

# LACTOCOCCUS LACTIS SUŞLARINDA EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİNİN FAJ DİRENÇLİLİK İLE İLİŞKİSİ

## RELATIONSHIP BETWEEN EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION AND PHAGE RESISTANCE IN *LACTOCOCCUS LACTIS*

Ela KOÇER<sup>1</sup>, Çağla TÜKEL<sup>1</sup>, Mustafa AKÇELİK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü - Ankara

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü - Ankara

**ÖZET:** Türkiye kökenli 90 *Lactococcus lactis* suşunun 25 laktik fajı karşı test edilmesi sonucu, 7 adet suşun tüm fajlara karşı tam direnç gösterdiği belirlendi. Yedi suştan altı adedi ekzopolisakkarit üretme yeteneğinde bulundu. Bu suşlardan 4 adedinin kapsüler, 2 adedinin ise hücre duvarı ile gevşek ilişkili ekzopolisakkaritler ürettiği saptandı. Tüm ekzopolisakkarit üreten *L. lactis* suşlarında, faj dirençlilik fenotipinin faj adsorbsiyonunun engellenmesi suretiyle oluşturulduğu tespit edildi.

**ABSTRACT:** Seven of 90 strains of *Lactococcus lactis*, originated from Turkey, showed complete resistance against 25 lactic phages. Six strains of totally 7 were determined as exopolysaccharide producers. Capsular exopolysaccharides and exopolysaccharides which are loosely associated to the cell wall were identified for four and two strains, respectively. It is determined that phage resistance phenotypes are formed by inhibition of phage adsorption in all exopolysaccharide producer strains.

### GİRİŞ

Ekzopolisakkarit oluşturma yeteneğindeki *Lactococcus lactis* suşları; düşük pıhtılaşma kapasitesine sahip, kıvamlı ve katı-sıvı faz ayrımının olmadığı yarı sert peynirler, tereyağı, kefir, dahi, laktofil ve tetemelk gibi özel fermente süt ürünlerinin eldesinde starter kültürler olarak kullanılmaktadır (LITOPOLU-TZENETAKI ve TZENETAKIS 1999, ROGINSKI 1999). Starter kültürler tarafından üretilen ekzopolisakkaritler, fermente süt ürünlerinin yapısal, aromatik ve reolojik özellikleri üzerinde etkin rol oynamaktadır (DUBOC ve MOLLET 2001, LAWS ve MARSHALL 2001).

Son yıllarda, özellikle *L. lactis* suşlarında, ekzopolisakkaritlerin faj dirençlilik fenotipinin oluşumunda da rol aldığı belirlenmesi; bu metabolik özelliğin, starter kültür suşları üzerinde çalışılan araştırmacıların başlıca ilgi alanı haline gelmesine yol açmıştır (VALYASEVI ve ark. 1991, GARVEY ve ark. 1995, O'SULLIVAN ve ark. 2001). İlk araştırmalar, üretilen ekzopolisakkarit tipinin, bakteride faj duyarlı ya da faj dirençli fenotipin oluşumunda belirleyici rol oynadığına işaret etmiştir (LINDBERG 1977, CERNING 1990). Halen bu konu ile ilgili sınırlı sayıda literatür verisi bulunmaktadır. Bu araştırmalarda da, kapsüler ekzopolisakkarit üreten suşların çoğunlukla faj duyarlı, hücre duvarı ile gevşek ilişkili bir şekilde ve dış ortama salgılanmış (LAM) ekzopolisakkarit üreten suşların ise faj dirençli olduğu belirlenmiştir (VALYASEVI ve ark. 1991, GARVEY ve ark. 1995, DALY ve ark. 1996, AKÇELİK ve ŞANLIBABA 2002). Endüstriyel önemi nedeniyle bu duyarlılık ya da dirençlilik fenotipinin genetik ve biyokimyasal doğası üzerindeki araştırmalar detaylandırılarak sürdürülmektedir.

Bu araştırmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilerek ekzopolisakkarit üretim özelliği tanımlanan *L. lactis* suşlarında, söz konusu özelliğin faj dirençlilik ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

### MATERYAL ve YÖNTEM

#### Materyal

Araştırmada kullanılan *L. lactis* suşları ve laktik fajlar KOÇER ve AKÇELİK (2002) tarafından izole edilmiş tanımlanmıştır. Bakteri ve faj stokları %40 oranında steril gliserol ilave edilen M17 broth ortamlarında (TERZAGHI ve SANDINE 1975) -18 °C' de saklanmıştır.

