	(kb): 18.6, 4.6
5	48 saat 2. paralel	(kb): 18.6, 4.6
6	72 saat 1. paralel	(kb): —
7	72 saat 2. paralel	(kb): —



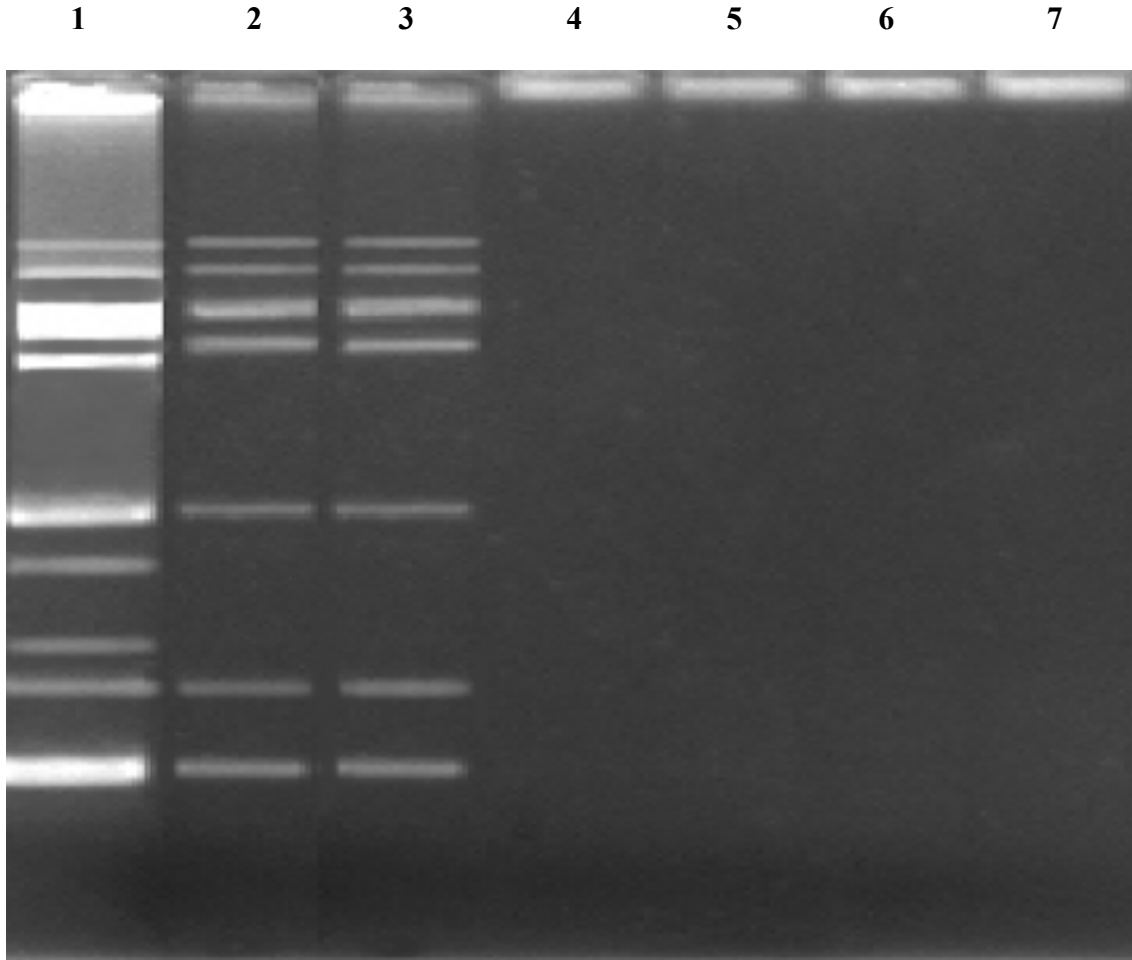
Şekil 4.15 35°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	<i>L. cremoris</i> U70 (Kontrol)	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.7, 6.0, 5.2
2	24 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.0, 5.2
3	24 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0, 9.5, 6.0, 5.2
4	48 saat 1. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0
5	48 saat 2. paralel	(kb): 22.2, 20.2, 18.2, 12.0
6	72 saat 1. paralel	(kb): —
7	72 saat 2. paralel	(kb): —



