

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE KÖKENLİ *Lactococcus lactis* SUŞLARININ KROMOZOMAL  
FARKLILIKLARININ TANIMLANMASI

Özlem GÜNAY

Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

ANKARA

2012

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK danışmanlığında, Özlem GÜNAY tarafından hazırlanan bu çalışma 08/08/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

İmza:



Üye: Prof. Dr. Ali ERGÜL

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

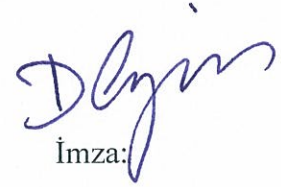
İmza:



Üye: Yrd. Doç. Dr. E. Doruk ENGİN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

İmza:



**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**



**Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK**

**Enstitü Müdürü**

## Türkiye Kökenli *Lactococcus lactis* Suşlarının Kromozomal Farklılıklarının Tanımlanması

### ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye' nin farklı bölgelerinden izole edilen çiğ süt kaynaklı, fenotipik testlerle suş düzeyinde tanımlanmış olan 30 adet *Lactococcus lactis* suşunun, moleküler yöntemlerin kullanımıyla tanımlanması sağlanmıştır. Suşların genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir birkaç tanımlama tekniği seçilmiştir. Başlangıçta hem izolatların suş düzeyinde tanımlanabilmesi için hem de suşlar arasındaki benzerliklerin saptanması amacıyla plazmid profillemeye yöntemi kullanılmıştır. Tüm suşların bir ya da daha fazla plazmide sahip olduğu tespit edilmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* olduğu düşünülen suşların hepsinin farklı plazmid profilleri gösterdikleri saptanmıştır. Suşların plazmid profilleri karşılaştırıldığında birbirleri ile %55 oranında benzerlik gösteren bir grup oluşturdukları belirlenmiştir. PFGE analizleri ile, genomun bütünü *SmaI*, *ApaI* ve *I-CeuI* restriksiyon endonükleazları ile kesilmiş ve farklı PFGE profilleri gösteren 4 suşun dışındaki tüm suşların birbirleri ile benzer oldukları saptanmıştır. Sonuçlar *L. lactis* olduğu PFGE ile tanımlanan 26 suş arasında yüksek derecede heterojenitenin varlığını göstermiştir. Suşlar arasındaki kromozomal farklar dikkate alındığında *SmaI* enzim kesimi sonucunda, suşlardan 10 tanesinin referans suş olarak kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962 ve IL1403 ile, 3 tanesinin ise referans suş olarak kullanılan *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1614 ile benzerlik düzeyi %75 olan gruplar oluşturmuşlardır. Diğer yandan, çoğunluğunun *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* suşlarının oluşturduğu 13 suşu içeren bir grup ise % 65 benzerlik oranıyla bir arada kümelenebilir. *L. lactis* suşlarında 6 adet rRNA operonu bulunduğu bilinmektedir. *I-CeuI* restriksiyon endonükleaz enzimi, evrimsel süreçte oldukça korunmuş bölgeler olan 23S rDNA operon bölgelerinden kesim yapmakta ve *L. lactis* suşları için 6 makrorestriksiyon parçası oluşturmaktadır. Operon sayısı farklılık gösteren suşlar, 16S rDNA bölgelerine spesifik olarak tasarlanmış primerlerin kullanımıyla polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutulmuştur. 16S rDNA dizi analizi sonuçları, 4 suşun yanlış tanımlandığını, suşlarının 1 tanesinin *Enterococcus durans* diğer 3 tanesinin ise *Streptococcus bovis* olduğunu doğrulamıştır. 2012, 86 sf.

*Anahtar Sözcükler:* *Lactococcus lactis*, Kromozomal Farklılık, Plazmid Profillemesi, PFGE, 16S rDNA Analizleri.

# Identification of Chromosomal Diversity of *Lactococcus lactis* Strains Originated From Turkey

## ABSTRACT

In this study, 30 *Lactococcus lactis* strains originating from raw milk isolated in Turkey, which are defined by phenotypic tests at the strain level, were characterized by molecular techniques. A few typing techniques were estimated to determine the genetic diversity of strains. First of all, plasmid profiling was used in order to both identify the isolates at the strain level and determine the similarities between the strains. It has been identified that all strains have one or more plasmid. It was determined that all strains, which are considered as *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*, showed different plasmid profiles. Strains from one cluster which shows 55% similarity when plasmid profiles were compared. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of complete genomes digested with *SmaI*, *ApaI* and *I-CeuI* restriction endonucleases proved that all strains were similar out of four isolates, which showed different PFGE profiles from the others. Results showed a high degree of heterogeneity among determined with PFGE twenty six *L. lactis* strains. Taking account of the chromosomal differences between strains after *SmaI* restriction digestion process, 10 of strains were clustered at a similarity level of about 75% with *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962 and IL1403 which are used as reference strain, and 3 of strains were clustered at a same similarity level with *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1614 which are used as reference strain. On the other hand, 13 strains, which are mostly *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*, were clustered at a similarity level of 65%. It is known that *L. lactis* strains have 6 rRNA operons. *I-CeuI* restriction endonuclease digests from 23S rDNA operon regions, which are well preserved in evolutionary processes and produces 6 macrorestriction patterns for *L. lactis* strains. The strains, which have differences between numbers of operons, confirmed by PCR using specific primers designed for conserved 16S rDNA regions. Results of 16S rDNA sequencing showed that 4 of strains are identified incorrect, 3 of strains are *Streptococcus bovis* and 1 of the strains is *Enterococcus durans*. 2012, 86 p.