### Yöntem

*L. lactis* suşlarında ekzopolisakkarit üretim özelliğinin tanısı için, morfolojik ve kültürel karakterler esas alınmıştır (CERNING 1990, DUBOC ve MOLLET 2001). Suşların ürettiği ekzopolisakkarit tipinin belirlenmesinde ise, kapsül boyama yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntemde; steril bir öze ile lam üzerine yayılan bakteri kültürleri havada kurutulmuş ve ısı tespit işlemi yapılmaksızın %1 kristal viyole çözeltisi ile 2 dk boyanmıştır. Bu süre bitiminde lamlar %20 oranında bakır sülfat içeren çözelti ile yıkanmış ve preparatlar faz kontrast mikroskopta 1500X büyütmede incelenmiştir. Hücre çevresinde saptanan açık mavi zon, kapsüler ekzopolisakkarit yapısı olarak değerlendirilmiştir (NORREL 1990).

İzole edildikten sonra, ardışık pasajlarla titreleri  $10^7$  pfu/mL ya da yukarısına yükseltileen faj lizatlarının *L. lactis* suşlarına karşı etkinlikleri M17 çift tabaka agar ortamlarında saptanmıştır (TERZAGHI ve SANDINE 1975). *L. lactis* suşlarına karşı mutajen ajan olarak akriflavin (Sigma Chem. Co. USA) uygulanmış ve ekzopolisakkarit üretme yeteneği kaybolmuş mutantlar M17 broth ve agar ortamlarında seçilmiştir (McKay ve ark. 1972, TERZAGHI ve SANDINE 1975, CERNING 1990). Faj adsorbsiyon oranınının saptanması için, 30°C' de 18 saat geliştirilen bakteri kültürlerinden 0.7 mL alınarak, titreleri  $10^5$  pfu/mL düzeyine kadar seyreltilen 0.75 mL faj süspansiyonu ve 37.5 mL  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.185M) çözeltisi ile karıştırılmıştır. Bu karışımları içeren steril eppendorf tüpleri, 30°C su banyosunda 15 dk tutulmuş ve son aşamada 5000 devir/dk hızda 3 dk santrifüj edilmiştir. Üst fazdan hazırlanan seri dilüsyonlar duyarlı bakterilere karşı denenerek elde edilen sonuçlar % faj adsorbsiyonu formülüne uygulanmıştır (LUCEY ve ark. 1992).

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

### BULGULAR ve TARTIŞMA

*L. lactis* suşlarının ekzopolisakkarit üretme karakteristikleri; M17 agar ortamlarında geliştirilen kolonilerin sünme yeteneği ile M17 broth ortamlarında kültüre edilen hücrelerin, santrifüj çöktülerinin yapısı ve saf suda çözünme özellikleri incelenerek saptandı. Ekzopolisakkarit üretme yeteneğindeki suşlarda, üretilen ekzopolisakkarit tipi ise, kapsül boyama yöntemi kullanılarak belirlendi. Tüm bu testler sonucunda ekzopolisakkarit üretme yeteneğindeki 6 suştan *L. lactis* subsp. *lactis* ELL4, ELL6 ve ELL39 ile *L. lactis* subsp. *cremoris* ELC19' un kapsüler ekzopolisakkarit, *L. lactis* subsp. *lactis* ELL23 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* ELC5' in ise hücre duvarı ile kovalent olmayan gevşek bağlarla ilişkilendirilmiş ekzopolisakkarit (LAM) ürettiği tespit edildi (Çizelge 1).

Faj dirençlilik testlerinin ilk aşamasında, araştırmada kullanılan 90 adet *L. lactis* suşunun tümü 25 faja karşı denendi. Bu testler sonucunda 7 adet *L. lactis* suşu, 25 fajın tümüne karşı direnç gösterdi (Çizelge 2). Tam direnç fenotipi gösteren suşlardan 6 adedi ekzopolisakkarit üretme yeteneğinde bulundu (Çizelge 1 ve Çizelge 2). Bu suşlardan sadece *L. lactis* subsp. *cremoris* ELC27 ekzopolisakkarit üretme özelliği göstermemektedir. Diğer 83 *L. lactis* suşunda ise %4 ile %96 arasında değişen düzeylerde faj direnç saptandı. Tüm fajlara karşı dirençli suşlar hariç, hiçbir suşta birbiri ile aynı direnç profili belirlenmedi (Çizelge 2).

