

LACTOCOCCUS CİNSİNE AİT STARTER KÜLTÜR SUŞLARINDA FAJ DİRENÇLİLİK SİSTEMLERİ

PHAGE RESISTANCE SYSTEMS IN STARTER CULTURE STRAINS OF GENUS: LACTOCOCCUS

Mustafa AKÇELİK, Pınar ŞANLIBABA

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

ÖZET: Endüstriyel açıdan önem taşıyan çok sayıda gıda fermentasyon ortamları ve biyoprosesler, bakteriyofaj etkisine karşı duyarlıdır. Ticari alanda faj probleminin kontrolü; faj kontaminasyonunun engellenmesi, faj enfeksiyonuna karşı dirençli suşların kullanımı ve fermentasyon ortamlarında yeni virulent fajların ortaya çıkma olasılığının minimizasyonu gibi temel önlemlere gereksinim duyar. Laktokoklarda doğal olarak meydana gelen farklı faj dirençlilik sistemlerinin tanımlanması, yeni faj dirençli suşların oluşturulmasında araştırmacılara genetik yaklaşımları kullanma olanağı tanımıştır. Bu makalede, laktokoklarda doğal olarak bulunan faj dirençlilik sistemlerinin etki mekanizmaları ve bu sistemlere ait genetik determinantlar üzerinde yürütülen araştırmalar özetlenmiştir.

ABSTRACT: Many important industrial bioprocess and food fermentations are susceptible to attack by bacteriophages. Control of phage problems in the commercial arena requires basic measures such as prevention of phage contamination, employment of strains that are resistant to phage infection, and minimization of opportunities for the appearance of new virulent phages in fermentation media. The characterization of different naturally occurring phage resistance systems in lactococci has enabled researchers to use genetic approaches in the construction of new phage-insensitive strains. In this report, the researches that carried on the mechanisms of the acts of naturally occurring phage resistance systems and genetic determinants of these systems in lactococci, were summarized.

GİRİŞ

Lactococcus cinsine ait iki alt tür (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*) ve bir biyovaryete (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), yarı sert peynirler, eritme peynirler, taze peynirler, quark, ekşi süt ve krema, yağlı süt ürünleri ve kefir gibi çok sayıda fermente süt ürününün eldesinde starter kültürler olarak kullanılmaktadır. Peynir yapımında kullanılan starter kültür suşlarının faj enfeksiyonu sonucu inaktive olduklarına dair ilk bilgiler 65 yıl öncesine dayanmaktadır (KLAENHAMMER, 1987). Bu enfeksiyonlar halen tüm dünyada mezofilik süt fermentasyonlarında starter kültürlerin inaktivasyonunun ve dolayısı ile önemli ölçüde ekonomik kayıpların ana nedenini teşkil etmektedir (GASSON ve DE VOS, 1994).

Faj probleminin geleneksel çözümünde temel yaklaşım, fermentasyon ortamlarından faj dirençli mutantların seçimi ve kullanımı esasına dayandırılmaktadır. Laktokokların süt fermentasyonlarında çok yoğun bir şekilde kullanılmaları, faj-konakçı interaksyonları bakımından en dinamik suşlar haline gelmeleri sonucunu doğurmuştur. Bu nedenle klasik teknikler ile seçilen faj dirençli mutantlar, genellikle dirençlilik özelliklerini kısa sürelerle koruyabilmekte ve sadece lokal fajlara karşı etkili olabilmektedir (DE VOS ve ark. 1984; DE VOS, 1989; HILL, 1993). Zira laktokok fajlarının; konakçı bakterilerin doğal koşullarda geliştirdiği dirençlilik sistemlerini aşarak, litik etkilerini sürdürmelerine olanak sağlayan düzenlemeleri yapabilecek genetik esnekliğe sahip olduğu bilinmektedir (TEUBER, 1990; HILL, 1993). Günümüzde faj probleminin kalıcı ve evrensel çözümü için, modern genetik teknikler kullanılarak birden fazla ve etkin faj dirençlilik sistemleri ile donatılmış suşların geliştirilmesi çalışmaları ağırlık kazanmıştır. Bu yönde düzenlenmiş endüstriyel suşların geliştirilmesi, ancak laktokok suşlarının içerdiği doğal dirençlilik sistemlerinin etki mekanizmalarının ve genetik determinantlarının detaylı bir şekilde tanımlanması ile mümkün olacaktır.

Bu makalede; laktokoklarda saptanan restriksiyon/modifikasyon, abortif enfeksiyon, faj adsorbsiyonunun ve faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi tipte dirençlilik sistemlerinin etki mekanizmaları ve genetik determinantları üzerine yürütülen çalışmalar konu edilmiştir.