*Key words: Lactococcus lactis, Chromosomal Diversity, Plasmid Profilling, PFGE, 16S rDNA Analysing*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü çalışma olanağını sağlayan, engin bilgi ve önerileriyle çalışmalarımda bana yol gösteren değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK' e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi);

Laboratuvar çalışmalarım süresince tecrübelerini ve yardımlarını benden esirgemeyen sevgili hocam, Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK' e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü);

Ön çalışmalarımda tecrübelerini benimle paylaşan, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvar sorumlusu, Sayın Prof. Dr. Rıza DURMAZ' a ve sabırla benimle ilgilenen Dr. Özlem ÜNALDI' ye;

Bana hayat veren, her koşulda destekleyen ve her türlü fedakarlıkla beni bu zamanlara getiren annem Gönül GÜNAY ve babam Yusuf Ziya GÜNAY' a, sıkıntılarımı paylaştığım, olgunlukla beni dinleyen ve anlamaya çalışan canlarım kardeşlerime;

Kendimi bildim bileli yanımda olan, beni destekleyen, azimlendiren, varlığından güç aldığım, hayatımın aşkı Çağdaş EŞİYOK'a;

Laboratuvarda eğlenerek çalışmamı sağlayan, birlikteyken rahat hissettiğim çalışma arkadaşlarım F. Neslihan YÜKSEL, Maryam DIANI, M. Nima BADALI, Arş. Gör. Başar KARACA (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi), Uzm. Burcu İLÇE (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), Barış YAVAŞ, Arş. Gör. Neslihan TAŞKALE KARATUĞ (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi), Sena BİLGİN ile Burcu BUYER' e yardım ve destekleri için;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özlem GÜNAY

Ankara, Ağustos 2012

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>2</b>
2.1. Laktik Asit Bakterileri .....	2
2.1.1. Tarihçesi.....	2
2.1.2. Genel özellikleri.....	5
2.1.3. Doğal habitatları ve kullanım alanları.....	7
2.1.4. Taksonomisi .....	8
2.2. <i>Lactococcus</i> Cinsi .....	10
2.2.1. Taksonomik özellikleri .....	10
2.2.2. Genel özellikleri.....	11
2.3. <i>Lactococcus lactis</i> Türü .....	13
2.3.1. <i>L. lactis</i> ' in alt grupları.....	13
2.3.2. <i>L. lactis</i> ' in starter suşları arasındaki fenotipik farklar .....	13
2.3.3. <i>L. lactis</i> suşlarının endüstriyel açıdan önemi.....	16
2.4. Kromozom Temelli Moleküler Tanımlama Yöntemleri.....	17
2.5. Plazmid Profillemesi .....	19
2.6. Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE).....	20
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
3.1. Materyal .....	26
3.1.1. Bakteriler .....	26