Çizelge 1. *L. lactis* Suşlarının Ekzopolisakkarit Üretim Özelliklerinin ve Ürettikleri Ekzopolisakkarit Tipinin Tanısı

Bakteri Kod No.	Hücre Çökeltisi Yapısı (10000 devir /dk da 10 dk santrifüjden sonra)	Hücre Çökeltisinin saf suda çözünme özelliği (mekanik karıştırıcı 30 sn)	M17 agarda sünme	Kapsül Boyama
<i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i>				
ELL4	Gevşek	+	+	+
ELL6	Gevşek	+	+	+
ELL23	Gevşek	+	+	-
ELL39	Gevşek	+	+	+
<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>				
ELC5	Gevşek	+	+	-
ELC19	Gevşek	+	+	+

Çizelge 2. *Lactococcus lactis* Suşlarının Faj Duyarlılıkları

Bakteri Kod No	Faj Kod No																								
	Öell2	Öell7	Öell14	Öell15	Öell21	Öell22	Öell27	Öell28	Öell29	Öell36	Öell40	Öell41	Öell45	Öell48	Öelc9	Öelc10	Öelc15	Öelc18	Öelc23	Öelc25	Öelc26	Öeld4	Öeld5	Öeld9	Öeld11
ELL1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
ELL2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
ELL3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ELL4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELL5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ELL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELL7	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
ELL8	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
ELL9	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
ELL10	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ELL11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ELL12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ELL13	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
ELL14	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
ELL15	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
ELL16	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
ELL17	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
ELL18	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
ELL19	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
ELL20	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
ELL21	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ELL22	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ELL23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELL24	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
ELL25	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
ELL26	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ELL27	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
ELL28	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
ELL29	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
ELL30	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
ELL31	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
ELL32	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ELL33	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
ELL34	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
ELL35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ELL36	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ELL37	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
ELL38	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ELL39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELL40	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+

Çizelge 2. *Lactococcus lactis* Suşlarının Faj Duyarlılıkları (devamı)

Bakteri Kod No	Faj Kod No																									
	Øell2	Øell7	Øell14	Øell15	Øell21	Øell22	Øell27	Øell28	Øell29	Øell36	Øell40	Øell41	Øell45	Øell48	Øelc9	Øelc10	Øelc15	Øelc18	Øelc23	Øelc25	Øelc26	Øeld4	Øeld5	Øeld9	Øeld11	
ELL41	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	
ELL42	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
ELL43	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
ELL44	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ELL45	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
ELL46	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
ELL47	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ELL48	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ELC1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ELC2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
ELC3	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
ELC4	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ELC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELC6	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ELC7	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
ELC8	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ELC9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
ELC10	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ELC11	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ELC12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
ELC13	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ELC14	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
ELC15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
ELC16	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
ELC17	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELC18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ELC19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELC20	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
ELC21	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
ELC22	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
ELC23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
ELC24	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
ELC25	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
ELC26	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ELC27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELC28	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
ELC29	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+

Çizelge 2. *Lactococcus lactis* Suşlarının Faj Duyarlılıkları (devamı)

Bakteri Kod No	Faj Kod No																								
	Øell2	Øell7	Øell14	Øell15	Øell21	Øell22	Øell27	Øell28	Øell29	Øell36	Øell40	Øell41	Øell45	Øell48	Øelc9	Øelc10	Øelc15	Øelc18	Øelc23	Øelc25	Øelc26	Øeld4	Øeld5	Øeld9	Øeld11
ELD1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ELD2	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
ELD3	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
ELD4	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ELD5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
ELD6	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
ELD7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
ELD8	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
ELD9	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
ELD10	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
ELD11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ELD12	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
ELD13	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-

ELL : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

ELC : *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

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

+

- : Dirençli

Tüm fajlara karşı dirençli bulunan *L. lactis* suşlarında, faj dirençlilik fenotipinin, adsorbsiyon ile ilişkisini araştırmak için; 90 adet *L. lactis* suşuna karşı en geniş konakçı dizgesi saptanan 9 adet faj seçildi (Çizelge 2 ve Çizelge 3). Araştırmada kullanılan 25 laktokok fajının hiçbirinde alt tür ya da biyovaryete spesifitesi saptanamadığı için (Çizelge 2), dirençli suşlar içerisinde *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşları bulunmamasına rağmen, söz konusu biyovaryete suşları kullanılarak izole edilen fajlar da adsorbsiyon testlerine dahil edilmiştir (Çizelge 2 ve Çizelge 3).

