

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

LAKTOKOK SUŞLARI TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNLERİN
TANISI VE BU ÖZELLİĞİN GENETİK DOĞASININ BELİRLENMESİ

Yasin TUNCER

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2005

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

LAKTOKOK SUŞLARI TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNLERİN TANISI VE BU ÖZELLİĞİN GENETİK DOĞASININ BELİRLENMESİ

Yasin TUNCER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanan 100 adet *L. lactis* (68 adet *L. lactis* subsp. *lactis*, 24 adet *L. lactis* subsp. *cremoris* ve 8 adet *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) suşunda bakteriyosin üretim yeteneği ve bu özelliğin genetik determinantları araştırıldı. Bakteriyosin üreticisi suşlar; laktik asit üretimi, proteolitik aktivite ve faj dirençlilik düzeyleri gibi endüstriyel özellikleri bakımından da incelendi. 100 adet *L. lactis* suşu içerisinde, 9 adet *L. lactis* subsp. *lactis* suşu bakteriyosin üretme yeteneğinde bulundu. Etki spektrumları, plazmid profilleri ve toplam hücre proteinlerindeki uyuşmaya göre bu suşların esasen 3 farklı suş olduğu belirlendi. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşları tarafından üretilen bakteriyosinler, farklı enzim, pH ve sıcaklık uygulamaları sonucu; sırasıyla laktoztrepsin 2, laktisin 481 ve laktisin FS92 olarak tanımlandı. SDS-PAGE analizleri sonucunda; kısmi saflaştırması yapılan laktoztrepsin 2'nin 12000 Da, laktisin 481'in 3400 Da ve laktisin FS92'nin 3500 Da moleküler ağırlıkta olduğu tespit edildi. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19 suşunda 27.3 kb, PLL23 suşunda 19.0 kb ve PLL47 suşunda 19.6 kb büyüklükteki plazmidlerin bakteriyosin üretimi ve laktoz fermentasyonundan sorumlu olduğu saptandı. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşlarında bakteriyosin üretim yeteneğini determine eden plazmidlerin konjugal aktarım sıklığı, verici hücre başına 2.6×10^{-3} – 4.5×10^{-4} arasında belirlendi. Konjugantlarda bakteriyosin üretimini kodlayan plazmidlerin stabilite oranları % 88-92 arasında bulundu. Bakteriyosin üretme yeteneğindeki 3 *L. lactis* subsp. *lactis* (PLL19, PLL23 ve PLL47) suşunda laktik asit üretimi % 0.48-0.52, proteolitik aktivite düzeyleri 42.6-61.3 µg Tyr/mL arasında saptandı. Bu suşların hiçbirinde fajların tümüne karşı dirençlilik özelliği belirlenmedi.

2005, 125 sayfa

ANAHTAR KELİMELELER: *Lactococcus lactis*, bakteriyosin, plazmid, konjugasyon, endüstriyel özellikler.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IDENTIFICATION OF BACTERIOCINS WHICH ARE PRODUCED BY LACTOCOCCAL STRAINS AND DETERMINATION OF GENETIC NATURE OF THIS PROPERTY

Yasin TUNCER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, bacteriocin production abilities and genetic determinants of this character in producer strains among 100 *Lactococcus lactis* strains (68 *L. lactis* subsp. *lactis*, 24 *L. lactis* subsp. *cremoris* and 8 *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), provided from culture collection of Ankara University, Agricultural Faculty, Food Engineering Department, were investigated. Industrial traits such as lactic acid production, proteolytic activity and phage resistance were also investigated in bacteriocin producer strains. 9 *L. lactis* subsp. *lactis* strains were found as bacteriocin producers among 100 *L. lactis* strains. These strains were determined as three different strains according to similarities in their activity spectrum, plasmids and whole-cell protein profiles. Bacteriocins of *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 and PLL47 were characterized as lactostrepcin 2, lacticin 481 and lacticin FS92, respectively by enzyme, pH and heat treatments. SDS-PAGE analysis showed that molecular weights of partially purified lactostrepcin 2, lacticin 481 and lacticin FS92 were 12000 Da, 3400 Da and 3500 Da, respectively. Bacteriocin production and lactose fermentation abilities of these strains were found to be determined by 27.3 kb, 19.0 kb and 19.6 kb plasmids for PLL19, PLL23 and PLL47 strains of *L. lactis* subsp. *lactis*, respectively. Plasmids, encoding bacteriocin production in *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 and PLL47 could be transferred by conjugation with the frequency rates of 2.6×10^{-3} – 4.5×10^{-4} per donor cell. The stability of plasmids encoding bacteriocin production were ranged at 88-92 % in conjugants. Lactic acid production and proteolytic activity in three bacteriocin producer *L. lactis* subsp. *lactis* strains (PLL19, PLL23 and PLL47) were determined at the rates between 0.48-0.52 % and 42.6-61.3 µg Tyr/mL, respectively. Complete phage resistance was not found in any of these strains.

2005, 125 pages

Key Words: *Lactococcus lactis*, bacteriocin, plasmid, conjugation, industrial traits

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma imkanı sunan ve çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e;

Tez izleme komitelerindeki değerli düşünce ve önerilerinden dolayı Ankara Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI'ya ve Prof. Dr. Cumhuriyet ÇÖKMÜŞ'e;

İndikatör bakterileri sağladığı için Sayın Prof. Dr. Ingolf F. NES'e (Department of Genetics and Biochemistry, Agricultural University of Norway, As/Norway);

Konjugasyon çalışmasında alıcı suş olarak kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* MLL40-29 suşunu sağladığı için Sayın Dr. Çağla TÜKEL'e (Texas A&M University, Department of Medical Microbiology and Immunology, USA);

Tüm yardımları için laboratuvar arkadaşlarım Öğrt. Gör. Dr. Pınar ŞANLIBABA, Araş. Gör. Dilek AVŞAROĞLU, Araş. Gör. Özay MENTEŞ, Banu ÖZDEN ve Pelin BAŞÇI'ya;

Beni her konuda destekleyen ve anlayışlarını esirgemeyen sevgili anneme, babama ve ağabeyim'e;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Yasin TUNCER

Ankara, Ocak 2005

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. <i>Lactococcus</i> Cinsi ve Bu Cinse Ait Türlerin Özellikleri.....	3
2.2. <i>L. lactis</i> Suşlarının Endüstriyel Öneme Sahip Özellikleri.....	5
2.3. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	8
2.3.1. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler.....	9
2.3.1.1. Grup I bakteriyosinler.....	9
2.3.1.2. Grup II bakteriyosinler.....	10
2.3.1.3. Grup III bakteriyosinler.....	11
2.3.1.4. Grup IV bakteriyosinler.....	11
2.3.2. Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler.....	11
2.3.2.1. Diplokoksin.....	11
2.3.2.2. Laktokoksinler.....	12
2.3.2.2.1. Laktokoksin A.....	12
2.3.2.2.2. Laktokoksin B.....	13
2.3.2.2.3. Laktokoksin MN.....	13
2.3.2.2.4. Laktokoksin G.....	14
2.3.2.2.5. Laktokoksin 972.....	14
2.3.2.2.6. Laktokoksin MMFII.....	15
2.3.2.3. Lantibiyotikler.....	15
2.3.2.3.1. Nisin.....	16
2.3.2.3.2. Laktisin 3147.....	19
2.3.2.3.3. Laktisin 481.....	20
2.3.2.3.4. Laktisin FS92.....	21

2.3.2.4. Laktotropsinler.....	21
2.4. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları.....	22
2.4.1. Peynir ve süt rnleri.....	23
2.4.2. Et rnleri.....	24
2.4.3. Salata ve salata sosları.....	25
2.4.4. Konserve rnler.....	25
2.4.5. Biyomedikal uygulamalar.....	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Mikroorganizmalar.....	27
3.1.2. Besiyerleri.....	27
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Bakteriyosin retim özelliğinin belirlenmesi.....	29
3.2.2. Proteolitik enzim uygulaması.....	30
3.2.3. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi.....	31
3.2.3.1. pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	31
3.2.3.2. Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	32
3.2.3.3. Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	32
3.2.4. Bakteriyosinlerin kısmi saflaştırması.....	32
3.2.5. Toplam hücre proteinlerinin izolasyonu.....	33
3.2.6. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)....	35
3.2.7. Protein büyüklüklerinin saptanması.....	38
3.2.8. Bakterilerin plazmid içeriklerinin tanımlanması.....	38
3.2.8.1. Plazmid izolasyonu.....	38
3.2.8.2. Elektroforez.....	41
3.2.8.3. Plazmid büyüklüklerinin saptanması.....	42
3.2.9. Bakteriyosin üreten suşlardan plazmidlerin giderilmesi ve plazmidleri giderilmiş mutantların seçimi.....	43
3.2.10. Konjugasyon.....	44

3.2.11. Bakteriyosin üretme yeteneğini kodlayan plazmidlerin stabilite düzeylerinin saptanması.....	45
3.2.12. Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşlarının laktik asit üretim düzeylerinin saptanması.....	45
3.2.13. Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşlarının proteolitik aktivite düzeylerinin saptanması.....	46
3.2.14. Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşlarının faj duyarlılıklarının saptanması.....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	49
4.1. <i>L. lactis</i> Suşlarının Bakteriyosin Üretme Yeteneklerinin Belirlenmesi...	49
4.2. Proteolitik Enzim Uygulaması.....	73
4.3. Bakteriyosin Üreticisi <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Suşlarının Plazmid İçeriklerinin Tanımlanması.....	76
4.4. Bakteriyosin Üreticisi <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Suşlarının Toplam Hücre Proteinlerinin Tanımlanması.....	78
4.5. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine pH, Sıcaklık ve Enzim Uygulamalarının Etkisi.....	80
4.6. Kısmi Saflaştırılması Yapılan Bakteriyosinlerin Moleküler Büyüklüklerinin Saptanması.....	85
4.7. Bakteriyosin Üreticisi <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Suşlarının Genetik Determinantlarının Saptanması.....	87
4.8. Doğal <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Suşları ve Bunların Konjugantlarında Bakteriyosin Üretimini Determine Eden Plazmidlerin Stabilitesi.....	98
4.9. Bakteriyosin Üreticisi <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Suşlarının Laktik Asit Üretimi, Proteolitik Aktivite ve Faj Dirençlilik Düzeylerinin Belirlenmesi.....	99
KAYNAKLAR.....	104
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
cm	Santimetre
Da	Dalton
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonukleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
g	Gram
GRAS	İnsan ve Hayvan Tüketiminde Güvenilir
HACCP	Kritik Kontrol Noktalarında Engel Analizi
kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
N	Normal
pfu/mL	Mililitredeki Plak Oluşturma Birimi
RNA	Ribonukleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TCA	Triklor Asetik Asit
TEMED	Tetrametil Etilen Diamin
TES	Tris, Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Sakkaroz
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL23 (1), PLL52 (2), PLL69 (3) ve PLL77 (4) suşlarının <i>Lactococcus lactis</i> LMG 2912 suşuna karşı verdikleri inhibisyon zonları.....	62
Şekil 4.2.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL47 suşunun, <i>Lactococcus lactis</i> T1 suşuna karşı verdiği inhibisyon zonu.....	62
Şekil 4.3.	Bakteriyosin üreticisi <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşlarının plazmid içerikleri.....	77
Şekil 4.4.	Bakteriyosin üreticisi <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşlarının protein profilleri.....	79
Şekil 4.5.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL19 suşunun ürettiği bakteriyosin üzerine enzimlerin etkisi.....	84
Şekil 4.6.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL23 suşunun bakteriyosin aktivitesinin kritik dilüsyon yöntemi ile saptanması.....	84
Şekil 4.7.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin sodyum dodesil sülfat – poliakrilamid jel elektroforez profilleri.....	86
Şekil 4.8.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL19 doğal suşu ve laktoztrepsin 2 üretme yeteneğini kaybetmiş ($Lct2^-$) ya da bu özelliği sürdüren ($Lct2^+$) mutantlarının plazmid içerikleri.....	91
Şekil 4.9.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL23 doğal suşu ve laktisin 481 üretme yeteneğini kaybetmiş (481^-) ya da bu özelliği sürdüren (481^+) mutantlarının plazmid içerikleri.....	92
Şekil 4.10.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL47 doğal suşu ve laktisin FS92 üretme yeteneğini kaybetmiş ($FS92^-$) ya da bu özelliği sürdüren ($FS92^+$) mutantlarının plazmid içerikleri.....	93
Şekil 4.11.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL19 doğal suşu ve laktoztrepsin 2 üretimi ile laktoz fermentasyonu yeteneği kazanmış ($Lct2^+$, Lac^+) konjugantının plazmid içerikleri.....	94
Şekil 4.12.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL23 doğal suşu ve laktisin 481 üretimi ile laktoz fermentasyonu yeteneği kazanmış (481^+ , Lac^+) konjugantının plazmid içerikleri.....	95

Şekil 4.13. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 doğal suşu ve laktisin FS92 üretimi ile laktoz fermentasyonu yeteneği kazanmış (FS92⁺, Lac⁺) konjugantının plazmid içerikleri..... 96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.	İndikatör bakterilere karşı zon veren laktokok suşları.....	50
Çizelge 4.2.	Türkiye kökenli <i>L. lactis</i> suşlarının bakteriyosin üreticisi laktokoklara karşı inhibisyon etkinliği.....	65
Çizelge 4.3.	Bakteriyosin üreticisi laktokokların, Türkiye kökenli <i>L. lactis</i> suşlarına karşı inhibisyon etkinliği.....	69
Çizelge 4.4.	<i>L. lactis</i> kültür üst sıvılarında proteinaz K uygulaması sonucu meydana gelen antimikrobiyel aktivite değişimleri.....	75
Çizelge 4.5.	Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	82
Çizelge 4.6.	Bakteriyosin aktivitesi üzerine enzim ve sıcaklığın etkisi.....	83
Çizelge 4.7.	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PLL19, PLL23 ve PLL47 suşlarından laktoz fermentasyonu ve bakteriyosin üretimini kodlayan plazmidlerin, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MLL40-29 alıcı suşuna konjugal aktarımı.....	97
Çizelge 4.8.	Doğal tip <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşları ve <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MLL40-29 alıcı suşu kullanılarak oluşturulan konjugantlarda endüstriyel özellikleri kodlayan plazmidlerin stabilitesi.....	99
Çizelge 4.9.	Bakteriyosin üretim yeteneğindeki <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşlarının laktik asit üretimi ve proteolitik aktivite düzeyleri.....	101
Çizelge 4.10.	Bakteriyosin üretme yeteneğindeki <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşlarının faj dirençlilik özellikleri.....	102

1. GİRİŞ

Lactococcus (laktokoklar) cinsi üyesi *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* başta fermente süt ürünleri olmak üzere, değişik tip fermente gıdaların üretiminde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadır. Fermentasyon süreçlerinde bu bakteriler, ürünün yapısal ve aromatik özelliklerinin gelişimi ve raf ömrünün uzatılması gibi iki temel fonksiyona sahiptir. Ürünün raf ömrünün uzatılması, söz konusu bakterilerin özellikle süt şekeri laktoz üzerinden hızlı asit üretmeleri ve bakteriyosin sentezleme yetenekleri sayesinde gıda bozulması etmeni ya da patojen mikroorganizmaların gelişimlerinin engellenmesi ile sağlanmaktadır. Şeker fermentasyonu sonucu ortamda asit birikimi, ayrıca ürünün reolojik ve organoleptik özelliklerinin gelişimi üzerinde de kritik bir role sahiptir. Bu süreçte starter kültür suşlarının ürettiği proteinazlar, peptidazlar ve hidrolazlar gibi hidrolitik enzimler yanında, lipazlar ve esterazlar da etkili olmaktadır.

Günümüzde kullanılan modern teknoloji ve kritik kontrol noktalarında engel analizleri (HACCP) gibi güvenlik sistemlerine rağmen, rapor edilen gıda kaynaklı hastalıkların ve intoksikasyonların sayısı artmaktadır. Başta et, süt, deniz ve yumurta ürünleri olmak üzere, tüm temel gıdalar aracılığı ile; *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* ve *Clostridium perfringens* gibi patojen mikroorganizmaların neden olduğu çok sayıda hastalık vakası meydana gelmekte ve özellikle gelişmekte olan ya da gelişmemiş ülkelerde beklenenden yüksek oranda ölümlere yol açmaktadır. Ayrıca, gıda bozulması etmeni bakterilerin faaliyetleri sonucunda tüm dünyada giderek artan miktarlarda gıda tüketilemez hale gelmektedir. Bu durum, gıdaların mikrobiyel patojenlerden ve bozulma etmenlerinden korunmasına özel bir önem kazandırmıştır. Son yıllarda özellikle insan ve çevre sağlığı üzerinde yarattığı olumsuz etkiler nedeni ile, kimyasal katkıları kullanılarak korunan ürünlere karşı tepkiler artmaktadır. Bunun yerine tüketici eğilimi daha doğal ve mikrobiyolojik açıdan güvenli olan ürünler yönünde gelişme göstermektedir. Bu da, alternatif gıda koruma yöntemlerinin geliştirilmesi çalışmalarına hız kazandırmıştır.

İnsan ve çevre sağlığı üzerinde olumsuz etki içermeyen, ancak gıda bozulması ya da gıda kökenli hastalık etmeni olan mikroorganizmalara karşı güçlü bir koruma sağlayan en önemli bileşiklerden biri bakteriyosinlerdir. Bu özellikleri, bakteriyosinleri yoğun araştırmaların odağı haline getirmiştir. Diğer laktik asit bakterileri gibi, laktokoklar da değişik tip bakteriyosinler üretme yeteneğindedir. Yapısal özellikleri ve konakçı etkinlikleri esas alınarak sınıflandırılan ve her geçen gün yeni üyelerin ilave edildiği laktokok bakteriyosinleri içerisinde, gıda katkıları olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosin nisin'dir. Nisin, özellikle peynir, sıvı yumurta ürünleri, düşük asitli konserve gıdalar, çeşitli pastörize süt ürünleri ve salata soslarının mikrobiyel kontaminantlardan korunması amacı ile, 48 ülkede kullanılmaktadır. Son yıllarda gıda endüstrisinde fermente ürünlerin mikrobiyel güvenliğini sağlamak için, bakteriyosinlerin dolaylı kullanımı tercih edilir olmuştur. Bu durumda, fermente gıdaların üretiminde kullanılan starter kültür suşları, diğer endüstriyel özellikleri yanında, bakteriyosin üretme yetenekleri de dikkate alınarak seçilmektedir. Laktokoklarda bu uygulama uzun zamandır yapılmaktadır.

Bakteriyosin üreten suşların doğrudan ya da dolaylı bir şekilde gıda endüstrisinde kullanımının artması, bakteriyosin üretme yeteneği yüksek ya da konakçı spektrumu geniş yeni bakteriyosin üreticilerinin tanımlanması ile mümkün olacaktır. Bu gereksinim doğrultusunda tasarlanan tezde, Türkiye kökenli laktokok suşlarında bakteriyosin üretim özelliğinin belirlenmesi, üretilen bakteriyosinlerin biyokimyasal ve genetik doğasının tanımlanması amaçlanmıştır. Tez kapsamında ayrıca, bakteriyosin üreticisi suşların; laktik asit üretimi, proteolitik aktivite ve faj dirençlilik gibi diğer endüstriyel özelliklerinin de araştırılarak, starter kültür potansiyellerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Lactococcus* Cinsi ve Bu Cins Ait Türlerin Özellikleri

Nükleik asit hibridizasyonu, karşılaştırmalı serolojik çalışmalar, lipit kompozisyonu ve hücre duvarı kimyasal yapısının belirlenmesi sonucu elde edilen veriler ışığında *Streptococcus* cinsinden ayrılan bazı türler, *Lactococcus* cinsi altında sınıflandırılmıştır (Schleifer *et al.* 1985).

N grup streptokokların hareketsiz üyelerini içeren laktokoklar; *L. lactis*, *L. raffinolactis*, *L. garriviae*, *L. piscium* ve *L. plantarum* olmak üzere beş türe sahiptir (Schleifer *et al.* 1985, Williams *et al.* 1990, Holler and Steele 1995). Laktokoklar; Gram-pozitif, katalaz negatif, kemoorganotrof, fakültatif anaerob, hareketsiz ve endospor oluşturmeyen bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Gelişmeleri için başta azot kaynakları olmak üzere çok sayıda besin maddesine gereksinim duyan laktokoklar; sıvı besin ortamlarında tek, çift veya kısa zincirler halinde üreme gösterirler. Hücre çiftlerinin temas yönünde uzaması, morfolojik tanımlamada laktobasiller ile karıştırılmalarına yol açmaktadır. Sferik ve ovoid şekilli olan hücreler, ortalama 0.5-1.2 x 0.5-1.5 µm boyutlarındadır. N grup antisera ile aglutine olmayan nadir suşlar hariç, tümü N grup antijen içermektedir. Homofermentatif özellikte olan laktokoklar, karbonhidrat katabolizması sonucu ana ürün olarak L (+) laktik asit üretmektedir. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C'dir. 10 °C'nin altında ve 45 °C'nin üzerinde gelişememe özellikleri ile hem streptokoklardan hem de enterokoklardan ayrılırlar. β-hemolitik reaksiyon göstermemektedirler. Bazı *L. lactis* subsp. *lactis* suşları zayıf α-hemolitik zon oluşturmaktadır (Schleifer 1987, Holt *et al.* 1994, Boumerdassi *et al.* 1997).

Laktokoklarda hücre duvarında yer alan temel glikolipit Glc(α1-2)Glc(α1-3)acyl₂Gro yapısındadır. Ancak az miktarda Glc(α1-2),acyl₆Glc(α1-3)acyl₂Gro'da bulunmaktadır. Bütün suşlar fosfatidilgliserol ve kardiolipin içermektedir. Lipotaykoik asit yapısı ve aminofosfolipitlerin meydana gelişi ise, cins'ten çok türe özgü özelliklerdir (Schleifer *et al.* 1985, Holler and Steele 1995, Erlandson and Batt 1997).

L. lactis türü; *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* olmak üzere üç alt tür ve bir biyovaryete içermektedir. Peynir, tereyağı, krema ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanımlarından dolayı *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* büyük ekonomik öneme sahiptir (Schleifer *et al.* 1985, Boumerdassi *et al.* 1997).

L. lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* sitrat fermentasyonu sonucu diasetil ve asetoin üretme özelliği ile *L. lactis* subsp. *lactis* 'den ayrılmaktadır. Sitrat fermentasyonu yeteneğinin plazmid kodlu bir özellik olması nedeniyle; bu suşlar *L. lactis*'in bir alt türü değil, *L. lactis* subsp. *lactis*'in biyovaryetesi olarak tanımlanmıştır (Schleifer *et al.* 1985, Mundt 1986). *L. lactis* subsp. *cremoris* ise; arjinini hidrolize edememesi, riboz ve maltoz fermentasyonu yeteneklerini içermemesi (Schleifer and Kilpper-Bälz 1987), % 4 NaCl varlığında, % 0.1 metilen mavisi içeren sütte, pH 9.2'de ve 40 °C inkübasyon sıcaklığında gelişme gösterememesi ile *L. lactis* subsp. *lactis*'ten ayrılmaktadır (Stiles and Holzapfel 1997).

Son yıllarda *L. lactis* alt türlerinin sınıflandırılmasında; plazmid profilleri (Davies *et al.* 1981), restriksiyon endonükleaz haritaları (Köhler *et al.* 1991, Desmaures *et al.* 1998) ve polimeraz zincir reaksiyonlarına dayalı DNA polimorfizmi (Cancilla *et al.* 1992, Conconcelli *et al.* 1995, Başaran *et al.* 2001, Samarzija *et al.* 2002, Delgado and Mayo 2004) gibi modern analiz teknikleri kullanılmaya başlanmıştır.

L. lactis suşları da, diğer laktokok türleri gibi evrimsel pozisyonları ile patojenik cinslerden ayrılmaktadır. Tüm laktokok türleri insan ve hayvan tüketimine güvenilir (GRAS) mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. Kronik ya da enfeksiyöz tipte hastalık etmeni üyeleri bulunmamaktadır (Teuber 1990, Holt *et al.* 1994, Erlandson and Batt 1997, Forde and Fitzgerald 2003).

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

Laktokokların; süt şekeri laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmaları, kazein hidrolizi (proteolitik aktivite), faj dirençlilik düzeyleri, sitrattan diasetil oluşturmaları (yalnız *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), ekzopolisakkarit ve bakteriyosin üretim yetenekleri, bu bakterilerin süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanımlarına esas teşkil eden özellikleridir. Pek çok laktokok suşunda bu endüstriyel özellikler plazmidler tarafından kodlanmaktadır (Gasson and Davies 1984, von Wright and Sibakov 1993, Hill and Ross 1998).

L. lactis suşlarında ana metabolik yol şekerlerin laktik asite glikolitik değişimidir. *L. lactis* suşları normal gelişme koşulları altında, şekerleri homolaktik fermentasyon yolu ile L-laktat'a metabolize eder (van Asseldonk *et al.* 1993). Laktoz, fosfotransferaz sistemi tarafından hücre içine alınır ve ilk aşamada laktoz-6-fosfata dönüştürülür. Laktoz-6-fosfat, fosfo- β -galaktozidaz enzimi tarafından glukoz ve galaktoz-6-fosfata hidrolize edilir. Bu ara bileşikler sırasıyla glikoliz ve tagatoz-fosfat yolu ile triyoz-fosfata metabolize edilir. Triyoz-fosfat, son aşamada laktik asidin oluşturulacağı piruvata dönüştürülür (Vaughan and De Vos 1994). *L. lactis* suşlarında yukarıda özetlenen laktoz metabolizmasını yöneten temel enzimler, genellikle büyük konjugatif özellikte plazmidler tarafından kodlanmaktadır (Gasson *et al.* 1992, Godon *et al.* 1994, Gasson *et al.* 1995, Akçelik 1998, De Vos and Hugenholtz 2004).

Sütte bulunan proteinlerin yaklaşık % 80'ini kazeinler oluşturmaktadır. Laktokokların hücre zarında bulunan proteinazlar yardımıyla kazeinleri hidrolize etmeleri, gelişmeleri için gerekli olan amino asitlerin sağlanmasında ilk aşamadır (Pritchard and Coolbear 1993). Kazein hidrolizi sonucu oluşan ürünler (küçük peptitler ve amino asitler) starter kültürler için önemli besin kaynağı oluşturmanın yanında peynirlerin olgunlaşması sırasında aroma ve tat gelişiminde de anahtar rol oynamaktadır (Visser 1993). Diğer yandan, belirli peptitler peynirlerde istenmeyen aroma ve tat gelişimine de neden olabilmektedir (Chopin 1993, Flambard *et al.* 1998). Laktokokkal proteinazlar, laktosepinler olarak adlandırılmaktadır (Reid and Coolbear 1998). Laktokoklarda; α_{s1} -

β -, ve κ -kazein'in parçalanma ürünleri esas alınarak P_I ve P_{III} olmak üzere iki özel proteinaz aktivitesi tanımlanmıştır (Visser *et al.* 1986, Poolman *et al.* 1995). P_I tip proteinaz β -kazein'i parçalarken, P_{III} tip proteinaz hem α _{s1} hem de β -kazein'i parçalamaktadır (Trieu-Cuot and Courvalin 1983, Visser *et al.* 1986). P_I tip proteinaz, κ -kazein'in parçalanmasında P_{III} tip proteinaz'a göre daha az aktiftir (Exterkate and de Veer 1987). *L. lactis* suşlarında her iki tip proteinazın da kromozomal DNA ve değişik moleküler ağırlıkta plazmidler tarafından kodlandığı belirlenmiştir. Proteinaz negatif varyantlar, doğal koşullarda da meydana gelebilmekte ve bu tip varyantların kullanımı halinde sütün koagülasyonu için 48 saatten daha uzun bir süre gerekmektedir (Kok 1996, Flambard *et al.* 1997, Flambard and Juillard 2000).

Süt fermentasyonlarının doğası gereği tam anlamı ile aseptik koşulların sağlanamayışından dolayı faj kontaminasyonları yaygın bir şekilde meydana gelmekte ve fajların duyarlı kültürleri parçalaması sonucu, ürünün kalite ve miktarı olumsuz yönde etkilenmektedir (Garvey *et al.* 1995). Ortalama bir faj kontaminasyonu; ürün kalitesini etkilemesi dışında, bir üretim devresinde yaklaşık % 15-20 oranında ürün kaybına yol açmaktadır (Daly *et al.* 1996). *L. lactis* suşlarında bugüne kadar saptanan doğal faj dirençlilik sistemleri, etki tipine göre dört ana grupta toplanmıştır. Bunlar; faj adsorpsiyonunun engellenmesi, faj DNA'sının hücre içine enjeksiyonunun inhibisyonu, restriksiyon/modifikasyon sistemleri ve abortif enfeksiyon mekanizmaları olarak tanımlanmaktadır (Klaenhammer 1984, Hill 1993, Moineau *et al.* 1997). Faj dirençlilik sistemleri üzerinde yürütülen araştırmalarda temel yaklaşım, fermentasyon ortamlarında fajlar ile sürekli temas halinde olan *L. lactis* suşlarındaki doğal dirençlilik mekanizmalarının tanımlanmasıdır. Bir diğer yaklaşım ise, genetik aktarım ile bu sistemlerin determinantlarının duyarlı starter suşlara aktarımı ve ifadesini esas almaktadır (Moineau *et al.* 1997).