FAJ ADSORBSİYONUNUN ENGELLENMESİ

Laktokok suşlarında faj almaç bölgeleri çoğunlukla hücre duvarında bulunmaktadır. Ancak hücre membranı üzerinde faj almaç bölgesi bulunan suşlar da tanımlanmıştır. Almaç bölgeler lipoproteinlerle kombin olmuş proteinler ya da protein ve karbonhidrat moleküllerinden oluşmaktadır (SANDERS ve KLAENHAMMER, 1984).

Bakterilerle özgül fajların karşı karşıya gelişleri, tümüyle rastlantıya bağlı olup, faj ortamda konakçısı ile karşılaşınca kuyruğu ile bakterinin hücre duvarında ya da stoplazma membranında bulunan faj reseptör bölgesine tutunur. Normalde kuyuksuz olan ya da kuyruk iplikçikleri bulunmayan fajların bakteriyeye nasıl tutundukları, taban levhaları ile kuyruk dikenlerinin de adsorbsiyon olayındaki rolleri anlaşılammıştır (AKMAN, 1983). Fajın konakçı hücrelerine adsorbsiyonu oldukça spesifik olup; faj özgüllüğüne, konakçı hücrenin biyokimyasal özelliğine, stoplazmik membranın elektiriksel potansiyeline, faj reseptör materyalinin yoğunluğuna ve fajlar tarafından kullanılabilirliğine bağlıdır (SIJTSMA ve ark. 1990).

Adsorbsiyonun engellenmesi, laktokoklarda faj tipine özgül almaç bölgelerde (reseptör) oluşan bir değişim sonucu, fajların bakteri yüzeyine tutunmasının engellenmesidir. Bu direnç sistemi, plazmid kodlu genler tarafından kontrol edilebildiği gibi, hücresel fonksiyonların ikincil bir etkisi sonucunda da meydana gelebilmektedir (SANDERS ve KLAENHAMMER, 1984). Laktokok suşlarında almaç bölgelerde protein kompozisyonunu değiştirmek suretiyle adsorbsiyonun engellenmesinin bir faj direnç sistemi olduğu ve belirli plazmidler tarafından kontrol edildiği değişik araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır (DE VOS ve ark. 1984, SANDERS ve KLAENHAMMER, 1984, AKÇELİK ve TUNAİL, 1992).

İlk kez SANDERS ve KLAENHAMMER (1983) tarafından, *L.lactis* subsp. *lactis* ME 2 suşunda 48 Kb büyüklükte, pME0030 plazmidinin faj adsorbsiyonunun engellenmesi özelliğinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar dört farklı faja karşı %40 oranında adsorbsiyon sıklığı ve 10^{-9} plak etkinliği veren doğal suştan, 48 Kb'lık plazmidin giderilmesi ile oluşturdukları restriksiyon/modifikasyon aktivitesine sahip varyantlarda; adsorbsiyon sıklığının %99.7, plak etkinliğinin ise 10^{-7} 'ye yükseldiği belirlemiştir.

DUNNY ve ark. (1988) *L. lactis* subsp. *lactis* LM2301 suşunda faj adsorbsiyonunun engellenmesi direnç gen kodunu taşıyan 90 Kb büyüklükte bir plazmidin, bu suşun hücre duvarındaki antijen nitelikli proteinlerle ilişkisi üzerine yaptıkları çalışmada; söz konusu plazmidin varlığında faj almaç bölgelerinde lokalize olan 16-20 KDa'luk iki özel proteinin üretildiği ve 22 KDa'luk bir başka proteinin üretiminin engellendiği saptanmıştır. Plazmid kodlu proteinlerin faj almaç bölgeleri ile etkileşimleri üzerinde yürütülen diğer çalışmalarda; *L. lactis* subsp. *lactis* SK110 suşunda bulunan 54 Kb büyüklükteki pSK112 plazmidinde kodlu bir gen ürününün, faj reseptör bölgesini maskeleyerek söz konusu suşta faj adsorbsiyonunu engellediği belirlenmiştir (DE VOS ve ark. 1984). Ayrıca AKÇELİK ve TUNAİL (1992), *L. lactis* subsp. *lactis* LL25 suşunda tanımladıkları p2520L plazmidinin, hücre yüzeyi antijenlerini sentezleyerek faj adsorbsiyonunu bloke eden bir mekanizmayı kodladığını saptamışlardır.