Şekil 4.16 40°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	<i>L. lactis</i> U29(Kontrol)	(kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
2	24 saat 1. paralel	(kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
3	24 saat 2. paralel	(kb):	23.6, 22.1, 19.6, 16.7, 15.0, 12.3, 7.7, 7.1, 5.7
4	48 saat 1. paralel	(kb):	—
5	48 saat 2. paralel	(kb):	—
6	72 saat 1. paralel	(kb):	—
7	72 saat 2. paralel	(kb):	—



Şekil 4.17 40°C sıcaklık uygulamasının *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunun plazmid stabilitesi üzerine etkisi

1	<i>L. diacetylactis</i> U52 (Kontrol)	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 7.7, 5.9, 4.6, 2.8
2	24 saat 1. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 4.6, 2.8
3	24 saat 2. paralel	(kb): 24.0, 22.7, 20.5, 18.6, 8.7, 4.6, 2.8
4	48 saat 1. paralel	(kb): —
5	48 saat 2. paralel	(kb): —
6	72 saat 1. paralel	(kb): —
7	72 saat 2. paralel	(kb): —

4.2 Türkiye Kökenli *L. lactis* Suşlarının Faj Dirençlilik Düzeyleri

Değişik inkübasyon sıcaklıkları ve sürelerinde plazmid stabilite özellikleri belirlenen laktokok suşlarında faj dirençlilik fenotipleri; Türkiye kökenli 82 adet litik faj kullanılarak araştırıldı (Çizelge 4.1). Testler sonucunda *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşu 12, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşu 9, *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşu da 9 faja karşı duyarlı bulundu. Suşlarda belirlenen bu yüksek düzeydeki faj dirençlilik karakteristikleri, endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır. Zira halen laktokok starter kültür suşlarının kullanıldığı fermente süt endüstrisi uygulamalarında en önemli sorun, faj kontaminasyonları yolu ile meydana gelen ekonomik kayıplardır (Madera *et al.* 2003, Dupont *et al.* 2004, Delgado and Mayo 2004). Türkiye kökenli suşların plazmid stabilite testlerinden elde edilen, plazmid içermeyen ya da değişik plazmidleri giderilmiş türev suşların kültür koleksiyonuna alınmış olması nedeni ile, söz konusu bakterilerde faj dirençlilik özelliklerinin genetik determinantları kolaylıkla tanımlanabilir ve pratik uygulamalarda kullanılabilir.

Faj denemelerinde belirlenen bir diğer önemli nokta, laktokok fajlarının konakçı spesifitesi göstermemesidir. Homolog konakçısı ne olursa olsun, fajlar diğer laktokok alt türleri ve biyovaryetesine etkili olabilmektedir (Çizelge 4.1). Bu durum laktokok fajlarından korunmada en etkili yöntemlerden biri olan starter kültür rotasyonunun (de Haard *et al.* 2005, Lunde *et al.* 2005) koşullarının tanımlanmasında esas alınmalıdır.

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları

Suşlar	Faj Kod No.																			
	Φp1d 67.44	Φyp1d 67.43	Φyp1d 67.26	Φyp1d 67.28	Φyp1d 67.57	Φp1d 67.12a	Φp1d 67.5a	Φp1d 67.6a	Φp1d 67.16a	Φp1d 67.46	Φp1d 67.14a	Φp1d 67.45	Φp1d 67.43	Φp1d 67.42	Φp1d 67.41	Φp1d 67.40	Φp1d 67.39	Φp1d 67.38	Φp1d 67.37	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> ld67 (Duyarlı suş)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları (devam)

Suşlar	Faj Kod No.									
	ΦpII 98.12a	ΦpII 98.22	ΦpII 98.23	ΦpII 98.24	ΦpII 98.25	ΦpII 98.26	ΦpII 98.27	ΦpII 98.30	ΦpII 98.31	ΦpII 98.32
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II 98 (Duyarlı suş)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları (devam)

Suşlar	Faj Kod No.																		
	ΦypII 36.30	ΦypII 36.33	ΦypII 36.35	ΦypII 36.40	ΦypII 36.48	ΦypII 36.49	ΦypII 36.57	ΦypII 36.58	ΦpII 36.12a	ΦpII 36.13a	ΦpII 36.10	ΦpII 36.12	ΦpII 36.14	ΦpII 36.15	ΦpII 36.16	ΦpII 36.17	ΦpII 36.18	ΦpII 36.19	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II 36 (Duyarlı suş)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları (devam)

Suşlar	Faj Kod No.										
	Øyplc 61.51	Øplc 61.50	Øyplc 61.38	Øplc 61.60	Øplc 61.52	Øplc 61.20a	Øplc 61.55	Øplc 61.59	Øplc 61.58	Øplc 61.54	Øplc 61.56
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> lc 61 (Duyarlı suş)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları (devam)