Başta tereyağı olmak üzere, özel fermente süt ürünlerinin ana aroma bileşiklerinden biri olan diasetil, bazı *Leuconostoc* suşları ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* tarafından, sitrat metabolizması sonucu sentezlenmektedir (Hugenholtz and Starrenburg 1992). Sitrat, hücre içine sitrat permeaz enzimi tarafından alınır ve burada sitrat liyaz enzimi yardımı ile asetata ve okzaloasetata katabolize edilir. Okzaloasetat, okzaloasetat

dekarboksilaz enzimi tarafından piruvata dönüştürülür. α -Asetolaktat sintaz (ALS) enzimi piruvattan asetaldehit-tiamin pirofosfat ve α -asetolaktat oluşumunu gerçekleştirir. Son aşamada diasetil, α -asetolaktat'ın kimyasal oksidatif dekarboksilasyonu ile meydana getirilir (Hugenholtz and Starrenburg 1992, Swindell *et al.* 1996). Asetoin ise; diasetilin, diasetil redüktaz enzimi aracılığı ile redüksiyonu ya da oksidatif olmayan dekarboksilasyonu yolu ile oluşturulur (Hugenholtz 1993, Morita *et al.* 1997). Genetik araştırmalar sonucu, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'in tüm suşlarında sitrat metabolizmasının ana enzimi olan sitrat permeaz aktivitesinin 8 kb (kilobaz) büyüklükte bir plazmid tarafından kodlandığı saptanmıştır. Bazı starter kültür suşlarında söz konusu plazmidin kendiliğinden kaybı sorunu, bu plazmidin bakteriyel kromozoma entegrasyonu ile aşılmaya çalışılmaktadır (Morita *et al.* 1997).

L. lactis suşları tarafından üretilen hücre dışı polisakkaritler (EPS); galaktoz, glukoz ve ramnoz monomerlerinin tekrarlarını içeren heteropolisakkaritlerdir. Hücre duvarına gevşek bağlarla bağlanan ekzopolisakkaritleri üretme yeteneğindeki laktokok suşlarının starter kültür olarak kullanılması halinde; pıhtılaşma azalmakta, viskozite artmakta ve süt ürünlerinin yapısal özellikleri gelişmektedir. Diğer yandan, ekzopolisakkaritler üretici suşları zararlı çevresel koşullara karşı korumaktadır. Ekonomik önemlerinden dolayı, çeşitli laktokok suşları tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin yapısı, kompozisyonu, *eps* genlerinin organizasyonu ve baz dizilerinin belirlenmesi gibi çalışmalar son yıllarda büyük bir ivme kazanmıştır (De Vuyst and Degeest 1999, van Kranenburg *et al.* 1999, van Casteren *et al.* 2000).

Laktokokların endüstriyel açıdan önem taşıyan bir diğer özelliği, bakteriyosin üretme yetenekleridir. Bakteriyosinler, gıdaların mikrobiyel kontaminasyonlardan korunmasını esas alan çalışmalarda, özellikle insan ve çevre sağlığı açısından risk taşımaması nedeniyle, büyük önem arz etmektedir (Coakley *et al.* 1997). Geis *et al.* (1983) tarafından yürütülen çalışmalarda, laktokok suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında; konakçı spesifiteleri, sıcaklık ve pH optimumları, enzim uygulamalarına karşı gösterdikleri aktivite özellikleri, moleküler büyüklükleri ve amino asit dizilimleri esas alınmıştır. Bu kriterlere göre laktokok bakteriyosinleri; laktokoksinler, diplokoksin, lantibiyotikler ve laktoztrepsinler olmak üzere dört gruba

ayrılmıştır. Söz konusu bakteriyosinlerin genetik ve biyokimyasal doğası üzerinde yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Özellikle bakteriyosinlerin etkinlik mekanizmalarının ve genetik determinantlarının tespiti starter kültür geliştirme programları açısından büyük önem taşımaktadır. Zira bu programlarda, bir yandan geniş etki spektrumuna sahip bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanım olanakları araştırılırken, diğer yandan plazmid ya da kromozomal DNA kökenli bakteriyosin genlerinin genetik aktarımı ve stabilizasyonu sağlanmaya çalışılmaktadır (Nettles and Barefoot 1993, Coakley *et al.* 1997).

2.3. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen antibakteriyel etkiye sahip, protein ya da proteinlerle birlikte bazı yan gruplar da içerebilen metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Tagg *et al.* 1976, Klaenhammer 1993, Jack *et al.* 1995). Bu tanımdan hareketle bir çok kaynakta bakteriyosinler ile antibiyotikler karıştırılmaktadır. Ancak bakteriyosinler ile antibiyotikler arasında temel farklılıklar bulunmaktadır. Söz konusu farklılıklar aşağıdaki maddeler halinde özetlenebilir;

1. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen ürünlerdir, antibiyotikler ise enzimatik işleme sonucu aktif formlarını kazanırlar.
2. Bakteriyosinler, antibiyotiklere göre çok daha dar etki spektrumlarına sahiptir.
3. Her bakteriyosinin kendi bağışıklık proteini vardır. Bu bağışıklık proteinlerini kodlayan genler, bakteriyosinlerin yapısal genleri ile bağlantılıdır. Antibiyotik bağışıklığını yöneten genetik determinantlar ise, yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir.
4. Bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilir ve iki bileşenli bir sistem tarafından regüle edilir. Antibiyotikler ise, gelişimin durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Nes *et al.* 2002).

Bakteriyosin sentezleme yeteneğine sahip bakteriler incelendiğinde, oldukça geniş bir yelpaze ile karşılaşılmaktadır. Başta *Lactobacillus* ve *Lactococcus* olmak üzere

Staphylococcus, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsi bakterilere ait pek çok tür, bakteriyosin üretme yeteneğine sahiptir (Gorris 1996).

Laktokokkal bakteriyosinlerin tanımlanmasında kullanılan ve daha önce söz edilen tüm kriterler, diğer bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında da kullanılmaktadır. Bu kriterlere göre, Gram-pozitif bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler dört grup altında toplanmıştır. Gram-negatif bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler, bu sınıflandırmada yer almamaktadır. Zira Gram-negatif bakterilerin ürettiği bakteriyosinler ayrı bir sınıf olarak kabul edilmektedir (Klaenhammer 1993, Nes *et al.* 1996, Ennahar *et al.* 2000).

2.3.1. Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler

2.3.1.1. Grup I bakteriyosinler

Lantibiyotikler olarak da adlandırılan bu grup içerisinde yer alan bakteriyosinler, translasyon sonrasında modifiye edilen küçük peptitleri içermektedir. Bu bakteriyosinler lantionin ve β -metillantionin gibi modifiye olmuş tioether amino asitleri ve dehidroalanin ve dehidrobutirin gibi α ve β doymamış amino asitleri içermeleri ile karakterize edilirler. Grup I bakteriyosinlerin moleküler ağırlıkları 1.9 kDa ile 4.6 kDa arasında değişmektedir (Oscariz and Pisabarro 2001, O'Sullivan *et al.* 2002a).

Lantibiyotikler grubuna dahil bakteriyosinler, olgunlaşmış peptitlerin amino asit kompozisyonu esas alınarak 6 kategoriye ayrılmıştır. Söz konusu kategoriler; nisin alt grubu (nisin A ve nisin Z), laktisin 481 alt grubu (laktisin 481 ve laktisin J49), laktisin 3147 alt grubu (Plw β ve Ltn A2), mersaisin alt grubu (plantarasin C, Ltn A1 ve Plw α), sitolisin alt grubu (CylL1 ve CylL2) ve laktosin S alt grubu adını almaktadır (Twomey *et al.* 2002).

2.3.1.2. Grup II bakteriyosinler

Grup II bakteriyosinler; 10 kDa'dan küçük, genelde ısı stabil ve translasyon sonrasında modifiye olmayan bakteriyosinleri içeren oldukça geniş bir gruptur. Grup II bakteriyosinler, IIa ve IIb olmak üzere iki alt grup altında toplanmaktadır (Ennahar *et al.* 2000).

IIa alt grubu bakteriyosinler, *Listeria* türlerine karşı aktivite gösteren pediosin benzeri bakteriyosinlerdir. Bu bakteriyosinlerin N-uç bölgelerinde yer alan YGNGV-C dizisi ve peptit ortasında yer alan disülfid köprüsü oluşturmuş iki sistein amino asidi evrimsel süreçte korunmuştur. Pediosin PA-1 (AcH), leukosin A, sakasin A, sakasin P ve enterosin A, IIa alt grubu üyesi bakteriyosinlerdir (Nes *et al.* 1996, Callewaert *et al.* 1999, Ennahar *et al.* 2000, O'Sullivan *et al.* 2002a).

IIa alt grubuna dahil bakteriyosinlerin ve dolayısı ile bu bakteriyosinlerin üreticisi olan bakterilerin *Listeria* türlerine karşı gösterdikleri yüksek antibakteriyel etki, biyokoruyucu olarak kullanımlarını esas alan çalışmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Son yapılan araştırmalar; IIa alt grubu bakteriyosinlerin, anti-listeriyal ajanlar olarak, nisin gibi grup I üyesi bakteriyosinlerden daha etkili olduklarına işaret etmektedir. Ancak, bu grup bakteriyosinler nisin kadar geniş aktivite spektrumu göstermemektedir (Ennahar *et al.* 1999, Nes *et al.* 2002).

IIb alt grubu bakteriyosinler, laktokoksin G, laktokoksin F ve laktasin F'nin dahil olduğu iki bileşenli (iki peptitli) bakteriyosinleri içermektedir. Bu grupta bulunan bakteriyosinlerin en önemli özelliği, tam aktivite gösterebilmeleri için her iki peptite de ihtiyaç duymalarıdır (Nes *et al.* 2002). Bu peptitler, tek tek oldukça zayıf inhibisyon aktivitesi gösterirken, aynı ortamda olduklarında sinerjetik etkileşim sonucu çok daha aktif moleküller haline gelmektedir (Fimland *et al.* 1996, Nes *et al.* 2002, Ramnath *et al.* 2004).

2.3.1.3. Grup III bakteriyosinler

Grup III bakteriyosinler, yüksek moleküler ağırlığa sahip ve ısıya duyarlı proteinlerden oluşmaktadır. Bu grupta yer alan bakteriyosinlerin büyük bir kısmı *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından sentezlenmektedir. Helvetisin J, laktisin A, laktisin B, helvetisin V-1829 ve enterolislin A bu grubun en bilinen üyeleridir. Grup III üyesi bakteriyosinlerin çoğu ısı duyarlı proteinler olmasına rağmen, helvetisin J gibi ısı stabil üyeleri de bulunmaktadır (Klaenhammer 1993, Ennahar *et al.* 2000, O'Sullivan *et al.* 2002a, Trotter *et al.* 2004).

2.3.1.4. Grup IV bakteriyosinler

Dördüncü grup altında sınıflandırılan bakteriyosinler, polipeptit yapısı dışında, lipoprotein veya glikoprotein gibi ilave bazı yapılar içermeleri ile karakterize edilmektedir. Plantarasin S, laktosin 27 ve leukonosin S bu gruba dahil bazı bakteriyosinlerdir (Klaenhammer 1993, Nes *et al.* 1996, Ennahar *et al.* 2000, Nes and Holo 2000). Bu sınıflandırma, bakteriyosin aktivitesinin protein dışı yan gruplardan da kaynaklanabileceğine işaret eden sınırlı sayıda literatür verisi esas alınarak yapılmıştır. Ancak, yan grupların bakteriyosin aktivitesi hiçbir araştırmada kesin bir şekilde tanımlanamamıştır (Oscariz and Pisabarro 2001, Madera *et al.* 2003).

2.3.2. Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler

2.3.2.1. Diplokoksin

Laktokoklarda tanımlanan ilk protein benzeri inhibitör madde diplokoksindir. Diplokoksin üreticisi suşlar; laktokoklarda bakteriyosin üretiminin genetik doğası ve bağışıklık proteinlerinin detaylı bir şekilde incelenmesi için model sistem olmuştur. *L. lactis* subsp. *cremoris* suşları tarafından üretilen diplokoksin; tripsin, pronaz ve α -kemotripsin enzimlerine duyarlı 5300 Da büyüklüğünde bir peptittir. Söz konusu peptit saflaştırıldığı zaman, stabilitesini kaybetmektedir. Diplokoksin, laktokok suşları üzerine

güçlü bakterisidal etkiye sahiptir. Bu bakteriyosinle muamele edilen hücrelerde DNA ve RNA sentezi hızlı bir şekilde durmakta ve hücre lizisi olmaksızın ölüm meydana gelmektedir. Moleküler büyüklüğü, ısı stabilitesi ve bakterisidal etkisi nedeniyle, diplokoksinin membrana etkili bir bileşik olduğu düşünülmektedir (Davey and Richardson 1981, Klaenhammer 1993).

Konjugal aktarım çalışmalarında diplokoksin üretme yeteneği içermeyen alıcı suşlar kullanılmak suretiyle, diplokoksin üretici suşlardan bakteriyosin üretiminin aktarımı sağlanmış ve plazmid doğası tanımlanmıştır. Özellikle *L. lactis* subsp. *cremoris* 346 suşunda tespit edilen ve diplokoksin üretimi/dirençlilik genlerini taşıyan 81 kb büyüklükteki konjugatif plazmid, starter kültür geliştirme programlarında kullanılmaktadır. Dar konakçı spektrumu, bu bakteriyosinin gıda koruma ajanı olarak kullanımını engellemektedir (Sahl and Bierbaum 1998, Twomey *et al.* 2002).

2.3.2.2. Laktokoksinler

Laktokoksinler, *L. lactis* suşları tarafından üretilen, primer bakterisidal aktiviteyi diğer laktokoklara karşı gösteren ısı stabil peptitlerdir. Bu grup bakteriyosinlerin en bilinen üyeleri laktokoksin A ve laktokoksin B'dir (van Belkum *et al.* 1989, Holo *et al.* 1991, Stoddard *et al.* 1992, Klaenhammer 1993).

2.3.2.2.1. Laktokoksin A

Bazı *L. lactis* suşları tarafından üretilen laktokoksin A, dar bir etki spektrumu içermektedir (van Belkum *et al.* 1989, Stoddard *et al.* 1992). Biyokimyasal analizler sonucu laktokoksin A'nın (Lcn A) 54 amino asit içeren hidrofobik bir peptit olduğu saptanmıştır. Lcn A primer etkisini sitoplazmik membran üzerinde göstermektedir (Holo *et al.* 1991). Hücre içi iyonların dışarı sızması ve proton itici gücün azalmasına yol açarak, *L. lactis* hücrelerinde sitoplazmik membranın geçirgenliğini değiştirebildiği gösterilmiştir. Laktokoksin A, sağlam hücrelerde veya membran vesiküllerinde bölge spesifitesi içermektedir. Bu spesifitenin lipozomlarda tanımlanmaması, laktokoksin

A'nın hedefi tanınması ve hedef yapı üzerinde aktivite gösterebilmesi için özel bir membran reseptörüne gereksinim duyduğu görüşünü güçlendirmektedir (Klaenhammer 1993).

Laktokoksin A üreticisi *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG 2130 suşunda yapılan genetik analizler sonucunda, bakteriyosin üretimi ve dirençliliğini kodlayan genlerin 55 kb büyüklükteki bir plazmid üzerinde yer aldığı belirlenmiştir (Holo *et al.* 1991, Klaenhammer 1993).

2.3.2.2.2. Laktokoksin B

Laktokoksin B, *L. lactis* subsp. *cremoris* 9B4 suşu tarafından üretilmektedir. Genetik analizler, bu bakteriyosinin sentezinin p9B4 olarak adlandırılan plazmid üzerinde yer alan ve 1.2 kb büyüklükte olan bir bölge tarafından kodlandığını göstermiştir (Nettles and Barefoot 1993). Hidrofobik bir bakteriyosin olan laktokoksin B, duyarlı laktokok suşlarının membran vesiküllerinde porlar açmaktadır. Duyarlı hücrelerde oluşan porlar, öncelikle proton itici güçte kayba neden olmaktadır. Daha sonra hücre içi iyonların ve amino asitlerin (yüksek laktokoksin B konsantrasyonunda özellikle glutamatın) hücre dışına kontrolsüz akışı meydana gelmektedir (Venema *et al.* 1993). Laktokoksin B'nin aktivitesi, bakteriyosindeki tek sistein kalıntısının (Cys-24) redüklenmesine bağlıdır. Tiol-aktif toksinler ile benzerlik gösteren bu aktivite, laktokoksin B'yi mekanik olarak laktokoksin A'dan ayırmaktadır. Sistein kalıntısı redüklenmesinin, membran reseptörünü tanımaya yol açtığı veya bakteriyosinin por oluşturmasını teşvik ettiği düşünülmektedir (Klaenhammer 1993).

2.3.2.2.3. Laktokoksin MN

Laktokoksin MN, laktokoksin M ve laktokoksin N alt ünitelerinden oluşan iki peptitli bir bakteriyosindir. Laktokoksin M alt birimi 48 amino asit, laktokoksin N alt birimi ise 47 amino asit içermektedir. Bu bakteriyosinin üretimi, *L. lactis* subsp. *cremoris* 9B4

suşunun içerdiği p9B4 plazmidinin 1.8 kb'lık fragmenti tarafından kodlanmaktadır (Nettles and Barefoot 1993, Nes and Holo 2000).

2.3.2.2.4. Laktokoksin G

Laktokoksin G, ilk kez Nissen-Meyer *et al.* (1992) tarafından *L. lactis* LMG 2081 suşundan izole edilmiştir. Bakteriyosin, α ve β olarak adlandırılan iki alt birim içermektedir. α alt birimi 39 amino asitten, β alt birimi ise 35 amino asitten meydana gelmiştir (Nes and Holo 2000). Laktokoksin G, duyarlı hücrelerde ATP konsantrasyonunu düşürmekte, membran potansiyellerinin değişimine yol açmakta ve amino asit birikimini engellemektedir. Bu kombine etkiler sonucu hücreler normal yaşam faaliyetlerini sürdüremez hale gelmektedir. Laktokoksin G'nin antibakteriyel etki mekanizmasına ait yukarıdaki veriler doğrultusunda, araştırmacılar bu bakteriyosinin birincil hedefinin hücre membranı olduğunu ve burada özellikle K^+ porları meydana getirdiğini ileri sürmüştür (Moll *et al.* 1996, McAuliffe *et al.* 2001). Bu bakteriyosin, pH değişimine karşı yüksek düzeyde direnç göstermektedir (McAuliffe *et al.* 2001).

2.3.2.2.5. Laktokoksin 972

L. lactis subsp. *lactis* IPLA 972 tarafından üretilen laktokoksin 972, içerdiği iki peptidin zayıf bağlı homodimer halinde bulunduğu bir bakteriyosindir. Bakteriyosin, 50 °C ısı işlem veya asidik pH uygulaması sonucu kolaylıkla monomerlerine ayrılmaktadır. Ayrılan monomerler antibakteriyel aktivite gösterememektedir (Martinez *et al.* 1996). Laktokoksin 972, şimdiye kadar söz edilen bakteriyosinlerden farklı olarak, hidrofobik özellik içermemektedir (Martinez *et al.* 1999). Laktokoksin 972 ile muamele edilen duyarlı hücrelerde, sitoplazmik içerikte sızma ve makro moleküllerin (DNA veya RNA) sentezinde önemli bir azalma tanımlanmamıştır (González *et al.* 1996, Martinez *et al.* 1996, Martinez *et al.* 1999).

Martinez *et al.* (2000) laktokoksin 972'nin hücre duvarı metabolizması üzerine etkisini belirlemek için; bakteriyosin ile muamele edilen hücreleri elektron mikroskopunda

incelemiş ve hücre şekillerinde büyük değişimlerin meydana geldiğini belirlemiştir. Yapılan çalışmada kontrol olarak kullanılan, bakteriyosin ile muamele edilmemiş hücreler; tipik küresel şekilli ve kısa zincirler halinde tanımlanmıştır. Bakteriyosin ile muamele edilen hücreler ise; uzamış, düzensiz basil benzeri formlar halinde tespit edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin pek çoğu, beklenildiği gibi erken eksponensiyel fazda bölünürken; bakteriyosin ilavesini takiben, bölünme sürecinin başlangıcında bloke olan hücre sayısında artış olduğu saptanmıştır. Laktokoksin 972 ilave edilerek iki saatten fazla inkübasyona bırakılan bakteri hücrelerinde ise hücre parçalanması meydana gelmiştir.

2.3.2.2.6. Laktokoksin MMFII

Laktokoksin MMFII, Tunus'ta üretilen geleneksel bir fermente süt ürününden izole edilen *L. lactis* MMFII suşu tarafından sentezlenmektedir. Bu bakteriyosin 80 °C'de ve 100 °C'de 30 dakika ısı uygulaması sonucu, sırasıyla % 42 ve % 75 oranında aktivite kaybına uğramaktadır. Laktokoksin MMFII, pH 5.0-8.0 arasında tam aktivite gösterirken, daha düşük ve yüksek pH'larda aktivitede önemli oranda azalma olmaktadır. Laktokoksin MMFII'nin inhibitör etkisi proteinaz K, tripsin ve papain enzimleri ile tamamen kaybolurken; glukoamilaz, lipaz, α -amilaz ve lizozim enzimlerinden etkilenmemektedir. 37 amino asit içeren polipeptidin, 9. ve 14. pozisyonunda iki adet sistein bulunmaktadır. Bakteriyosinin moleküler ağırlığı 4144.6 Da'dur. Laktokoksin MMFII N-uç bölgesinde YGNGV konsensüs serisi içermesi ve *Listeria*'ya karşı aktivite göstermesinden dolayı, IIa alt grubu bakteriyosinlere dahil edilmiştir (Ferchichi *et al.* 2001, Vaughan *et al.* 2004).

2.3.2.3. Lantibiyotikler

Lantibiyotikler, tioether amino asitler olan lantionin ve β -metillantionin tarafından meydana getirilen intramoleküler halkalar içeren ve translasyon sonrası modifikasyonlar ile aktive edilen peptitlerdir. *L. lactis* subsp. *lactis* suşu tarafından üretilen nisın en

bilinen lantibiyotiktir (Jung and Sahl 1991, Sahl and Bierbaum 1998, McAuliffe *et al.* 2001, Twomey *et al.* 2002, Nes and Johnsborg 2004).

2.3.2.3.1. Nisin

Nisin 1947 yılında Mattick ve Hirsch tarafından izole edilmiş, tanımlanmış ve isimlendirilmiştir. Nisin polipeptidi 34 amino asit içermekte ve bu amino asitler arasında 5 tioether bağı bulunmaktadır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 3500 Da'dur (Gross and Morell 1967, Gross 1977). Üretim ortamlarında monomer yapıdan çok, 7000 Da moleküler ağırlığında iki aynı monomerden meydana gelen bir dimer halinde saptanmaktadır (Jarvis *et al.* 1968). pH 2.0-10.0 gibi geniş pH aralığında aktivite gösterebilen nisin, 121 °C'de 15 dakika ısıtılma dayanıklı, α -kemotripsin ve proteinaz K uygulamasına karşı ise duyarlıdır (De Vuyst and Vandamme 1994). Nisinin; nisin A, nisin Z ve son yıllarda izole edilen nisin Q olmak üzere üç doğal varyantı bulunmaktadır (Mulders *et al.* 1991, Zendo *et al.* 2003). Nisin A ve nisin Z, polipeptidin 27. pozisyonundaki bir amino asitin değişmesi sonucu farklılaşmıştır. Bu pozisyonda nisin A histidin amino asiti içerirken, nisin Z asparajin amino asiti içermektedir (Mulders *et al.* 1991). Nisin A ve nisin Q, polipeptit zincirindeki dört amino asitin değişimi sonucu farklılaşmıştır. Nisin Q, nisin A'dan; polipeptidin 15. pozisyonundaki alanin yerine valin, 21. pozisyonundaki metiyonin yerine lösin, 27. pozisyonundaki histidin yerine asparajin ve 30. pozisyonundaki izolösin yerine valin amino asitlerini içermesi ile ayrılmaktadır. Nisin A ile nisin Q arasında tanımlanan bu farklılıklar, 27. pozisyonda yer alan asparajin hariç (bu amino asit nisin Z ve nisin Q'da ortaktır), nisin Z ile nisin Q arasında da ortaktır (Zendo *et al.* 2003).

L. lactis subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin, letal etkisi ve geniş aktivite spektrumu nedeniyle en çok çalışılan ve halen doğal gıda koruyucusu olarak kullanılan tek bakteriyosindir (Hurst 1981, Delves-Broughton *et al.* 1996, Zendo *et al.* 2003). Bu bakteriyosin, *L. lactis* subsp. *cremoris* gibi yakın akraba türlere ilave olarak, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *S. aureus* ve *Streptococcus* türlerinin de dahil olduğu geniş bir konakçı spektrumunda inhibisyon

etkisi göstermektedir (Mattick and Hirsch 1947, Gowas *et al.* 1952, Mohamed *et al.* 1984, Noonpakdee *et al.* 2003).

Nisin üreticisi *L. lactis* suşları, doğal populasyonlarda oldukça nadir rastlanmaktadır. Bu nedenle nisin üreticisi yeni suşların belirlenmesine yönelik çalışmalar halen sürdürülmektedir. Saptanan nisin üreticilerinin aktivite spektrumlarının tanımlanması ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi ise, gıda koruyucusu olarak kullanımlarına esas teşkil etmektedir. Spelhaug ve Harlander (1989) nisin üreticisi olarak tanımlanan *L. lactis* subsp. *lactis* 11454 suşunun aktivite spektrumunu inceledikleri çalışmalarında; nisinin *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* ve *Staphylococcus aureus* gibi Gram-pozitif bakteri türleri yanında, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* ve *Vibrio parahaemolyticus* gibi Gram-negatif bakteri türlerinin gelişimini de engellediğini tespit etmiştir. Bu çalışma, bazı doğal nisin varyantlarının Gram-negatif bakterilere karşı da etkili olduğunun belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Motlagh *et al.* (1991) tarafından yürütülen benzer bir araştırmada ise; *L. lactis* subsp. *lactis* DL16 suşunun ürettiği nisin yanında, ticari nisin preparatı olan nisaplin'in de Gram-negatif bakterilere karşı inhibisyon etkinliği göstermediği ileri sürülmüştür. Olasupo *et al.* (1999) Afrika'da üretilen değişik fermente gıdalardan izole ettikleri 500 adet laktik asit bakterisi içerisinde yalnız birinin nisin üreticisi olduğunu tespit etmiştir. Wara (bir tür geleneksel Nijerya peyniri) adı verilen fermente süt ürününden izole edilen bakteriyosin üreticisi *L. lactis* BFE 1500 suşunun, hem yakın akraba laktik asit bakterilerine ve hem de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *C. butyricum*, *C. perfringens*, *B. cereus* ve *S. aureus* gibi farklı türlere karşı inhibisyon etkinliği gösterdiği saptanmıştır. Bu suşun kültür ortamlarından saflaştırılan bakteriyosin ile yürütülen çalışmalarında, söz konusu antibakteriyel etkinliğin nisin'den kaynaklandığı belirlenmiştir. Yürütülen ileri analizlerde, BFE 1500 suşunun ürettiği nisin'in ısı stabil (121 °C'de 15 dk.) olduğu ve pH 2.0-10.0 arasında aktivitesini koruduğu kanıtlanmıştır. Nisin aktivitesi özellikle pH 2.0-3.0 arasında optimuma ulaşmaktadır. α -kemotripsin ve proteinaz K uygulaması sonunda ise nisinin antibakteriyel aktivitesi tamamen kaybolmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonunu esas alan genetik analiz çalışmaları, BFE 1500 suşunda nisin operonunun varlığına işaret etmiş ve yapısal genin DNA dizi analizleri sonucunda,

bu suş tarafından üretilen nisinin, nisin Z olduğu belirlenmiştir. Geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan laktokok suşlarının nisin üretim sıklığının tanımlanmasını esas alan ve Noonpakdee *et al.* (2003) tarafından yürütülen araştırmada da, nisin üreticisi suş sıklığının çok düşük olduğu belirlenmiştir.

Nisin, N-uç bölgesi aracılığı ile membrana bağlı hücre duvarı öncüsü lipit II molekülüne bağlanarak peptidoglukan biyosentezini inhibe etmekte ve duyarlı hücre membranlarında por oluşumuna neden olmaktadır (Wiedemann *et al.* 2001, Hechard and Sahl 2002, Hsu *et al.* 2002). Bu porlar, membran geçirgenliğini arttırarak ATP ve amino asitler gibi hücre için yaşamsal öneme sahip olan moleküllerin hücre dışına sızmasına yol açmaktadır (Garcia-Garcera *et al.* 1993, Hechard and Sahl 2002). Yapılan çeşitli araştırmalarda, nisinin duyarlı hücrelere bağlanması ve por oluşturması için, bakteriyosinin N-uç bölgesinin yanında, C-uç bölgesinin de negatif yüklü membran yüzeyi ile etkileşiminin gerekli olduğu belirlenmiştir (Demel *et al.* 1996, Breukink *et al.* 1997, van Kraaij *et al.* 1998, Breukink *et al.* 2003). Duyarlı hücrelerde por oluşumu için 5 ile 8 arasında nisin molekülüne ve aynı sayıda lipit II molekülüne gereksinim vardır (Breukink *et al.* 2003).