RESTRİKSİYON/MODİFİKASYON SİSTEMLERİ

Restriksiyon endonukleazlar, plazmid ya da faj gibi yabancı DNA saldırısına karşı konakçı hücrenin doğal savunma mekanizmalarıdır. Bu enzimler, hücreye giren yabancı DNA molekülünü belli serilerden tanıma ve kesme aktivitesi gösterirler (WATSON ve ark. 1987). Modifikatör enzimler ise belirli pozisyonlardaki adenin ya da timin bazlarını metilleyerek, yabancı DNA molekülünü restriksiyon endonukleaz aktivitesinden korurlar. (BICKLE ve KRUGER, 1983). Bu nedenle; laktokoklarda restriksiyon/modifikasyon sistemleri esasen faj enfeksiyonunu engelleyici rol oynamakla birlikte, aynı zamanda fermentasyon ortamlarını enfekte eden fajların konakçı özgülüğünün genişlemesine de neden olabilmektedir (KLAENHAMMER, 1987).

Laktik starter kültür olarak kullanılan değişik suşların, kendiliğinden oluşan adsorbsiyonun engellenmesi ve abortif enfeksiyon sistemlerini içermeyen varyantlarında, restriksiyon/modifikasyon aktivitelerinin gözleendiği ve bu özelliğin stabil olmadığı bildirilmiştir (BOUSSAMAER ve ark. 1980). Bugüne dek yürütülen değişik araştırmalarda, laktokoklardaki restriksiyon/modifikasyon sistemlerinin sadece tip II restriksiyon endonukleaz-

larla sınırlı olduğu saptanmıştır (FITZGERALD ve ark. 1982, DALY ve ark. 1996). Laktokoklarda, farklı tip II restriksiyon endonukleaz enzimleri, farklı DNA serilerini tanımaktadır. Ancak farklı kaynaklardan izole edilen enzimlerin aynı serileri tanıdığı ve kestiği de belirlenmiştir (DALY ve ark. 1996).

Laktokoklarda belirlenen ilk plazmid kodlu faj dirençlilik mekanizması restriksiyon/modifikasyon sistemleridir. SANDERS ve KLAENHAMMER (1981), *L. lactis* subsp. *cremoris* KH suşunda restriksiyon/modifikasyon aktivitesinin bu suşun içerdiği 10 MDa'luk bir plazmid tarafından kontrol edildiğini belirlemiştir.

DNA dizi analizleri sonucu, laktokoklarda saptanan restriksiyon/modifikasyon sistemleri iki ana gruba ayrılmıştır. Bunlar; Scr FI ve Llal sistemleridir (DALY ve ark. 1996).

L. lactis subsp. *lactis* UC 503 suşundan izole edilen ve Scr FI adı verilen tip II restriksiyon endonukleaz enzimi, restriksiyon/modifikasyon aktivitesi görülen laktokoklarda yaygın olarak bulunmakta (FITZGERALD ve ark. 1982) ve Scr FI restriksiyon/modifikasyon aktivitesi konakçı hücre kromozomu tarafından kontrol edilmektedir (TWOMEY ve ark. 1997). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 suşunda Scr F₁'in iki nükleolitik aktivitesi saptanmıştır. Bunlardan birisi stoplazma dışında bulunan, spesifik olmayan bir nükleaz aktivitesi ve diğeri ise hemen hemen Scr F₁'in hedef bölgesi ile aynı hedef bölgesi olan tip II restriksiyon endonukleaz aktivitesidir. NCDO 497 suşu aynı zamanda, Lla I olarak adlandırılan tip II restriksiyon aktivitesi de göstermektedir (MAYO ve ark. 1991, TWOMEY ve ark. 1997).

Plazmid kodlu Lla I tip restriksiyon/modifikasyon aktiviteleri de değişik laktokok suşlarında tanımlanmıştır (CHOPIN ve ark. 1984, SANDERS, 1988). CHOPIN ve ark. (1984), *L. lactis* subsp. *lactis* 503 suşunda; konjugasyon yeteneğinde olan 28 Kb büyüklükte, PIL6 ve konjugasyon yeteneğinde olmayan 31 Kb büyüklükte pLL7 plazmidlerinin konakçı restriksiyon/modifikasyon sisteminin genetik determinantları olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmada, her iki plazmidin protoplast transformasyonu ile aktarımı sağlanmış ve R⁺/M⁺ varyanların R⁺/M⁺ hale dönüştükleri belirlenmiştir. Yine *L. lactis* subsp. *lactis* IL 964 suşunda 5.7 Kb'lık pIL10 ve 15.2 Kb'lık pIL107 plazmidlerinin, M12R suşunda pLR1020 plazmidinin Llal tip restriksiyon/modifikasyon aktivitesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (KLAENHAMMER ve STEENSON, 1986). *L. lactis* subsp. *cremoris* TDM1 suşunda ise Llal tip restriksiyon/modifikasyon sistemleri 30 Kb büyüklükteki pTR12, 28 Kb büyüklükteki pTRK30 ve 16 Kb büyüklükteki pTRK317 plazmidleri tarafından kodlanmaktadır (HILL, 1993; DALY ve ark. 1996).