3.1.2. Bakterilerin üretiminde kullanılan besiyeri ve saklama koşulları .....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Plazmid içeriklerinin belirlenmesi .....	27
3.2.1.1. Plazmid izolasyonu .....	27
3.2.1.2. Elektroforez .....	30
3.2.1.3. Plazmid büyüklüklerinin hesaplanması .....	31
3.2.2. Darbeli alan (Pulsed Field) jel elektroforezi .....	33
3.2.2.1. Suşların hazırlanması .....	33
3.2.2.2. İzolatların agaroz gömülmesi .....	33
3.2.2.3. Agaroz gömülü hücrelerin lizisi.....	34
3.2.2.4. Hücre lizizinden sonra agaroz kalıplarının yıkanması.....	35
3.2.2.5. DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi .....	36
3.2.2.6. Kalıpların elektroforez jeline yüklenmesi.....	38
3.2.2.7. Elektroforez .....	39
3.2.2.8. PFGE jelinin görüntülenmesi ve analizi .....	40
3.2.3. 16S rDNA dizi analizi.....	40
3.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu.....	40
3.2.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile 16S rDNA bölgelerinin çoğaltılması.....	42
3.2.3.3. PZR ürününün baz dizilerinin belirlenmesi .....	44
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>45</b>
4.1. Suşların Plazmid İçeriklerinin Belirlenmesi .....	45
4.2. Suşların Restriksiyon Bant Profillerinin PFGE ile Belirlenmesi .....	51
4.3. 16S rDNA Dizi Analizi Sonuçları .....	67
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>68</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>70</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>85</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Laktik asit bakterilerine dahil edilen bazı cinslerin morfolojik özellikleri .....	5
Şekil 2.2. Laktik asit bakterilerinin filogramı.....	9
Şekil 2.3. <i>Lactococcus lactis</i> kolonilerinin, kanlı agardaki (A) ve Gram boyama yapıldıktan sonra ışık mikroskobu altındaki (B) görüntüsü .....	12
Şekil 2.4. PFGE Aşamaları.....	21
Şekil 2.5. PFGE' nin yaygın olarak kullanılan elektrod konfigürasyonları .....	23
Şekil 2.6. Genetik olayların PFGE bant profillerine yansması .....	25
Şekil 4.1. <i>Lactococcus lactis</i> türüne ait suşların plazmid profilleri.....	47
Şekil 4.1. <i>Lactococcus lactis</i> türüne ait suşların plazmid profilleri (Devam) .....	47
Şekil 4.2. Türkiye kökenli <i>Lactococcus lactis</i> suşlarının plazmid içeriklerinin karşılaştırılmasıyla kümeleme analizi sonucunda oluşturulan dendogram. ....	49
Şekil 4.3a. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> örneklerinin <i>SmaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri .....	52
Şekil 4.3b. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> örneklerinin <i>SmaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri.....	52
Şekil 4.3b. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> örneklerinin <i>SmaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri (Devam).....	53
Şekil 4.3c. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> örneklerinin <i>SmaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri .....	53
Şekil 4.4. Türkiye kökenli <i>L. lactis</i> suşlarının <i>SmaI</i> makrorestriksiyon örneklerinin PFGE analizi .....	56
Şekil 4.5a. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> örneklerinin <i>ApaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri.....	57
Şekil 4.5b. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> örneklerinin <i>ApaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri.....	57
Şekil 4.5b. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> örneklerinin <i>ApaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri (Devam).....	58
Şekil 4.5c. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> örneklerinin <i>ApaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri.....	58



Şekil 4.6. Türkiye kökenli <i>L. lactis</i> suşlarının <i>ApaI</i> makrorestriksiyon örneklerinin PFGE analizi .....	61
Şekil 4.7a. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> örneklerinin <i>I-CeuI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri .....	63
Şekil 4.7b. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> örneklerinin <i>I-CeuI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri .....	63
Şekil 4.7b. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> örneklerinin <i>I-CeuI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri (Devam).....	64
Şekil 4.7c. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> örneklerinin <i>I-CeuI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri .....	64
Şekil 4.8. Türkiye kökenli <i>L. lactis</i> suşlarının <i>I-CeuI</i> makrorestriksiyon örneklerinin PFGE analizi .....	65

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Laktik asit bakterilerinin ilk gruplandırılması ve güncel taksonomideki karşılıkları.....	4
Çizelge 2.2. <i>Lactococcus</i> cinsinin sınıflandırılması .....	11
Çizelge 2.3. <i>L. lactis</i> türünün starter kültür olarak kullanılan alt gruplarını ayırıcı özellikler .....	15
Çizelge 2.4. PFGE profillerini yorumlama kriterleri.....	24
Çizelge 2.5. Genetik olayların PFGE profilleri üzerindeki etkisi.....	24
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan suşların listesi .....	45
Çizelge 4.2. Türkiye kökenli <i>L. lactis</i> suşlarının plazmid içerikleri.....	48
Çizelge 4.3. <i>L. lactis</i> suşlarının <i>SmaI</i> restriksiyon parça büyüklükleri .....	55
Çizelge 4.5. <i>L. lactis</i> suşlarının <i>I-CeuI</i> restriksiyon bant büyüklükleri ve toplam kromozom büyüklüklerinin hesaplanması .....	66

## SİMGELER DİZİNİ

LAB	Laktik Asit Bakterileri
RE	Restriksiyon Enzimi
DGGE	Denatürasyon Gradyent Jel Elektroforezi
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
PFGE	Darbeli Alan Jel Elektroforezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RGE	Rotasyonlu Jel Elektroforezi
FIGE	Ters Alan Jel Elektroforezi
TAFE	Çapraz Değişen Alan Elektroforezi
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
MLSA	Çoklu Lokus Dizi Analizi
AFLP	Amplifiye Edilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi
CGH	Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu
dk	Dakika
Mb	Megabaz
kb	Kilobaz
PMSF	Fenil Metil Sülfanil Florid
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
NaCl	Sodyum Klorür
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
M	Molar

gr	gram
N	Normal
rpm	Dakika Devir Sayısı
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
mM	Milimolar
UV	Ultraviyole
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
lt	Litre
ml	Mililitre
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit

## 1. GİRİŞ

*Lactococcus* (*L.*) cinsine ait farklı türler arasından sadece *Lactococcus lactis*' in alt türleri olan *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* teknolojik ve ekonomik açıdan büyük öneme sahiptir (Garvie 1984, Sandine 1985, Salama *et al.* 1991, Delgado and Mayo 2004). Bu bakteriler endüstriyel açıdan birçok fermente süt ürününe aromatik ve duyuşal özelliklerini kazandıran starter kültürler olarak kullanılmaktadır. Her suşun kendine özgü bir tat ve aroma bileşeni olduğu bilinmektedir. Mandıra endüstrisinde farklı tat ve lezzet bileşenlerine olan ihtiyaçtan dolayı laktokoklar, yeni starter kültürlerin ve var olan özelliklerin geliştirilmesi amacıyla laktik asit bakterileri içerisinde en fazla merak edilen ve bu zamana dek birçok araştırmaya konu olmuş bir bakteri grubudur (Salama *et al.* 1993, Urbach *et al.* 1997, Nomura *et al.* 1999, Kimoto *et al.* 2004, Göncü and AlpKent 2005, Jivadipur and Tunçtürk 2006, Fernandez *et al.* 2011).

*Lactococcus lactis* türünün taksonomisi geçmişten günümüze dek çok kez değişmiş olmasına rağmen hala fenotipik temelden uzaklaşmamıştır (Schleifer *et al.* 1985, van Hylckama Vlieg *et al.* 2006, Rademaker *et al.* 2007). Günümüzde tanımlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler biyoloji teknikleri, geçmişte çalışılan klasik fenotipik testler ile tam anlamıyla uyum sağlamadığından, bu türün taksonomisini daha da karmaşık hale getirmektedir (Taillienz *et al.* 1998, Kelly *et al.* 2010).

*L. lactis* suşları arasındaki farkların kromozomal düzeyde tanımlanması, bu türün taksonomisini aydınlatmasının yanında süt endüstrisinde farklı lezzetlere sahip yeni ürünlerin oluşturulabilmesine de hizmet edecektir. Bu tez çalışmasında, güvenilirliği birçok araştırmacı tarafından ispatlanmış, kromozomal düzeyde yüksek ayırım gücüne sahip bir moleküler tanı yöntemi olan darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) yöntemi ile Türkiye kaynaklı *L. lactis* suşlarının birbirlerinden kesin surette ayrılması amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Laktik Asit Bakterileri

#### 2.1.1. Tarihçesi

Bir grup mikroorganizmayı ifade etmek amacıyla kullanılan laktik asit bakterileri (LAB) kavramı 1900'lü yılların başlarında ortaya atılmış ve 19. yüzyılın sonlarına kadar sistematik bilimi ile beraber teknik gelişimlere de öncülük etmiştir. Gıda kaynaklı LAB'nin birbirleriyle olan etkileşimlerinin bilim insanlarının dikkatini çekmesi 1857 yılında Louis Pasteur'un laktik asit fermentasyonuna önemli katkılarıyla sonuçlanmıştır. Ardından 1873 yılında Joseph Lister tarafından ilk saf bakteri kültürünün (*Bacterium lactis*) izolasyonu yapılmıştır. Bu kültürün peynir ya da ekşi süt üretiminde tat, koku gibi aromatik özelliklerin kazandırılması amacıyla starter olarak kullanılabilmesi 1890 yılında Almanya'nın Kiel şehrinde Weigmann, Kopenhag'da ise Storch tarafından eş zamanlı olarak kanıtlanmıştır. Bu çalışmalar gıda fermentasyon çalışmalarının ticari amaçlar için kullanımının yolunu açmıştır (Stiles and Holzapfel 1997). 1900'lü yıllarda ortaya çıkan LAB kavramı, filogenetik bir sınıfı yansıtmamakta olup bu bakterilerin metabolik özelliklerini ifade etmek amacıyla kullanılmıştır (Pfeiler and Klaenhammer 2007).

Şekerden laktik asit üretebilen vajinal bakterilerin, diğer patojenik bakterilerin gelişimini engellediğini ya da sınırlandırdığını saptayan Döderlein (1892), mikroorganizmalar ile konakları olan insanların yararlı birliktelikte bulunabileceği ihtimalini ilk defa öne sürmüştür. Bu gibi özelliklere sahip laktik asit bakterileri (LAB) ayrıca daha sonraları fermente edilmiş süt ürünlerinden de izole edilmiş ve 1908 yılında Metchnikoff tarafından yapılan araştırmalar sonucunda insan sağlığına yararlı oldukları kesin olarak belirlenmiştir (Holzapfel *et al.* 2001). Metchnikoff (1908), beyaz insanların uzun ömürlü olmasının nedeninin yüksek oranda fermente süt ürünlerinin tüketimi ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür (Holzapfel *et al.* 2001).