Nisin biyosentezi eksponensiyel gelişme fazında meydana gelmektedir. Hücreler durma fazına girdiği zaman ise, nisin üretimi de tamamen durmaktadır (van der Meer *et al.* 1993, Kim *et al.* 1997, Cheigh *et al.* 2002). Değişik çalışmalarda, sakkaroz fermentasyon yeteneği ile nisin üretimi özelliklerini kodlayan gen kümesinin (*nisABTCIPRKFEG*) yakın ilişkili olduğu ve bu genlerin kromozomal DNA'daki konjugatif bir transpozon üzerinde bulunduğu saptanmıştır (Horn *et al.* 1991, Rauch and De Vos 1992, Kuipers *et al.* 1993, Kuipers *et al.* 1995, Immonen and Saris 1998, Olasupo *et al.* 1999, Hsu *et al.* 2002). *nisABTCIPRKFEG* gen kümesi; nisin öncü proteininin (NisA) sentezini, proteinin translasyon sonrası modifikasyonunu, nisin dirençliliği, transkripsiyonel regülasyonu, peptit transferini ve öncü proteinin işlenmesini gerçekleştiren proteinleri kodlamaktadır (Engelke *et al.* 1994, Siegers and Entain 1995, Cheigh *et al.* 2002). İnaktif olan NisA öncü proteini, *nisB* ve *nisC* gen ürünleri ile kimyasal olarak modifiye edilmektedir. Bu kimyasal süreçte serin ve treonin kalıntılarının dehidrasyonu yapılr ve lantibiyotik bakteriyosinlerin karakteristik özelliği

olan tioether köprüleri şekillendirilir (Siegers *et al.* 1996, Sen *et al.* 1999, Koponen *et al.* 2002). Modifiye olan öncü peptit, NisT proteini tarafından taşınır. *nisP* geninin kodladığı proteinaz, 23 amino asitlik lider peptiti bakteriyosin yapısından ayırır (Koponen *et al.* 2002). *nisI* ve *nisFEG* genleri ise; üretici suşta nisin dirençliliğini sağlayan proteinleri kodlamaktadır (Engelke *et al.* 1994, Siegers and Entain 1995, Ra *et al.* 1999, Zendo *et al.* 2003, Pongtharangkul and Demirci 2004).

Nisin biyosentezi iki elemanlı bir sistem (NisRK) tarafından regüle edilmektedir. Hücre dışı olgunlaşmış nisin birikimi kritik seviyeye ulaştığı zaman, hücre membranına bağlı kinaz (NisK) fosforilize edilerek aktif hale geçer. Daha sonra bu fosforil grubu NisR proteinine transfer edilir ve hücre içi yanıtı düzenleyici NisR proteini, *nisABTCIP* ve *nisFEG* genlerinin transkripsiyonunun başlamasını sağlar (Chandrapati and O'Sullivan 1999, Breukink *et al.* 2003, Beasley and Saris 2004).

2.3.2.3.2. Laktisin 3147

Laktisin 3147, ilk kez *L. lactis* subsp. *lactis* DPC3147 suşundan tanımlanan geniş etki spektrumlu bir bakteriyosindir. Laktisin 3147 *Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus* ve *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir (Ryan *et al.* 1996). İki bileşenli bir lantibiyotik bakteriyosin olan laktisin 3147'nin tam biyolojik aktivite gösterebilmesi için her iki yapısal proteine de (LtnA1 ve LtnA2) gereksinim duyduğu belirlenmiştir. Bu bakteriyosin, duyarlı hücrelerin stoplazmik membranları üzerinde porlar açarak, potasyum ve fosfat iyonlarının sızmasına neden olmaktadır. Ancak, ATP gibi büyük moleküller söz konusu porlardan sızmamaktadır. İyonların bu hareketi sonucu membran potansiyeli ($\Delta\psi$) zarar görmekte ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bu mekanizma, dar etki spektrumuna sahip iki bileşenli bakteriyosinler olan laktisin F ve laktokoksin G'nin yol açtığı seçici iyon porlarına benzemektedir (Abee *et al.* 1994, Moll *et al.* 1996, McAuliffe *et al.* 1998).

Laktisin 3147 üretimi ve dirençliliğinin genetik determinantlarının, 60.2 kb büyüklükteki pMRC01 plazmidi üzerinde bulunduğu saptanmıştır (Dougherty *et al.* 1998). Konjugatif karakteri nedeniyle ticari starter kültürlerine bakteriyosin üretimi özelliğinin kazandırılmasında pMRC01 plazmidinden yararlanılmaktadır (Coakley *et al.* 1997, O'Sullivan *et al.* 1998). Günümüzde bu yolla yirmi beş kadar laktisin 3147 üreticisi transkonjugant meydana getirilmiştir (Ryan *et al.* 1996, Coakley *et al.* 1997, O'Sullivan *et al.* 1998). pMRC01 plazmidinde laktisin 3147 üretimi ve dirençliliğinden sorumlu bölge, farklı organize olmuş iki gen kümesi içermektedir. Büyük olan gen kümesinin bakteriyosin üretimi, modifikasyonu ve salınımindan, küçük gen kümesinin ise laktisin 3147 dirençliliğinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Fath and Kolter 1993, Jack *et al.* 1995, McAuliffe *et al.* 1998).

2.3.2.3.3. Laktisin 481

Laktisin 481, bazı *L. lactis* suşları tarafından üretilen ve tek peptit zincirinden oluşan lantibiyotik özellikte bir bakteriyosindir (Piard *et al.* 1992, Rince *et al.* 1994, O'Sullivan *et al.* 2002b). Bu bakteriyosin, son yapılan sınıflandırmada grup I bakteriyosinlerin bir alt grubu olarak değerlendirilmiştir (Twomey *et al.* 2002). Laktisin 481 özellikle *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* olmak üzere laktik asit bakterilerine ve *C. tyrobutyricum* 'a karşı bakterisidal etki göstermektedir (Mackay *et al.* 1996, O'Sullivan *et al.* 2002b). Laktisin 481'in laktokokal starter kültürlerin lizisine sebep olması, peynir üretiminde kullanım olanağı bulabileceğine işaret etmektedir. Zira bu bakteriyosinin starter kültürleri lize etmesi sonucu yardımcı enzimlerin peynir matriksine salınımı, peynirin olgunlaşmasını hızlandırmaktadır (O'Sullivan *et al.* 2002b, O'Sullivan *et al.* 2003).

Laktisin 481'in üretimi, dirençliliği ve transportundan, plazmidler tarafından taşınan altı genin (*lctAMTFEG*) sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Rince *et al.* 1994, Rince *et al.* 1997, Dufour *et al.* 2000, Mills *et al.* 2001, O'Sullivan *et al.* 2002b, Hindré *et al.* 2004). İlk üç gen laktisin 481 biyosentezini yönetmektedir. *lctA*, laktisin 481 öncü peptidini kodlamaktadır. *lctMT* gen ürünleri ise *lctA* proteinini modifiye ederek salgılanmasına

yardımcı olmaktadır (Rince *et al.* 1994, Uguen *et al.* 2000). *LctFEG* genleri de, üretici suşların kendi bakteriyosinlerinden korunmasını sağlayan, dirençlilik proteinlerini kodlamaktadır (Rince *et al.* 1997, Dufour *et al.* 2003, Hindré *et al.* 2004).

2.3.2.3.4. Laktisin FS92

L. lactis subsp. *lactis* FS92 tarafından üretilen laktisin FS92, *Bacillus* ve *Clostridium* türleri ile *L. monocytogenes* 'e karşı inhibitör etki göstermektedir. Enzim uygulamaları sonucu, laktisin FS92'nin; α -kemotripsin, pepsin, pronaz E ve proteinaz K ya karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu bakteriyosin, 100 °C'de 20 dakika veya 121 °C'de 15 dakika ısı uygulamasına karşı dirençlidir. Bakteriyosinin moleküler büyüklüğü yaklaşık 3500 Da olarak tanımlanmıştır (Mao *et al.* 2001).

2.3.2.4. Laktoztrepsinler

Laktoztrepsinler (Las); *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* suşları tarafından üretilen ve sadece asidik pH'larda aktivite gösteren antimikrobiyel proteinlerdir (Kozak *et al.* 1977). Bütün laktoztrepsinler, protein yapılarından dolayı proteolitik enzimlere karşı duyarlıdır (Dobrzanski *et al.* 1982). Las 1 ve Las 2; tripsin, α -kemotripsin, pronaz ve fosfolipaz D ile inaktive olmaktadır (Kozak *et al.* 1977). Las 5; tripsin, α -kemotripsin ile inaktive olurken lipaz ve fosfolipaz D uygulamasından etkilenmemektedir (Zajdel and Dobrzanski 1983). Laktoztrepsinler pH 7.0'de aktivitelerini kaybetmekte, ancak ortam pH'sının asidik değere getirilmesi durumunda inhibitör aktivite tekrar gelişmektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğu pH değişimiyle birlikte aktivitelerinde azalma veya artma göstermelerine rağmen, pH bağımlı aktivitedeki bu açık farklılık başka hiç bir bakteriyosin için tanımlanmamıştır (Klaenhammer 1993). Laktoztrepsin 1; pH 4.2-6.0 arasında optimum aktivite göstermekte, pH 7.0 ve yukarısında ise inaktif forma dönüşmektedir. Laktoztrepsin 2'nin, pH 4.6-5.0 arasında *L. lactis* subsp. *lactis* 60 suşuna karşı optimum inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir. pH 6.0'da söz konusu aktivite azalmakta, pH 7.0 ve yukarısında ise

tamamen kaybolmaktadır. Bütün laktoztrepsinler 100 °C'de 10 dakika ısı uygulamasına dirençlidir. Sadece Las 1 121 °C'de 10 dakika ısı uygulaması sonucu inaktive olmaktadır (Kozak *et al.* 1977, Kozak *et al.* 1978, Bardowski *et al.* 1979, Zajdel *et al.* 1985).

Laktoztrepsin 5 uygulanan duyarlı bakterilerde; ATP, K⁺, Ca⁺² ve Mg⁺² iyonlarının hücre dışına akışının önemli ölçüde stimüle edildiği saptanmıştır. Bununla birlikte; protein, DNA ve RNA gibi makromoleküllerin sentezinde kayda değer bir farklılık belirlenmemiştir. *L. lactis* subsp. *cremoris* 202 suşunda yürütülen mutasyon testleri sonucu, söz konusu bakteriyosinin kromozomal DNA tarafından kodlandığı tespit edilmiştir (Klaenhammer 1993).

2.4. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları

Günümüzde gıda katkı maddesi olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosin nisin'dir. Applin-Barret firması tarafından üretilen bu ticari preparat, Nisaplin ticari adıyla piyasada satılmaktadır (Delves-Broughton 1990, O'Sullivan *et al.* 2002a). Gıdaların korunmasında bakteriyosinlerin kullanımını esas alan alternatif bir yaklaşımda, bakteriyosin üreticisi canlı kültürlerin kullanımınıdır. Bu yaklaşımda bakteriyosin üreticisi suşların; starter kültürler ya da starter kültür karışımlarının bir parçası olarak kullanımı veya bu suşların mamul gıdalara ilave edilmesi önerilmektedir (O'Sullivan *et al.* 2002a).

Son on yılda çok sayıda bakteriyosin tanımlanmış olmasına rağmen, bu bakteriyosinlerin içerdiği dar inhibisyon spektrumları yanında, ısıl stabilitelerinin ve çözünürlüklerinin gıda sistemlerine uygun olmaması, ticari uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Genelde gıda uygulamaları için bakteriyosin üreticisi suş seçiminde takip edilen kriterler şunlardır;

1. Üretici suş tercihen GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir kabul edilen özelliklere sahip) olmalıdır.
2. Bakteriyosin *L. monocytogenes* ve *C. botulinum* gibi patojenlerin dahil olduğu geniş bir aktivite spektrumuna sahip olmalıdır.
3. Bakteriyosin ısı stabil olmalıdır.
4. Bakteriyosinin, tüketici sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olmamalıdır.
5. Üründe güvenlik, kalite ve aroma bileşenlerinin geliştirilmesi gibi yararlı etkileri olmalıdır (Holzapfel *et al.* 1995, O'Sullivan *et al.* 2002a, Horn *et al.* 2004).

2.4.1. Peynir ve süt ürünleri

Peynirlerde nisin kullanımının temel amacı; peynir üretiminde ve olgunlaşması sırasında ciddi problemlere neden olan *L. monocytogenes* kontaminasyonlarından korunmaktır (Delves-Broughton 1990). Günümüzde nisin üreticisi starter kültürlerinin, çiğ sütün mL'sinde 10^3 oranına kadar *L. monocytogenes* bulunması halinde bile, peynir üretiminde tam bir koruma sağladığı bilinmektedir (Maisnier-Patin *et al.* 1992).

Laktisin 3147 üretici suşları, Cottage peynirinin ve doğal yoğurtların korunmasında *L. monocytogenes* ve *B. cereus* suşlarına karşı kullanılmaktadır (Morgan *et al.* 1999, Scannell *et al.* 2000). Laktisin 3147 üreticisi kültürler, Cheddar peynirlerinde starter kültür suşu özelliği taşımayan laktik asit bakterilerinin (NSLAB) gelişimini tamamen inhibe etme yeteneklerinden dolayı, peynir kalitesinin standardizasyonuna yardımcı olmaktadır (Ryan *et al.* 1996, Fenelon *et al.* 1999). Starter kültür özelliği taşımayan laktik asit bakterileri; bazen kalsiyum laktat kristallerinin oluşumuna, aroma bileşiklerinin ve ürünün fiziki yapısının gelişiminin bozulmasına yol açmaktadır (McAuliffe *et al.* 1999).

Laktokoksin A, B ve M, sadece tür içi etkinlik gösteren laktokok bakteriyosinleridir. Söz konusu bakteriyosinlere karşı duyarlı starter kültür suşlarının Cheddar peyniri üretiminde kullanımı, ürünün yapısal ve aromatik özelliklerinin oluşumunun (olgunlaşma) hızlandırılmasında etkin bir yöntemin uygulanmasını olası kılmıştır. Buna

göre laktokoksinlere duyarlı starter kültür suşları, fermentasyon sürecinin belirli bir aşamasında laktokoksinler aracılığı ile parçalanmakta ve hücre içi enzimlerin salınımı sonucunda peynirin olgunlaşması önemli ölçüde hızlandırılmaktadır (Ross *et al.* 1999, Morgan *et al.* 2002).

Cheddar peyniri üretiminde yardımcı kültür olarak laktisin 481 üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* CNRZ481 kullanımı sonucu, üretilen peynirde, kontrol peynire göre laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi seviyesinin 5 kat arttığı ve starter kültür suşu özelliği taşımayan laktik asit bakterilerinin gelişiminin % 90 oranında azaldığı saptanmıştır (O'Sullivan *et al.* 2003).

2.4.2. Et ürünleri

Taze et ve fermente et ürünleri patojenik ve bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişimi için uygun ortamlardır (Stiles and Hasting 1991). Nisin'in et ürünlerinde koruyucu olarak kullanımı üzerinde yoğun çalışmalar yürütülmesine rağmen, uygulamaların çok azında ticari başarı sağlanmıştır (O'Sullivan *et al.* 2002a). Yüksek oranda yağ içeren etlerde nisin, fosfolipitler ile güçlü bir etkileşime girmekte ve bu durum nisinin antibakteriyel aktivitesini sınırlamaktadır. Nisin üreticisi *L. lactis* kültürlerinin biyokoruyucu olarak dondurulmuş etlerde kullanımı ise, bu suşların dondurulmuş ürünlerde gelişmemesinden dolayı mümkün değildir (Henning *et al.* 1986, O'Sullivan *et al.* 2002a).

Nisinin, özellikle tween 80 ilave edilen alginat ya da agaroz esaslı jeller ile birlikte tavuk parçalarının yüzeyine uygulanması, tavuk etlerinin *S. typhimurium* kontaminasyonlarından korunmasında ticari potansiyel taşımaktadır. Zira bu uygulamalarda *S. typhimurium* sayısının +4 °C de 72 saatte 10^3 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Natrajan and Sheldon 2000, Barbosa *et al.* 2004).

2.4.3. Salata ve salata sosları

Taze kesilmiş sebzeler (salatalar), mikroorganizmaların gelişimi için uygun ortamlar haline gelmektedir. Özellikle *L. monocytogenes* gibi gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar besince zengin hale gelen bu ortamlarda kolaylıkla üreyebilmektedir. Bakteriyosinler, bu gıdaların raf ömrünü uzatmak için soğukta muhafazanın yanı sıra, ilave bir önlem olarak kullanılmaktadır. Tüketime hazır salatalar ile yürütülen çalışmalarda; nisin Z üreticisi *L. lactis* HPB 1688 suşunun, *L. monocytogenes*'e karşı 7 °C saklama koşullarında önemli ölçüde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Cai *et al.* 1997).

Salata sosları, düşük pH değerlerinden dolayı mikrobiyel bozulmalara karşı oldukça dirençlidir. Ancak bu soslar laktobasiller ve mayalar gibi asidik koşulları tolere eden mikroorganizmalar tarafından bozulabilmektedir. Son yıllarda, bileşimindeki asetik asit miktarı azaltılmış salata soslarına (az ekşili) olan tüketici talebi artmaktadır. Asetik asit miktarının azaltılması, salata soslarının muhafazası sırasında laktik asit bakterileri tarafından bozulmaları riskini arttırmaktadır (Delves-Broughton *et al.* 1996, Cai *et al.* 1997). Nisin'in, çeşitli ticari salata soslarından izole edilen bakteriyel kontaminantlar üzerine inhibitör etkisini belirlemek için yapılan araştırmada, bu ortamlardan izole edilen 30 adet bakteriyel kontaminanttan 27 adedinin gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir (Muriana and Kanach 1995, Ryan *et al.* 2002).

2.4.4. Konserve ürünler

Nisin, konserve gıdalarda *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin ve sporlarının gelişimini engellemek için kullanılmaktadır. Konserve gıdaların bozulmasına özellikle *B. stearothermophilus* ve *C. thermosaccharolyticum* bakterileri neden olmaktadır. Bu bakterilerin ana kontaminasyon kaynağı konserve gıdalara katılan un, şeker ve baharatlardır. Konserve gıdalarda nisin kullanımı ile bu gıda bozulması etmeni organizmaların gelişimi engellenmekte ve bu nedenle proses sırasında uygulanan ısı işlem derecesi düşürülebilmektedir. Yüksek sıcaklık uygulaması ile ürünün besin

değerinde, tekstüründe ve görünüşünde meydana gelen olumsuz değişimler, işlem sıcaklığının düşürülmesi ile azalmaktadır. Bu durum, ayrıca üretim maliyetinin düşmesine de yol açmaktadır (Ryan *et al.* 2002).

2.4.5. Biyomedikal uygulamalar

Son yıllarda yürütülen çalışmalar, nisin mastitis etmeni patojenleri inhibe ettiğini göstermiştir (Broadbent *et al.* 1989). Sığır mastitis tedavisinde nisin, anti stafilokok ajan olan lisostafin ile birlikte kullanılmaktadır. Bu iki antimikrobiyel madde, sinerjit etkileşim sonucu mastitis etmeni organizmalara karşı güçlü bakterisidal etki göstermektedir. Nisin uygulaması ile, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Streptococcus uberis* tedavisinde sırasıyla % 66, % 95 ve % 100 iyileşme sağlanmıştır (Sears *et al.* 1995). Nisin gibi, laktisin 3147 de bütün önemli mastitis etmeni patojenlere karşı (Gram-pozitif) bakterisidal etki göstermektedir (Ryan *et al.* 1998). Laktisin 3147 “Teat seal” (Cross Vetpharm Group Ltd, Dublin, Ireland) adıyla, ineklerde mastitis tedavisi için ticari kuru preparat olarak üretilmektedir (Ross *et al.* 1999).

Laktisin 3147'nin, metisilin dirençli *S. aureus*, vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*, penisilin dirençli *Pneumococcus*, *Propionibacterium acne* ve *Streptococcus mutans*'ın dahil olduğu bazı insan patojenlerine karşı da inhibisyon yeteneği araştırılmıştır. Laktisin 3147'nin (20.000 AU/mL) konsantre edilmiş preparatı kullanılarak iki saat içerisinde 10^4 den fazla hücre içeren insan patojeni popülasyonunu öldürdüğü belirlenmiştir (Galvin *et al.* 1999). *Propionibacterium acne*'nin laktisin 3147'ye özel duyarlılık göstermesi, laktisin 3147'nin akne tedavisinde kullanım potansiyeli olduğuna işaret etmektedir (Ross *et al.* 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Çalışma kapsamında, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanan 100 adet laktokok suşu (68 adet *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 24 adet *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve 8 adet *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), 50 adet laktokok fajı ve Prof. Dr. I. F. Nes'den (Department of Genetics and Biochemistry, Agricultural University of Norway, As/Norway) temin edilen 18 adet (*L. lactis* SIK-83, *L. lactis* IL 1403, *L. lactis* 105, *L. lactis* LMG 2908, *L. lactis* T1, *L. lactis* 731, *L. lactis* 2, *L. lactis* LMG 2912, *L. lactis* LMG 2088, *L. lactis* LMG 2132, *L. lactis* JC 17, *Lactobacillus sake* NCDO 2714, *Lactobacillus plantarum* LMG 2003, *Listeria innocua* LMG 2813, *Escherichia coli* LMG 3083 (ETEC), *Salmonella enterica* serotype Typhimurium SL1344, *Pseudomonas fluorescens* P1 ve *Enterococcus faecalis*) indikatör bakteri kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri

Doğal tip laktokok suşları M17 broth ve agar ortamlarında, laktoz fermentasyon yeteneğini kaybetmiş *L. lactis* mutantları ise, laktoz yerine 5 g/L olacak şekilde glukoz ilave edilmiş Glukoz M17 broth (GM17) ortamlarında geliştirilmiştir. İndikatör bakterilerden *Lb. sake* NCDO 2714 ve *Lb. plantarum* LMG 2003 MRS broth ortamında, *P. fluorescens* P1, *S. enterica* serotype Typhimurium SL1344 ve *E. coli* LMG 3083 (ETEC) Luria Bertani (LB) broth ortamında üretilmiştir. Bunların dışında kalan indikatör bakteriler için ise GM17 broth ortamları kullanılmıştır.

M17 Broth ve Agar

Polipepton	5	g
Fitopepton	5	g
Maya ekstraktı	2.5	g
Et ekstraktı	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 950 mL destile su içerisinde çözülmüş ve 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Ortam su banyosunda soğutulduktan sonra (45 °C), ayrı sterilize edilen laktoz çözeltisi (50 mL) ilave edilmiştir (Terzaghi and Sandine 1975).

MRS Broth

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

pH 5.7 \pm 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam içerikleri 1000 mL destile su içerisinde çözülmüş ve sterilizasyon, 118 °C’de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

Luria Bertani Broth

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

pH 7.0 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Ortam içerikleri 1000 mL destile su içerisinde çözülmüş ve sterilizasyon, 121 °C’de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

Bakteriler M17, LB, MRS ve GM17 dik agar ortamlarında +4 °C’de ve M17, LB, MRS ve GM17 broth ortamlarına % 20 oranında steril gliserol ilave edilerek, –20 °C’de saklanmıştır. Laktokok faj stokları ise, % 40 oranında steril gliserol ilave edilen M17 broth ortamında hazırlanmış ve bakteri stoklarında olduğu gibi –20 °C’de muhafaza edilmiştir. Çalışma materyalleri ise gliserol ilave edilmemiş M17, LB, MRS ve GM17 broth ortamlarında, +4 °C’de ve haftalık transferler yapılarak korunmuştur (Holt *et al.* 1994).

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteriyosin üretim özelliğinin belirlenmesi

L. lactis suşlarında bakteriyosin üretim özelliğinin belirlenmesinde iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde, test edilecek *L. lactis* suşları M17 broth ortamında 30 °C’de 18 saat süreyle geliştirilmiştir. Bu aktif kültürlerden M17 agar ortamlarına mikropipet yardımı ile damlatma ekim yapılmış (5 µL) ve 30 °C’de 18 saat süreyle inkübe edilmiştir. Koloni gelişiminden sonra, % 0.7 agar oranı ile hazırlanan 3.5 mL

yumuşak agar (LB, MRS ve GM17) ortamına indikatör bakteri ilave edilmiş (100 µL) ve M17 agar besiyerinde geliştirilen laktokok kolonileri üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Bu ortamlar, indikatör bakterilerin gelişimi için uygun sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda laktokok suşlarının indikatör bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir (Geis *et al.* 1983).

Bakteriyosin üretim özelliğinin tanısında kullanılan ikinci yöntemde, aktif *L. lactis* suş kültürlerinden öze yardımıyla M17 agar ortamlarına sürme ekim yapılmış ve bakteriler bu ortamlarda 30 °C'de 18 saat geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan kolonilerden, steril kürdan aracılığıyla M17 agar ortamına bir petride beş farklı *L. lactis* suşu olacak şekilde nokta ekim yapılmış ve 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Uygun besiyeri ve inkübasyon sıcaklığında 18 saat geliştirilen indikatör bakterilerden 100 µL alınarak, % 0.7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar (LB, MRS ve GM17) üzerine aktarılmış ve bu ortamlar M17 agar besiyerinde geliştirilen laktokok kolonileri üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Petri kutuları indikatör bakterilerin gelişimi için uygun sıcaklıkta 18 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda, laktokok suşlarının indikatör bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir (van Belkum *et al.* 1989).

3.2.2. Proteolitik enzim uygulaması

Üretilen antimikrobiyel maddenin protein doğasında olup olmadığının belirlenmesi için, öncelikle indikatör bakterilere karşı zon veren *L. lactis* suşları M17 broth ortamında 30 °C'de 18 saat süreyle geliştirilmiştir. Bu süre sonunda kültürler 6000 devirde 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek yeni tüplere aktarılan kültür üst sıvılarının pH'sı, 6 N NaOH kullanılarak 6.5-7.0 arasında ayarlanmış ve bu ortamlar 0.45 µm por çapında steril membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilmek suretiyle sterilize edilmiştir. Nötralize edilmiş steril kültür üst sıvılarına son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde proteinaz K (Sigma, Chem. Co., USA) ilave edilmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim

aktivitesi 100 °C'de 5 dakika ısı uygulaması ile sonlandırılmıştır. Enzim ilave edilmemiş örnekler kontrol olarak kullanılmıştır (Franz *et al.* 1997).

Enzim uygulanan ve uygulanmayan nötralize edilmiş kültür üst sıvılarında antimikrobiyel aktivite; duyarlı indikatör bakterilere karşı kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Kültür üst sıvıları kuyucuklara 100 µL olacak şekilde aktarılmıştır.

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

3.2.3.1. pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

30 °C'de 18 saat geliştirilen *L. lactis* kültürleri 6000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiş ve kültür üst sıvılarının pH'ları, 6 N NaOH veya 6 N HCl kullanılarak 2.0-11.0 değerleri arasında ayarlanmıştır. pH'ları ayarlanan kültür üst sıvıları, 0.45 µm por çaplı membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilerek sterilize edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ortamlar +4 °C'de 24 saat bekletilmiştir. pH değişimlerinin bakteriyosinlerin inhibisyon düzeyleri üzerindeki etkisi; membran filtrelerden geçirildikten sonra hiçbir işleme tabi tutulmayan kültür üst sıvılarının inhibisyon etkinliklerinin, pH düzeyleri ayarlanan kültür üst sıvılarının inhibisyon etkinlikleri ile karşılaştırılması sonucu tanımlanmıştır. pH ayarlaması yapılan kültür üst sıvılarında, bakteriyosin aktivitesinin pH değişimlerinden etkilendiği, bu ortamlara proteinaz K uygulaması sonrası antibakteriyel aktivitenin tamamen kaybı belirlenerek kesinlik kazanmıştır. Değişik pH düzeylerinde bakteriyosin aktivitelerindeki değişimler, duyarlı indikatör bakterilere karşı kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Bakteriyosin aktiviteleri; inhibisyon zonu alınan en yüksek dilüsyon oranının, 1000/aktarılan miktar ile çarpımından elde edilen arbitrary ünite (AU) cinsinden hesaplanmıştır (Franz *et al.* 1997).

3.2.3.2. Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Nötralize edilmiş ve nötralize edilmemiş kültür üst sıvılarında bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi; söz konusu ortamların 100 °C’de 5, 10, 15, 20 dakika ve 121 °C’de 10 dakika süreyle sıcaklığa tabi tutulmasından sonra, bu ortamlardan alınan örneklerin duyarlı indikatör bakterilere denenmesi suretiyle saptanmıştır. Kontrol olarak sıcaklık uygulanmamış kültür üst sıvıları kullanılmıştır. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerinde yarattığı etki, kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Franz *et al.* 1997).

3.2.3.3. Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine değişik enzimlerin etkisi; pH ve sıcaklığın etkisinin saptandığı testlerde olduğu gibi, kültür üst sıvıları kullanılarak tanımlanmıştır. Nötralize edilmiş ve nötralize edilmemiş kültür üst sıvılarına, son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde tripsin (pH 7.0 Merck, Germany), α -kemotripsin (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), pepsin (pH 3.0 Sigma Chem. Co., USA), α -amilaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), lipaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA), katalaz (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA) ve lizozim (pH 7.0 Sigma Chem. Co., USA) enzimleri ilave edilmiş ve 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktiviteleri, 100 °C’de 5 dakika ısı uygulaması ile sonlandırılmıştır. Denemelerde kontrol olarak, enzim muamele edilmemiş kültür üst sıvıları kullanılmıştır. Bakteriyosin aktiviteleri kritik dilüsyon yöntemi esas alınarak saptanmıştır (Franz *et al.* 1997).