Restriksiyon/modifikasyon sistemi, aynı suşta diğer direnç mekanizmaları ile birlikte bulunursa daha etkili bir dirençlilik reaksiyonu meydana gelmektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* LM2030 suşunda abortif enfeksiyon ve Llal tip restriksiyon/modifikasyon sistemlerinin gen kodunun konjugatif bir plazmid olan pTR2030 üzerinde bulunduğu saptanmıştır (KLAENHAMMER ve ark. 1989). Yine aynı şekilde pTN20, pBF61, pKR223 ve PHD131 plazmidlerinde Llal tip restriksiyon/modifikasyon mekanizması yanında abortif enfeksiyon mekanizması gen kodu da bulunmaktadır (HILL, 1993). Genetik çalışmalar, aynı suşta iki yada üç farklı restriksiyon/modifikasyon sisteminin bulunabileceğini göstermiştir (DALY ve ark. 1996).

Laktokok fajları restriksiyon endonukleazların aktivitelerinden kaçarak gelişmelerini sürdürebilmektedir. Konakçı endonukleazlarının inhibe edilmesi, faj kodlu metilazların kendi kendini modifiye etmesi, diğer metilasyon mekanizmalarından farklı olan DNA modifikasyonu ve faj genomunda restriksiyon endonukleazların hedef bölge sayısının azalması gibi nedenler, laktokoklarda antirestriksiyon mekanizmasının meydana gelmesine yol açmaktadır. Laktokokal bakteriyofajlarda şimdiye kadar bu şekilde oluşan iki antirestriktif mekanizma saptanmıştır (GASSON ve DE VOS, 1994).

Abortif Enfeksiyon

Abortif enfeksiyon, faj DNA'nin konakçı hücreye enjeksiyonundan sonraki faj enfeksiyon süreçlerinin engellenmesi olarak tanımlanmaktadır (DUCKWORTH ve ark. 1981). Bu faj direnç tipinde, faj DNA'nin hücreye girişi ve erken gen ifadesi normal olarak meydana gelmekte, ancak geç gen ifadesi engellenmektedir (KLAENHAMMER ve DINSMORE, 1997). Erken dönem proteinler faj DNA'nin sentez enzimleri, geç dönem proteinler ise kapsid ve kuyruk monomerlerinin yapı taşlarıdır (KLAENHAMMER, 1984). Litik fajlarda plak etkinliği ve patlama büyüklüğü abortif tipteki süreçte düşürülebilmektedir (KLAENHAMMER ve ark. 1989).

Abortif enfeksiyon sistemlerini içeren fenotiplerin, morfolojik farklılık gösteren fajlara karşı aynı dirençliliği vermesi, bu tip direnç özelliğini pratikte çok önemli kılmaktadır (SANDERS, 1988). Abortif enfeksiyon tipindeki faj dirençlilik mekanizmaları genellikle konjugatif plazmidler tarafından determine edilmektedir. Laktokok suşlarında moleküler düzeyde 10 abortif enfeksiyon sistemi tanımlanmıştır. Farklı *Lactococcus lactis* suşlarından izole edilen bu sistemler; Abi A, Abi B, Abi C, Abi D, Abi D1, Abi E, Abi F, Abi G, Abi H, ve Abi K olarak adlandırılmaktadır. Abi D, Abi D1 ve Abi F arasında görülen protein homolojisi bu sistemlerin evrimine ışık tutacak niteliktedir (MOINEAU ve ark. 1997).

İlk DNA dizi analizi yapılan sistem olan Abi A, pTR2030 plazmidinde belirlenmiştir. Konjugatif bir plazmid olan pTR2030'un abortif enfeksiyon yanında 13.5 Kb'lık bölgesinde ikinci bir bağımsız dirençlilik mekanizması olan restriksiyon/modifikasyon aktivitesi de içerdiği belirlenmiştir. Restriksiyon/modifikasyon sisteminin etkili olmadığı durumlarda dirençlilik, abortif enfeksiyon mekanizması tarafından sağlanmaktadır (KLAENHAMMER ve ark. 19989). Isı duyarlı faj direnç sistemi (Hsp) olarak da adlandırılan Abi A, küçük izometrik başlı fajlarda kapsid protein üretimini tamamiyle engellemektedir (KLAENHAMMER ve ark. 1993). Son yıllarda yapılan çalışmalarda Abi A'nın küçük izometrik başlı fajlarda DNA replikasyonunu da engellediği belirlenmiştir (KLAENHAMMER ve DINSMORE, 1994). *L. lactis* subsp. *lactis* UC811 suşundan elde edilen konjugatif bir plazmid olan pCI829 plazmidinde de Abi A geninin varlığı saptanmıştır (HILL, 1993; KLAENHAMMER ve DINSMORE, 1997).