Çizelge 3. Tüm Fajlara Karşı Direnç Gösteren *L. lactis* Suşlarında, 9 Laktokok Fajının Adsorbsiyon Karakteristikleri

Suş Kod No.	Adsorbsiyon (%)								
	Øell15	Øell22	Øell27	Øelc10	Øelc18	Øelc23	Øelc25	Øeld4	Øeld11
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELL4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELL23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELL39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>									
ELC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELC19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELC27	94.6	92.8	96.2	98.5	97.5	95.4	93.8	98.6	96.4

Tüm fajlara karşı dirençlilik fenotipi gösteren 7 adet *L. lactis* suşunun, 9 laktokok fajı ile yürütülen adsorbsiyon testlerine verdiği yanıt incelendiğinde; ekzopolisakkarit üretim özelliği içeren suşların hiçbir faj adsorbsiyon spesifitesi göstermemişken, ekzopolisakkarit üretmeyen *L. lactis* subsp. *cremoris* ELC27 suşunun tüm fajlara karşı %92.8-98.6 gibi yüksek oranlar arasında değişen düzeylerde adsorbsiyon spesifitesi gösterdiği saptandı (Çizelge 3). Bu sonuçlar ekzopolisakkarit üreten 4 adet *L. lactis* subsp. *lactis* (ELL4, ELL6, ELL23, ve ELL39) ve 2 adet *L. lactis* subsp. *cremoris* suşunda (ELC5 ve ELC19) faj direnç fenotipinin, faj adsorbsiyonunun engellenmesi suretiyle meydana geldiğini göstermektedir. Ekzopolisakkarit üretmeyen suş *L. lactis* subsp. *cremoris* ELC27' de ise faj dirençlilik, adsorbsiyondan sonraki aşamalarda oluşmaktadır. Laktokoklarda adsorbsiyondan sonra, faj enfeksiyon döngüsü sırasına göre; faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi, restriksiyon/modifikasyon ve abortif enfeksiyon yolu ile dirençlilik meydana gelebilmektedir (ALLISON ve KLAENHAMMER 1998, AKÇELİK ve ark. 2001, TUNCER ve AKÇELİK 2002). *L. lactis* subsp. *cremoris* ELC27'de yürütülecek ileri analizler ile söz konusu dirençlilik sistemlerinden hangisinin etkin olduğunun saptanması, bu bakterinin starter kültür suşu olarak kullanım potansiyelinin tanımlanması açısından zorunludur.

Ekzopolisakkarit üreten suşlarda faj dirençlilik sisteminin faj adsorbsiyonunun engellenmesi suretiyle meydana geldiğinin kesinlik kazanması amacı ile; akriflavin uygulanan doğal suşların ekzopolisakkarit üretme yeteneğini kaybeden mutantları M17 agar ortamlarında seçilerek, bunlara karşı, denemeye alınan 9 fajın adsorbsiyon karakteristiklerindeki değişimler incelendi (Çizelge 4). Bu testler sonucunda ekzopolisakkarit

Çizelge 4. Ekzopolisakkarit Üreten *L. lactis* Suşlarının Bu Özelliği Giderilmiş Mutantlarında, 9 Laktokok Fajının Adsorbsiyon Karakteristikleri

Mutant Kod No.	Adsorbsiyon (%)								
	Øell15	Øell22	Øell27	Øelc10	Øelc18	Øelc23	Øelc25	Øeld4	Øeld11
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>									
ELL4-22	90.8	92.5	88.0	88.2	94.2	98.0	96.5	86.2	98.0
ELL6-10	94.2	91.4	93.5	85.0	95.5	94.2	94.6	98.6	94.2
ELL23-27	98.4	96.8	95.2	91.5	94.8	96.5	94.0	96.4	90.2
ELL39-63	92.5	90.4	95.4	92.8	90.0	91.8	95.5	93.0	94.6
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>									
ELC5-8	85.5	94.3	90.8	96.2	95.6	96.2	91.4	92.8	90.7
ELC19-65	93.6	95.4	85.5	94.2	98.1	98.2	90.0	94.5	85.0

üretme yeteneğini yitiren mutantların tümünde 9 fajın adsorbsiyonunun %85.0-98.6 gibi yüksek düzeylerde meydana geldiği ve tüm mutantlarda faj plaklarının oluştuğu saptandı. Bu bulgular; ekzopolisakkarit üreten suşlarda, söz konusu materyalin faj almaç bölgeleri maskelemek suretiyle faj adsorbsiyonunu engellediğine kesinlik kazandırmıştır. Literatür verilerinin aksine (DALY ve ark. 1996, DUBOC ve MOLLET 2001, O'SULLIVAN ve ark. 2001) sadece hücre duvarı ile gevşek ilişkili ekzopolisakkaritlerin değil, kapsüller ekzopolisakkaritlerin de faj adsorbsiyonunu engelleyici rol oynadığının belirlenmesi dikkat çekici bir bulgudur.