LAB grubu için yapılan ilk tanımlama ‘sütün koagülasyonunu sağlayan ve fermente edebilen, ekşimiş sütün izole edilebilen koliform yapısındaki bakterilerdir’ şeklinde olmuştur. 1901 yılında Beijerinck tarafından *Lactobacillus* cinsi üyelerinin Gram pozitif olarak tanımlanması ile koliform yapısındaki bakteriler LAB grubundan ayrılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda Orla-Jensen (1919), LAB’ ı; Gram pozitif, hareket yeteneği olmayan, spor oluşturmeyen, kok ya da kokobasil şeklinde bulunan, karbonhidratları ve alkolleri genellikle son ürün olarak laktik asit oluşturarak fermente edebilen bir bakteri grubu olarak tanımlamış ve 7 bakteri cinsinin bu grup içerisine dahil edilebileceğini ileri sürmüştür. Morfolojik ve fenotipik özelliklerini dikkate alarak bu bakteri cinslerini *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus* ve *Microbacterium* olarak tanımlamıştır (Stiles and Holzapfel 1997, Yörük ve Güner 2011). Çizelge 2.1’de Orla-Jensen (1919) tarafından tanımlanan bakteri grupları ve günümüzde karşılık gelen adlandırılmaları görülmektedir (Stiles and Holzapfel 1997).

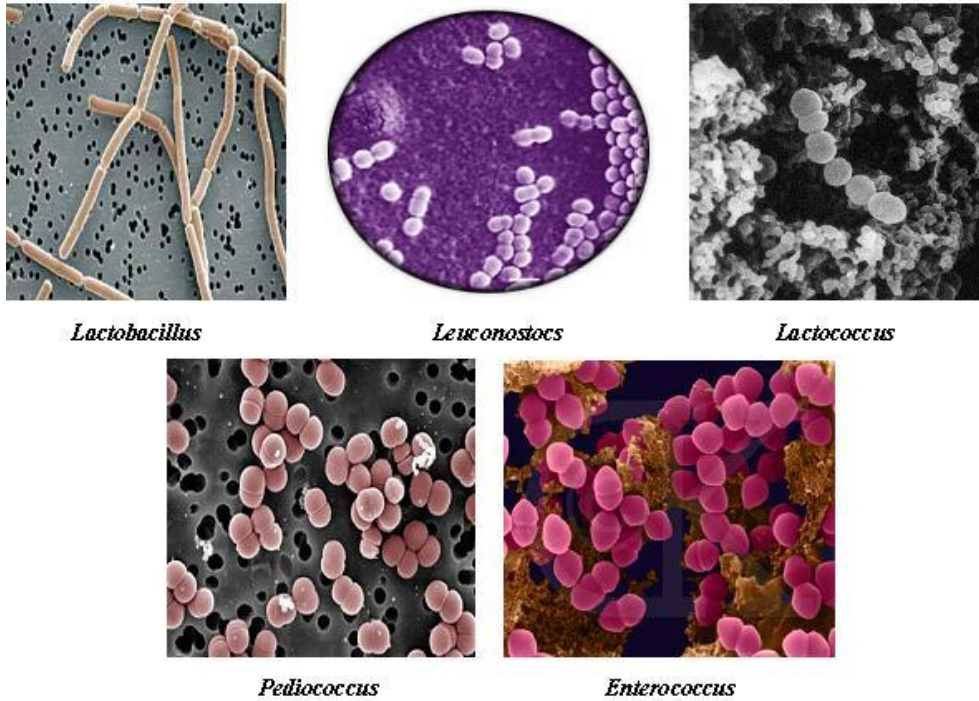
**Çizelge 2.1.** Laktik asit bakterilerinin ilk gruplandırılması ve güncel taksonomideki karşılıkları ( Stiles ve Holzapfel 1997 )

<b>Cins adı</b>	<b>Morfolojisi</b>	<b>Katalaz</b>	<b>Nitrit indirgemesi</b>	<b>Fermentasyonu</b>	<b>Günümüzde Karşılık Gelen Cinsler</b>
<i>Betabacterium</i>	Çubuk	--	--	Hetero-	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i>	Çubuk	--	--	Homo-	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Çubuk	--	--	Homo- ve hetero-	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Kok	--	--	Homo-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Kok	--	--	Hetero-	<i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Microbacterium</i>	Çubuk	+	+	Homo-	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	Kok	+	+	Homo-	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>



### 2.1.2. Genel özellikleri

Laktik asit bakterileri; Gram pozitif, spor oluşturmeyan, sitokromlardan yoksun, anaerobik solunum yapan fakat aerotolerant özellik gösteren, asit toleransına sahip, hekzoz şekerleri fermente edebilen ve son ürün olarak laktik asit meydana getiren, katalaz negatif mikroorganizmalardır (Axelsson 1998, Holzapfel *et al.* 2001). Aslında, bu genel tanımın dışında kalan bazı türler katalazı metabolize edebilir ya da hematin (hemoglobinin erimesiyle meydana gelen koyu lacivert madde) içeren ortamlarda sitokrom bulundurabilirler (Wolf *et al.* 1991, Meisel *et al.* 1994). LAB, gelişimleri için glikoz ve amonyumun yanında bazı vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duyan mikroorganizmalardır (Holzapfel *et al.* 2007). Morfolojik açıdan çok değişken olan (kısa-uzun çubuk veya kok şekilli) üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzer özellikler göstermektedirler (Şekil 2.1). Laktik asit bakteri türleri, hekzoz metabolizması için iki farklı yol kullanmaktadır. Homofermentatif yolda başlıca ürün laktik asittir; heterofermentatif yolda ise laktik asit, CO<sub>2</sub>, asetik asit ya da etanol üretilebilir (Kandler 1983, Axelsson 1998, Carr *et al.* 2002, Makarova *et al.* 2006).