Abi B mekanizması, enfeksiyondan 15 dakika sonra faj transkriptlerinin azalmasına yol açarak dirençlilik sağlamaktadır. 251 aminoasit kodlayan Abi B genine sahip hücrelerde RNaz aktivitesi stimüle edilmekte ve transkriptlerin U-U, A-U, U-A bölgelerinde endonukleolitik aktivite gözlenmektedir (MOINEAU ve ark. 1997). *L. lactis* subsp. *lactis* IL 416 suşundan izole edilen konjugatif bir plazmid olan PIL611'in 2 Kb'lık bölgesinde Abi B yanında Abi C mekanizmasının varlığı da tanımlanmıştır. PIL611 plazmidinin 753 baz çifti uzunluğundaki bir açık okuma kalıbında (ORF) kodlu Abi C mekanizması, faj patlama büyüklüğünün redüksiyonu yolu ile etkinlik göstermektedir (CLUZEL ve ark. 1991).

L. lactis subsp. *cremoris* UC653 suşunda saptanan ve konjugatif bir plazmid olan pC1750 üzerinde kodlu Abi G abortif enfeksiyon geninde, 242 aminoasit kodlayan AbiG_i; ve 397 aminoasit kodlayan AbiG_{ii}; açık okuma kalıpları bulunmaktadır. Bu okuma kalıpları ne protein ne de DNA sıraları bakımından homoloji göstermemektedir. Abi G'de, laktokokal abi genlerinin karakteristik özelliği olan düşük oranda (%27) G+C bulunmaktadır. Abi G, DNA replikasyonu üzerinde etki göstermemekte, ancak litik siklusta DNA replikasyonundan sonraki bazı aşamaları inhibe ettiği sanılmaktadır (FITZGERALD ve ark. 1996).

L. lactis subsp. *lactis* W1'den izole edilen 8 Kb büyüklükte pSRQ800 plazmidinde, Abi A gibi ısı duyarlı olan ikinci bir abortif enfeksiyon sistemi de tanımlanmıştır. Abi K olarak adlandırılan bu sistem, küçük izometrik fajların gelişimini engellerken, prolat fajlara karşı etkisi oldukça sınırlıdır ve faj patlama büyüklüğünü 15 kez azaltmaktadır. Başarılı bir enfeksiyon meydana geldiğinde, latent dönem bu sistem tarafından 15 dakika kadar uzatılmakta ve büyük bir hücre ölümü (%97.5) meydana getirilmektedir (MOINEAU ve ark. 1997).

L. lactis subsp. *lactis* DRC3 suşunda bulunan konjugatif bir plazmid olan pNP40 plazmidinde, Abi E ve Abi F olmak üzere iki abortif enfeksiyon sistemi tanımlanmıştır. İki açık okuma kalıbından oluşan Abi E, küçük izometrik başlı fajlara karşı etkili olup viral genlerin translasyon, transkripsiyon, paketleme ve serbest kalma aşamalarında engelleyici rol oynamaktadır. Abi F abortif enfeksiyon mekanizması, 41.2 KDa'luk bir protein oluşturan tek ORF bölgesinde kodlanmaktadır. Bütün prolat ve küçük izometrik başlı fajlara karşı etkili olan Abi F mekanizması, DNA replikasyonunu engellemektedir (GARVEY ve ark. 1995).

L. lactis subsp. *lactis* KR5 suşundaki 42 Kb büyüklükte pBF61 plazmidinde hem restriksiyon/modifikasyon aktivitesi ve hem de Abi D1 tip abortif enfeksiyon mekanizması saptanmıştır. Dört açık okuma kalıbından oluşan ve M operonunda tanımlanan Abi D1, 366 aminoasit kodlamaktadır (MOINEAU ve ark. 1997). Bu suşta Abi D1 proteini, Abi D gibi küçük izometrik başlı fajların translasyon süreçlerini inhibe etmektedir (RENAULT, 1996).

L. lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* S94 suşunda çalışılan, Abi H abortif enfeksiyon mekanizmasının fonksiyonları henüz tam olarak bilinmemektedir. Konakçı kromozomu üzerinde kodlu bulunan Abi H mekanizmasının, yapılan çalışmada prolat başlı fajların plak etkinliğini azalttığı, küçük izometrik fajlara karşı da direnç özelliği gösterdiği saptanmıştır (PREVOTS ve ark. 1996).

FAJ DNA ENJEKSİYONUNUN ENGELLENMESİ

Fajın konakçı hücreye adsorbsiyonu, faj DNA'nın hücre içine translokasyonu için yeterli değildir. MONTEVILLE ve ark. (1994) *L. lactis* subsp. *lactis* C2 suşunda saptadıkları membran proteinin, faj c2 DNA'nın hücre içine enjeksiyonunda zorunlu bir eleman olduğunu bildirmiştir. İlk kez GARVEY ve ark. (1996) MONTEVILLE ve ark. (1994) tarafından kullanılan faj materyalini (c2 fajı) esas alarak, *L. lactis* subsp. *lactis* C2 suşu ile çok benzer olan MG1614 türev suşunda, c2 faj DNA'nın hücre içine enjeksiyonunun engellendiğini saptamışlardır. Genetik analiz çalışmaları sonucu MG1614 suşunda pNP40 plazmidinin, Abi E ve Abi F olarak adlandırılan iki farklı abortif enfeksiyon sistemi yanında, c2 fajı DNA'nın enjeksiyonunu engelleyici tipte dirençlik sistemi gen kodunu da içerdiği belirlenmiştir. GARBUTT ve ark. (1997) tarafından *L. lactis* subsp. *lactis* LM2301 suşunda da yalnız c2 fajı DNA enjeksiyonunu engelleme özelliğinde dirençlilik sisteminin varlığı tanımlanmış ve bu suşta söz konusu sistemin kromozomal DNA kökenli olduğu kanıtlanmıştır. Son olarak AKÇELİK (1998), *L. lactis* subsp. *lactis* MPL18 suşunda la2 fajına karşı dirençliliğin, faj DNA enjeksiyonunu engelleyerek etkili olduğunu ve kromozomal DNA tarafından kodlandığını saptamıştır.

Faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi tipte faj dirençlilik sistemi, oldukça güçlü bir dirençlilik fenotipi oluşturma yeteneğindedir. Ancak bugüne kadar yalnız üç suşta ve iki faja karşı tanımlanmış olması, çok spesifik bir sistem olduğuna işaret etmektedir. Sistemin etkinliği ve laktokok suşlarındaki yaygınlığı üzerindeki çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir (FITZGERALD ve ark. 1996; GARBUTT ve ark. 1997).

SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

Laktokoklarda tanımlanan plazmid kodlu faj dirençlilik sistemlerinin endüstriyel starter suş geliştirme programlarında kullanımı; konjugatif özellik içermeleri ve konakçı suşlarda yüksek düzeyde stabilite göstermeleri gibi iki temel kritere bağlıdır. Bu iki özellik söz konusu plazmidlerin doğal süreçlerle verici suşlardan aktarımını ve populasyonda sürekliliğini sağlamaktadır. Diğer yandan faj dirençlilik özelliğini determine eden plazmidlerin detaylı moleküler analizleri, hedef konakçılarda yalnız bu plazmidlere ait dirençlilik genlerinin klonlarının oluşturulmasını mümkün hale getirmiştir. Kromozomal DNA kökenli dirençlilik sistemleri ise, özellikle stabil konakçı suş karakterleri ve starter suş geliştirme programlarında ideal alıcı suşlar olarak gösterdikleri potansiyel açısından önem taşımaktadır. Plazmid kodlu faj dirençlilik sistemleri içeren verici suşların, kromozomal DNA kökenli faj dirençlilik sistemleri içeren alıcı suşlarla eşleştirilmeleri sonucu süper suşların oluşturulması, sorunun endüstriyel çözümünde temel strateji olarak tanımlanmaktadır.

Türkiye kökenli laktokok suşlarının endüstriyel kültür olarak kullanılmamaları, faj konakçı interaksyonlarındaki dinamizmi engelleyen temel unsurdur. Geleneksel ürünlerimize adapte olmuş laktokoklarda faj dirençlilik sistemlerinin tanımlanması bu açıdan önem taşımaktadır. Ancak bu kritik potansiyellerine rağmen laktokok suşlarının içerdiği faj dirençlilik sistemlerinin genetik ve biyokimyasal analizine yönelik araştırmalar halen ülkemizde oldukça sınırlı düzeydedir. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü gıda Mikrobiyolojisi biriminde oluşturduğumuz faj ve laktokok kültür koleksiyonu bu konuda araştırma yapmayı planlayan araştırmacılara hizmet verecek düzeye ulaşmıştır.