3.2.4. Bakteriyosinlerin kısmi saflaştırması

Bakteriyosin üreticisi *L. lactis* suş kültürlerinden, 100 mL M17 broth ortamlarına 1 mL ekim yapılmış ve 30 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, gelişen kültürler 5000 devirde 20 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek, yeni tüplere aktarılan kültür üst sıvılarının pH'sı 10 N NaOH kullanılarak 6.5'e ayarlanmıştır. Kültür üst sıvılarına, son konsantrasyon oranı % 40 olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilmiş ve eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Amonyum sülfat ilave edilen nötrale edilmiş kültür üst sıvıları santrifüj tüplerine aktarılmış ve +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra örnekler +4 °C'de 15000 devirde 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitiminde üst faz dökülmüş ve çökelti kurutulmuştur. Kurutulmuş çökelti 1 mL sodyum fosfat tampon (pH 6.5) içerisinde çözülmüş ve üzerine 15 mL metanol/kloroform (1:2 v/v) çözeltisi ilave edilerek +4 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler +4 °C'de 15000 devirde 30 dakika santrifüj edilmiş, üst faz dökülmüş ve çökelti kurutulmuştur. Son aşamada, kurutulmuş çökelti 100 µL steril saf suda çözülmüş ve – 20 °C'de saklanmıştır (Moreno *et al.* 2003).

Sodyum Fosfat Tampon

Sodyum dihidrojen fosfat	10	g
Disodyum hidrojen fosfat	10	g
Destile su	100	mL
pH 6.5 ± 0.02		

3.2.5. Toplam hücre proteinlerinin izolasyonu

Bakterilerin toplam protein içeriklerinin analizi için, ilk aşamada 1.6 mL hacimde aktif bakteri kültürleri 2.5 mL'lik steril tüplere aktarılmıştır. Kültürlerin üzerine 400 µL triklor asetik asit (% 80 TCA) ilave edilmiş ve 20 dakika buz banyosunda bekletilmiştir. Buz banyosundan alınan kültürler +4 °C'de 10000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj uygulaması ile tüplerde meydana gelen üst faz dökülmüş, kalan çökelti 500 µL aseton ile iki kez yıkanmıştır. Aseton ile yıkanarak çözülen ortamlara, +4 °C'de 10000 devirde ve 10 dakika santrifüj uygulanarak ikinci bir çöktürme yapılmıştır. Bu işlem sonunda üst faz dökülmüş ve çökelti içerisinde kalan aseton uçurulmuştur. Asetonu uzaklaştırılan çöktürlere 160 µL TES, 16 µL lizozim, 2 µL RNaz A (x5 seyreltik) ilave edilmiş ve 37 °C'ye ayarlı su banyosunda 30 dakika

süreyile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde protein izolatlarından 20 µL alınarak steril eppendorf tüplerine aktarılmış ve üzerine 4 µL örnek tamponu ilave edildikten sonra 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda tutulmuştur. Örneklerin oda sıcaklığına kadar soğuması beklenmiş ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sistemlerinde protein analizi işlemine geçilmiştir (Piard *et al.* 1997).

TES

Sakkaroz	6.7	g
10 mM Tris-HCl	0.1576	g
1 mM EDTA	0.0372	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		

TCA

Triklor asetik asit	36.32	g
Destile su	100	mL

Örnek Tamponu (x4)

0.5 M Tris-HCl	1	mL
Gliserol	0.8	mL
Destile su	4	mL
% 10 SDS	1.6	mL
2-Merkaptoetanol	0.4	mL
Brom fenol mavisi (% 0.05)	0.2	mL
pH 6.8 ± 0.02		

RNaz A Çözeltisi: 5 mL steril destile su içerisinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat çözeltisinin pH'sı asetik asit ile 5.0'a ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A (Sigma, Chem. Co., USA) ilave edilmiştir. Kaynar su içerisinde ortam 5 dakika tutulduktan sonra, -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.6. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE denemeleri Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. Dikey jel sisteminde, iki adet 20x20 cm ebatlarında cam plaka kullanılmıştır. Elektroforez plakaları % 70'lik etanol çözeltisi ile yıkanıp kurutulduktan sonra, plakalar arasına, jel tarağının yerleştirildiği üst kısım hariç, 0.3 mm kalınlığında ayırıcılar konulmuştur. Ayırıcı jel dökülmeden önce, plakaların ayırıcılarına % 1'lik agaroz uygulanarak jelin akması engellenmiştir. Bu aşamadan sonra, jel tarağının 1 cm altına kadar gelecek şekilde % 10'luk ayırıcı jel dökülmüş ve üzerine 1 mL destile su ilave edilmiştir. Ayırıcı jelin polimerizasyonu için 45 dk beklenmiş ve destile su, filtreler aracılığı ile ortamdaki alınmıştır. Plakanın geri kalan kısmı, % 4'lük toplayıcı jel dökülerek tamamlanmış ve tarak yerleştirilmiştir. Toplayıcı jelin polimerizasyonu için 45 dk daha beklendikten sonra cam plakalar elektroforez tankına konulmuş, tarak çıkarılmış ve tank haznelere elektrot tamponu ilave edilmiştir. Son aşamada, protein örnekleri 20 µL ve bakteriyosin örnekleri 50 µL olacak şekilde kuyucuklara aktarılmıştır. Jel sistemine, toplayıcı jel için 100-120 Volt (25 mA) ve ayırıcı jel için ise 220-300 Volt (35 mA) elektrik akımı verilmiştir. Protein örneklerinin yürütülme işleminin tamamlanmasının ardından jel, Commasie brillant blue boya çözeltisine alınarak, burada bir gece tutulmuştur. Bu süre bitiminde jel, fazla boyanın geri alındığı çözeltide protein bantları netlik kazanıncaya kadar (30-60 dk) bekletilmiş ve asetik asit çözeltisi (fiksasyon çözeltisi, % 7 v/v) içine alınmıştır.

Akrilamid / Bis-akrilamid Çözeltisi

Akrilamid	29.2	g
Bis-akrilamid	0.8	g
Destile su	100	mL

Whatman No. 1 ile filtre edilen çözeltinin bulunduğu erlenmayer, alüminyum folyo ile kaplanarak +4 °C'de tutulmuştur.

SDS (%10)

SDS	10	g
Destile su	100	mL

1.5 M Tris-HCl

Tris-HCl	18.15	g
Destile su	100	mL

pH 8.6 ± 0.02 'ye ayarlanır. +4 °C'de saklanır.

0.5 M Tris-HCl

Tris-HCl	6.05	g
Destile su	100	mL

pH 6.8 ± 0.02 'ye ayarlanır. +4 °C'de saklanır.

APS (%10)

Amonyum persülfat	0.1	g
Destile su	1	mL

Elektrot Tamponu

Tris	1.65	g
Glisin	8	g
SDS	1.4	g
Destile su	1100	mL

Ayırıcı Jel

Akrilamid / Bis-akrilamid	8.67	mL
1.5 M Tris-HCl	6.5	mL
SDS (% 10)	250	μ L
Destile su	10.7	mL

Dökmeden hemen önce, 130 μ L % 10 amonyum persülfat ve 12.24 μ L tetrametil etilen diamin (TEMED) ilave edilmiştir.

Toplayıcı Jel

Akrilamid / Bis-akrilamid	1.221	mL
0.5 M Tris-HCl	1.86	mL
SDS (% 10)	75	μ L
Destile su	4.365	mL

Dökmeden hemen önce, 43.5 μ L % 10 amonyum persülfat ve 7.35 μ L TEMED ilave edilmiştir.

Commasie Brilliant Blue Boya Çözeltisi

Commasie brilliant blue R250	1	g
Metanol	400	mL
Glasiyel asetik asit	100	mL
Destile su	500	mL

Boya Geri Alma Çözeltisi

Metanol	400	mL
Glasiyel asetik asit	100	mL
Destile su	500	mL

Jel Fiksasyon Cözeltisi

Glasiyel asetik asit	70	mL
Destile su	930	mL

3.2.7. Protein büyüklüklerinin saptanması

Beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek alınan jel fotoğraflarında bakteriyosinlerin ve diğer hücrel proteinlerin moleküler büyüklükleri; 180.0, 116.0, 97.0, 58.1, 39.8, 29.0, 20.1, 14.3 ve 6.5 kDa'luk proteinleri içeren marker karışımı (Sigma Chem. Co., USA, Cat. No: B 2787) kullanılarak hesaplanmıştır. Excel programında her bir marker proteinin moleküler büyüklüğünün logaritması y eksenini, hesaplanan R_f değeri x eksenini oluşturacak şekilde grafiğe geçirilmiş ve program aracılığı ile grafiğe ait eğrinin matematiksel ifadesi elde edilmiştir. Büyüklüğü hesaplanmak istenen proteinin R_f değeri, jel fotoğrafı üzerinde ölçülmüş ve formülde yerine konularak, Excel programında moleküler büyüklüğü hesaplanmıştır (Laemmli 1970).

R_f Değeri

$R_f = \text{proteinin kat ettiği mesafe} / \text{boyanın kat ettiği mesafe}$

3.2.8. Bakterilerin plazmid içeriklerinin tanımlanması

3.2.8.1. Plazmid izolasyonu

M17 broth ortamında 30 °C'de 18 saat geliştirilen *L. lactis* kültürlerinden, 10 mL'lik M17 broth ortamlarına birer mL inokülasyonlar yapılarak tüpler 30 °C'de 3-3.5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri, 6000 devirde 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen hücre çökeltisi kurutulduktan sonra, 379 µL sakkaroz tamponunda çözülmüştür. 37 °C'ye kadar ısıtılan bu ortama 96.5 µL lizozim ilave edilmiş ve su banyosunda 37 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. 48.2 µL Tris-EDTA-1 uygulamasından sonra, tüplere % 20 sodyum dodesil sülfat (SDS) cözeltisinden 27.6 µL aktararak karıştırılmıştır. Bu

aşamada ortamda viskozitenin artışı lizinin başladığını göstermektedir. Lizinin tamamlanması için santrifüj tüpleri 37 °C su banyosunda 10 dakika süre ile tutulmuştur. 10 dakika sonunda tüpler mekanik karıştırıcıda, yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA'nın kırılması sağlanmıştır. Ortama yeni hazırlanmış 3 N NaOH çözeltisinden 27.6 µL ilave edilmiş ve tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dakika süre ile yavaşça çevrilerek kromozomal DNA'nın alkali denatürasyon koşulları oluşturulmuştur. Denatürasyon aşamasının sonunda santrifüj tüplerine 49.6 µL Tris-HCl çözeltisi aktarılarak, 3 dakika süre ile yine düz bir zeminde hafifçe karıştırılmıştır. Ortam pH'ının 8.5-9.0 arasına düşüşü ile nötralizasyonun sağlandığı belirlenmiştir. Tüplere, +4 °C'de tutulan 5 M NaCl çözeltisinden 71.7 µL ve % 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 µL ilave edilerek, +4 °C'de 15000 devirde 15 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüplerde oluşan üst faz, mikropipet yardımıyla yeni tüplere aktarılmış ve deproteinasyonun sağlanması için 700 µL kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi ilave edilmiştir. Bu ortamlara +4 °C'de 15000 devirde 15 dakika santrifüj işlemi uygulanmış, oluşan üst faz yeni tüplere alınmış ve üzerine eşdeğer hacimde etil alkol aktarılmıştır. Etil alkol ilave edilen tüpler -20 °C'de bir gece bekletildikten sonra, 15000 devirde 15 dakika santrifüj uygulanarak plazmid DNA çöktürülmüş ve sıvı faz dökülerek çökeltiler kurutulmuştur. Kurutulan çökeltiler 20 µL Tris-EDTA-2 içerisinde çözülmüş ve RNaz A stok çözeltisinden 2 µL ilave edilerek 37 °C'de 45-50 dakika inkübe edilmiştir (Anderson and McKay 1983).

Sakkaroz Çözeltisi

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

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

RNaz A Çözeltisi: 5 mL steril destile su içerisinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat çözeltisinin pH'sı asetik asit ile 5.0'a ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A (Sigma, Chem. Co., USA) ilave edilmiştir. Kaynar su içerisinde ortam 5 dakika tutulduktan sonra, -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.8.2. Elektroforez

Plazmid DNA örneklerinin elektroforezi % 0.7 agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır (Meyers *et al.* 1976). Yatay jel sistemleri için agaroz, kullanılan jel plaka sisteminin büyüklüğüne göre 30-35 ya da 150-200 mL tris-fosfat elektroforez tamponu içerisinde kaynar su banyosunda çözülmüştür. 45 °C'ye kadar soğuması beklenen ortam, elektroforez plakalarına dökülmüş ve jel tarakları yerleştirilerek 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin üzerini kapatacak biçimde tampon çözelti ilave edilmiş ve jelin zedelenmemesine dikkat edilerek, taraklar ortamdaki alınmıştır. RNaz uygulanan DNA örnekleri su banyosundan alınarak 2 µL marker boya çözeltisi ile karıştırılmış ve mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına aktarılmıştır (20 µL). Elektroforez, 100 voltta 3-3.5 ya da 5-5.5 saat süreyle yapılmıştır. Marker boyanın jel sistemini terk etmesinden sonra elektrik akımı kesilmiş ve ortamdaki alınan jeller, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren çözeltisinde 1 saat boyanmıştır. Boyama işleminin sonunda jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışık altında incelenmiştir (Macrina *et al.* 1982). Fotoğrafların çekiminde Kodak Gel Logic 200 jel dökümantasyon sistemi (Eastman Kodak Co., USA) kullanılmıştır.

Tris-Fosfat Tampon (10X)

Tris	108	g
% 85 fosforik asit (1.679 µg/mL)	15.5	mL
EDTA (0.5 M)	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Marker Boya

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

3.2.8.3. Plazmid büyüklüklerinin saptanması

L. lactis suşlarından izole edilen plazmidlerin büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler büyüklükleri bilinen ccc DNA marker'larının elektroforetik hareketleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanılmıştır (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 çıkarılmıştır. İstatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek, bakterilerden izole edilen plazmidlerin büyüklükleri saptanmıştır (Campbell 1974, Elder and Southern 1983, Elder *et al.* 1983).

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

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

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

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

Y = Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.9. Bakteriyosin üreten suşlardan plazmidlerin giderilmesi ve plazmidleri giderilmiş mutantların seçimi

L. lactis subsp. *lactis* suşlarında plazmid giderme ajanı olarak akriflavin kullanılmıştır. Her suşun gelişebildiği en yüksek akriflavin oranı deneysel olarak belirlendikten sonra, suşlar bu akriflavin oranında beş pasaj geliştirilmiştir. Bu süre sonunda gelişen kültürlerden hazırlanan seri dilüsyonlardan, laktoz indikatör agar ortamlarına ekimler yapılmış ve 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda oluşturdukları laktik asit sayesinde indikatör boya rengini sarıya çeviren koloniler, laktoz fermentasyon yeteneğini sürdüren (Lac⁺) koloniler olarak değerlendirilmiştir. Yeterli asit oluşturamadığı için indikatör boya renginin dönüşümüne neden olamayan beyaz koloniler ise, laktoz fermentasyon yeteneğini kaybetmiş (Lac⁻) mutantlar olarak

seçilmiş ve GM17 broth ortamına alınmıştır (McKay *et al.* 1972, Gasson and Davies 1980, Wolfe and McKay 1983). Seçilen mutantların plazmid içeriklerindeki değişimler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

Laktoz İndikatör Agar

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

pH 6.8 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

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

3.2.10. Konjugasyon

Konjugasyonda alıcı suş olarak Dr. Çağla TÜKEL’den (Texas A&M University, Department of Medical Microbiology and Immunology, USA) temin edilen *L. lactis* subsp. *lactis* MLL 40-29 kullanılmıştır. Alıcı suş GM17 broth, diğer suşlar ise M17 broth ortamlarında 30 °C’de 18 saat süreyle geliştirildikten sonra, 2 mL alıcı suş ile 3 mL verici suş karıştırılmış ve steril membran filtreler (0.45 µm, Sartorius, Germany) üzerinde toplanmıştır. Alıcı ve verici suş kültürlerini içeren filtreler GM17 agar ortamlarına yerleştirilerek, 30 °C’de 18 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda GM17 agar ortamlarından alınan filtreler, 1 mL steril fizyolojik tuzlu su içerisinde karıştırılarak, bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. Bu ortamlardan 10^{-6} düzeyine kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her dilüsyondan, 45 µg/mL kloramfenikol ve 120 µg/mL eritromisin içeren laktoz indikatör agar ortamlarına, 0.1 mL aktararak yayma ekimler yapılmış ve 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, laktoz indikatör agar ortamında belirlenen bakteriyosin üretme yeteneğindeki Lac⁺ ya da Lac⁻ koloniler konjugant olarak tanımlanmıştır. Konjugasyon sıklığı; 1 mL için saptanan konjugant sayısının, 1 mL'de bulunan verici suş sayısına oranlanması sonucu saptanmıştır. Hiçbir muameleye tabi tutulmadan laktoz indikatör agar ortamlarında geliştirilen verici suş kültürleri, kontrol olarak kullanılmıştır (Gasson and Davies 1980, Gasson and Davies 1981).

3.2.11. Bakteriyosin üretme yeteneğini kodlayan plazmidlerin stabilite düzeylerinin saptanması

Bakteriyosin üretme yeteneğindeki doğal suşlarda ve konjugantlarda, bu özelliği determine eden plazmidlerin stabilitesi; suşların her birinin % 10 reconstitute skim milk (Oxoid Ltd., England) ortamında 10 pasaj (~70 generasyon) geliştirilmesinden sonra seçilen kolonilerin, bakteriyosin üretim yetenekleri yönünden tekrar test edilmesi suretiyle saptanmıştır (Coakley *et al.* 1997). Bakteriyosin üretim yeteneğini sürdüren kolonilerin popülasyondaki oranı, yüzde stabilite cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.12. Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının laktik asit üretim düzeylerinin saptanması

Laktik asit üretim düzeylerinin belirlenmesinde, 30 °C'de 18 saat geliştirilen bakteriyosin üretme yeteneğindeki *L. lactis* subsp. *lactis* kültürleri kullanılmıştır. Bu kültürlerden reconstitute skim milk ortamına (% 11, Oxoid Ltd., England) inokülasyon yapılmış (% 1 v/v) ve 30 °C'de 6 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda, bu ortamlara 0.5 mL fenolftalein indikatörü aktarılmış ve 0.1 N NaOH (pH

8.2) ile titre edilmiştir. Üretilen % laktik asit miktarı, aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir;

$$\% \text{ Laktik asit} = \frac{[\text{Harcanan NaOH miktarı (mL)}] \times (\text{NaOH'ın normalitesi})}{\text{Örnek miktarı}} \times 9$$

(Bradley *et al.* 1992).

Fenolftalein İndikatörü: 1 g fenolftalein, 100 mL etil alkol (% 95) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.13. Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının proteolitik aktivite düzeylerinin saptanması

Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının proteolitik aktivite düzeyleri, gelişme ortamında meydana gelen tirozin miktarının spektrofotometrik olarak ölçümü ile tespit edilmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* suşları 100 mL reconstitute skim milk (% 11, Oxoid Ltd., England) ortamlarına % 1 oranında inoküle edilmiş ve 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürlerden alınan 2 mL hacimdeki örnekler steril erlenlere aktarılmış ve 1 mL destile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu ortamlara 10 mL çözelti A uygulamasından (10 dk) sonra filtrasyon işlemi yapılmış (Whatman No.40) ve filtratlar 5 mL'lik hacimler halinde ayrı erlenlere alınmıştır. Bunların üzerine 10 mL B çözeltisi ve 3 mL C çözeltisi ilave edilip, mavi renk oluşumu için 5 dakika beklenmiştir. Spektrofotometrik ölçümler, 1 cm ışık yoluna sahip küvetler kullanılarak 650 nm dalga boyunda yapılmıştır (Shimadzu UV-1201V spektrofotometer). Elde edilen değerler tirozin standardı sonuçları ile karşılaştırılmış ve tirozin eşdeğeri olarak verilmiştir. Örneklerin okunmasında kontrol olarak; steril reconstitute skim milk besiyerinden alınan (2 mL) ve yukarıda belirtilen işlemler uygulanarak elde edilen karışım kullanılmıştır (Anonymous 1997).

A Cözeltisi: 0.72 N triklor asetik asit (TCA)

B Cözeltisi: 75 g sodyum karbonat ve 10 g tetrasodyum-difosfat 500 ml destile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

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

Tirozin Standart Cözeltisinin Hazırlanması: 100 mg tirozin 250 mL destil su içerisinde çözülmüştür. Tirozin çözeltisinden 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mL hacimlerde alınmış ve ayrı ayrı her biri 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden 5'er mL alınarak erlenlere aktarılmış ve 1'er mL destile su ilave edilerek hacimleri 6 mL'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan standart çözelti örneklerinin diğer işlemleri 3.2.13.'te anlatıldığı gibi yürütülmüştür.

3.2.14. Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının faj duyarlılıklarının saptanması

Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip *L. lactis* suşlarının faj duyarlılıkları çift tabaka agar yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Terzaghi and Sandine 1975). Hazırlanan 3 saatlik bakteri kültürlerinden (aktif bakteri kültürlerinden M17 broth ortamlarına % 1 oranında inokülasyon yapıldıktan sonra, 30 °C'de 3 saat inkübasyona tabi tutulması ile geliştirilmiştir) yumuşak agar üzerine 0.1 mL aktarılıp karıştırıldıktan sonra, bu ortam alt tabaka M17 agar üzerine dökülmüştür. Yumuşak agarın homojen bir şekilde dağılması sağlanmış ve katılaşması için kısa bir süre bekletilmiştir. Son aşamada üst tabaka üzerine, titreleri 10^7 plak oluşturma birimi/mL (pfu/mL) ya da yukarısında elde edilen faj lizatları mikropipet yardımıyla damlatılmıştır (10 µL). Bu ortamlar 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmış; faj plak oluşumuna ve faj plak etkinliği düzeyine göre, suşlar duyarlı ya da dirençli olarak tanımlanmıştır.

Cift Tabaka Ortamların Hazırlanışı: Faj denemelerinde M17 alt tabaka agar ortamı, ayrı sterilize edilen 1 M CaCl₂.6H₂O çözeltilisinden 10 mL/L ilave edilerek petri kutularına aktarılmış (15-20 mL) ve 20-25 °C'de 18 saat tutulmuştur. Üst tabaka agar ortamı M17 alt tabaka içeriklerinin tümünün katılması ile hazırlanmış, ancak burada agar oranı % 0.45'e düşürülmüştür (Terzaghi and Sandine 1975).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *L. lactis* Suşlarının Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

İki farklı yöntem kullanılarak, 18 adet indikatör bakteriye karşı bakteriyosin üretim özellikleri araştırılan Türkiye kökenli 100 adet *L. lactis* suşundan 20 adedinin çeşitli indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturduğu belirlendi. *L. lactis* suşlarının indikatör bakterilere karşı oluşturdukları zon çapları, van Belkum *et al.* (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlara göre verilmiştir (Çizelge 4.1.).

Bakteriyosin üretim özellikleri test edilen *L. lactis* suşları, etki spektrumu benzerliğine göre, yedi farklı grup altında toplandı. I. Grup, sadece *Listeria innocua* LMG 2813'e karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarını (PLL3, PLL16, PLL17, PLL30 ve PLL36); II. Grup, *Listeria innocua* LMG 2813 ile birlikte *Lactobacillus plantarum* LMG 2003'e karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarını (PLL10 ve PLL44); III. Grup, *Lactococcus lactis* SIK-83, *Lactococcus lactis* 105, *Lactococcus lactis* LMG 2908, *Lactococcus lactis* T1, *Lactococcus lactis* 731, *Lactococcus lactis* LMG 2912 ve *Lactococcus lactis* 2'ye karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarını (PLL19, PLL84 ve PLL98); IV. Grup, *Lactococcus lactis* SIK-83, *Lactococcus lactis* IL 1403, *Lactococcus lactis* 105, *Lactococcus lactis* LMG 2908, *Lactococcus lactis* T1, *Lactococcus lactis* 731, *Lactococcus lactis* LMG 2912 (Şekil 4.1.), *Lactococcus lactis* 2, *Listeria innocua* LMG 2813 ve *Enterococcus faecalis*'e karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarını (PLL23, PLL52, PLL69 ve PLL77); V. Grup, *Lactococcus lactis* IL 1403, *Lactococcus lactis* T1 ve *Enterococcus faecalis*'e karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarını (PLL32 ve PLL83); VI. Grup, *Lactobacillus sake* NCDO 2714, *Lactococcus lactis* IL 1403, *Lactococcus lactis* T1 (Şekil 4.2.), *Listeria innocua* LMG 2813 ve *Enterococcus faecalis*'e karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarını (PLL47 ve PLL67) ve VII. Grup, *Lactobacillus sake* NCDO 2714, *Lactobacillus plantarum* LMG 2003 ve *Listeria innocua* LMG 2813'e karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşlarını (PLD14 ve PLD73) içermektedir.

Çizelge 4.1. İndikatör bakterilere karşı zon veren laktokok suşları

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLL1	PLL2	PLL3	PLL4	PLL5	PLL6	PLL7	PLL8	PLL9	PLL10
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLL11	PLL12	PLL13	PLD14	PLL15	PLL16	PLL17	PLL18	PLL19	PLL20
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

PLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLL21	PLL22	PLL23	PLL24	PLL25	PLL26	PLL27	PLL28	PLL29	PLL30
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLL31	PLL32	PLL33	PLL34	PLL35	PLL36	PLL37	PLL38	PLL39	PLL40
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLL41	PLL42	PLL43	PLL44	PLL45	PLL46	PLL47	PLL48	PLL49	PLL50
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLL51	PLL52	PLL53	PLL54	PLL55	PLL56	PLL57	PLL58	PLL59	PLL60
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLC61	PLC62	PLC63	PLC64	PLD65	PLC66	PLL67	PLD68	PLL69	PLD70
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

PLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

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

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLD71	PLD72	PLD73	PLC74	PLC75	PLC76	PLL77	PLC78	PLC79	PLC80
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

PLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

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

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLC81	PLC82	PLL83	PLL84	PLC85	PLC86	PLC87	PLC88	PLC89	PLD90
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

PLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

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

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLC91	PLC92	PLL93	PLC94	PLC95	PLC96	PLC97	PLL98	PLL99	PLL100
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

PLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLL3	PLL10	PLD14	PLL16	PLL17	PLL19	PLL23	PLL30	PLL32	PLL36
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	-	-	-	5 mm	6 mm	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	-	9 mm	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	-	9 mm	10 mm	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	2 mm	-	3 mm	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	-	-	-	2 mm	6 mm	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	6 mm	7 mm	-	-	-
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	-	-	-	-	3 mm	5 mm	-	3 mm	-
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	6 mm	8 mm	-	-	-
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	6 mm	8 mm	-	-	-
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	-	-	-	5 mm	9 mm	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	2 mm	3 mm	2 mm	3 mm	4 mm	-	8 mm	2 mm	-	2 mm
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	-	-	-	-	-	3 mm	-	2 mm	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

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

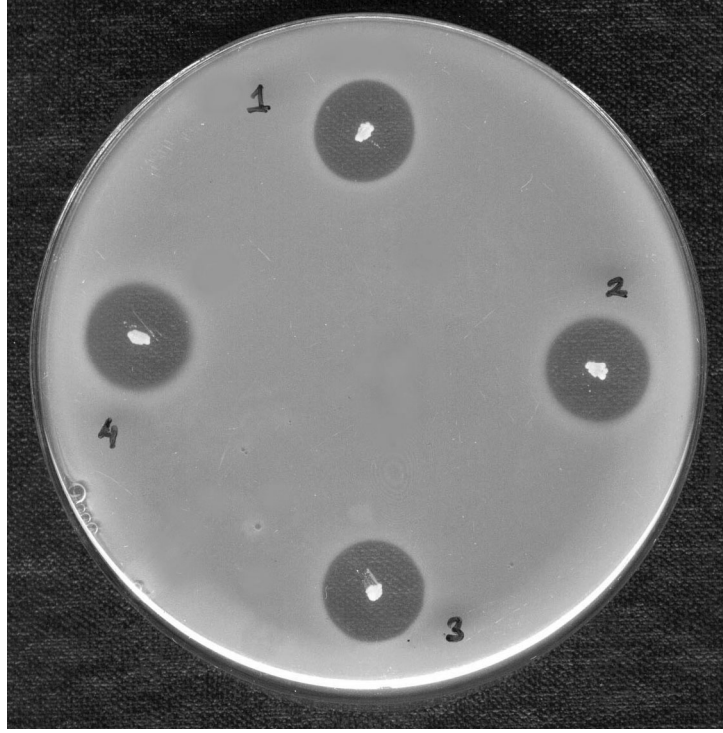
Çizelge 4.1. (devam)

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşlar									
	PLL44	PLL47	PLL52	PLL67	PLL69	PLD73	PLL77	PLL83	PLL84	PLL98
<i>L. lactis</i> SIK-83 (nisin üreticisi)	-	-	6 mm	-	6 mm	-	5 mm	-	4 mm	5 mm
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714 (nisin duyarlı)	-	3 mm	-	3 mm	-	10 mm	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	8 mm	-	-	-	-	8 mm	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> IL 1403 (nisin duyarlı)	-	2 mm	2 mm	3 mm	2 mm	-	2 mm	2 mm	-	-
<i>L. lactis</i> 105 (laktisin üreticisi)	-	-	6 mm	-	6 mm	-	5 mm	-	2 mm	1 mm
<i>L. lactis</i> LMG 2908 (Bac ⁻)	-	-	7 mm	-	7 mm	-	7 mm	-	6 mm	6 mm
<i>L. lactis</i> T1 (Bac ⁻)	-	18 mm	5 mm	19 mm	5 mm	-	5 mm	3 mm	3 mm	3 mm
<i>L. lactis</i> 731 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	7 mm	-	8 mm	-	8 mm	-	5 mm	6 mm
<i>L. lactis</i> 2 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	8 mm	-	8 mm	-	7 mm	-	6 mm	6 mm
<i>L. lactis</i> LMG 2912 (laktisin 3147 üreticisi)	-	-	8 mm	-	9 mm	-	8 mm	-	5 mm	6 mm
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813 (nisin duyarlı)	2 mm	14 SZ	8 mm	14 SZ	8 mm	2 mm	8 mm	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serotype Typhimurium SL1344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (nisin duyarlı)	-	2 mm	3 mm	2 mm	3 mm	-	3 mm	2 mm	-	-

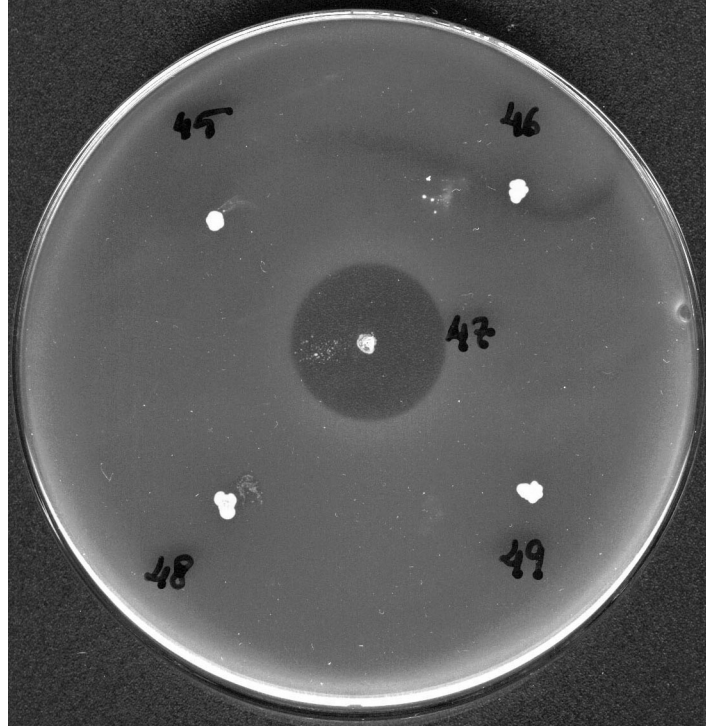
PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

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

SZ: Silik zon



Şekil 4.1. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23 (1), PLL52 (2), PLL69 (3) ve PLL77 (4) suşlarının *Lactococcus lactis* LMG 2912 suşuna karşı verdikleri inhibisyon zonları



Şekil 4.2. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 suşunun, *Lactococcus lactis* T1 suşuna karşı verdiği inhibisyon zonu

Bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında kullanılan yöntemlerin ilk aşamasında bakteriyosin üreticisi suşların aktivite spektrumlarının belirlenmesi esastır (Geis *et al.* 1983, Nes *et al.* 1996). Yapılan birçok araştırmada laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerin yakın akraba türler yanında çeşitli Gram-pozitif gıda patojenlerine karşı da inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir (Geis *et al.* 1983, Ryan *et al.* 1996, Mao *et al.* 2001). Laktokokkal bakteriyosinlerin Gram-negatif bakteriler üzerine inhibitör etki gösterdiğini öne süren sınırlı sayıda literatür verisi bulunmaktadır (Spelhaug and Harlander 1989, Noonpakdee *et al.* 2003). Araştırma kapsamında bakteriyosin üretim özellikleri test edilen Türkiye kökenli 100 adet laktokok suşundan hiçbirinin Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyel aktivite göstermemesi literatür verileriyle uyum göstermektedir.