Suşlar	Faj Kod No.		
	Φypld 66.37	Φpld 66.10a	Φpld 66.44
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> Id 66 (Duyarlı suş)	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları (devam)

Suşlar	Faj Kod No.				
	Φpll 6.2	Φpll 6.5a	Φpll 6.6a	Φpll 6.10a	Φpll 6.12a
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Il 6 (Duyarlı suş)	+	+	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları (devam)

Suşlar	Faj Kod No.				
	Φpll 35.15a	Φypll 35.47	Φpll 35.13a	Φpll 35.6	Φpll 35.8
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-	-	+	-	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	-	+	-	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II 35 (Duyarlı suş)	+	+	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları (devam)

Suşlar	Faj Kod No.			
	Φpld 64.20a	Φpld 64.35	Φpld 64.34	Φpld 64.14a
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> Id 64 (Duyarlı suş)	+	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları (devam)

Suşlar	Faj Kod No.			
	Φpll 10.5	Φpll 10.12a	Φpll 10.17a	Φpll 10.16a
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Il 10 (Duyarlı suş)	+	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

Çizelge 4.1 Laktokok suşlarının faj duyarlılıkları (devam)

Suşlar	Faj Kod No.		
	Φpll 47.21	Φpll 47.16a	Φpll 47.17a
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-	+	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	-	+	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Il 47 (Duyarlı suş)	+	+	+

- : Dirençli

+ : Duyarlı

4.3 Laktokok Suşlarının Endüstriyel Açıdan Önem Taşıyan Metabolik Özellikleri

Araştırmada kullanılan laktokok suşlarının endüstriyel açıdan önem taşıyan özelliklerinin tanımlanması, bu suşların starter kültür kullanım potansiyellerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır (Madera *et al.* 2003, van Kranenburg *et al.* 2005). Bu doğrultuda, Türkiye kökenli laktokok suşlarında, beklendiği gibi, sadece *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 sitrat fermentasyonu sonucu diasetil oluşturma yeteneğinde bulundu. Ayrıca bu sonuç, suşun daha önceki çalışmalarda gerçekleştirilen tanısının doğruluğuna işaret etmektedir (Çizelge 4.2).

Süt fermentasyonlarında kullanılan starter kültür suşlarının temel aktivitesi, fermentasyon ana ürünü olarak laktik asit oluşturmalarıdır. Laktik asit oluşumu; sadece fermentasyonun başlaması ve ürünün yapısal-aromatik özelliklerinin gelişimi açısından değil, kontamine floranın engellenmesine katkısı yönünden de ürün kalitesi ve verimi üzerine etki etmektedir (Boonmee *et al.* 2003, Lee 2005). Araştırmamızda 30°C’de 6 saat sonunda Δ pH değerleri 0.04-0.91 arasında, 24 saat sonunda ise 1.77-2.11 arasında değişim gösterdi (Çizelge 4.3). Endüstriyel fermentasyon süreçlerinde yararlanılan *Lactococcus* cinsi üyesi starter kültür suşlarında hızlı asit oluşturma yeteneği; çiğ süt ortamına % 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). Bu koşullarda; Δ pH 1.50 ve üzerinde olanlar yüksek, 1.00-1.50 arasında olanlar orta ve 1.00 den düşük olanlar zayıf asit üreticileri olarak tanımlanmaktadır (Ziadi *et al.* 2005). Bu esasa göre Türkiye kökenli tüm laktokok suşları düşük asit üreticiler olarak değerlendirildi. Starter kültürlerin asit üretme özellikleri, üretilecek fermente gıdanın karakteristikleri dikkate alınarak tanımlanmaktadır. Özellikle uzun olgunlaşma süresine sahip sert ve yarı sert peynirlerde hızlı asitlik gelişimi tercih edilmemektedir. Zira bu durumda kontrolsüz bakteri parçalanması meydana gelmekte ve proteolitik enzimlerin zamana bağlı olgunlaştırma işlevi bozulmaktadır. Bu durumda ürünün tipik aroma özellikleri değişmekte ve tüketici kabulü düşmektedir. Bu koşullarda düşük ya da orta düzeyde asit oluşturma yeteneğine sahip starter kültürlerin kullanımı tercih edilmektedir (Cock and de Stouvenel 2006). Bu bilgiler dikkate alınarak 24 saat inkübasyon süresi sonunda da Türkiye kökenli suşların

asit üretimleri değerlendirildi. Bu çalışma sonunda; 6 saatte tanımlanan Δ pH değerlerinin, 24 saat sonunda 1.20-1.73 arasında arttığı ve % 0.690-0.885 laktik asit oranlarına ulaştığı saptandı (Çizelge 4.3). Bu değerler dikkate alındığında, Türkiye kökenli suşların yavaş ya da orta düzeyde asit oluşumu ile karakterize edilen fermente süt ürünlerinde kullanılabileceği ortaya çıkmaktadır.