KAYNAKLAR

- AKÇELİK, M., TUNAİL, N. 1992. A 30 kd Cell Wall Protein Produced by Plasmid DNA Which Encodes Inhibition of Phage Adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P25. *Milchwissenschaft*, 47; 215-217.
- AKÇELİK, M. 1998. A Phage DNA Injection- Blocking Type Resistance Mechanism Encoded by Chromosomal DNA in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PLM 18. *Milchwissenschaft*, 53; 619-622.
- AKMAN, M. 1983. Bakteri Genetiği. İkinci baskı. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını, 544s, Sivas.
- BICKLE, A.T., KRUGER, H.D. 1983. Bacteriophage Survival: Multiple Mechanisms for Avoiding The Deoxyribonucleic Acid Restriction Systems of Their Hosts. *Microbiological Reviews*, 345-360.
- BOUSSAMAER, J.P., SCHRAUWEN, P.P., SOURROILE, J.D., GUY, P. 1980. Multiple Modification/Restriction Systems in Lactic Streptococci and Their Significance in Defining a Phage Typing system. *J. Dairy Sci.* 47; 401-409.
- CHOPIN, A., CHOPIN, M.C., BATT, G.M. AND LANGELLA, P. 1984. Two Plasmid Determined Restriction and Modification Systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid*, 11; 260-263.
- CLUZEL, P.J., CHOPIN, A., EHRLICH, S.D., CHOPIN, M.C. 1991. Phage Abortive Infection Mechanism from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, Expression of Which is Mediated by an Iso ISS 1 Element. *Appl. Environ. Microbiol.* 57; 3547-3551.
- DALY, C., FITZGERALD, G.F., DAVIS, R. 1996. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria with Special Reference to Bacteriophage Resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70; 99-110.
- DE VOS, W.M., UNDERWOOD, H.M., DAVIES, F.L. 1984. Plasmid Encoded Bacteriophage Resistance in *Streptococcus cremoris* SK 11. *FEMS Microbiology Letters*, 23; 175-178.
- DE VOS, W.M. 1989. On the Carrier State of Bacteriophages in Starter Lactococci. *Neth. Milk Dairy J.* 43; 221-228.
- DUCKWORTH, D.H., GLENN, J., McCOQODALE, D.I. 1981. Inhibition of Bacteriophage Replication by Extrachromosomal Genetic Elements. *Microbiological Reviews*, 45(1); 52-71.
- DUNNY, G.M., KRUG, D.A., PAN, C.L., LEDFORD, R.A. 1988. Identification of Cell Wall Antigens Associated with a Large Conjugative Plasmid Encoding Phage Resistance and Lactose Fermentation Ability in Lactic Streptococci. *Biochimie*, 70; 443-450.
- FITZGERALD, G.F., DALY, C., BROWN, L.R., GINGERAS, T.R. 1982. ScrF1: A New Sequence Specific Endonuclease from *Streptococcus cremoris*. *Nucleic Acids Research*, 10; 8171-8178.
- FITZGERALD, G.F., HILL, C., GARVEY, P. 1996. Restriction Modification Systems in *Lactococcus lactis*. *Gene*, 157; 13-18.
- GARBUTT, K.C., KRAUS, J., GELLER, B.L. 1997. Bacteriophage Resistance in *Lactococcus lactis* Engineered by Replacement of a Gene for a Bacteriophage Receptor. *Journal of Dairy Science*, 80(8); 1512-1519.
- GARVEY, P., FITZGERALD, G.F., 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.
- GARVEY, P., HILL, C., FITZGERALD, G.F. 1996. The Lactococcal plasmid pNP40 Encodes a Third Bacteriophage Resistance Mechanism, One Which Affect Phage DNA Penetration. *Appl. Environ. Microbiol.* 62; 676-679.
- GASSON, J.M., DE VOS, W.M. 1994. Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. 106-168.
- HILL, C. 1993. Bacteriophage and Bacteriophage Resistance in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12; 87-108.
- KLAENHAMMER, T.R. 1984. Interactions of Bacteriophages with Lactic Streptococci. *Adv. Appl. Microbiol.* 30; 1-29.
- KLAENHAMMER, T.R., STEENSON, L.R. 1986. Plasmid Heterogeneity in *Streptococcus cremoris* M12R: Effects on Proteolytic Activity and Host Controlled Phage Replication. *Journal of Dairy Science*, 69; 2227-2236.
- KLAENHAMMER, T.R. 1987. Plasmid Directed Mechanisms for Bacteriophage Defense in Lactic Streptococci. *FEMS Microbiology Reviews*, 46; 313-325.
- KLAENHAMMER, T.R., HILL, C., PIERCE, K. 1989. The Conjugative Plasmid pTR2030 Encodes Two Bacteriophage Defense Mechanisms in Lactococci, Restriction-Modification and Abortive Infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 55; 2416-2419.
- KLAENHAMMER, T.R., PANDIAN, S., DURMAZ, E., MOINEAU, S. 1993. Differentiation of Two Abortive Mechanisms by Using Monoclonal Antibodies Directed Toward Lactococcal Bacteriophage Capsid Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 59; 208-212.
- KLAENHAMMER, T.R., DINSMORE, P.K. 1994. Phenotypic Consequences of Altering The Copy Number of *Abi A*, a Gene Responsible for Aborting Bacteriophage Infections in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1129-1136.
- KLAENHAMMER, T.R., DINSMORE, P.K. 1997. Molecular Characterization of a Genomic Region in a *Lactococcus* Bacteriophage That is Involved in Its Sensitivity to The Phage Defense Mechanism *Abi A*. *Journal of Bacteriology*, 2949-2957.
- MAYO, B., HARDISSON, C., BRANA, A.F. 1991. Nucleolytic Activities in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497. *FEMS Microbiol. Rev.* 52:812-818.