Bakteriyosin üreticisi oldukları düşünülen 20 adet *L. lactis* suşunun ürettiği bakteriyosinlerin ön tanısı, bakteriyosin üreticisi oldukları bilinen *L. lactis* referans suşlarına karşı çapraz denemeler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.). Bakteriyosin üreticisi suşlarda, genellikle operonlar ya da gen grupları halinde organize olan dirençlilik genleri tanımlanmıştır. Söz konusu genler sayesinde her bakteri ürettiği bakteriyosine dirençliliği kontrol eden proteinleri sentezlemektedir (Engelke *et al.* 1994, Siegers and Entain 1995, Rince *et al.* 1997, Ra *et al.* 1999, Trotter *et al.* 2004). Bu özellik Türkiye kökenli *L. lactis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin ön tanısında etki spektrumları ile birlikte kullanılmıştır.

Çapraz denemelerde, bakteriyosin üreticisi *L. lactis* referans suşları ve Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının karşılıklı inhibisyon etkinlikleri araştırılmıştır. Bakteriyosin üreticisi *L. lactis* referans suşlarına karşı test edilen 20 adet *L. lactis* suşu, inhibisyon etkinliği benzerliğine göre beş farklı grup altında toplanmıştır. I. Grup, sadece *L. lactis* JC17'ye karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL36 suşunu; II. Grup, yalnız *L. lactis* LMG 2132'ye karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL10 ile PLL44 suşlarını ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PLD14 ile PLD73 suşlarını; III. Grup, *L. lactis* SIK-83, *L. lactis* 105, *L. lactis* 731, *L. lactis* 2, *L. lactis* LMG 2912, *L. lactis* LMG 2088 ve *L. lactis* JC17'ye karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL84 ve PLL98 suşlarını; IV. Grup, *L. lactis* SIK-83, *L.*

L. lactis 105, *L. lactis* 731, *L. lactis* 2, *L. lactis* LMG 2912, *L. lactis* LMG 2088 ve *L. lactis* LMG 2132'ye karşı inhibisyon zonu oluşturan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23, PLL52, PLL69 ve PLL77 suşlarını ve V. Grup, bakteriyosin üreticisi referans suşların hiçbirine karşı inhibisyon zonu oluşturmamayan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL3, PLL16, PLL17, PLL30, PLL32, PLL47, PLL67 ve PLL83 suşlarını içermektedir (Çizelge 4.2.).

L. lactis referans suşlarının, Türkiye kökenli 20 adet *L. lactis* suşuna karşı inhibisyon etkinliklerinin incelenmesi sonucu; *L. lactis* SIK-83, *L. lactis* 105, *L. lactis* 731, *L. lactis* 2, *L. lactis* LMG 2912 suşlarının denemede kullanılan Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının tümünün gelişimini engellediği belirlenmiştir. *L. lactis* LMG 2088 referans suşu, *L. lactis* subsp. *lactis* PLL3, PLL16, PLL17, PLL19, PLL23, PLL30, PLL32, PLL36, PLL47, PLL52, PLL67, PLL69, PLL77, PLL83, PLL84 ve PLL90 suşlarına; *L. lactis* JC17 referans suşu, *L. lactis* subsp. *lactis* PLL3, PLL10, PLL16, PLL17, PLL19, PLL30, PLL32, PLL36, PLL44, PLL83, PLL84 ile PLL90 ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PLD14 ile PLD73 suşlarına; *L. lactis* LMG 2132 referans suşu, *L. lactis* subsp. *lactis* PLL3, PLL10, PLL16, PLL17, PLL19, PLL23, PLL30, PLL32, PLL36, PLL44, PLL52, PLL69, PLL77, PLL83, PLL84 ile PLL90 ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PLD14 ile PLD73 suşlarına karşı inhibisyon etkinliği göstermiştir (Çizelge 4.3.).

Etki spektrumunun belirlenmesini esas alan testler ve üretici organizmalar arasında yürütülen çapraz denemeler sonucunda; PLL3, PLL16, PLL17 ve PLL36 suşlarının ürettikleri antimikrobiyel maddelerin laktokoksin MMFII veya laktotropsinler ile, PLL10, PLD14, PLL44 ve PLD73 suşlarının ürettikleri antimikrobiyel maddelerin laktokoksin G, laktokoksin MMFII, laktotropsinler veya nisin ile, PLL19, PLL84 ve PLL98 suşlarının ürettikleri antimikrobiyel maddelerin laktotropsinler, laktokoksin A, B veya MN ile, PLL23, PLL52, PLL69 ve PLL77 suşlarının ürettikleri antimikrobiyel maddelerin laktisin 481, laktisin FS92 veya laktokoksin MMFII ile, PLL30, PLL32 ve PLL83 suşlarının ürettikleri antimikrobiyel maddelerin laktokoksin G, laktokoksin MMFII veya laktotropsinler ile, PLL47 ve PLL67 suşlarının ürettikleri antimikrobiyel maddelerin ise laktisin 481, laktisin FS92, laktokoksin MMFII veya laktotropsinler ile uyumlu bir konakçı etkinliği içerdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının bakteriyosin üreticisi laktokoklara karşı inhibisyon etkinliği

Referans Bakteriler	Test Edilen Bakteriler									
	PLL3	PLL10	PLD14	PLL16	PLL17	PLL19	PLL23	PLL30	PLL32	PLL36
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 105	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 731	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 2	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2912	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2088	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> JC17	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2132	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

PLL: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

PLD: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Lactococcus lactis SIK-83: Nisin üreticisi

Lactococcus lactis 105: Laktisin üreticisi

Lactococcus lactis 731: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis 2: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2912: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2088: Laktokoksin G üreticisi

Lactococcus lactis JC17: Laktisin 481 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2132: Laktokoksin A+B üreticisi

Çizelge 4.2. (devam)

Referans Bakteriler	Test Edilen Bakteriler									
	PLL44	PLL47	PLL52	PLL67	PLL69	PLD73	PLL77	PLL83	PLL84	PLL98
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> 105	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> 731	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> 2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2912	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2088	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> JC17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2132	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-

PLL: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

PLD: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Lactococcus lactis SIK-83: Nisin üreticisi

Lactococcus lactis 105: Laktisin üreticisi

Lactococcus lactis 731: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis 2: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2912: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2088: Laktokoksin G üreticisi

Lactococcus lactis JC17: Laktisin 481 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2132: Laktokoksin A+B üreticisi

Çizelge 4.2. (devam)

Referans Bakteriler	Test Edilen Bakteriler									
	PLL3	PLL10	PLD14	PLL16	PLL17	PLL19	PLL23	PLL30	PLL32	PLL36
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83	-	-	-	-	-	5 mm	6 mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 105	-	-	-	-	-	2 mm	6 mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 731	-	-	-	-	-	6 mm	8 mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 2	-	-	-	-	-	6 mm	8 mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2912	-	-	-	-	-	5 mm	9 mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2088	-	-	-	-	-	6 mm	10 mm	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> JC17	-	-	-	-	-	5 mm	-	-	-	7 SZ
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2132	-	15 mm	17 mm	-	-	-	7 mm	-	-	-

PLL: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

PLD: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Lactococcus lactis SIK-83: Nisin üreticisi

Lactococcus lactis 105: Laktisin üreticisi

Lactococcus lactis 731: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis 2: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2912: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2088: Laktokoksin G üreticisi

Lactococcus lactis JC17: Laktisin 481 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2132: Laktokoksin A+B üreticisi

SZ: Silik zon

Çizelge 4.2. (devam)

Referans Bakteriler	Test Edilen Bakteriler									
	PLL44	PLL47	PLL52	PLL67	PLL69	PLD73	PLL77	PLL83	PLL84	PLL98
<i>Lactococcus lactis</i> SIK-83	-	-	6 mm	-	6 mm	-	5 mm	-	4 mm	5 mm
<i>Lactococcus lactis</i> 105	-	-	6 mm	-	6 mm	-	5 mm	-	2 mm	1 mm
<i>Lactococcus lactis</i> 731	-	-	7 mm	-	8 mm	-	8 mm	-	5 mm	6 mm
<i>Lactococcus lactis</i> 2	-	-	8 mm	-	8 mm	-	7 mm	-	6 mm	6 mm
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2912	-	-	8 mm	-	9 mm	-	8 mm	-	5 mm	6 mm
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2088	-	-	10 mm	-	10 mm	-	10 mm	-	5 mm	6 mm
<i>Lactococcus lactis</i> JC17	-	-	-	-	-	-	-	-	5 mm	5 mm
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2132	15 mm	-	7 mm	-	7 mm	17 mm	6 mm	-	-	-

PLL: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

PLD: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Lactococcus lactis SIK-83: Nisin üreticisi

Lactococcus lactis 105: Laktisin üreticisi

Lactococcus lactis 731: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis 2: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2912: Laktisin 3147 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2088: Laktokoksin G üreticisi

Lactococcus lactis JC17: Laktisin 481 üreticisi

Lactococcus lactis LMG 2132: Laktokoksin A+B üreticisi

Çizelge 4.3. Bakteriyosin üreticisi laktokokların, Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarına karşı inhibisyon etkinliği

<i>L. lactis</i> Suşları	Test Edilen Referans Bakteriler							
	SIK-83	105	731	2	LMG 2912	LMG 2088	JC17	LMG 2132
PLL3	+	+	+	+	+	+	+	+
PLL10	+	+	+	+	+	-	+	+
PLD14	+	+	+	+	+	-	+	+
PLL16	+	+	+	+	+	+	+	+
PLL17	+	+	+	+	+	+	+	+
PLL19	+	+	+	+	+	+	+	+
PLL23	+	+	+	+	+	+	-	+
PLL30	+	+	+	+	+	+	+	+
PLL32	+	+	+	+	+	+	+	+
PLL36	+	+	+	+	+	+	+	+

PLL: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

PLD: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

SIK-83 : *Lactococcus lactis* SIK-83 (Nisin üreticisi)

105 : *Lactococcus lactis* 105 (Laktisin üreticisi)

731 : *Lactococcus lactis* 731 (Laktisin 3147 üreticisi)

2 : *Lactococcus lactis* 2 (Laktisin 3147 üreticisi)

LMG 2912 : *Lactococcus lactis* LMG 2912 (Laktisin 3147 üreticisi)

LMG 2088 : *Lactococcus lactis* LMG 2088 (Laktokoksin G üreticisi)

JC17 : *Lactococcus lactis* JC17 (Laktisin 481 üreticisi)

LMG 2132 : *Lactococcus lactis* LMG 2132 (Laktokoksin A+B üreticisi)

Çizelge 4.3. (devam)

<i>L. lactis</i> Suşları	Test Edilen Referans Bakteriler							
	SIK-83	105	731	2	LMG 2912	LMG 2088	JC17	LMG 2132
PLL44	+	+	+	+	+	-	+	+
PLL47	+	+	+	+	+	+	-	-
PLL52	+	+	+	+	+	+	-	+
PLL67	+	+	+	+	+	+	-	-
PLL69	+	+	+	+	+	+	-	+
PLD73	+	+	+	+	+	-	+	+
PLL77	+	+	+	+	+	+	-	+
PLL83	+	+	+	+	+	+	+	+
PLL84	+	+	+	+	+	+	+	+
PLL90	+	+	+	+	+	+	+	+

PLL: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

PLD: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

SIK-83 : *Lactococcus lactis* SIK-83 (Nisin üreticisi)

105 : *Lactococcus lactis* 105 (Laktisin üreticisi)

731 : *Lactococcus lactis* 731 (Laktisin 3147 üreticisi)

2 : *Lactococcus lactis* 2 (Laktisin 3147 üreticisi)

LMG 2912 : *Lactococcus lactis* LMG 2912 (Laktisin 3147 üreticisi)

LMG 2088 : *Lactococcus lactis* LMG 2088 (Laktokoksin G üreticisi)

JC17 : *Lactococcus lactis* JC17 (Laktisin 481 üreticisi)

LMG 2132 : *Lactococcus lactis* LMG 2132 (Laktokoksin A+B üreticisi)

Çizelge 4.3. (devam)

<i>L. lactis</i> Suşları	Test Edilen Referans Bakteriler							
	SIK-83	105	731	2	LMG 2912	LMG 2088	JC17	LMG 2132
PLL3	6 mm	4 mm	4 mm	2 mm	4 mm	4 mm	6 mm	17 mm
PLL10	2 mm	4 mm	4 mm	4 mm	6 mm	-	1 mm	20 mm
PLD14	2 mm	7 mm	4 mm	5 mm	5 mm	-	16 mm	24 mm
PLL16	6 mm	4 mm	4 mm	2 mm	4 mm	4 mm	6 mm	17 mm
PLL17	17 mm	5 mm	4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	18 mm
PLL19	12 mm	10 mm	8 mm	8 mm	10 mm	8 mm	28 mm	30 mm
PLL23	24 mm	12 mm	12 mm	12 mm	12 mm	6 mm	-	30 mm
PLL30	4 mm	4 mm	4 mm	2 mm	6 mm	1 mm	23 mm	25 mm
PLL32	6 mm	7 mm	7 mm	3 mm	7 mm	2 mm	28 mm	20 mm
PLL36	10 mm	6 mm	6 mm	6 mm	6 mm	5 mm	28 mm	33 mm

PLL: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

PLD: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

SIK-83 : *Lactococcus lactis* SIK-83 (Nisin üreticisi)

105 : *Lactococcus lactis* 105 (Laktisin üreticisi)

731 : *Lactococcus lactis* 731 (Laktisin 3147 üreticisi)

2 : *Lactococcus lactis* 2 (Laktisin 3147 üreticisi)

LMG 2912 : *Lactococcus lactis* LMG 2912 (Laktisin 3147 üreticisi)

LMG 2088 : *Lactococcus lactis* LMG 2088 (Laktokoksin G üreticisi)

JC17 : *Lactococcus lactis* JC17 (Laktisin 481 üreticisi)

LMG 2132 : *Lactococcus lactis* LMG 2132 (Laktokoksin A+B üreticisi)

Çizelge 4.3. (devam)

<i>L. lactis</i> Suşları	Test Edilen Referans Bakteriler							
	SIK-83	105	731	2	LMG 2912	LMG 2088	JC17	LMG 2132
PLL44	2 mm	4 mm	4 mm	4 mm	6 mm	-	1 mm	20 mm
PLL47	4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	-	-
PLL52	22 mm	11 mm	11 mm	11 mm	12 mm	6 mm	-	29 mm
PLL67	4 mm	4 mm	3 mm	4 mm	3 mm	4 mm	-	-
PLL69	24 mm	12 mm	12 mm	11 mm	12 mm	6 mm	-	28 mm
PLD73	2 mm	7 mm	4 mm	5 mm	5 mm	-	16 mm	24 mm
PLL77	24 mm	12 mm	12 mm	12 mm	12 mm	6 mm	-	30 mm
PLL83	6 mm	7 mm	7 mm	3 mm	7 mm	2 mm	26 mm	21 mm
PLL84	12 mm	10 mm	8 mm	8 mm	10 mm	9 mm	28 mm	30 mm
PLL90	11 mm	10 mm	8 mm	8 mm	9 mm	8 mm	28 mm	30 mm

PLL: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

PLD: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

SIK-83 : *Lactococcus lactis* SIK-83 (Nisin üreticisi)

105 : *Lactococcus lactis* 105 (Laktisin üreticisi)

731 : *Lactococcus lactis* 731 (Laktisin 3147 üreticisi)

2 : *Lactococcus lactis* 2 (Laktisin 3147 üreticisi)

LMG 2912 : *Lactococcus lactis* LMG 2912 (Laktisin 3147 üreticisi)

LMG 2088 : *Lactococcus lactis* LMG 2088 (Laktokoksin G üreticisi)

JC17 : *Lactococcus lactis* JC17 (Laktisin 481 üreticisi)

LMG 2132 : *Lactococcus lactis* LMG 2132 (Laktokoksin A+B üreticisi)

4.2. Proteolitik Enzim Uygulaması

Değişik indikatör bakterilere karşı antimikrobiyel etki gösterdiği tespit edilen 20 adet *L. lactis* suşunda, üretilen antimikrobiyel maddenin protein doğasında olup olmadığı; bu bakterilerin nötralize edilmiş steril kültür üst sıvılarına, son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde proteinaz K uygulaması sonucu belirlenmiştir. Proteinaz K uygulamasında indikatör bakteri olarak, test edilen her bir *L. lactis* suşunun en yüksek inhibisyon zonunu oluşturduğu bakteri seçilmiştir. Kontrol testler, enzim ilave edilmemiş nötralize kültür üst sıvıları kullanılarak yapılmıştır.

L. lactis suşlarının nötralize edilmiş steril kültür üst sıvılarında yapılan proteinaz K uygulaması sonucu, 11 adet *L. lactis* suşunun (PLL3, PLL10, PLD14, PLL16, PLL17, PLL30, PLL32, PLL36, PLL44, PLD73 ve PLL83) ürettiği antimikrobiyel maddenin proteinaz K uygulamasından etkilenmediği, buna karşın 9 adet *L. lactis* suşunun (PLL19, PLL23, PLL47, PLL52, PLL67, PLL69, PLL77, PLL84 ve PLL98) ürettiği antimikrobiyel maddenin ise proteinaz K uygulaması sonucu etkinliğini kaybettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4.).

L. lactis subsp. *lactis* PLL19, PLL84 ve PLL98 suşlarının kontrol amacı ile kullanılan nötralize edilmiş steril kültür üst sıvılarında indikatör bakteriye karşı zon alınamamasından dolayı, bu suşlar ile yürütülen denemelerde nötralize edilmemiş steril kültür üst sıvıları devreye sokulmuştur. Nötralize edilmemiş steril kültür üst sıvıları kullanıldığı zaman, bu suşlar tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin proteinaz K uygulamasından etkilendiği ve aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerin bir grubunu teşkil eden laktotropsinler, nötral pH değerlerinde aktivitelerini tamamen kaybetmektedir (Kozak *et al.* 1977, Klaenhammer 1993). *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL84 ve PLL98 suşlarının kültür üst sıvılarında da aynı aktivite özelliklerinin saptanması, bu suşlar tarafından üretilen bakteriyosinin laktotropsin olduğunun güçlü bir delili olarak kabul edilmiştir.

Bazı karbonhidrat veya lipit yan grupları da içerebilmelerine rağmen, bakteriyosinlerin tümünde antibakteriyel etkinlik ana protein yapıdan kaynaklanmaktadır. Laktik asit bakterilerinde tanımlanan tüm bakteriyosinlerin, proteolitik enzim muamelesi sonucunda aktivitelerini ya tamamen ya da büyük ölçüde kaybettikleri saptanmıştır (Dobrzanski *et al.* 1982, van Belkum *et al.* 1989, Jimenez-Diaz *et al.* 1990, Piard *et al.* 1990, Dieye *et al.* 2001). Proteinaz K uygulaması sonucu inhibitör etkinin tamamen ortadan kalkması aktif maddenin protein yapıda olduğunu (bakteriyosin), proteinaz K uygulamasından etkilenmemesi ise antibakteriyel aktivitenin protein benzeri yapıdan ileri gelmediğinin delili olarak değerlendirilmiştir. Bu veriler ışığında, proteinaz K uygulamasından etkilenen 9 adet *L. lactis* subsp. *lactis* suşu bakteriyosin üreticisi olarak tanımlanmıştır.

11 adet *L. lactis* suşunun ürettiği antimikrobiyel maddenin proteinaz K uygulamasından etkilenmemesi ise, bu suşların bakteriyosin dışında başka bir antimikrobiyel madde ürettiklerine işaret etmektedir. Bugüne kadar yapılan farklı çalışmalarda, laktokok suşlarının bakteriyosinler dışında; organik asitler, diasetil, asetoin ve hidrojen peroksit gibi farklı antimikrobiyel maddeler ürettikleri belirlenmiştir (Jay 1982, McKay 1983, Condo 1987, Hugenholtz and Starrenburg 1992, Morita *et al.* 1997, Hsu *et al.* 2002, Devlieghere *et al.* 2004).

Çizelge 4.4. *L. lactis* kültür üst sıvılarında proteinaz K uygulaması sonucu meydana gelen antimikrobiyel aktivite değişimleri

Bakteri Kod No. (Nötralize Edilmiş <i>L. lactis</i> Kültür Üst Sıvıları)	Antimikrobiyel Aktivite ¹	
	Kontrol ²	Proteinaz K Uygulaması Sonrası
PLL3	+	+
PLL10	+	+
PLD14	+	+
PLL16	+	+
PLL17	+	+
PLL19 ³	+	-
PLL23	+	-
PLL30	+	+
PLL32	+	+
PLL36	+	+
PLL44	+	+
PLL47	+	-
PLL52	+	-
PLL67	+	-
PLL69	+	-
PLD73	+	+
PLL77	+	-
PLL83	+	+
PLL84 ³	+	-
PLL98 ³	+	-

PLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

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

¹ Antimikrobiyel aktiviteler suşların en yüksek düzeyde etki gösterdiği indikatörlere karşı belirlenmiştir.

² Nötralize edilen kültür üst sıvılarına proteinaz K uygulaması yapılmamıştır.

³ Nötralize edilen kültür üst sıvılarında indikatör bakteriye karşı zon alınamayınca, bu suşların laktoztrepsin üreticisi olabileceği düşünülerek, denemelerde nötralize edilmemiş kültür üst sıvıları kullanılmıştır.

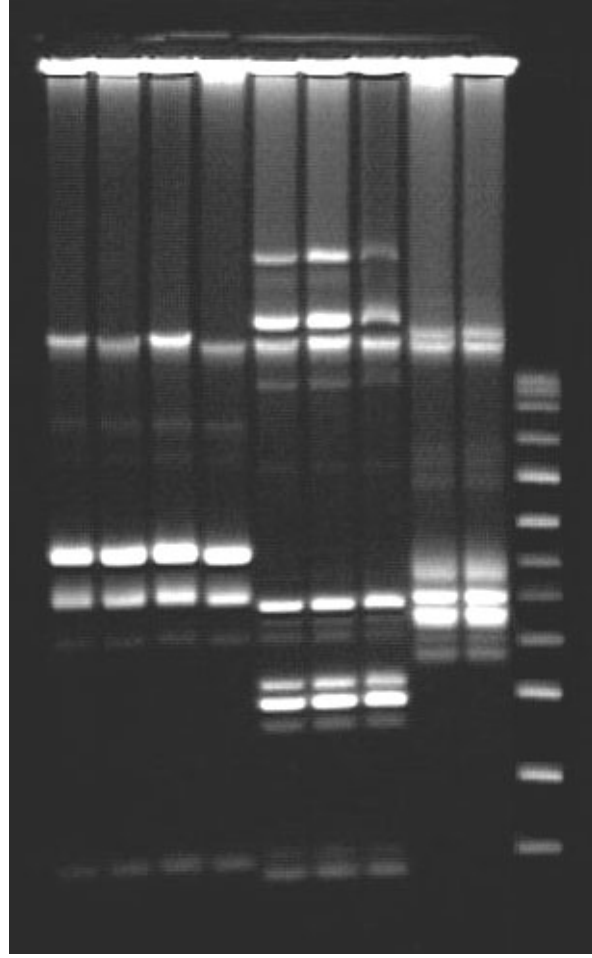
4.3. Bakteriyosin Üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* Suşlarının Plazmid İçeriklerinin Tanımlanması

Proteinaz K uygulaması sonucu bakteriyosin üreticisi oldukları tespit edilen 9 adet laktokok suşunun, Anderson ve McKay (1983) tarafından önerilen alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak yapılan plazmid izolasyonu çalışmalarında, içerdikleri plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri aynı olan üç grup oluşturulmuştur. Birinci grupta; moleküler büyüklükleri 19.0, 13.2, 11.2, 7.5, 6.2, 5.2 ve 1.9 kb (kilobaz) olan 7 adet plazmid içerdiği belirlenen *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23, PLL52, PLL69 ve PLL77 suşları bulunmaktadır. İkinci grup'ta 13 adet plazmid içeren ve moleküler büyüklükleri 27.3, 20.9, 18.6, 15.5, 10.8, 5.9, 5.6, 5.2, 4.2, 3.9, 3.5, 2.0 ve 1.8 kb olan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL84 ve PLL98 suşları yer almıştır. Üçüncü grup ise; moleküler büyüklükleri 19.6, 18.3, 11.9, 11.2, 10.1, 6.8, 6.0, 5.6, 5.1 ve 4.7 kb olarak saptanan 10 adet plazmid içeren *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 ve PLL67 suşlarından oluşmuştur (Şekil 4.3.).

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, *Lactococcus* cinsi suşların içerdiği plazmidlerin büyüklüklerinin genellikle 1-100 kb arasında olduğu belirlenmiştir (Klaenhammer *et al.* 1978, Kuhl *et al.* 1979, Davies *et al.* 1981, von Wright *et al.* 1986, Lucey *et al.* 1993, Liu *et al.* 1997, Tükel ve Akçelik 2000). Bakteriyosin üreticisi oldukları tespit edilen 9 adet *L. lactis* subsp. *lactis* suşunun plazmid içerikleri, bu literatür verileri ile uyum göstermektedir.