Daha önceki araştırmalarda olduğu gibi (Tükel ve Akçelik 2000, Özkalp ve Akçelik 2006) bu çalışmada kullanılan Türkiye kökenli laktokok suşlarında düşük laktik asit üretim düzeylerinin saptanması, söz konusu suşların endüstriyel üretim süreçlerine adapte olmamasından kaynaklanmaktadır. Büyük bir olasılıkla bakteriler yüksek asitliği stres koşulu olarak algılamakta ve bu doğrultuda düşük üretim seviyesinde regüle etmektedir. Bu öngörü, laktik asit stresi altında laktokok suşlarının oluşturduğu genetik ve biyokimyasal yanıtların doğası incelenerek açıklık kazanacaktır.

L. lactis suşlarında proteolitik aktivite özellikleri, Citti *et al.* (1963) tarafından önerilen yöntem esas alınarak belirlendi. Buna göre *L. lactis* subsp. *lactis* U29 suşunda 0.0141 mg Tyr/L, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşunda 0.0164 mg Tyr/L ve *L. lactis* subsp. *cremoris* U70'de 0.0200 mg Tyr/L arasında proteolitik aktivite yeteneği tespit edildi (Çizelge 4.4). Literatür verilerinde 0.010-0.025 mg Tyr/L düzeyi, orta düzeyde proteolitik aktivite yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Guedon *et al.* 2001). Laktokok suşları proteolitik aktivite yetenekleri sayesinde, sütte bulunan ana azot kaynağı olan kazeini kullanmak suretiyle, bu ortamdaki gelişme hızlarını kontrol etmektedir. Kazein katabolizması esnasında salınan ara ürünler, fermente süt ürünlerinin aroma ve tat bileşiklerinin oluşumunda anahtar rol oynamaktadır. Ancak hızlı proteolitik aktivite yeteneğine sahip suşların, fermentasyon ortamlarında oluşturdukları yüksek miktardaki peptit kalıntıları ve aminoasitler nedeni ile acı bir tadın gelişimine yol açtığı belirlenmiştir (Atiles *et al.* 2000, Helinck *et al.* 2003, Madera *et al.* 2003). Bu nedenle Türkiye kökenli laktokoklarda tanımlanan orta düzeyde proteolitik aktivite yeteneği, starter kültür suşları için tercih edilen bir özellik olmaktadır.

L. lactis suşlarında araştırılan son endüstriyel özellik antibakteriyel aktivite yetenekleri olmuştur. İndikatör bakterilere karşı yürütülen testler sonucunda, sadece *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* U52 suşu *L. lactis* T1 suşuna karşı 6 mm ve *L. lactis* subsp. *cremoris* U70 suşu ise, *Bacillus cereus* FM1 suşuna karşı 5 mm inhibisyon zonu oluşturduğu belirlendi (Çizelge 4.5). Antibakteriyel aktivitenin kontrol bakteriyosin üreticilerine oranla çok düşük olması, elde edilen zonların bakteriyosin dışı bileşikler tarafından oluşturulduğuna işaret etmektedir.

Çizelge 4.2 Laktokok suşlarının diasetil üretme özellikleri

Suşlar	Diasetil Üretimi
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> 50 *	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> 101 *	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> 33 *	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 70 *	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 7 *	-

* Kontrol suşlar

Çizelge 4.3 Laktokok suşlarının laktik asit üretim düzeyleri

Suşlar	6. saat sonundaki ortalama pH	6. saat sonundaki ortalama Δ pH	24 saat sonundaki ortalama pH	24 saat sonundaki Δ pH	24 saat sonundaki % asitlik
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	5.57	0.91	4.37	2.11	0.885
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> U52	6.44	0.04	4.71	1.77	0.726
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	6.10	0.38	4.43	2.05	0.690
<i>L. lactis</i> JC 17 (lactisin 481 üreticisi)	6.35	0.13	6.05	0.43	0.303