- MOINEAU, S., KONDO, J.K., VEDAMUTHU, E.R., EMOND, E., HOLLER, J.B., BOUCHER, I., VANDENBERGH, P.A. 1997. Phenotypic And Genetic Characterization of The Bacteriophage Abortive Infection Mechanism Abi K from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63; 1274-1283.
- MONTEVILLE, M.R., ARDESTANI, B., GELLER, B.A. 1994. Lactococcal Phages Required a Host Cell Wall Carbohydrate And a Plasma Membrane Protein for Adsorption And Ejection of DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 60; 3204-3211.
- PREVOTS, F., DALOYAU, M., BONIN, O., DUMONT, X., TOLOU, S. 1996. Cloning And Sequencing of The Novel Abortive Infection Gene Abi h of *Lactococcus lactis* subsp. *lactic* biovar. *diacetylactis* S94. *FEMS Microbiol. Letters*, 142; 295-299.
- RENAULT, P. 1996. Progress in Genetic Research of Lactic Acid Bacteria. *Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications*, 15-37s, France.
- SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. 1981. Evidence for Plasmid Linkage of Restriction And Modification in *Streptococcus cremoris* Kh. *Appl. Environ. Microbiol.* 42; 944-950.
- SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. 1983. Characterization of Phage Sensitive Mutants from a Phage-Insensitive Strain of *Streptococcus lactis*: Evidence for a Plasmid Determinant That Prevents Phage Adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.* 46; 1125-1133.
- SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. 1984. Phage Resistance in a Phage Insensitive Strain of *Streptococcus lactis*: Temperature Dependent Phage Development And Host Controlled Phage Replication. *Appl. Environ. Microbiol.* 47; 979-985.
- SANDERS, M.E. 1988. Phage Resistance in Lactic Streptococci. *Biochimie*, 70; 411-421.
- SIJTSMA, L., WOUTERS, J.T., HELLINGWERF, K.J. 1990. Isolation And Characterization of Lipoteichoic Acid, a Cell Envelope Component Involved in Preventing Phage Adsorption, from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK 110. *J. Bacteriol.* 172; 7126-7130.
- TEUBER, M. 1990. Strategies for Genetic Modification in Lactic Acid Bacteria. *Food Biotechnology*, 4(1); 537-546.
- TWOMEY, D.P., GABILLET, N., DALY, C., FITZGERALD, G.F. 1997. Molecular Characterization of The Restriction Endonuclease Gene (Scr FIR) Associated With The ScrFI Restriction/Modification System from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC503. *Microbiology*, 143; 2277-2286.
- WATSON, J.D., HOPKINS, H.A., ROBERTS, J.W., STEITZ, A.J., WEINER, A.M. 1987. *Molecular Biology of The Gene*. Benjamin Cummings Publ. CO. USA, Fourth Edition. 1163s.

GIDA DERGİSİ 2000 yılı dizgi ücreti abone olanlar için 10.000.000.-TL.
abone olmayanlar için 15.000.000.-TL. olarak yeniden belirlenmiştir.

Ayrı basım; talep eden araştırmacılara 3.000.000.-TL.
ek ücret karşılığında verilecektir.

GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ
YÖNETİM KURULU