Plazmid içeriklerindeki uyuşma; tür, alttür ya da biyovaryete'nin suşlarının ayrımında yaygın kullanım alanı bulan yöntemlerin başında gelmektedir (Schleifer 1987, Beimfohr *et al.* 1997, Leroy and De Vuyst 2004). Etki spektrumları benzerliğine göre aynı grup içerisinde yer alan Türkiye kökenli bakteriyosin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içeriklerinin de tamamen aynı olması, bu suşların aynı suşlar olduklarını kanıtlamaktadır.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 M



Şekil 4.3. Bakteriyosin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içerikleri

1	2	3	4	5	6	7	8	9	M
PLL23	PLL52	PLL69	PLL77	PLL19	PLL84	PLL98	PLL47	PLL67	(ccc Plazmid DNA Marker)
kb	kb	kb	kb	kb	kb	kb	kb	kb	kb
				27.3	27.3	27.3	19.6	19.6	16.2
				20.9	20.9	20.9	18.3	18.3	14.1
				18.6	18.6	18.6	11.9	11.9	12.2
				15.5	15.5	15.5	11.2	11.2	10.2
				10.8	10.8	10.8	10.1	10.1	8.0
				5.9	5.9	5.9	6.8	6.8	7.2
				5.6	5.6	5.6	6.0	6.0	6.0
				5.2	5.2	5.2	5.6	5.6	5.0
				4.2	4.2	4.2	5.1	5.1	4.0
				3.9	3.9	3.9	4.7	4.7	2.9
				3.5	3.5	3.5			2.1
				2.0	2.0	2.0			
				1.8	1.8	1.8			

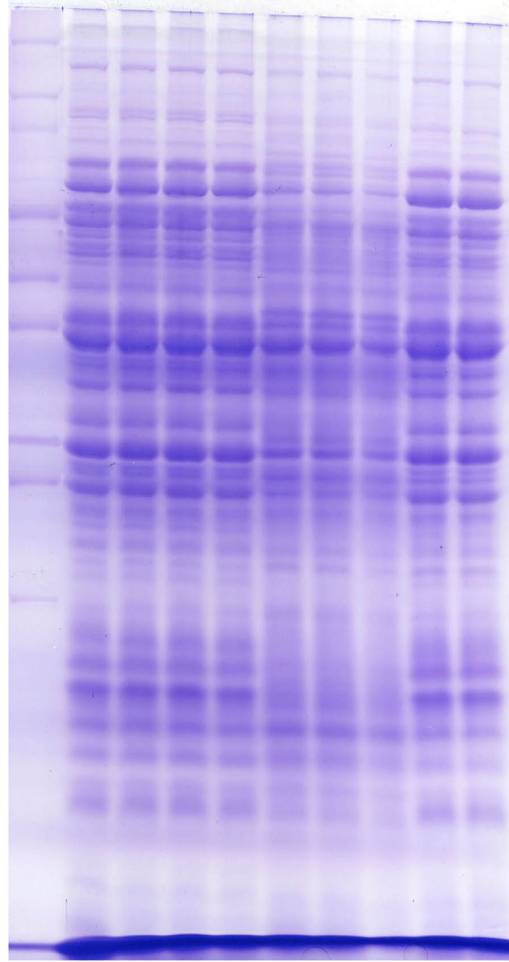
4.4. Bakteriyosin Üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* Suşlarının Toplam Hücre Proteinlerinin Tanımlanması

Bakteriyosin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının toplam hücre proteini profilleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile belirlenmiştir. Plazmid sayı ve büyüklükleri bakımından tam bir uyuşma görülen grup üyelerinde yürütülen protein analizi sonucunda, aynı benzerliğin toplam hücre proteini profilleri bakımından da var olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).

Birinci grup üyesi olan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23, PLL52, PLL69 ve PLL77 suşlarında, moleküler büyüklükleri 197.0, 138.5, 120.4, 109.0, 104.7, 102.6, 97.0, 92.9, 80.8, 71.6, 63.5, 57.5, 54.2, 51.0, 48.0, 46.1, 40.1, 33.5, 29.1, 27.4, 26.4, 23.4, 19.2, 16.3, 15.1, 14.5, 12.8, 11.3, 10.5, 9.5, 8.6, 7.9, 6.6, 5.7, 4.9, 4.2, 3.4, 2.9, 2.5, 2.2, 1.8, 1.4, 1.2 ve 1.0 kDa (kilo Dalton) olan 44 adet protein bandı tanımlanmıştır. İkinci grubu teşkil eden *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL84 ve PLL98 suşlarında, moleküler büyüklükleri 138.5, 120.4, 109.0, 104.7, 102.6, 100.1, 96.7, 84.1, 80.8, 71.6, 64.8, 59.8, 56.4, 55.2, 52.0, 46.1, 42.6, 37.0, 34.2, 29.7, 23.4, 18.0, 16.3, 15.1, 14.5, 12.8, 11.3, 10.5, 9.5, 8.6, 6.6, 5.7, 4.9, 4.5, 4.2, 3.4, 2.9, 2.5, 2.2, 1.8, 1.4, 1.2 ve 1.0 kDa olan 43 adet protein bandı saptanmıştır. Üçüncü grup üyeleri *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 ve PLL67 suşlarında ise, moleküler büyüklükleri 138.5, 120.4, 109.0, 102.6, 97.0, 92.9, 80.8, 71.6, 63.5, 57.5, 54.2, 51.0, 48.0, 46.1, 40.1, 33.5, 29.1, 27.4, 26.4, 23.4, 19.2, 16.7, 15.4, 12.8, 11.3, 10.5, 9.7, 8.6, 7.9, 6.6, 5.7, 4.9, 4.2, 3.4, 2.9, 2.5, 2.2, 1.8, 1.4 ve 1.2 kDa olan 40 adet protein bandı belirlenmiştir.

Konakçı bakterilere karşı gösterdikleri inhibisyon etkinliği ve plazmid içerikleri benzerliğine göre, esasen 3 farklı suş oldukları sonucuna varılan 9 adet *L. lactis* subsp. *lactis* suşunun protein profilleri de, bu değerlendirmeyi desteklemektedir. Toplam hücre proteini profillerinin belirlenmesi (SDS-PAGE); kolay, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle, tür ve alt tür ayrımlarında genetik yöntemlerle beraber kullanılmaktadır (Descheemaeker *et al.* 1994, Teixeira *et al.* 1996, Perez *et al.* 2000, Vereecken and Van Impe 2002, Delgado and Mayo 2004).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



Şekil 4.4. Bakteriyosin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının protein profilleri

M	Protein Marker	(kDa):	180.0, 116.0, 97.0, 58.1, 39.8, 29.0, 20.1, 14.3, 6.5
1	PLL23	(kDa):	197.0, 138.5, 120.4, 109.0, 104.7, 102.6, 97.0, 92.9, 80.8, 71.6, 63.5, 57.5, 54.2, 51.0, 48.0, 46.1, 40.1, 33.5, 29.1, 27.4, 26.4, 23.4, 19.2, 16.3, 15.1, 14.5, 12.8, 11.3, 10.5, 9.5, 8.6, 7.9, 6.6, 5.7, 4.9, 4.2, 3.4, 2.9, 2.5, 2.2, 1.8, 1.4, 1.2, 1.0
2	PLL52		
3	PLL69		
4	PLL77		
5	PLL19	(kDa):	138.5, 120.4, 109.0, 104.7, 102.6, 100.1, 96.7, 84.1, 80.8, 71.6, 64.8, 59.8, 56.4, 55.2, 52.0, 46.1, 42.6, 37.0, 34.2, 29.7, 23.4, 18.0, 16.3, 15.1, 14.5, 12.8, 11.3, 10.5, 9.5, 8.6, 6.6, 5.7, 4.9, 4.5, 4.2, 3.4, 2.9, 2.5, 2.2, 1.8, 1.4, 1.2, 1.0
6	PLL84		
7	PLL98		
8	PLL47	(kDa):	138.5, 120.4, 109.0, 102.6, 97.0, 92.9, 80.8, 71.6, 63.5, 57.5, 54.2, 51.0, 48.0, 46.1, 40.1, 33.5, 29.1, 27.4, 26.4, 23.4, 19.2, 16.7, 15.4, 12.8, 11.3, 10.5, 9.7, 8.6, 7.9, 6.6, 5.7, 4.9, 4.2, 3.4, 2.9, 2.5, 2.2, 1.8, 1.4, 1.2
9	PLL67		

4.5. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine pH, Sıcaklık ve Enzim Uygulamalarının Etkisi

Bakteriyosin üreticisi olarak tanımlanan ve plazmid içerikleri ile toplam hücre protein profillerindeki uyuşmaya göre 3 farklı suş oldukları belirlenen *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında, üretilen bakteriyosinlerin ileri düzeyde tanısı ve sınıflandırılmasında; bakteriyosinlerin değişik enzim, pH ve sıcaklık uygulamalarına karşı davranışları esas alınmıştır. Çalışmalarda I. grup temsilcisi olarak PLL23, II. grup temsilcisi olarak PLL19 ve III. grup temsilcisi olarak PLL47, suşları kullanılmıştır.

L. lactis subsp. *lactis* PLL19 suşunun kültür üst sıvılarında kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak yürütülen testler sonucunda, üretilen bakteriyosinin aktivitesi 80 AU/mL olarak belirlenmiştir. pH denemelerinde; PLL19 suşunun ürettiği bakteriyosinin pH 2.0-5.0 arasında stabilitesini koruduğu, pH 6.0 da % 50 oranında aktivite kaybı gösterdiği ve pH 7.0-11.0 arasında ise tamamen inaktive olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.5.). Enzim uygulamalarında söz konusu suşun ürettiği bakteriyosinin; tripsin ve α -kemotripsin tarafından inaktivasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6. ve Şekil 4.5.). Kullanılan diğer enzimler ve 100 °C'de sıcaklık uygulamalarında ise, herhangi bir aktivite değişimi meydana gelmemiştir (Çizelge 4.6.). Değişik enzim ve pH uygulamalarının sonuçları ile literatür verileri karşılaştırıldığında (Kozak *et al.* 1977, Kozak *et al.* 1978, Bardowski *et al.* 1979, Klaenhammer 1993) PLL19 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin laktoztrepsin 1 ya da laktoztrepsin 2 olduğu ortaya çıkmaktadır. Laktoztrepsin 1 ve 2 arasındaki temel ayırım, laktoztrepsin 1'in 121 °C'de 10 dakika sıcaklık uygulamasında aktivitesini tamamen kaybetmesidir (Bardowski *et al.* 1979, Klaenhammer 1993). Bu test sonucunda PLL19 suşunun ürettiği bakteriyosinin aktivitesinin etkilenmediği belirlenmiştir (Çizelge 4.6.). Bu nedenle söz konusu bakteriyosin, laktoztrepsin 2 olarak tanımlanmıştır.

L. lactis subsp. *lactis* PLL23 suşunda bakteriyosin aktivitesi, bu bakterinin nötrale edilmiş kültür üst sıvılarında 2560 AU/mL düzeyinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.5. ve Şekil 4.6.). PLL23 suşu tarafından üretilen bakteriyosin; pH 2.0-8.0 değerleri arasında tamamen stabil iken, pH 9.0, 10.0 ve 11.0 değerlerinde % 50 oranında aktivite kaybı

göstermiştir (Çizelge 4.5.). Bu bakteriyosin de α -kemotripsin muamelesi sonucu tüm aktivitesini kaybetmiş, ancak diğer enzim uygulamalarından etkilenmemiştir. Son olarak; söz konusu bakteriyosin değişik süreler ile 100 °C’de yürütülen sıcaklık denemelerinden hiç etkilenmemiş, 121 °C’de 10 dakika sıcaklık uygulamasında ise % 50 oranında aktivite kaybına uğramıştır (Çizelge 4.6.). Bu veriler, denemelerde şahit olarak kullanılan ve laktisin 481 üreticisi olan *L. lactis* subsp. *lactis* JC17 suşunun kültür üst sıvıları ile yürütülen testlerle tam bir uyum göstermiştir. Buradan hareketle, PLL23 tarafından üretilen bakteriyosin laktisin 481 olarak tanımlanmıştır.

Üçüncü bakteriyosin üreticisi olan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 suşu, diğer iki bakteriyosin üreticisinden daha yüksek oranda antibakteriyel protein üretme yeteneğinde bulunmuştur. Bu bakterinin nötralize edilmiş kültür üst sıvılarında bakteriyosin aktivitesi 6400 AU/mL olarak saptanmıştır. Bu bakteriyosin, PLL23 suşunun ürettiği bakteriyosinle benzer bir şekilde, pH 2.0-8.0 arasında tamamen stabilitesini korumuş ve pH 9.0, 10.0 ve 11.0’de ise % 50 oranında aktivite kaybı göstermiştir (Çizelge 4.5.). α -kemotripsin’e ilave olarak, pepsin ile de tamamen ve tripsin uygulaması ile ise kısmen aktivite kaybı (% 50 oranında) gösteren PLL47 tarafından üretilen bakteriyosin, sıcaklık uygulamalarına da dirençli bulunmuştur (Çizelge 4.6.). Bu veriler PLL47 suşunun ürettiği bakteriyosinin, laktisin FS92 ile tamamen aynı özelliklere sahip olduğuna işaret etmektedir (Mao *et al.* 2001).

Çizelge 4.5. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Bakteriyosin Aktivitesi (AU mL ⁻¹)			
	PLL19	PLL23	PLL47	JC17
2	80	2560	6400	3200
3	80	2560	6400	3200
4	80	2560	6400	3200
5	80	2560	6400	3200
6	40	2560	6400	3200
7	0	2560	6400	3200
8	0	2560	6400	3200
9	0	1280	3200	1600
10	0	1280	3200	1600
11	0	1280	3200	1600

PLL : *L. lactis* subsp. *lactis*

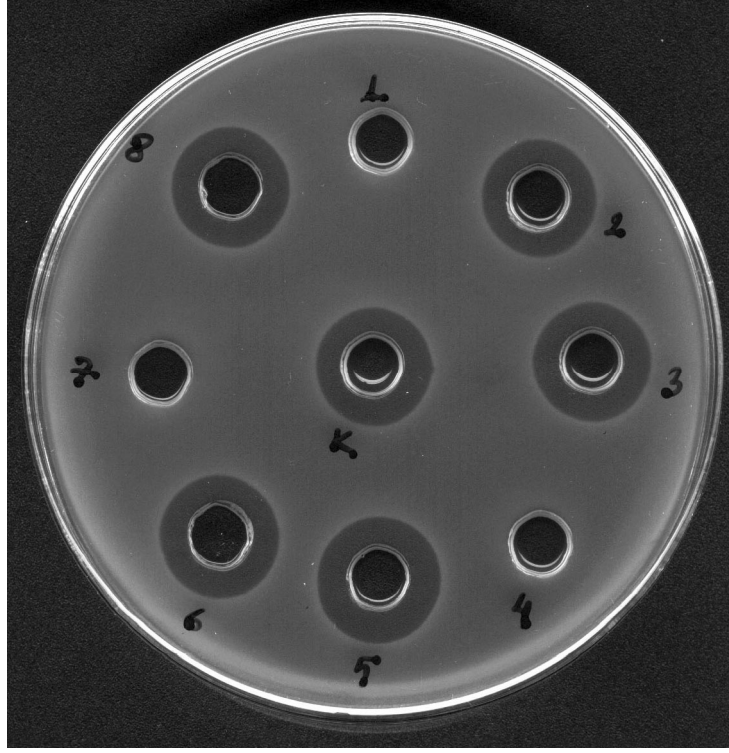
JC17 : *L. lactis* subsp. *lactis* (laktisin 481 üreticisi)

Çizelge 4.6. Bakteriyosin aktivitesi üzerine enzim ve sıcaklığın etkisi

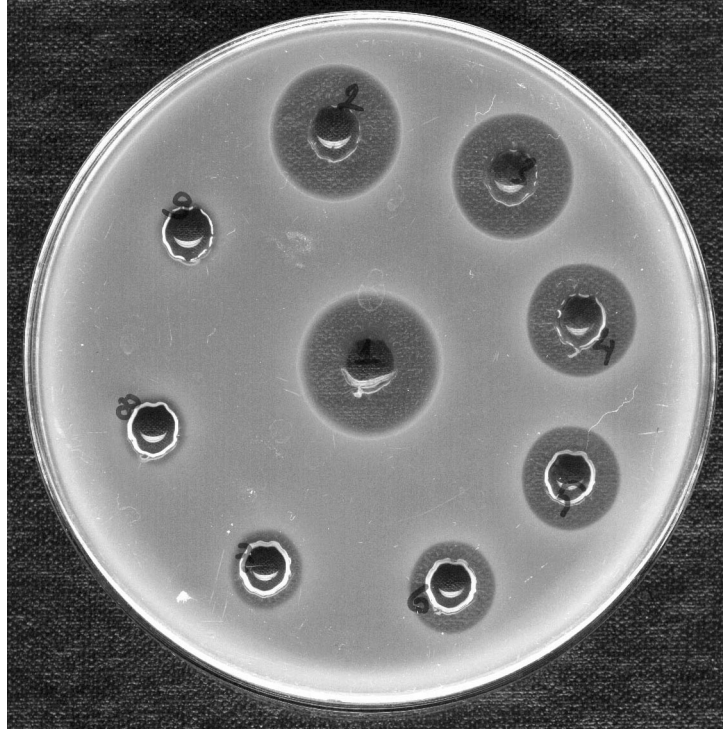
Muamele	Bakteriyosin Aktivitesi (AU mL ⁻¹)			
	PLL19	PLL23	PLL47	JC17
Kontrol	80	2560	6400	3200
Tripsin	0	2560	3200	3200
α -kemotripsin	0	0	0	0
Pepsin	80	2560	0	3200
α -amilaz	80	2560	6400	3200
Lipaz	80	2560	6400	3200
Katalaz	80	2560	6400	3200
Lizozim	80	2560	6400	3200
100 °C'de 5 dak	80	2560	6400	3200
100 °C'de 10 dak	80	2560	6400	3200
100 °C'de 15 dak	80	2560	6400	3200
100 °C'de 20 dak	80	2560	6400	3200
121 °C'de 10 dak	80	1280	6400	1600

PLL : *L. lactis* subsp. *lactis*

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



Şekil 4.5. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19 suşunun ürettiği bakteriyosin üzerine enzimlerin etkisi. Proteinaz K (1), lizozim (2), pepsin (3), tripsin (4), α -amilaz (5), katalaz (6), α -kemotripsin (7), lipaz (8) ve kontrol (K)



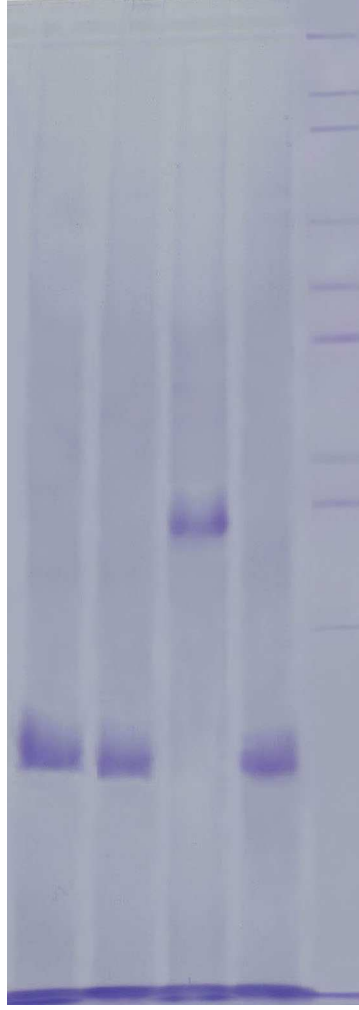
Şekil 4.6. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23 suşunun bakteriyosin aktivitesinin kritik dilüsyon yöntemi ile saptanması (2560 AU/mL)

4.6. Kısmi Saflaştırılması Yapılan Bakteriyosinlerin Moleküler Büyüklüklerinin Saptanması

L. lactis subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşlarının; antibakteriyel etki spektrumları yanında, kimyasal ve fiziksel uygulamalara verdikleri yanıtlar esas alınarak tanımlanan bakteriyosinlerinin moleküler büyüklükleri, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sisteminde belirlenmiştir (Şekil 4.7.). Amonyum sülfat (% 40) çöktürme esasına göre kısmi saflaştırması yapılan bakteriyosinlerin moleküler büyüklükleri; laktoztrepsin 2 için 12000 Dalton, laktisin 481 için 3400 Dalton ve laktisin FS92 için ise 3500 Dalton olarak saptanmıştır.

Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalarda laktoztrepsinlerin moleküler büyüklüğü hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Laktoztrepsinlerin çeşitli proteolitik enzimler yanında fosfolipaz D'ye karşıda duyarlı olması, söz konusu bakteriyosinlerin protein yapı yanında fosfolipit yan grubu da içerdiğini göstermektedir. Yan gruplar içermesi nedeniyle, laktoztrepsinlerin diğer bakteriyosinlerden daha büyük moleküler ağırlığa sahip olduğu ileri sürülmüştür (Kozak *et al.* 1977, Kozak *et al.* 1978, Zajdel and Dobrzanski 1983). Araştırma kapsamında laktoztrepsin 2'nin moleküler büyüklüğünün belirlenmesi, bu konuda kısıtlı olan literatür verilerine katkısından dolayı ayrı bir önem taşımaktadır. Değişik araştırmalarda, üretim ortamlarından ekstrakte edilerek hazırlanan preparatlar üzerinde yürütülen analizler, laktisin 481'in moleküler büyüklüğünün 3400 Da civarında olduğunu göstermiştir (Piard *et al.* 1992, Nettles and Barefoot 1993). Diğer yandan, kısmi saflaştırılması yapılan laktisin FS92'nin moleküler büyüklüğünün, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi analizleri sonucunda yaklaşık olarak 3500 Da olduğu belirlenmiştir (Mao *et al.* 2001). Türkiye kökenli *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında amonyum sülfat çöktürmesi esasına göre kısmi saflaştırılması yapılan bakteriyosinlerin moleküler büyüklüklerinin literatür verileri ile paralellik taşıması, *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanısına kesinlik kazandırmıştır.

1 2 3 4 M



Şekil 4.7. *L. lactis* subsp. *lactis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez profilleri

1	2	3	4	M
PLL47	PLL23	PLL19	JC 17*	Protein marker
kDa	kDa	kDa	kDa	kDa
3.5	3.4	12.0	3.4	180.0
				116.0
				97.0
				58.1
				39.8
				29.0
				20.1
				14.3
				6.5

* *L. lactis* subsp. *lactis* JC 17; laktisin 481 üreticisi

4.7. Bakteriyosin Üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* Suşlarının Genetik Determinantlarının Saptanması

Bakteriyosin üreticisi olarak tanımlanan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında, bu özelliği kontrol eden genetik determinantların belirlenmesi için; mutasyonel analiz ve konjugal aktarım olmak üzere, iki farklı yöntemden yararlanılmıştır. Mutasyonel analiz çalışmalarında mutajen ajan olarak akriflavin kullanılmıştır. Minimum üremenin gerçekleştiği akriflavin dozu deneysel olarak belirlenmiştir (PLL19, PLL23 ve PLL47 suşları için, sırasıyla 22.5 µg/mL, 15.0 µg/mL ve 18.5 µg/mL). Bu akriflavin konsantrasyonlarında 5 pasaj geliştirilen bakteriyosin üreticisi laktokok suşlarından, laktoz indikatör agar ortamlarına yayma ekim (0.1 mL) yapılmış ve 30 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda laktoz fermentasyon yeteneğini sürdüren (Lac⁺) ve laktoz fermentasyon yeteneğini kaybetmiş (Lac⁻) koloniler seçilmiş ve GM17 agar ortamlarında bakteriyosin üretim yetenekleri, duyarlı indikatör bakteriler kullanılarak araştırılmıştır. Bakteriyosin üretme yeteneğini sürdüren (Bac⁺) ve bakteriyosin üretme yeteneğini kaybetmiş (Bac⁻) mutantların plazmid içeriklerindeki değişim, % 0.7 agaroz içeren jellerde belirlenmiştir (Şekil 4.8., 4.9. ve 4.10.). Konjugal aktarım çalışmalarında ise; Bac⁺, Lac⁺, kloramfenikol ve eritromisine duyarlı (Cm^s ve Em^s) doğal tip verici suşlar ile Bac⁻, Lac⁻, kloramfenikol (45 µg/mL) ve eritromisine (120 µg/mL) dirençli (Cm^r ve Em^r) *L. lactis* subsp. *lactis* MLL40-29 alıcı suşunun membran filtre üzerinde eşleştirilmesi yöntemi kullanılmıştır. Bac⁺, Cm^r ve Em^r kriterlerine göre seçilen konjugantlarda (Çizelge 4.7.) plazmid analizleri ile, aktarım sağlanan özelliği kontrol eden plazmidler tanımlanmıştır (Şekil 4.11., 4.12. ve 4.13.).

Laktotrepisin 2 üreticisi olarak tanımlanan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19 suşunda yapılan plazmid izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi analizleri sonucunda; büyüklükleri 27.3, 20.9, 18.6, 15.5, 10.8, 5.9, 5.6, 5.2, 4.2, 3.9, 3.5, 2.0 ve 1.8 kb olan 13 adet plazmid içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). Bu suşun laktotrepisin 2 üretme yeteneğini içermeyen (Lct2⁻) iki mutantından birincisinde (PLL19-11) büyüklükleri 27.3, 5.9, 5.6 ve 5.2 kb olan 4 plazmid kaybı olmuş iken, ikincisinde (PLL19-17) sadece 27.3 kb büyüklükteki plazmid kaybı meydana gelmiştir. PLL19-17 mutantında, sadece 27.3 kb büyüklükteki plazmidin kaybı ile Lct2⁻ ve Lac⁻ fenotipin oluşması, bu iki

özelliğın 27.3 kb büyüklükteki plazmid tarafından determine edildiğinin güçlü delili olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.8.). *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19 doğal suşu (Lct2⁺, Lac⁺) ile *L. lactis* subsp. *lactis* MLL40-29 (Lct2⁻, Lac⁻) alıcı suşu arasında gerçekleştirilen konjugasyon denemeleri sonucu; verici hücre başına 2.6x10⁻³ sıklıkta meydana gelen Lct2⁺ ve Lac⁺ konjugantların (Çizelge 4.7.) yalnız 27.3 kb büyüklükteki plazmidi içermesi, Lct2⁺ ve Lac⁺ özelliklerin genetik determinantlarının 27.3 kb büyüklükteki plazmid üzerinde taşındığına kesinlik kazandırmıştır (Şekil 4.11.).

Büyüklükleri 19.0, 13.2, 11.2, 7.5, 6.2, 5.2 ve 1.9 kb olan 7 adet plazmid içerdığı belirlenen (Şekil 4.3.) laktisin 481 üreticisi (481⁺) *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23 suşunda; PLL23-20 mutanı 19.0, 13.2, 11.2 ve 7.5 kb ve PLL23-9 mutanı 19.0, 13.2 ve 11.2 kb büyüklükteki plazmidlerin giderilmesiyle, 481⁺ ve Lac⁺ özelliklerini kaybetmiştir. PLL23-15 mutanında ise, sadece 19.0 kb büyüklükteki plazmidin giderilmesi ile 481⁻ ve Lac⁻ fenotip meydana gelmesi, 481⁺ ve Lac⁺ özelliklerinin genetik determinantlarının 19.0 kb büyüklükteki plazmid üzerinde bulunduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.9.). *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23 verici suşu ile, *L. lactis* subsp. *lactis* MLL40-29 alıcı suşu arasında gerçekleştirilen konjugal aktarım çalışmalarında; verici hücre başına 4.5x10⁻⁴ sıklıkta Lac⁺ ve 481⁺ fenotipin meydana geldiği belirlenmiştir. Konjugantlarda sadece 19.0 kb büyüklükteki plazmidin aktarımı ile 481⁺ ve Lac⁺ fenotipin oluşması, bu özelliklerin genetik determinantlarının 19.0 kb büyüklükteki plazmid üzerinde bulunduğu verisini desteklemektedir (Çizelge 4.7. ve Şekil 4.12.).

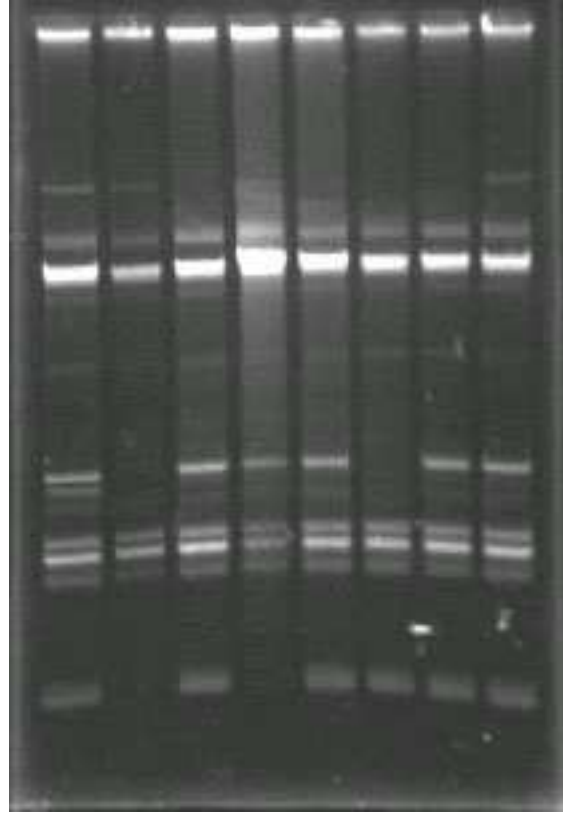
Laktisin FS92 üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 suşunda, büyüklükleri 19.6, 18.3, 11.9, 11.2, 10.1, 6.8, 6.0, 5.6, 5.1 ve 4.7 kb olan 10 adet plazmid tanımlandı (Şekil 4.3.). PLL19 ve PLL23 suşları ile benzer bir şekilde PLL47 suşunda da, yalnız bir plazmidin (19.6 kb) kaybı sonucu FS92⁻ ve Lac⁻ mutant (PLL47-18) meydana gelmiştir (Şekil 4.10.). *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47'nin (FS92⁺, Lac⁺) verici suş olarak kullanıldığı konjugal aktarım çalışmaları sonucu, 19.6 kb büyüklükteki plazmidin *L. lactis* subsp. *lactis* MLL40-29 (FS92⁻, Lac⁻) alıcı suşuna transferi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13.). Laktoz metabolizması ve laktisin FS92 üretimini kontrol eden plazmidin konjugal aktarım sıklığı, verici hücre başına 8.0x10⁻³ düzeyinde saptanmıştır (Çizelge 4.7.).