Başlangıç pH: 6.48

Çizelge 4.4 Laktokok suşlarının proteolitik aktivite düzeyleri

Suşlar	Proteolitik Aktivite (mg Tyr/L)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> U29	0.0141
<i>L. lactis</i> subsp. biovar. <i>diacetylactis</i> U52	0.0164
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> U70	0.0200
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> *	0.0180
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> *	0.0153

<10 µg Tirozin (Tyr)/mL : Çok düşük düzeyde proteolitik aktivite

10.00 – 23.55 µg Tyr/mL : Orta düzeyde proteolitik aktivite

26.60 – 43.70 µg Tyr/mL : Yüksek düzeyde proteolitik aktivite

* Kontrol

Çizelge 4.5 Laktokok suşlarının antibakteriyel aktivite özellikleri

İndikatör bakteriler	Suşlar ve Zon Çapları				
	U29	U52	U70	SIK-83 *	JC-17 **
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	—	—	—	—	9 mm
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	—	—	—	10 mm	14 mm
<i>Lactococcus lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	—	—	—	9 mm	26 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	—	—	—	—	—
<i>Listeria innovia</i> (nisin duyarlı)	—	—	—	—	—
<i>Lactococcus lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	—	—	—	6 mm	—
<i>Lactococcus lactis</i> 1	—	—	—	8 mm	—
<i>Lactococcus lactis</i> T1	—	6 mm	—	6 mm	7 mm
<i>Lactococcus lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	—	—	—	—	—
<i>Lactococcus lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	—	—	—	8 mm	—
<i>Lactococcus lactis</i> 1 (laktisin 3147 üreticisi)	—	—	—	10 mm	—
<i>Escherichia coli</i> C1845 CFAI	—	—	—	—	—
<i>Salmonella enterica</i> serovar. <i>Typhimurium</i> SL 1344	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	—	—	—	5 mm	6 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	—	—	—	13 mm	12 mm
<i>Lactococcus lactis</i> JC 17 (laktisin 481 üreticisi)	—	—	—	9 mm	—
<i>Bacillus cereus</i> FM 1	—	—	5 mm	7 mm	5 mm
<i>Staphylococcus carnosus</i> MC1, B	—	—	—	19 mm	11 mm
<i>Pediococcus pentasaceus</i> FB B61.1 (pediosin üreticisi)	—	—	—	10 mm	14 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	—	—	—	5 mm	7 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 100	—	—	—	7 mm	5 mm
<i>Lactococcus cremoris</i> (Laktisin A + B üreticisi)	—	—	—	—	—
<i>Lactococcus lactis</i> (Laktisin üreticisi)	—	—	—	—	20 mm

U29: *L. lactis* subsp. *lactis*U52: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*U70: *L. lactis* subsp. *cremoris** : *L. lactis* subsp. *lactis* (nisin üreticisi)** : *L. lactis* subsp. *lactis* (laktisin üreticisi)

KAYNAKLAR

- Akçelik, M. and 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.
- Anderson, D.G. and McKay, L.L. 1983. A simple and rapid method for isolation large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46; 549-552.
- Atiles, M.W., Dudley, E.G. and Steele, J.L. 2000. Gene cloning, sequencing and inactivation of the branched-chain aminotransferase of *Lactococcus lactis* LM0230. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (6); 2325-2329.
- Balasubmaranyam, B.V. and Varadaraj, M.C. 1998. Cultural conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* CFR 2028 in milk medium. *J. Appl. Microbiol.*, 84; 97-102.
- Barriaut, D. and Sylvestre, M. 1999. A coleE1- compatible expression vector for the production of his-tagged fusion proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75; 293-297.
- Beasley, S.S. and Saris, P.E. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70; 5051-5053.
- 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 (2); 127-135.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 2293- 2299.
- 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, 433-531, USA.

- Campbell, R.C. 1974. Statistics for biologists. Cambridge University Press, Second Edition, pp 385, England.
- Caplice, E. and Fitzgerald, F. 1999. Food fermentation; role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50; 131-149.
- Carr, F.J., Chill, D. and Miada, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28 (4); 281-370.
- Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2; 82-100.
- Chopin, A. 1993. Organisation and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12; 21-38.
- Chopin, M.C., Chopin, A. and Bidnenko, E. 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8; 473-479.
- Citti, J.E., Sandine, W.E. and Elikler P.R. 1963. Some observation on the Hull method for measurement of proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 46; 337-345.
- Coakley, M., Fitzgerald, F. and Ross, R.P. 1997. Application and evaluation of the phage resistance and bacteriocin encoding plasmid pMRCOI for the improvement of dairy starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 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.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. 2003. A food-grade approach for functional analysis and modification of native plasmids in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69; 702-706.
- Daly, C. Fitzgerald, G.F. and Davis, R. 1996. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70; 99-110.