Şekil 2.1. Laktik asit bakterilerine dahil edilen bazı cinslerin morfolojik özellikleri (<http://www.agaclar.net>)

Binlerce yıldır gıda ve alkol fermentasyonlarında kullanılan mikrobiyel kültürler, 20. yüzyılda çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Mohania *et al.* 2008). İntestinal sistemde bulunan faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesine olumlu yönde katkıda bulunmasına “probiyozis”, fayda sağlayan mikroorganizmalara ise ‘probiyotikler’ adı verilmektedir (Çakır ve Çakmakçı 2004). FAO (Anonim 2002) kaynaklarına göre probiyotikler, yeterli miktarlara ulaştıklarında kendisine ev sahipliği yapan canlıya sağlık açısından fayda sağlayan ve mikrobiyel dengeyi koruyan konuk mikroorganizmalardır. Probiyotikler için Salminen (1998) tarafından yapılan ‘sağlığa faydalı olan canlı mikrobiyel yiyecek katkısı’ şeklindeki tanım günümüzde hala kullanılmaya devam etmektedir (<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/340320001.pdf>). Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin insan sağlığı üzerine faydalı etkileri suşlara özgü olup ürogenital ve intestinal sistem enfeksiyonlarının engellenmesinin yanı sıra iltihabi reaksiyonların azaltılması yönünde de oldukça etkili oldukları kabul edilmektedir (Tok ve Aslım 2007).

LAB tarafından sentezlenen ve hücre dışına salgılanan, protein yapısındaki antimikrobiyel bileşenler ‘bakteriyosinler’ olarak adlandırılmaktadır (Riley 1998, De Martins *et al.* 2002, Kurt ve Zorba 2005). Bakteriyosinleri geleneksel antibiyotiklerden ayıran kritik nokta, antibiyotiklere nazaran daha dar bir öldürücü spektruma sahip olmalarıdır (Riley and Wertz 2002). Bakteriyosinler arasında en detaylı tanısı gerçekleştirilmiş olanı ise ‘Nisin’dir (Delves-Broughton *et al.* 1996, Casalta and Montel 2008). LAB’ ların antimikrobiyel etkileri temel olarak ürettikleri laktik asit ve/veya organik asitler sonucunda, geliştikleri çevrenin pH değerini azaltmaları yoluyla olmaktadır (Kuipers *et al.* 2000, Mohania *et al.* 2008). Bunun sonucunda patojen ve kontaminant organizmaların gelişimini inhibe etmektedirler (Yüksekdağ ve Beyatlı 2009). Bakteriyosinlerin çoğunun plazmid kodlu olduğu (Davey 1984, Martinez *et al.* 1999) ve tek bir plazmidin üç farklı bakteriyosini kodlayabileceği tespit edilmiştir (van Belkum *et al.* 1991, Martinez *et al.* 1999).

### 2.1.3. Doğal habitatları ve kullanım alanları

Laktik asit bakterileri (LAB), insanlarla mutualist yaşayan çok sayıdaki bakteri grubunu içerir. Bu bakteriler çok önemli probiyotik mikroorganizmalar olup doğal ortamlar olarak mukozal yüzeylerde, özellikle de gastrointestinal sistemde, ağız ve burun boşluklarında, deride kısacası insan vücudunun dış ortamın etkisinde kalan ve bakterilerin hayatta kalması için uygun koşullara sahip tüm bölgelerinde bulunabilmektedir (Sanders 2000, Tok ve Aslım 2007). Anne sütüyle beslenen yeni doğan bir bebeğin bağırsak mikrobiyotasının en baskın üyelerinin laktik asit bakterileri olduğu söylenebilir (<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/beasley/isolatio.pdf>). Ayrıca gıda olarak tüketilen bitkiler (meyveler, sebzeler ve tahıl taneleri), şarap, süt ve et ortamlarında bulunurlar (Wood and Holzapfel 1995, Wood and Warner 2003, Makarova and Koonin 2007).