Değişik araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarda; laktokoklarda bakteriyosin üretim özelliğinin genetik determinantlarının, genellikle farklı büyüklüklerdeki plazmidler tarafından kodlandığı tanımlanmıştır (Scherwitz *et al.* 1983, Davey 1984, van Belkum *et al.* 1989, Dufour *et al.* 1991, Holo *et al.* 1991, Stoddard *et al.* 1992, Coakley *et al.* 1997, Akçelik 1999, Akçelik vd 2001). Bakteriyosin üretim özelliğine sahip olduğu tespit edilen Türkiye kökenli üç *L. lactis* subsp. *lactis* (PLL19, PLL23 ve PLL47) suşunda, laktoz fermentasyonu yeteneği ve bakteriyosin üretim özelliğinin genetik determinantlarının birlikte bulunduğu plazmidlerin büyüklüğü literatür verileriyle uyum göstermektedir. Laktokoklarda laktoz fermentasyon yeteneğinden sorumlu plazmidlerin 17 kb'dan büyük olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmalarda, laktoz plazmidleri üzerinde yer alan bakteriyosin üretimi fenotipinin, genellikle konjugal aktarım yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. Söz konusu plazmidlerin konjugal aktarım sıklığının, verici hücre başına 10^{-1} - 10^{-7} arasında değişme gösterdiği tespit edilmiştir (Neve *et al.* 1984, Powell *et al.* 1990, Piard *et al.* 1993, Coakley *et al.* 1997, Hindré *et al.* 2004).

Literatür verileri ile benzer şekilde, Türkiye kökenli bakteriyosin üreticisi laktokok suşlarında bakteriyosin üretim özelliğinin genetik determinantlarının konjugatif özelliğe sahip laktoz plazmidleri üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir. *Lactococcus* cinsi üyelerinde, konjugatif özellik içeren plazmidler üzerinde taşınan özellikler, yüksek düzeyde stabilite göstermektedir. Kromozomal replikasyon süresince çıkarılan plazmid kopya sayısının yüksek oluşu ve konjugasyon yolu ile aktarımı, plazmid kodlu özelliklerin popülasyondaki gen frekansının hızla artmasına yol açmakta ve sonuçta söz konusu fenotipin stabilitesi meydana gelmektedir. Bu stabilite, teknolojik açıdan kullanışlı metabolik özellikler için laktokok starter kültür suşlarında aranmaktadır (Gasson *et al.* 1992, Kok 1996, Langella *et al.* 1996, van Kranenburg and De Vos 1998, Nes and Johnsborg 2004, Vázquez *et al.* 2004). Bu araştırma kapsamında tanımlanan bakteriyosin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşlarında; laktoz fermentasyonu ve bakteriyosin üretimi özelliklerinin gen kodunun konjugal aktarım sıklığı yüksek laktoz plazmidleri üzerinde bulunduğunun tespiti, bu bakterilerin endüstriyel starter kültür suşu geliştirme programları için uygun olduğuna işaret etmektedir. Diğer yandan, laktokoklarda laktoztrepsinlerin üretimi ve genetik

determinantları üzerinde az miktarda literatür verisi bulunmaktadır (Devlieghere *et al.* 2004, Nes and Johnsborg 2004). Bu nedenle, araştırma kapsamında tanımlanan laktoztrepsin 2 üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19 suşundan sağlanan veriler, literatüre katkı niteliği taşımaktadır. Bu genetik verilerin çoğalması, özellikle bakteriyosin üretiminin regülasyonunun esasının tanımlanmasına yönelik çalışmalara ivme kazandıracaktır.

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.8. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19 doğal suşu ve laktoztrepsin 2 üretme yeteneğini kaybetmiş ($Lct2^-$) ya da bu özelliği sürdüren ($Lct2^+$) mutantlarının plazmid içerikleri

1-8 (PLL19 Doğal suş, $Lct2^+$, Lac^+)	2 (PLL19-6, Mutant, $Lct2^+$, Lac^+)	3-5-7 (PLL19-17, Mutant, $Lct2^-$, Lac^-)	4 (PLL19-9, Mutant, $Lct2^+$, Lac^+)	6 (PLL19-11, Mutant, $Lct2^-$, Lac^-)
kb	kb	kb	kb	kb
27.3	27.3	20.9	27.3	20.9
20.9	20.9	18.6	20.9	18.6
18.6	18.6	15.5	18.6	15.5
15.5	15.5	10.8	15.5	10.8
10.8	4.2	5.9	10.8	4.2
5.9	3.9	5.6	5.9	3.9
5.6	3.5	5.2	5.6	3.5
5.2		4.2	5.2	2.0
4.2		3.9	4.2	1.8
3.9		3.5	3.9	
3.5		2.0	3.5	
2.0		1.8		
1.8				

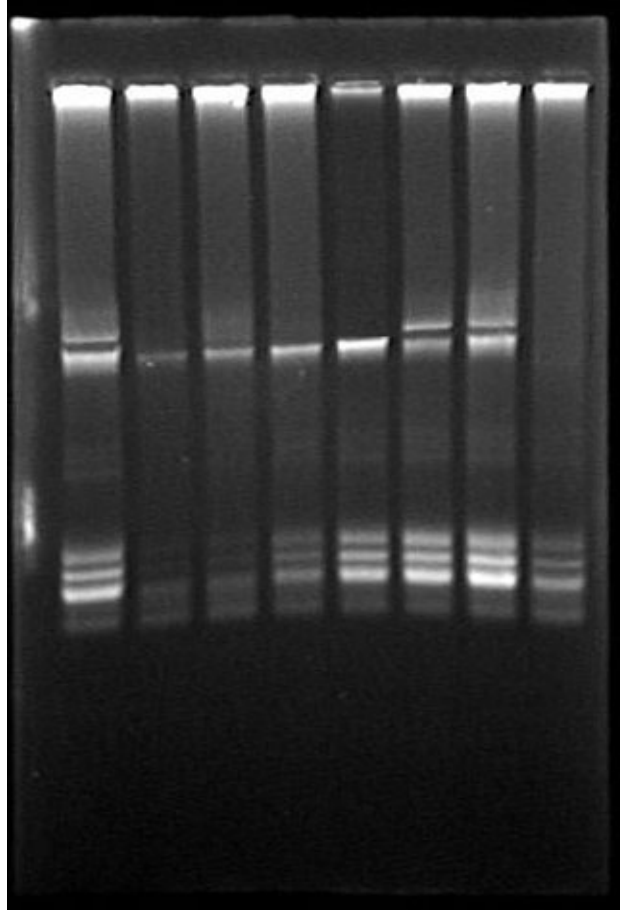
1 2 3 4 5 6 7



Şekil 4.9. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23 doğal suşu ve laktisin 481 üretme yeteneğini kaybetmiş (481⁻) ya da bu özelliği sürdüren (481⁺) mutantlarının plazmid içerikleri

1 (PLL23 Doğal suş, 481 ⁺ , Lac ⁺) kb	2-3 (PLL23-15, Mutant, 481 ⁻ , Lac ⁻) kb	4 (PLL23-9, Mutant, 481 ⁻ , Lac ⁻) kb	5-6 (PLL23-3, Mutant, 481 ⁺ , Lac ⁺) kb	7 (PLL23-20, Mutant, 481 ⁻ , Lac ⁻) kb
19.0	13.2	7.5	19.0	6.2
13.2	11.2	6.2	6.2	5.2
11.2	7.5	5.2	5.2	1.9
7.5	6.2	1.9	1.9	
6.2	5.2			
5.2	1.9			
1.9				

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.10. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 doğal suşu ve laktisin FS92 üretme yeteneğini kaybetmiş (FS92⁻) ya da bu özelliği sürdüren (FS92⁺) mutantlarının plazmid içerikleri

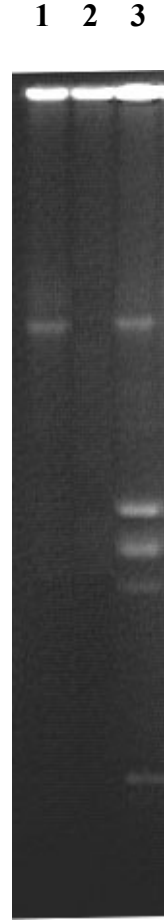
1-6-7 (PLL47 Doğal suş, FS92 ⁺ , Lac ⁺)	2 (PLL47-10, Mutant, FS92 ⁻ , Lac ⁻)	3 (PLL47-13, Mutant, FS92 ⁺ , Lac ⁺)	4-5 (PLL47-18, Mutant, FS92 ⁻ , Lac ⁻)	8 (PLL47-7, Mutant, FS92 ⁻ , Lac ⁻)
kb	kb	kb	kb	kb
19.6	18.3	19.6	18.3	11.9
18.3	6.8	18.3	11.9	11.2
11.9	6.0	6.8	11.2	10.1
11.2	5.6	6.0	10.1	6.8
10.1	5.1	5.6	6.8	6.0
6.8	4.7	5.1	6.0	5.6
6.0		4.7	5.6	5.1
5.6			5.1	4.7
5.1			4.7	
4.7				

1 2 3 4



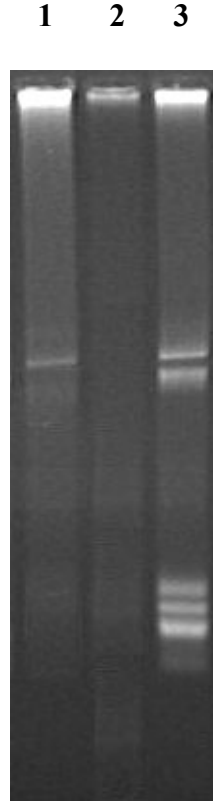
Şekil 4.11. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19 doğal suşu ve laktoztrepsin 2 üretimi ile laktoz fermentasyonu yeteneği kazanmış ($Lct2^+$, Lac^+) konjugantının plazmid içerikleri

2 (PLL19, Doğal suş, $Lct2^+$, Lac^+ , Konjugal verici suş) kb	4 (MLL40-29, Mutant, $Lct2^-$, Lac^- , Konjugal alıcı suş) kb	1-3 (PLL19K 26, PLL19 X MLL40-29 Konjugant $Lct2^+$, Lac^+) kb
27.3	-	27.3
20.9		
18.6		
15.5		
10.8		
5.9		
5.6		
5.2		
4.2		
3.9		
3.5		
2.0		
1.8		



Şekil 4.12. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23 doğal suşu ve laktisin 481 üretimi ile laktoz fermentasyonu yeteneği kazanmış (481^+ , Lac^+) konjugantının plazmid içerikleri

3 (PLL23, Doğal suş, 481^+ , Lac^+ , Konjugal verici suş) kb	2 (MLL40-29, Mutant, 481^- , Lac^- , Konjugal alıcı suş) kb	1 (PLL23K 7, PLL23 X MLL40-29 Konjugant 481^+ , Lac^+) kb
19.0	-	19.0
13.2		
11.2		
7.5		
6.2		
5.2		
1.9		



Şekil 4.13. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 doğal suşu ve laktisin FS92 üretimi ile laktoz fermentasyonu yeteneği kazanmış (FS92⁺, Lac⁺) konjugantının plazmid içerikleri

3
(PLL47, Doğal suş,
FS92⁺, Lac⁺,
Konjugal verici suş)
kb

2
(MLL40-29, Mutant,
FS92⁻, Lac⁻,
Konjugal alıcı suş)
kb

1
(PLL47K 33,
PLL47 X MLL40-29
Konjugant FS92⁺, Lac⁺)
kb

19.6
18.3
11.9
11.2
10.1
6.8
6.0
5.6
5.1
4.7

-

19.6

Çizelge 4.7. *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşlarından laktoz fermentasyonu ve bakteriyosin üretimini kodlayan plazmidlerin, *L. lactis* subsp. *lactis* MLL40-29 alıcı suşuna konjugal aktarımı

Verici Suş Kod No	Fenotipik* Özellikler	Alıcı Suş Kod No	Fenotipik* Özellikler	Konjugant Seçim Kriterleri	Konjugal Aktarım Sıklığı (Verici Hücre Başına)	Konjugant Plazmid İçeriği(kb)
PLL19	Lac ⁺ , Lct2 ⁺ Cm ^s , Em ^s	MLL40-29	Lac ⁻ , Lct2 ⁻ Cm ^r , Em ^r	Lac ⁺ , Lct2 ⁺ Cm ^r , Em ^r	2.6x10 ⁻³	27.3
PLL23	Lac ⁺ , 481 ⁺ Cm ^s , Em ^s	MLL40-29	Lac ⁻ , 481 ⁻ Cm ^r , Em ^r	Lac ⁺ , 481 ⁺ Cm ^r , Em ^r	4.5x10 ⁻⁴	19.0
PLL47	Lac ⁺ , FS92 ⁺ Cm ^s , Em ^s	MLL40-29	Lac ⁻ , FS92 ⁻ Cm ^r , Em ^r	Lac ⁺ , FS92 ⁺ Cm ^r , Em ^r	8.0x10 ⁻³	19.6

* Lac⁺: Laktozu fermente etme yeteneği var; Lac⁻: Laktozu fermente etme yeteneği yok; Lct2⁺: Laktoztrepsin 2 üretme yeteneği var; Lct2⁻: Laktoztrepsin 2 üretme yeteneği yok; 481⁺: Laktisin 481 üretme yeteneği var; 481⁻: Laktisin 481 üretme yeteneği yok; FS92⁺: Laktisin FS92 üretme yeteneği var; FS92⁻: Laktisin FS92 üretme yeteneği yok; Cm^r: Kloromfenikole dirençli (45 µg/mL); Cm^s: Kloromfenikole duyarlı (45 µg/mL); Em^r: Eritromisine dirençli (120 µg/mL); Em^s: Eritromisine duyarlı (120 µg/mL);

4.8. Doğal *L. lactis* subsp. *lactis* Suşları ve Bunların Konjugantlarında Bakteriyosin Üretimini Determine Eden Plazmidlerin Stabilitesi

Laktoz fermentasyonu (Lac⁺) ve bakteriyosin üretim (Bac⁺) özelliklerini determine eden plazmidlerin stabilitesi; tek kolonilerden üretilen kültürlerin, reconstitute skim milk (% 10) ortamlarında ardışık 10 pasaj (~70 generasyon) geliştirilmesinden sonra saptanmıştır.

Doğal suşlarda Lac⁺ ve Bac⁺ özelliklerini determine eden plazmidlerin stabilitesi; *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19 suşu için % 96, *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23 suşu için % 88 ve *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 suşu için ise, % 90 olarak belirlenmiştir. PLL23K 7 ve PLL47K 33 konjugantlarında, doğal suşlarda olduğu gibi, 19.0 kb büyüklükteki plazmid için % 88 ve 19.6 kb büyüklükteki plazmid için % 90 oranında plazmid stabilitesi tespit edilmiştir. PLL19K 26 konjugantında Lac⁺ ve Bac⁺ özelliklerini determine eden 27.3 kb büyüklükteki plazmidin stabilitesi ise, % 92 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.8.).

Özellikle konjugantlarda aktarımı gerçekleşen plazmidin stabilitesinin yüksek düzeyde meydana gelmesi, bu konjugantların fermentasyon süreçlerinde kullanılabilmesi için ön koşuldur. Zira süt endüstrisinde kullanılan laktokok suşlarında, in-vitro gen aktarımı ve stabilizasyonu tekniklerinin kullanımına izin verilmemektedir. Bu durumda, starter kültür suşlarının arzu edilen doğrultuda değiştirilerek yeniden düzenlenmesinde; yalnız klasik mutant seçme ve konjugal aktarım çalışmalarından yararlanılabilmektedir. Halen fermente süt endüstrisinde kullanımda olan bir çok starter kültür suşunda; bakteriyosin üretimi, laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite ve faj dirençlilik gibi özellikler, bu yöntemlerle geliştirilmiştir. Geliştirilen suşlarda stabilite, alıcı olarak seçilen suşun ve aktarılan plazmidin fonksiyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Çoğu kez rastlantısal olan bu koşullar, istenilen sonucu vermemektedir (Smith *et al.* 1992, Ward *et al.* 1993, van Kranenburg and De Vos 1998, Dieye *et al.* 2001, Rakonjac *et al.* 2003, McGrath *et al.* 2004). Çalışmamızda kullanılan, laktoz fermentasyonu ve bakteriyosin üretimi özelliklerini kodlayan plazmidlerin; gerek konakçı suşlarında ve gerekse

konjugantlarında tespit edilen stabilite düzeyleri, söz konusu plazmidlerin ve alıcı suşlarının in-vivo düzenleme çalışmaları için uygun olduğuna işaret etmektedir.

Çizelge 4.8. Doğal tip *L. lactis* subsp. *lactis* suşları ve *L. lactis* subsp. *lactis* MLL40-29 alıcı suşu kullanılarak oluşturulan konjugantlarda endüstriyel özellikleri kodlayan plazmidlerin stabilitesi

Doğal Suş (Verici) ve Konjugant Kod No.	Plazmid Büyüklüğü (kb)	Fenotipik Özellik**	Stabilite (%)
PLL19	27.3	Lac ⁺ ve Lct2 ⁺	96
PLL19K 26*	27.3	Lac ⁺ ve Lct2 ⁺	92
PLL23	19.0	Lac ⁺ ve 481 ⁺	88
PLL23K 7*	19.0	Lac ⁺ ve 481 ⁺	88
PLL47	19.6	Lac ⁺ ve FS92 ⁺	90
PLL47K 33*	19.6	Lac ⁺ ve FS92 ⁺	90

* Konjugantlar

** Lac⁺: Laktozu fermente etme yeteneği var; Lct2⁺: Laktoztrepsin 2 üretme yeteneği var; 481⁺: Laktisin 481 üretme yeteneği var; FS92⁺: Laktisin FS92 üretme yeteneği var

4.9. Bakteriyosin Üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* Suşlarının Laktik Asit Üretimi, Proteolitik Aktivite ve Faj Dirençlilik Düzeylerinin Belirlenmesi

Bakteriyosin üretim yetenekleri genetik ve biyokimyasal düzeyde tanımlanan *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşlarında, diğer endüstriyel özelliklerin üretim süreçlerine uygunluğunun belirlenmesi amacı ile laktik asit üretimi, proteolitik aktivite ve faj dirençlilik karakteristikleri araştırılmıştır. Yapılan testler sonucunda; *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında laktik asit üretim düzeylerinin % laktik asit cinsinden PLL19, PLL23 ve PLL47 suşları için, sırasıyla % 0.52, % 0.56 ve % 0.48 olduğu saptanmıştır. Proteolitik aktivite ise, üreme ortamında ölçülen µg tirozin (Tyr)/mL cinsinden hesaplanmıştır. Denemeye alınan suşların, proteolitik aktivite sonucunda üreme ortamının mL'sinde PLL19 suşunun 61.3 µg, PLL23 suşunun 42.6 µg ve PLL47

suşunun ise 47.4 µg oranlarında tirozin oluşumuna yol açtığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.9.).

Endüstriyel starter kültür suşu olarak kullanım amacı ile seçilecek *Lactococcus* cinsine ait bakterilerde laktik asit üretim düzeylerinin; süt ortamlarına bu bakterilerin % 1 oranında inokülasyonu ve 30 °C’de 6 saat üretilmesi halinde, % 0.4 oranında ya da yukarısında olması tercih edilmektedir. Endüstriyel suşlarda proteolitik aktivite düzeyleri ise, laktik asit üretimi tayininde kullanılan bakteriyel gelişme koşullarında, 25 µg/mL tirozin eşdeğeri ve üzerindeki miktarlarla ifade edilmektedir (Madera *et al.* 2003). Araştırma kapsamında bakteriyosin üreticisi oldukları tespit edilen *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşları bu kriterlere uymalarından dolayı, endüstriyel starter kültür suşu olarak kullanım potansiyeli taşımaktadır.

Bakteriyosin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşlarında araştırılan son endüstriyel özellik, Türkiye kökenli fajlara karşı gösterdikleri duyarlılık düzeyleri olmuştur. Bu amaçla, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonundan sağlanan 50 adet laktokok fajı kullanılmıştır. Çift tabaka M17 agar ortamlarında yürütülen denemeler sonucunda *L. lactis* subsp. *lactis* PLL47 suşunun 3, *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19 suşunun 7 ve *L. lactis* subsp. *lactis* PLL23 suşunun ise 10 adet faja karşı duyarlılık gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.10.).

Süt fermentasyonu ortamlarının tam anlamı ile aseptik olmamasından dolayı *Lactococcus* cinsi üyesi starter kültürler faj ataklarına maruz kalmakta ve fajların duyarlı kültürleri parçalaması sonucu, ürünün kalite ve miktarı olumsuz yönde etkilenmektedir (Garvey *et al.* 1995, Daly *et al.* 1996, Rakonjac *et al.* 2003, Blatny *et al.* 2004). Bakteriyosin üreticisi (PLL19, PLL23 ve PLL47) hiçbir suşun denenilen fajların tümüne direnç özelliği göstermemesi, süt endüstrisinde starter kültür suşları olarak kullanımlarında sorun yaratabilir. Bu bakterilerin starter kültür suşları olarak kullanılabilmesi, faj dirençlilik özelliklerinin geliştirilmesi ile mümkün olabilir. Starter kültür potansiyeli taşıyan suşların faj duyarlılık problemi; konjugatif özellik içeren ve doğal faj dirençlilik sistemlerini kodlayan plazmidlerin, faj duyarlı kültürlere

aktarımı ile aşılmaya çalışılmaktadır. Farklı araştışıcılar tarafından yapılan çalışmalarda bu plazmidlerin, faj duyarlı starter kültür suşlarına konjugasyon yolu ile aktarımı başarı ile gerçekleştirilmiştir (Coakley *et al.* 1997, O’Sullivan *et al.* 1998, Forde *et al.* 1999, Ross *et al.* 2000, Domingues *et al.* 2004, Ward *et al.* 2004). Starter kültür suşları olarak kullanılabilmeleri için, bakteriyosin reticisi *L. lactis* subsp. *lactis* PLL19, PLL23 ve PLL47 suşlarında konjugal aktarım yolu ile faj dirençlilik özelliklerinin geliştirilmesi zorunludur.

Çizelge 4.9. Bakteriyosin retim yeteneğindeki *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının laktik asit üretimi ve proteolitik aktivite düzeyleri

Bakteri Kod No.	Laktik Asit (%)	Proteolitik Aktivite (μg Tyr/mL)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
PLL19	0.52	61.3
PLL23	0.56	42.6
PLL47	0.48	47.4

Çizelge 4.10. Bakteriyosin üretme yeteneğindeki *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının faj dirençlilik özellikleri

Faj Kod No.	Bakteri Kod No.		
	PLL19	PLL23	PLL47
Øpll12-2	-	-	-
Øpll12-7	+	-	+
Øpll12-10	-	+	-
Øpll12-11	-	-	-
Øpll13-5	+	-	-
Øpll13-7	-	-	-
Øpll30-4	+	-	+
Øpll30-5	-	-	-
Øpll30-9	-	-	-
Øpll43-1	-	+	-
Øpll43-2	-	-	-
Øpll43-4	-	-	+
Øpll43-6	-	-	-
Øpll43-7	+	-	-
Øpll43-9	-	+	-
Øpll43-10	-	-	-
Øpll43-11	-	+	-
Øpll44-2	-	-	-
Øpll44-3	-	-	-
Øpll44-5	-	-	-
Øpll44-6	+	+	-
Øpll44-7	-	-	-
Øpll59- 1	-	-	-
Øpll59-2	-	+	-
Øpll59-4	-	-	-

PLL : *L. lactis* subsp. *lactis*

+ : Duyarlı

- : Dirençli

Çizelge 4.10. (devam)

Faj Kod No.	Bakteri Kod No.		
	PLL19	PLL23	PLL47
Øpll59-6	-	-	-
Øpll59-7	-	-	-
Øpll59-9	-	+	-
Øpll59-10	-	-	-
Øpll59-11	-	-	-
Øpll59-13	-	-	-
Øpll59-14	+	+	-
Øpll59-15	-	-	-
Øpld68-2	-	-	-
Øpld68-3	-	-	-
Øpld68-5	-	-	-
Øpld70-5	-	-	-
Øpld70-8	-	-	-
Øpld72-6	-	-	-
Øpld72-7	-	-	-
Øpld72-10	+	-	-
Øplc81-1	-	-	-
Øplc81-4	-	-	-
Øplc81-5	-	-	-
Øplc81-7	-	-	-
Øplc81-10	-	+	-
Øplc96-3	-	-	-
Øplc96-6	-	-	-
Øplc96-8	-	-	-
Øplc96-10	-	+	-

PLL : *L. lactis* subsp. *lactis*

+ : Duyarlı

- : Dirençli

KAYNAKLAR

- Abee, T., Klaenhammer, T. R. and Letellier, L. 1994. Kinetic studies of the action of lacticin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 1006-1013.
- Akçelik, M. 1998. A phage DNA injection-blocking type resistance mechanism encoded by chromosomal DNA in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Milchwissenschaft*, 53; 619-622.
- Akçelik, M. 1999. The conjugal plasmid pLL10236 encodes lactose fermentation ability, restriction/modification activity, bacteriocin production and immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102. *Food Microbiology*, 16; 487-494.
- Akçelik, M., Şanlıbaba, P., Tükel, Ç. ve Tuncer, Y. 2001. Laktokoklarda endüstriyel açıdan önem taşıyan özelliklerin genetik determinantları. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 25; 615-621.
- Anderson, D. G. and McKay, L. L. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46; 549-552.
- Anonymous. 1997. Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB). International Dairy Federation (IDF) Standart, Standart of Identity, 149 A.
- Barbosa, A. S., Abreu, H., Neto, A. S., Gruss, 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.
- Bardowski, J., Kozak, W. and Dobrzanski, W. T. 1979. Further characterization of lactostrepcins-acid bacteriocin of lactic streptococci. *Acta Microbiol. Pol.*, 28; 93-99.
- Başaran, P., Başaran, N. and Çakır, I. 2001. Moleculer differentiation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* strains by ribotyping and site specific- PCR. *Current Microbiology*, 42; 45-48.
- Beasley, S. S. and Saris, P. E. J. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70; 5051-5053.

- Beimfohr, C., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. 1997. Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. *System. Appl. Microbiol.*, 20; 216-221.
- Blatny, J. M., Godager, L., Lunde, M. and Nes, I. F. 2004. Complete genome sequence of the *Lactococcus lactis* temperate phage ØLC3: comparative analysis of ØLC3 and its relatives in lactococci and streptococci. *Virology*, 318; 231-244.
- 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: *Standard methods for the examination of dairy product*. (Marshall, R. T. Eds.) pp. 433-531. American Public Health Association, Washington, DC.
- Breukink, E., van Kraaij, C., Demel, R. A., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and de Kruijff, B. 1997. The C-terminal region of nisin responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*, 36; 6968-6976.
- Breukink, E., van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A. J. and de Kruijff, B. 2003. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J. Biol. Chem.*, 278; 19898-19903.
- Broadbent, J. R., Chou, C., Gillies, K. and Kondo, J. K. 1989. Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.*, 72; 3342-3345.
- Cai, Y., Ng, L-K. and Farber, J. M. 1997. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean sprouts. *J. Appl. Microbiol.*, 83; 499-507.
- Callewaert, R., Holo, H., Devreese, B., Beeumen, J. V. and Vuyst, L. D. 1999. Characterization and production of amylovorin amlovorus DCE 471 by a novel three-step method. *Microbiology*, 145; 2559-2568.
- Campbell, R. C. 1974. *Statistics for biologists*. Cambridge University Press, Second Edition, 385 p.

- Cancilla, M., Powell, J. B., Hillier, A. J. and Davidson, B. E. 1992. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with phosphorus-32 and fluorescent labels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58; 1772-1775.
- Chandrapati, S. and O'Sullivan, D. J. 1999. Nisin independent induction of the *nisA* promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170; 191-198.
- Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S. B., Kook, M. C., Kim, T. S., Hwang, J. K. and Pyun, Y. R. 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *J. Biotechnol.*, 95; 225-235.
- Chopin, A. 1993. Organisation and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12; 21-38.
- Coakley, M., Fitzgerald, G. F. and Ross, P. 1997. Application and evaluation of the phage resistance and bacteriocin encoding plasmid pMC01 for the improvement of dairy starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 1434-1440.
- Conconcelli, P. S., Porro, D., Galandini, S. and Senini, L. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and *Enterococci*. *Lett. Appl.*, 21; 376-379.
- Condo, S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46; 269-280.
- 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.
- Davey, G. P. and Richardson, B. C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41; 84-89.
- Davey, G. P. 1984. Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48; 895-896.
- Davies, F. L., Underwood, H. M. and Gasson, M. J. 1981. The value of plasmid profiles for strain identification between *Streptococci* and the relationship between *Streptococcus* and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 51; 325-338.

- 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.
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its application as a food preservative. *J. Soc. Dairy Technol.*, 43; 73-76.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69; 193-202.
- Demel, R. A., Peelen, T., Siezen, R. J., de Kruijff, B. and Kuipers, O. P. 1996. Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. *Eur. J. Biochem.*, 235; 267-274.
- Descheemaeker, P., Pot, B., Ledebuer, A., Verrips, T. and Kersters, K. 1994. Comparison of the *Lactococcus lactis* differential medium (DCL) and SDS-PAGE of whole-cell proteins for the identification of lactococci to subspecies level. *Syst. Appl. Microbiol.*, 17; 459-466.
- Desmaures, N., Mangin, L., Corroler, D. and Gueguen, M. 1998. Characterization of *Lactococci* isolated from milk produced in the Camembert region of Normandy. *J. Appl. Microbiol.*, 140; 3053-3060.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J. 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy. J.*, 14; 273-285.
- De Vos, W. M. and Hugenholtz, J. 2004. Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.*, 22; 72-79.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Microbiology, genetics and applications*. Chapman & Hall. New York, 539 p.
- De Vuyst, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23; 153-177.
- Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A. and Piard, J. C. 2001. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, 183; 4157-4166.
- Dobrzanski, W. T., Bardowski, J., Kozak, W. and Zajdel, J. K. 1982. Lactostrepcins. Bacteriocin of lactic streptococci. In: *Microbiology* (Schlessinger, D. Eds.) pp. 225-229 American Society for Microbiology, Washington DC.