- de Angelis, M., Corsetti, A., Tostl, N., Rossi, J., Corbo, M.R. and Gobbetti, M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheese based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (5); 2011-2020.
- de Haard, H.J.W., Bezemer, S., Ledebouer, A.M., Müller, W.H., Boender, P.J., Moineau, S., Coppelmans, M.C., Verkleji, 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. *J. Bacteriol.*, 187 (13); 4531-4541.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.*, 90; 309-319.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M. and Diaz-Orejas, R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62; 434-464.
- de Vos, W.M., Kleerebezem, M. and Kuipers, O.P. 1997. Expression systems for industrial Gram-positive bacteria with low guanine and cytosine content. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8; 547-553.
- de Vos, W.M. and Hugenholtz, J. 2004. Engineering metabolic highways in lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.*, 22; 72-79.
- Difco Manual, 1984. Difco Laboratories, Detroit-Michigan, pp 333, USA.
- Dmowski, M., Sitkiewicz, I. and Ceglowski, P. 2006. Characterization of a novel partition system encoded by the δ and ω genes from the streptococcal plasmid pSM19035. *J. Bacteriol.*, 188 (12); 4362-4372.
- Duan, K., Liu, C.Q., Liu, Y.J., Ren, J. and Dunn, N.W. 1999. Nucleotide sequence and thermostability of pND324, a 3.6-kb plasmid from *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53; 36-42.
- Dupont, K., Janzen, T., Vogensen, F.K., Josephsen, J. and Stuer-Lauridsen, B. 2004. Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (10); 5825-5832.

- Durlu-Özkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes milk. *J. Appl. Microbiol.*, 91; 861-870.
- Duwat, P., Ehrlich, S.D. and Grus, A. 1999. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. *Mol. Microbiol.*, 17; 1121-1131.
- Elder, J.K., Amos, A., Southern, E.M. and Shippey, G.A. 1983. Measurement of DNA length by electrophoresis (I). *Analytical Biochemistry*, 128; 223-226.
- Elliott, J.A., Collins, M.D., Pigot, N.E. and Facklam, R.R. 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garrisi* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (12); 2731-2734.
- Flambard, B., Helinck, S., Richard, J. and Juillard, V. 1998. The contribution of caseins to the amino acid supply for *Lactococcus lactis* depend on the type of cell envelope proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (6); 1991-1996.
- Forde, A., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. 1999. Identification of four phage resistance plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (4); 1540-1547.
- Forde, A. and Fitzgerald, G.F. 2003. Molecular organization of exopolysaccharide (*eps*) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658. *Plasmid*, 49 (2); 130-142.
- Grohmann, E., Muth, G. and Espinosa, M. 2003. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67; 277-301.
- Guedon, 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. *J. Bacteriol.*, 183 (12); 3614-3622.
- Guldfeldt, L.U., Sørensen, K.I., Strøman, P., Behrndt, H., Williams, D. and Johansen, E. 2003. Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 11; 373-382.

- Haga, T., Kumabe, S., Ikejiri, A., Li, H., Goto, Y., Matsui, H., Miyata, H. and Miura, T. 2006. In vitro and in vivo stability of plasmids in attenuated *Salmonella enterica* serovar. *Typhimurium* used as a carrier of DNA vaccine is associated with its replication origin. *Exp. Anim.*, 55 (4); 405-409.
- Hartke, A., Frore, J., Boutibonnes, P. and Auffray, Y. 1997. Differential induction of the chaperonin GroEL and the co-chaperonin GroES by heat, acid and UV-irradiation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.*, 34; 23-26.
- 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*. *J. Appl. Microbiol.*, 94; 900-907.
- 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, pp 787, USA.
- Horng, J.S., Polzin, K.M. and McKay, L.L. 1991. Replication and temperature-sensitive maintenance function of lactose plasmid pSK11L from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *J. Bacteriol.*, 173 (23); 7573-7581.
- Jack, R.W. Tagg, J.R. and Roy, B. 1995. Bacteriocins of Gram- positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59 (2); 171-200.
- Kiewiet, R., Bron, S., De Jonge, K., Venema, G. and Seegers, J.F.M.L. 1993. Theta replication of the lactococcal plasmid pWVO2. *Mol. Microbiol.*, 10; 319-327.
- Kiewiet, R. 1998. The mode of replication and plasmid instability in lactococci. *Mol. Microbiol.*, 65; 204-210.
- 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.
- Kobayasi, M., Nomura, M., Fujita, Y., Okamoto, T. and Ohmomo, S. 2002. Influence of lactococcal plasmid on the specific growth rate of host cells. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35; 403-408.