Bakteri faj interaksiyonuna olanak tanınamaması özelliği nedeniyle, starter kültür suşlarında tercih edilen en etkin faj dirençlilik sistemi faj adsorbsiyonunun engellenmesidir (FITZGERALD ve ark. 1996, ALLISON ve KLAENHAMMER 1998, KRAUS ve GELLER 1998, O'SULLIVAN ve ark. 2001). Araştırmamızda tanımlanan ekzopolisakkarit üretim yeteneğindeki *L. lactis* suşları, bu açıdan büyük önem taşımaktadır.

**KAYNAKLAR**

- AKÇELİK, M., ŞANLIBABA, P., TÜKEL, Ç., TUNCER, Y. 2001. Laktokoklarda endüstriyel açıdan önem taşıyan özelliklerin genetik determinantları. Tr. J. Veterinary and Animal Sci., 25, 615-621.
- AKÇELİK, M., ŞANLIBABA, P. 2002. Characterization of an exopolysaccharide, preventing phage adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MA39. Tr. J. Veterinary and Anim. Sci. In Press.
- ALLISON, E.G., KLAENHAMMER, T.R. 1998. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. Int. Dairy J., 8, 207-226.
- CERNING, J. 1990. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 87, 113-130.
- DALY, C., FITZGERALD, G.F., DAVIS, R. 1996. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. Ant. Leeuwen., 70, 99-110.
- DUBOC, P., MOLLET, B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. Int. Dairy J., 11, 759-768.
- FITZGERALD, G.F., HILL, C., GARVEY, P. 1996. Restriction/modification systems in *Lactococcus lactis*. Gene, 157, 13-18.
- GARVEY, P., FITZGERALD, G.F., HILL, C. 1995. Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. Appl. Environ. Microbiol., 61, 4321-4328.
- KOÇER, E., AKÇELİK, M. 2002. Ekzopolisakkarit üreten laktokok suşlarının izolasyonu, tanısı ve bu suşlarda ekzopolisakkarit üretiminin genetik analizi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 77 s.
- KRAUS, J., GELLER, B.L. 1998. Membrane receptor for prolate phages is not required for infection of *Lactococcus lactis* by small or large isometric phages. J. Dairy Sci., 81, 2329-2335.
- LAWS, A.P., MARSHALL, V.M. 2001. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. Int. Dairy J., 11, 709-721.
- LINDBERG, A.A. 1977. Bacterial surface carbohydrates and bacteriophage adsorption. Acad. Press New York, 390 p.
- LITOPOLOU-TZENETAKI, E., TZENETTAKIS, N. 1999. Fermented milks: range of products. Acad. Press New York, 425 p.
- LUCEY, M., DALY, C., FITZGERALD, G.F. 1992. Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI528, a 46 kb plasmid encoding inhibition of bacteriophage adsorption. J. Gen. Microbiol., 138, 2137-2143.
- McKAY, L.L., BALDWIN, K.A., ZOTTOLA, E.A. 1972. Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. Appl. Microbiol., 23, 1090-1096.
- NORREL, S.A. 1990. Microbiology: Principles and Applications. Prentice Hall. New Jersey, 328 p.
- O'SULLIVAN, J.D., ROSS, P., TWOMEY, D.P., HILL, C. 2001. Naturally occurring lactococcal plasmid pAH90 links bacteriophage resistance and mobility functions to a food grade selectable marker. Appl. Environ. Microbiol., 67, 929-938.
- ROGINSKI, H. 1999. Fermented milks: products from northern Europe. Acad. Press San Diego, 926 p.
- TERZAGHI, B.E., SANDINE, W.E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol., 29, 807-813.
- TUNCER, Y., AKÇELİK, M. 2002. A protein which masks galactose receptor mediated phage susceptibility in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MPL56. Int. J. Food Sci. Technol., 37, 139-144.
- VALYASEVI, R., SANDINE, W.E., GELLER, B.L. 1991. A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. J. Bacteriol., 173, 6095-6100.