Peynir gibi ev yapımı fermente süt ürünleri, besin kaynağı olarak yaklaşık 8.000 – 10.000 yıldır insanlar tarafından tüketilmektedir. Süt fermentasyonu 20. yüzyıla kadar herhangi bir müdahale ya da regülasyon olmaksızın doğal süreci ile devam etmiştir. Laktik asit bakterilerinin keşfi ve tanımlanmasından sonra süt fermentasyonuna bakış açısı değişmiştir. Son elli yıl içerisinde laktik asit bakterilerinin genetiği, biyokimyası ve fizyolojisi hakkında yeni bilgilerin tespit edilmesiyle bu bakterilerin starter kültürler olarak seçilmelerine ve fermente süt ürünlerinde üretim kalitesini arttırmak amacıyla kullanımlarına izin verilmiştir (Botina *et al.* 2006). Gıdaya tat, koku gibi aromatik özellikler kazandıran bu starter kültürler, daha önceden kullanılan fermente karışımların tamamıyla yerine geçmiştir. Günümüzde LAB' lar fermente süt ürünlerinin, etlerin ve sebzelerin biyoçevriminde temel görevi üstlenen ve gıda endüstrisinde ürün kalitesini arttıran organizmalar olarak kabul edilmektedir. Bunun yanında kahve, hayvan yemi, kakao, hamur mayası ve çok sayıda doğal yiyeceğin fermentasyon yolu ile üretilmesinde kritik rol oynadıkları da saptanmıştır (Wood 1998, Makarova *et al.* 2006). Ayrıca bu bakterilerin, tarih boyunca konserve yapımı ve geçmişinde tarımla uğraşan neredeyse tüm toplumlarda içki yapımında da kullanıldığı bilinmektedir (Miller and Wetterstrom 2000, İşleroğlu vd. 2008).

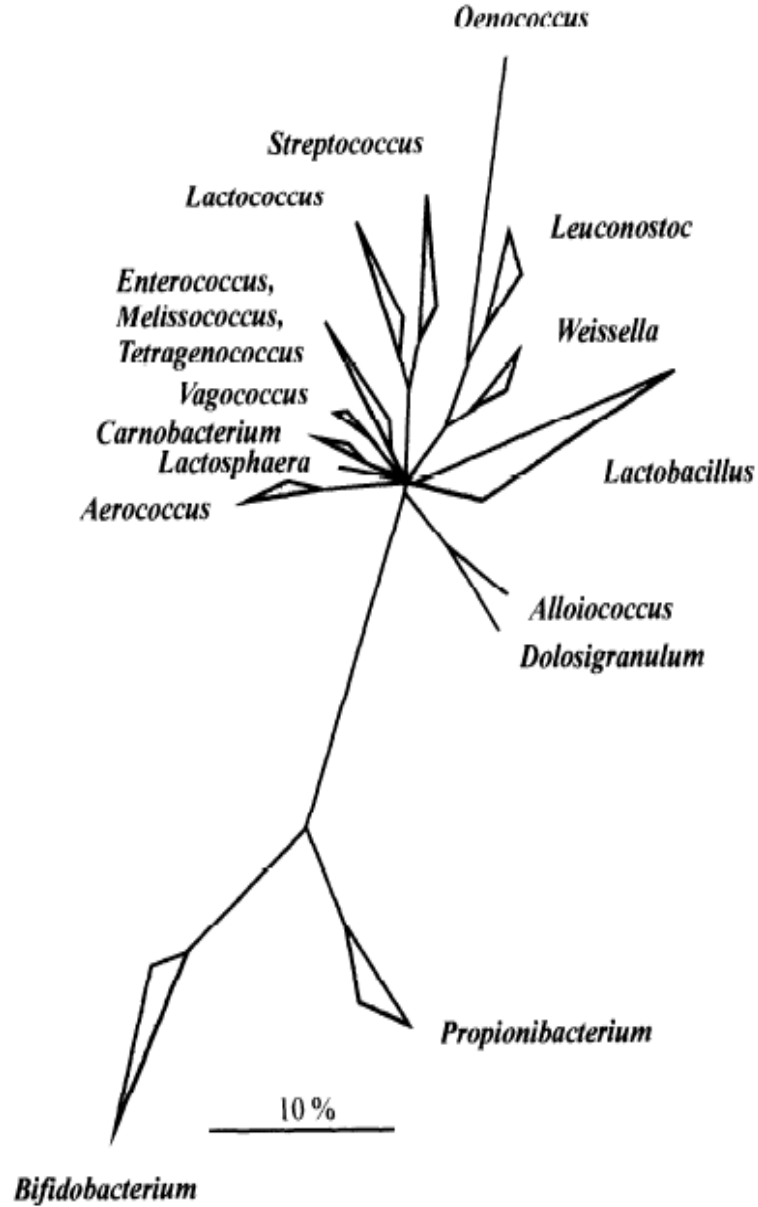
LAB' lar genellikle ürettikleri antimikrobiyel bileşenleri sayesinde gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerinin bilinen türleri bu nedenle GRAS (Generally recognized as safe) statüsünde kabul edilmekte olup 'genellikle güvenli' olarak tanımlanmaktadır (Salminen *et al.* 1998, Mohania *et al.* 2008).