- Koort, J. 2006. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with non fermented meats. Academic Dissertation. University of Helsinki. p 63, Finland.
- Labrie, S., Bart, C., Vadeboncoeur, C. and Moineau, S. 2005. Use of an α -Galactosidase gene as a food-grade selection marker for *Streptococcus thermophilus*. Journal of Dairy Science, 88 (7); 2341-2347.
- Lale, R. ve Akçelik, M. 2004. *Lactococcus lactis* suşlarının stres koşullarında dirençlilik özellikleri. Tarım Bilimleri Dergisi, 29 (5); 347-355.
- Lee, K. 2005. A media design program for lactic acid production coupled with extraction by electrodialysis. Bioresource Technology, 96 (13); 1505-1510.
- Lee, K. and Moon, S. 2003. Growth kinetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *diacetylactis* harboring different plasmid content. Curr. Microbiol., 47; 67-78.
- Leenhouts, K.J., Kok, J. and Venema, G. 1990. Stability of integrated plasmid in the chromosome of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 56 (9); 2726-2735.
- Leenhouts, K.J. and Venema, G. 1993. Lactococcal plasmid vectors. Plasmid, A Practical Approach, Oxford, 2; 326-338, England.
- Leroy, F. and de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation Industry. Trends in Food Science and Technology, 15; 67-78.
- Lunde, M, Aastveit, A.H., Blantny, J.M. and Nes, I.F. 2005. Effects of diverse environmental condition on Φ LC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 71 (2); 721-727.
- Lundin, K.E., Hasan, M., Moreno, P.M., Tornquist, E., Oprea, I., Svahn, M.G., Simonson, E.O. and Smith, C.I.E. 2005. Increased stability and specificity through combined hybridization of peptide nucleic acid (PNA) and locked nucleic acid (LNA) to supercoiled plasmid for PNA-anchored "Bioplex" formation. Biomol. Eng., 22 (5-6); 185-192.

- 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; 471-420.
- Macrina, F.L., Tobian, J.A., Jones, K.R, Evans, R.P. and Clewell, D.B. 1982. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*, 19; 345-353.
- Madera, C., Garcia, P., Janzen, T., Rodriguez, A. and Suarez, J.E. 2003. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection . *Int. J. Food Microbiol.*, 86; 213-222.
- Malone, A.S., Shellhammer, T.H. and Courtnez, P.D. 2002. Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (9); 4357-4363.
- Martin, 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. *J. Bacteriol.*, 186 (17); 5649-5660.
- Medina, R., Katz, M., Gonzales, S. and Oliver, G. 2001. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. *J. Food Prot.*, 64 (4); 549.563.
- Meijer, W., Dobbelaar, C. and Hugenholtz, J. 1998. Thermoinducible lysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110: implications for cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 8; 275-280.
- Meyers, J.A., Sanches, D., Elwell, L.P. and Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127; 1529-1537.
- Mills, S., 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. *J. Appl. Microbiol.*, 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 Microbiol. Rev., 30; 243-273.
- Moineau, S. 1999. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 76 (1-4); 377-382.
- Nga, B.H. 2005 Genome analysis of lactic acid bacteria in food fermentation and biotechnological applications. Curr. Opin. Microbiol., 8; 307-312.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y. and Suzuki, I. 1999. Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. Int. Journal of Systematic Bacteriology, 49; 163-166.
- Özkalp, B. ve Akçelik, M. 2006. Doğal tip *Lactococcus lactis* suşlarının endüstriyel starter kültür potansiyellerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 103s.
- Panoff, J.M., Legrand, S., Thammavongs, B. and Boutibonnes, P. 1994. The cold shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Curr. Microbiol., 29; 213-216.
- Perez-Arellano, I., Zuniga, M. and Perez-Martinez, G. 2001. Construction of compatible wide-host-range shuttle vectors for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. Plasmid, 6; 106-116.
- Perez, G., Cardell, E. and Zàrate, V. 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. International Journal of Food Science and Technology, 38; 537-546.
- Pillidge, C.J., Crow, V.L., Coolbear, T. and Reid, J.R. 2003. Exchanging lactocepin plasmid in lactococcal starters to study bitterness development in Gouda cheese: a preliminary investigation. International Dairy Journal, 13; 345-354.
- Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. Int. J. Food Microbiol., 79; 3-16.
- Sanders, M.E. 1988. Phage resistance in lactic acid bacteria. Biochimie, 70; 411-421.