- Domingues, S., Chopin, A., Ehrlich, S. D. and Chopin, M-C. 2004. The lactococcal abortive phage infection system AbiP prevents both phages DNA replication and temporal transcription switch. *J. Bacteriol.*, 186; 713-721.
- Dougherty, B. A., Hill, C., Weldman, J. F., Richardson, D. R., Venter, J. C. and Ross, R. P. 1998. Sequence and analysis of the 60 kb conjugative bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.*, 29; 1029-1038.
- Dufour, A., Thuault, D., Boulliou, A., Bourgeois, C. M. and Le Penec, J-P. 1991. Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide. *J. Gen. Microbiol.*, 137; 2423-2429.
- Dufour, A., Rince, A., Uguen, P. and Le Penec, J-P. 2000. ISI675, a novel lactococcal insertion element, forms a transposon-like structure including the lactacin 481 lantibiotic operon. *J. Bacteriol.*, 182; 5600-5605.
- Dufour, A., Rince, A., Hindré, T., Haras, D. and Le Penec, J-P. 2003. Lactacin 481: an antimicrobial peptide of the lantibiotic family produced by *Lactococcus lactis*. *Recent Research Developments in Bacteriology*, 1; 219-234.
- Elder, J. K., Amos, A., Southern, E. M. and Shippey, G. A. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis (I). *Analytical Biochemistry*, 128; 223-226.
- Elder, J. K. and Southern, E. M. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis (II): comparison of methods for plating mobility of fragment length. *Analytical Biochemistry*, 170; 38-44.
- Engelke, G., Gutochowski-Eckel, Z., Hammelman, M. and Entian, K. D. 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 814-825.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.*, 87; 705-716.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24; 85-106.

- Erlandson, K. and Batt, C. 1997. Strain-specific differentiation of lactococci in mixed starter culture population using randomly amplified polymorphic DNA-derived probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 2702-2707.
- Exterkate, F. A. and de Veer, G. J. C. M. 1987. Optimal growth of *Streptococcus cremoris* HP in milk is related to β - and κ -casein degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25; 471-475.
- Fath, M. J. and Kolter, R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.*, 57; 995-1017.
- Fenelon, M. A., Ryan, M. P., Rea, M. C., Guinee, T. P., Ross, R. P., Hill, C. and Harrington, D. 1999. Elevated temperature ripening of reduced fat Cheddar made with or without lactacin 3147 producing starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 82; 10-22.
- Ferchichi, M., Frere, J., Mabrouk, K. and Manai, M. 2001. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205; 49-55.
- Fimland, G. I., Blingsmo, O. R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I. F. and Nissen-Meyer, J. 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin like bacteriocin the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62; 3313-3318.
- Flambard, B., Richard, J. and Julliard, V. 1997. Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 2131-2135.
- Flambard, B., Helinck, S., Richard, J. and Juillard, V. 1998. The contribution of casein to the amino acid supply for *Lactococcus lactis* depends on the type of cell envelope proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64; 1991-1996.
- Flambard, B. and Juillard, V. 2000. The autoproteolysis of *Lactococcus lactis* Lactocepin III affects its specificity towards β -casein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66; 5134-5140.
- 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; 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.
- Franz, C. M. A. P., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. 1997. Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J. Basic. Microbiol.*, 37; 187-196.
- Galvin, M., Hill, C. and Ross, R. P. 1999. Lacticin 3147 display activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28; 355-358.
- Garcia-Garcera, M. J., Elferink, M. G. L., Driessen, A. J. M. and Konnings, W. N. 1993. *In vitro* pore-forming activity of the lantibiotic nisin: role of protonmotive-force and lipid composition. *Eur. J. Biochem.*, 212; 417-422.
- Garvey, P., Fitzgerald, G. F. and Hill, C. 1995. Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants for the lactococcal plasmid pNP40. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61; 4321-4328.
- Gasson, M. J. and Davies, F. L. 1980. High frequency conjugation associated with donor cell aggregation in *Streptococcus lactis* 712. *J. Bacteriol.*, 143; 1260-1264.
- Gasson, M. J. and Davies, F. L. 1981. Physical analysis and conjugal transfer of transduced lactose plasmids in *Streptococcus lactis* 712. *J. Gen. Microbiol.*, 119; 173-178.
- Gasson, M. J. and Davies, F. L. 1984. The genetics of lactic acid bacteria. In *Advances in Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk* (Davies, F. L. and Lwa, B. A Eds.) pp.99-126 Elsevier Applied Science Publishers, New York.
- Gasson, M. J., Swindell, S., Maeda, S. and Dodd, H. M. 1992. Molecular rearrangement of lactose plasmid DNA associated with high frequency transfer and cell aggregation in *Lactococcus lactis* 712. *Mol. Microbiol.*, 6; 3213-3223.
- Gasson, M. J., Godon, J. J., Pillidge, C. J., Eaton, T. J., Jury, K. and Shaerman, C. A. 1995. Characterization and exploitation of conjugation in *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.*, 5; 757-762.
- Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. 1983. Potential of lactic Streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45; 205-211.

- Godon, J. J., Jury, K. L., Shaerman, C. A. and Gasson, M. J. 1994. The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *clu A*. *Mol. Microbiol.*, 12; 655-663.
- González, B., Glaasker, E., Kunji, E. R. S., Driessen, A. J. M., Suárez, J. E. and Konings, W. N. 1996. Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Appl Environ Microbiol.*, 62; 2701-2709.
- Gorris, G. M. L. 1996. Bacteriocins potential applications in food preservation. *Kitap. Food preservation by combined processes. Final Report Flair. Concerted Action No: 7 Subgroup B.*
- Gowas, J. L., Smith, N. and Florey, H. W. 1952. Some properties of nisin. *Br. J. Pharmacol.*, 7; 438-449.
- Gross, E. and Morell, J. L. 1967. The presence of dehydroalanine in the antibiotic nisin and its relationship to activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 89; 2791.
- Gross, E. 1977. α , β -unsaturated and related amino acids in peptides and proteins. In: *Protein cross-linking-B.* (Fiedman, M. Eds) pp. 131-153, Plenum, New York.
- Hechard, Y. and Sahl, H-G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84; 545-557.
- Henning, S., Metz, R. and Hammes, W. R. 1986. Studies on the mode of action of nisin. *Int. J. Food Microbiol.*, 3; 121-134.
- Hill, C. 1993. Bacteriophage in dairy starter culture technology. *Food Technology*, 38; 41-50.
- Hill, C. and Ross, R. P. 1998. Starter cultures for the dairy industry. In: *genetic modification in the food industry.* (Roller, S. and Harlander, S. Eds.) pp. 256-274. Blackie Academic and Professional, London.
- Hindré, T., Le Penneç, J-P., Haras, D. and Dufour, A. 2004. Regulation of lantibiotic lactacin 481 production at the transcriptional level by acid pH. *FEMS Microbiol. Lett.*, 231; 291-298.
- Holler, B. J. and Steele, J. L. 1995. Characterization of *Lactococci* other than *Lactococcus lactis* for possible use as starter cultures. *Int. Dairy J.*, 5; 275-289.
- Holo, H., Nilssen, Ø. and Nes, I. F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, 173; 3879-3887.

- Holt, G. H., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Ninth Edition, 787 p.
- Holzapfel, W. H., Geisen, R. and Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, 24; 343-362.
- Horn, N., Swindell, S., Dodd, H. and Gasson, M. J. 1991. Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.*, 228; 129-135.
- Horn, N., Fernández, A., Dodd, H. M., Gasson, M. J. and Rodríguez, J. 2004. Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70; 5030-5032.
- Hsu, S. T., Breukink, E., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A. M. and Nuland, N. A. 2002. Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. *Biochemistry*, 41; 7670-7676.
- Hughenoltz, J. and Starrenburg, M. J. C. 1992. Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and *Leuconostoc* ssp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38; 17-22.
- Hughenoltz, J. 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12; 165-178.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27; 85-103.
- Immonen, T. and Saris, P. E. J. 1998. Characterization of the *nisFEG* operon of the nisin Z producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 strain. *DNA Sequence*, 9; 263-274.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59; 171-200.
- Jarvis, B., Jeffcoat, J. and Cheeseman, G. C. 1968. Molecular weight distribution of nisin. *Biochem. Biophys. Acta.*, 168 (1); 153-155.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44; 525-532.

- Jimenez-Diaz, R., Piard, J-C., Ruiz-Barba, J. L. and Desmazeaud, M. J. 1990. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. Third symposium on lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 87; 91.
- Jung, G. and Sahl, H-G. 1991. Nisin and novel lantibiotics. In: Lantibiotics: a survey. (Jung, G., Sahl, H-G. Eds.) Leiden: Escom., 1; 1-34.
- Kim, W. S., Hall, R. J. and Dunn, N. W. 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48; 449-453.
- Klaenhammer, T. R., McKay, L. L. and Baldwin, K. A. 1978. Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid DNA. Appl. Environ. Microbiol., 35; 592.
- Klaenhammer, T. R. 1984. Interactions of bacteriophages with lactic acid streptococci. Adv. Appl. Microbiol., 30; 1-29.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12; 39-86.
- Kok, J. 1996. Inducible gene expression and environmentally genes in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70; 129-145.
- Koponen, O., Tolonen, M., Qiao, M., Wahlström, G., Helin, J. and Saris, P. E. J. 2002. NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. Microbiology, 148; 3561-3568.
- Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, W. T. 1977. Lactostrepcin-a bacteriocin produced by *Streptococcus lactis*. Bull. Acad. Pol. Sci. Cl., 25; 217-221.
- Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, W. T. 1978. Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. J. Dairy Res., 45; 247-257.
- Köhler, G., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. 1991. Differentiation of Lactococci by rRNA gene restriction analysis. FEMS Microbiol. Lett., 84; 307-312.
- Kuhl, S. A., Larsen, L. D. and McKay, L. L. 1979. Plasmid profiles of lactose-negative and proteinase-deficient mutants of *Streptococcus lactis* C10, ML3 and M18. Appl. Environ. Microbiol., 37; 1193.

- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., De Vos, W. M. and Siezen, R. J. 1993. Biosynthesis and secretion of a precursor of nisin Z by *Lactococcus lactis* directed by the leader peptide of the homologous lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis*. FEMS Lett., 330; 23-27.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., De Ruyter, P. G. G. A., Luesink, E. J. and De Vos, W. M. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. J. Biol. Chem., 270; 27299-27304.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227; 680-685.
- Langella, P., Zagorec, M., Erlich, S. D. and Morel, F. 1996. Intragenic and intergenic conjugal transfer of plasmids pAMBeta1, pIL205 and pIL501. FEMS Microbiol. Lett., 139; 51-56.
- 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.
- Liu, C. Q., Dunn, N. W. and Duan, K. 1997. Cloning and sequence analysis of a plasmid replicon from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FG2. J. Gen. Microbiol., 43; 75-80.
- Lucey, M., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. 1993. Relationship between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 952, and industrial lactococcal starter culture and strains 712, ML3 and C2. J. Appl. Bacteriol., 75; 326-335.
- Mackay, V. C., Arendse, G. and Hastings, J. W. 1996. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. Int. J. Food Microbiology, 34; 1-16.
- Macrina, F. L., Kopecko, D. J., Jones, K. R., Ayers, D. S. and McCoven, S. M. 1978. A multiple plasmid containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules. Plasmid, 1; 417-420.
- Macrina, F. L., Tobian, J. A., Jones, K. R., Evans, R. P. and Clewell, D. B. 1982. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. Gene, 19; 345-353.
- Madera, C., Garcia, P., Janzen, T., Rodriguez, A. and Suárez, E. J. 2003. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistance to phage infection. Int. J. Food Microbiol., 86; 213-222.

- Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S. R. and Richard, J. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait*, 72; 249–263.
- Mao, Y., Muriana, P. M. and Cousin, M. A. 2001. Purification and transpositional inactivation of Lacticin FS92, a broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* FS92. *Food Microbiology*, 18; 165-175.
- Martinez, B., Suárez, J. E. and Rodriguez, A. 1996. Lactococcin 972, a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiology*, 142; 2393-2398.
- Martinez, B., Fernandez, M., Rodriguez, A. and Suárez, J.E. 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology*, 145; 3155-3161.
- Martinez, B., Rodriguez, A. and Suárez, J. E. 2000. Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology*, 146; 949-955.
- Mattick, A. T. R. and Hirsch, A. 1947. Further observation on an inhibitor (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 2; 5-7.
- McAuliffe, O., Ryan, M. P., Ross, R. P., Hill, C., Breeuwer, P. and Abee, T. 1998. Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64; 439-445.
- McAuliffe, O., Hill, C. and Ross, R. P. 1999 . Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. *J. Appl. Microbiol.*, 86; 251-256.
- McAuliffe, O., Ross, R. P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25; 285-308.
- McGrath, S., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. 2004. The impact of bacteriophage genomics. *Current Opinion Biotechnology*, 15; 94-99.
- McKay, L. L., Baldwin, K. A. and Zottola, E. A. 1972. Loss of lactose metabolism in lactic Streptococci. *Appl. Microbiol.*, 23(6); 1090-1096.
- McKay, L. L. 1983. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49; 259-274.

- 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 (3); 1529-1537.
- Mills, S., Coffey, A., O'Sullivan, L., Stokes, D., Hill, C., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. 2001. Use of lacticin 481 to facilitate delivery of the bacterio-phage resistance plasmid pCBG104 to cheese starters. *J. Appl. Microbiol.*, 91; 1-9.
- Mohamed, G. E. E., Seaman, A. and Woodbine, M. 1984. Food antibiotic nisin: Comparative effects on *Erysipelothrix* and *Listeria*, in antimicrobials and agriculture (Woodbine, M. Eds.) pp. 435-442, Butterworths, London.
- Moineau, S., Kondo, J. K., Vedamuthu, E. R., Emond, E., Holler, J. B., Boucher, I. and Vandenberg, P. A. 1997. Phenotypic and genetic characterization of the bacteriophage abortive infection mechanism Abi K from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 1274-1283.
- Moll, G., Ubbink-Kok, T., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J. Nes, I. F., Konings, W. N. and Driessen, A. J. M. 1996. Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin. *J. Bacteriol.*, 178; 600-605.
- Moreno, F. M. R., Callewaert, R., Devreese, B., van Beeumen, J. and De Vuyst, L. 2003. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.*, 94; 214-229.
- Morgan, S. M., Galvin, M., Delly, J., Ross, R. P. and Hill, C. 1999. Development of a Lacticin 3147-enriched whey powder with inhibition activity against food borne pathogens. *J. Food. Prot.*, 62; 1011-1016.
- Morgan, S. M., O'Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C. 2002. The design of a three strains system for Cheddar cheese manufacture exploiting bacteriocin-induced starter lyses. *Int. Dairy J.*, 12; 985-993.
- Morita, H., Kamizono, K., Nakamura, S., Fujita, Y., Sakata, R., Nagata, Y. and McKay, L. L. 1997. Cloning of citrate permease gene of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* NIAI N-7 and expression in citrate-negative lactococci. *Milchwissenschaft*, 52; 138-141.
- Motlagh, A. M., Johnson, M. C. and Ray, B. 1991. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food. Prot.*, 54; 873-878.

- Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. and De Vos, W. M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201; 581-584.
- Mundt, J. O. 1986. Enterococci and lactic acid streptococci. In: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* (Sneath, P. H. A., Mair, N. S. and Sharpe, M.E. Eds.) pp.1063-1066 Williams and Wilkins, Baltimore.
- Muriana, K. P. and Kanach, L. 1995. Use of Nisaplin TM to inhibit spoilage bacteria in buttermilk ranch dressing. *J. Food Prot.*, 58; 1109-1113.
- Natrajan, N. and Sheldon, B. W. 2000. Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin. *J. Food Prot.*, 63; 1189-1196.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70; 113-128.
- Nes, I. F. and Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 55; 50-61.
- Nes, I. F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H. H. and Nissen-Meyer, J. 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (ClassII) produced by lactic acid bacteria. In: *Peptide antibiotics; discovery, modes of action, and applications*. (Dutton, C. J., Haxell, M. A., McArthur, H. A. I. and Wax, R. G. Eds.) pp. 81-115. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Nes, I. F. and Johnsborg, O. 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnol.*, 15; 100-104.
- Nettles, C. G. and Barefoot, S. F. 1993. Biochemical and genetic characterization of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 56; 338-356.
- Neve, H., Geis, A. and Teuber, M. 1984. Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. *J. Bacteriol.*, 157; 833-838.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L. S., Sletten, K. and Nes, I. F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*, 174; 5686-5692.

- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, traditional Thai fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 81; 137-145.
- Olasupo, N. A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H. and Holzapfel, W. H. 1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from *wara*, a traditional Nigerian cheese product. *Int. J. Food Microbiol.*, 53; 141-152.
- Oscariz, J. C. and Pisabarro, A. 2001. Classification and mode of action of membrane active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Review Article. Springer-Verlag and SEM. 12; 123-127.
- O'Sullivan, D. Coffey, S., Fitzgerald, G. F., Hill, C. and Ross, R. P. 1998. Design of a phage-insensitive lactococcal dairy starter via sequential transfer of naturally occurring conjugative plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64; 4618-4622.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C. 2002a. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.*, 84; 593-604.
- O'Sullivan, L., Morgan, S. M., Ross, R. P. and Hill, C. 2002b. Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lactacin 481, produced by *L. lactis* DPC5552. *J. Dairy Sci.*, 85; 2130-2140.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C. 2003. A lactacin 481 producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. *J. Appl. Microbiol.*, 95; 1235-1241.
- Perez, G., Cardell, E. and Zarale, V. 2000. Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Lait*, 80; 589-600.
- Piard, J. C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J. and Desmazeaud, M. 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk Dairy J.*, 44; 143-158.
- Piard, J. C., Kuipers, O. P., Rollema, H. S., Desmazeaud, M. J. and Klaenhammer, T. R. 1992. Purification and partial characterization of lactacin 481, a lanthionine containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58; 279-284.

- Piard, J. C., Delorme, C., Novel, M., Desmazeaud, M. and Novel, G. 1993. Conjugal transfer of the determinants for bacteriocin (lacticin 481) production and immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. FEMS Microbiol. Lett., 112 (3); 313-318.
- Piard, J. C., Hautefort, I., Fischetti, V. A., Ehrlich, V. A., Fons, M. and Gruss, A. 1997. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. J. Bacteriol., 179; 3068-3072.
- Pongtharangkul, T. and Demirci, A. 2004. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. Appl. Microbiol. Biotechnol., 65; 268-272.
- Poolman, B., Kunji, E. R., Hagting, A., Julliard, V. and Konings, W. N. 1995. The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl., 79; 65-75.
- Powell, I. B., Ward, A. C., Hillier, A. J. and Davidson, B. E. 1990. Simultaneous conjugal transfer in *Lactococcus* to genes involved in bacteriocin production and reduced susceptibility to bacteriophages. FEMS Microbiol. Lett., 72; 209-214.
- Pritchard, G. G. and Coolbear, T. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12; 179-206.
- Ra, R., Beerhuyzen, M. M., De Vos, W. M., Saris, P. E. and Kuipers, O. P. 1999. Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. Microbiology, 145; 1227-1233.
- Rakonjac, J., Ward, L. J. H., Schiemann, A. H., Gardner, P. P., Lubbers, M. W. and O'Toole, P. W. 2003. Sequence diversity and functional conservation of the origin of replication in lactococcal prolate phages. Appl. Environ. Microbiol., 69; 5104-5114.
- Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J. W. and Héchar, Y. 2004. Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. Microbiology, 150; 2663-2668.
- Rauch, P. J. G. and De Vos, W. M. 1992. Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its integration in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol., 174; 1280-1287.

- Reid, J. R. and Coolbear, T. 1998. Altered specificity of lactococcal proteinase P_I (lactocepin I) in humectant systems reflecting the water activity and salt contents of Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64; 588-593.
- Rince, A., Dufour, A., Le Pogam, S., Thuault, D., Bourgeois, C. M. and Le Pennec, J. P. 1994. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 1652-1657.
- Rince, A., Dufour, A., Uguen, P., Le Pennec, J. P. and Haras, D. 1997. Characterization of the lactacin 481 operon: the *Lactococcus lactis* genes *lctF*, *lctE*, and *lctG* encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 4252-4260.
- Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S. M., Ryan, M. P., Twomey, D. P., Meaney, W. J. and Hill, C. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76; 337-346.
- Ross, R. P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F. and Coffey, A. 2000. Novel cultures for cheese improvement. *Trends Food Sci. Technol.*, 11; 96-104.
- Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C. and Ross, R. P. 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad spectrum bacteriocin lactacin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62; 612-619.
- Ryan, M. P., Meaney, W. J., Ross, R. P. and Hill, C. 1998. Evaluation of Lactacin 3147 and teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64; 2287-2290.
- Ryan, M. P., Hill, C. and Ross, R. P. 2002. Exploitation of lantibiotic peptides for food and medical uses. In: *Peptide antibiotics; discovery, modes of action and applications*. (Dutton, C. J., Haxell, M. A., McArthur, H. A. I. and Wax, R. G. Eds.) pp. 193-242. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Sahl, H-G. and Bierbaum, G. 1998. Lantibiotics: bioynthesis an biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52; 41-79.

- Samarzija, D., Sikora, S., Redzepovic, S., Antunac, N. and Havranek, J. 2002. Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains isolated from artisanal cultures. *Microbiological Research*, 157; 13-17.
- Scannell, A. G., Hill, C., Ross, R. P., Marx, S., Hartmeier, W. and Arendt, E. K. 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and nisaplin. *Int. J. Food. Microbiol.*, 60; 241-249.
- Schaffer, H. E. and Sederoff, R. R. 1981. Improvement estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 115; 122-133.
- Scherwitz, K. M., Baldwin, K. A. and McKay, L. L. 1983. Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45; 1506-1512.
- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. Nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6; 183-195.
- Schleifer, K. H. 1987. Recent changes in taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46; 201-203.
- Schleifer, K. H. and Kilpper-Bälz, R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: A Review. *System. Appl. Microbiol.*, 10; 1-19.
- Sears, P. M., Peele, J., Lassauzet, M. and Blackburn, P. 1995. Use of antimicrobial proteins in the treatment of bovine mastitis. In: *Proceeding of the 3rd International Mastitis Seminar*. p17-18.
- Sen, A. K., Narbad, A., Horn, N., Dodd, H. M., Parr, A. J., Colquhoun, I. and Gasson, M. J. 1999. Post-translational modification of nisin-the involvement of NisB in the dehydration process. *Eur. J. Biochem.*, 261; 524-532.
- Siegers, K. and Entian, K. D. 1995. Gene involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61; 1082-1089.
- Siegers, K., Heinzmann, S. and Entian, K. D. 1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *J. Biol. Chem.*, 271; 12294-12301.

- Smith, M., Hugenholtz, J., Mikoczi, P., Ree, E., Bunch, A. and Bont, A. M. 1992. The stability of the lactose and citrate plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. FEMS Microbiol. Lett., 96; 7-12.
- Southern, E. M. 1979. Measurement of DNA lengths by gel electrophoresis. Anal. Biochem., 100; 319-323.
- Spelhaug, S. R. and Harlander, S. K. 1989. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. J. Food. Prot., 52; 856-862.
- Stiles, M. E. and Hastings, J. W. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. Trends Food Sci. Technol., 2; 247-251.
- Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol., 36; 1-29.
- Stoddard, G. W., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J. and McKay, L. L. 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4. Appl. Environ. Microbiol., 58; 1952-1961.
- 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; 2641-2643.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriological Reviews, 40; 722-756.
- Teixeira, L. M., Merquior, V. L. C., Vianni, M. C. E., Carvallio, M. G. S., Fracalanza, S. E. L., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J., Facklam, R. R. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus lactis* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garviae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. Int. J. Syst. Bacteriol., 46; 664-668.
- Terzaghi, B. E. and Sandine, W. E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol., 29; 807-813.
- Teuber, M. 1990. Strategies for genetic modification in lactic acid bacteria. Food Biotechnology, 4; 537-546.

- Trieu-Cuot, P. and Courvalin, P. 1983. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3' 5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene*, 23; 331-341.
- Trotter, M., McAuliffe, O. E., Fitzgerald, G. F., Hill, C., Ross, R. P. and Coffey, A. 2004. Variable bacteriocin production in the commercial starter *Lactococcus lactis* DPC4275 is linked to the formation of the cointegrate plasmid pMRC02. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70; 34-42.
- Tükel, Ç. ve Akçelik, M. 2000. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşlarında laktoz plazmidlerinin tanımlanması. *Tr. J. Biology*, 24; 405-424.
- Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B. and Hill, C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. In: *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications* (Sizezen, R.J., Kok, J., Abee, T. and Schaafsma, G. Eds.) pp. 165-185. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Uguen, A., Le Pennec, J-P. and Dufour, A. 2000. Lantibiotic synthesis: interactions between prelactacin 481 and its putative modification enzyme, LctM. *J. Bacteriol.*, 182; 5262-5266.
- van Asseldonk, M., De Vos, W. M. and Simons, G. 1993. Functional analysis of the *Lactococcus lactis usp45* secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha amylase. *Mol. Gen. Genet.*, 240; 428-434.
- 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; 1187-1191.
- van Castaren, W. H. M., de Waard, P., Dijkema, C., Schols, H. A. and Voragen, A. G. J. 2000. Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. *Carbohydr. Res.*, 327; 411-422.
- van der Meer, J. R., Rollema, H. S., Siezen, R. J., Beerthuyzen, M. M., Kuipers, O. P. and De Vos, W. M. 1993. Characterization of the nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 175; 2578-2588.

- van Kraaij, C., Breukink, E., Noordermeer, M. A., Demel, R. A., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and de Kruijff, B. 1998. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. *Biochemistry*, 37; 16033-16040.
- van Kranenburg, R. and De Vos, W. 1998. Characterization of multiple regions involved in replication and mobilization of plasmid pNZ4000 coding for exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 180; 5285-8290.
- van Kranenburg, R., Vos, H. R., van Swam, I. I., Kleerebezen, M. and de Vos, W. M. 1999. Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *J. Bacteriol.*, 181; 6347-6353.
- Vaughan, E. E. and De Vos, W. M. 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 15; 217-237.
- Vaughan, A., Rouse, S. and van Sinderen, D. 2004. Investigating the antimicrobial efficacy of a lactococcal bacteriocin for the development of microbiologically stable beer. *J. Inst. Brew.*, 110 (3); 181-188.
- Vázquez, J. A., Cabo, M. L., González, M. P. and Murado, M. A. 2004. The role amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria a factorial study. *Enzyme and Microbiol Technology*, 34; 319-325.
- Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., Kok, J., Konings W. N. and Venema, G. 1993. Mode of actions of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59; 1041-1048.
- Vereecken, K. M. and Van Impe, J. F. 2002. Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 73; 239-250.
- Visser, S., Exterkate, F. A., Slangen, C. J. and de Veer, G. J. C. M. 1986. Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{s1} -, β - and κ - casein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52; 1162-1166.
- Visser, S. 1993. Proteolytic enzymes and their relationship to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*, 76; 329-350.

- von Wright, A., Suominen, M. and Sivelä, S. 1986. Identification of lactose fermentation plasmids of streptococcal dairy starter strains by Southern hybridization. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2; 73-78.
- von Wright, A. and Sibakov, M. 1993. Genetic modification of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria* (von Wright, A. and Salminen, S. Eds.) pp 161-198. Dekker, New York.
- Ward, A., Hillier, A., Davidson, B. and Powell, I. B. 1993. Stability analysis of the *Lactococcus lactis* DRC1 lactose plasmid using pulsed-field gel electrophoresis. *Plasmid*, 29; 70-73.
- Ward, L. J. H., Heap, H. A. and Kelly, W. J. 2004. Characterization of closely related lactococcal starter strains which show differing patterns of bacteriophages sensitivity. *J. Appl. Microbiol.*, 96; 144-148.
- Wiedemann, E., Breukink, E., van Kraaij, C., Bierbaum, G., de Kruijff, B. and Sahl, H-G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.*, 3; 1772-1779.
- Williams, A. M., Fryer, J. L. and Collins, M. D. 1990. *Lactococcus piscium* sp. Nov. A new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.*, 68; 109-114.
- Wolfe, T. W. and McKay, L. L. 1983. Isolation and partial characterization of lactose-negative mutants from *Streptococcus lactis* C2 defective in the phosphotransferase system. *J. Dairy Sci.*, 67; 950-959.
- Zajdel, J. K. and Dobrzanski, W. T. 1983. Isolation and preliminary characterization of *Streptococcus cremoris* (strain 202) bacteriocin. *Acta Microbiol. Pol.*, 32; 119-129.
- Zajdel, J. K., Ceglowski, P. and Dobrzanski, W. T. 1985. Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49; 969-974.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67; 1616-1619.

ÖZGEÇMİŞ

03.01.1975 tarihinde Eskişehir’de doğdu. İlkokul öğrenimini İzmir, ortaokul ve lise öğrenimini Malatya’da tamamladı. 1994 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden 1998 yılında mezun oldu. 1999 yılında Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimi, “*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MPL56 Suşunda Faj-Almaç Bölgeyi Maskeleyen Plazmid Kodlu Materyalin Tanısı” konulu yüksek lisans tezini vererek, 2000 yılında tamamladı.

1999 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2001 yılında 2547 sayılı Yükseköğretim Kurumu yasasının 35. maddesi gereği doktora öğrenimini yapmak üzere, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne görevlendirildi. Halen Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.