- Scannell, A.G.M., Kenneally, P.M., McCarthy, D., Schwarz, G.T. and Arendt, E.K. 2002. Optimization of fermentation conditions for the production of fermented hams. *European Food Research and Technology*, 215; 183-188.
- Schaffer, H.E. and Sederoff, R.R. 1981. Improvement estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 115; 122-133.
- Shareck, J., Choi, Y., Lee, B. and Miguez, C.B. 2004. Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential application in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 24; 155-208.
- Simones-Barbosa, A., Abreu, H., Silva Neto, A., Gruus, A. and Langella, P. 2004. A food-grade delivery system for *Lactococcus lactis* and evaluation of inducible gene expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65; 61-67.
- Southern, E.M. 1979. Measurement of DNA lengths by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 100; 319-323.
- Stepanek, V., Valesova, R. and Kyslik, P. 2005. Cryptic plasmid pRK2 from *Escherichia coli* W: sequence analysis and segregational stability. *Plasmid*, 51 (1); 86-91.
- 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*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (7); 2641-2643.
- Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. *Appl. Microbiol.*, 29; 807-813.
- Teuber, M. 1990. Strategies for genetic modification in lactic acid bacteria. *Food Biotechnol.*, 4; 537-546.
- Teuber, M., Schwarz, F. and Meile, L. 2003. Antibiotic resistance and transfer in lactic acid bacteria. *Genetics of Lactic Acid Bacteria*, 3; 317-354.
- Thompson, J.K., McConville, K.J., McReynolds, C. and Collins, M.A. 1999. Potential of conjugal transfer as a strategy for the introduction of recombinant genetic material into strains of *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (5); 1910-1914.

- Tükel, Ç. ve Akçelik, M. 2000. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşlarında laktoz plazmidlerinin tanımlanması. Tr. J. of Biology, 24; 405-424.
- 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. Appl. Environ. Microbiol., 55 (5); 1187-1191.
- 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*. J. Bacteriol., 180 (20); 5285-5290.
- van Kranenburg, R., Golic, N., Bongers, R., Leer, R.J., de Vos, W.M., Siezen, R.J. and Kleerebezem, M. 2005. Functional analysis of three plasmids from *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol., 71 (3); 1223-1230.
- van Rooijen, R.J., Gasson, M.J. and de Vos, W.M. 1992. Characterization of the *Lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequence and LacR repressor to promoter activity. J. Bacteriol., 174; 2273-2280.
- Verhue, W.M. and Tjan, F.S.B. 1991. Study of citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* by means of ¹³C nuclear magnetic resonance. Appl. Environ. Microbiol., 57; 3371-3377.
- Walker, S.A. and Klaenhammer, T.R. 2003. The genetics of bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. Genetics of Lactic Acid Bacteria. 3; 291-315.
- Whitaker, R.D. and Batt, C.A. 1991. Characterization of the heat shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 57; 1408-1412.
- Wouters, J.A., Sanders, J.W., Kok, J., de Vos, W.M., Kuipers, O.P. and Abee, T. 1998. Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five *csp* genes of *Lactococcus lactis* MG1363. Microbiol., 144; 2885-2893.
- Wouters, J. A., Jeynov, B., Rombouts, F.M., de Vos, W.M., Kuipers, O.P. and Abee, T. 1999. Analysis of the role of 7 kDa cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. Microbiology, 145; 3185–3194.

- Ziadi, M., Touhami, Y., Acchour, M., Thonart, P.H. and Hamdi, M. 2005. The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus*. *Biochemical Engineering Journal*, 24; 141-145.
- Zechner, E.L. 2000. Conjugative DNA Transfer Processes: The Horizontal Gene Pool. *Bacterial Plasmids and Gene Spread* (Thomas CM, ed.). Harvard Academic Publishers., Amsterdam, 87-174, Netherlands.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emre UĞUZ
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 09/02/1974
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kanuni Lisesi (1988-1991)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2000-2003)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Klinik İmmünoloji ve Romatoloji Laboratuvarı (1998-2005)

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı (2005-....)