#### 2.1.4. Taksonomisi

LAB' ların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılan en eski taksonomik ve fekal ekoloji çalışmaları, memelilerin bağırsak sisteminde bulunan *Bacillus acidophilus* bakterisi hakkında bilgi edinmek amacıyla Moro tarafından (1900) gerçekleştirilmiştir (Holzapfel *et al.* 2001). LAB' ların klasik fenotipik testler ile sınıflandırılmasında morfolojileri, glikozu fermente etme şekilleri, farklı sıcaklıklardaki gelişim düzeyleri, laktik asit konfigürasyonları, farklı karbonhidratları fermente edebilme yetenekleri, sahip oldukları yağ asitlerinin metil ester yapıları (Decallone *et al.* 1991) ve hücre duvarı proteinleri (Gatti *et al.* 1997) ya da hücre bütününden alınan protein örnekleri (Tsakalidou *et al.* 1994) dikkate alınmıştır. Fenotipik yöntemlerin doğasında düşük verimle tekrarlanabilirlik, bakteriyel gelişim esnekliğinden kaynaklı olarak farklı sonuçların elde edilebilmesi ve zayıf ayırt etme gücü gibi sınırlamalar bulunmaktadır. Fenotipik analizlerin bir dezavantajı da, genoma ait potansiyel toplam bilginin asla ifade edilememesidir. Tüm bu engeller, günümüzde de kullanılmasına rağmen, bakterilerin tür ya da alt tür düzeyinde tanımlanmasında fenotip temelli yöntemlerin güvenilirliğini azaltmaktadır (Mohania *et al.* 2008). Bu nedenle günümüzde mikroorganizmaların cins, tür, alt tür ve hatta biyovaryete düzeyinde tanımlanması ve sınıflandırılması ile ilgili yürütülen çalışmalarda DNA temelli moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla daha hassas ve kesin sonuçlara ulaşılmaktadır (Babalola 2003).

Gram pozitif bakterilerin hepsi DNA baz kompozisyonlarının uyumu dikkate alınarak sayıları 2'den 17'ye kadar değişiklik gösterebilen dallar halinde Eubacteria filumu içerisinde toplanmaktadır (Schleifer and Ludwig 1995a). Gerçek LAB' lar '*Clostridium*' adı verilen daldan ayrılan ve DNA' larında G+C oranları < %55 olan bakteri grubu olarak tanımlanmaktadır. LAB' lar *Firmicutes* şubesinin, *Bacilli* sınıfının, *Lactobacillales*

takımına dahil edilmekte olup, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* ve *Carnobacterium* cinslerini içermektedir. Gerçek LAB' ların farklı cinsleri arasındaki filogenetik ilişki 16S rDNA bölgelerinin karşılaştırılması temeline dayanarak tespit edilmiş ve Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Schleifer and Ludwig 1995b, Stiles and Holzapfel 1997, Holzapfel *et al.* 2001, Endo and Okada 2005, Yörük ve Güner 2011).



Şekil 2.2. Laktik asit bakterilerinin filogramı (Stiles and Holzapfel 1997)

## 2.2. *Lactococcus* Cinsi

### 2.2.1. Taksonomik özellikleri

Fermente gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan LAB' lar içerisinde yer alan laktokoklar (*Lactococcus* sp.); Gram-pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, fakültatif anaerob bakteriler olarak tanımlanmaktadır. DNA hibridizasyonu, immunolojik analizler, lipotaykoik asit yapısı, yağ asidi profillerinin karşılaştırılması gibi tanı testlerinden elde edilen verilere dayanılarak *Lactococcus* cinsi oluşturulmuştur (Schleifer *et al.* 1985). Bu veriler doğrultusunda; *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinden ayrılan bazı türler (*Lactobacillus xylosus*, *Lactobacillus hordinae*, *Streptococcus garviae*, *Streptococcus plantarum* ve *Streptococcus raffinolactis*) *Lactococcus* cinsine transfer edilmiştir (Collins *et al.* 1984, Schleifer and Kilpper-Bälz 1987, Stiles and Holzapfel 1997, Casalta and Montel 2008, Cho *et al.* 2008).

Bu dönemde *Lactococcus* cinsinin bilinen 5 türü olduğu kabul edilmekteydi (Euzéby 1997, <http://www.bacterio.net>). Bunlar; *Lactococcus garviae* (Collins *et al.* 1984), *Lactococcus plantarum* (Collins *et al.* 1984), *Lactococcus raffinolactis* (Orla-Jensen and Hansen 1932), *Lactococcus piscium* (Williams *et al.* 1990) ve *Lactococcus lactis* (Lister 1873) olarak adlandırılmaktadır. *Lactococcus lactis* türü *L. lactis* subsp. *lactis* (Lister 1873), *L. lactis* subsp. *cremoris* (Orla-Jensen 1919) ve *L. lactis* subsp. *hordniae* (Latorre-Guzmann *et al.* 1977) olmak üzere 3 alt türe ayrılmıştır (Schleifer *et al.* 1985, Cho *et al.* 2008, Casalta and Montel 2008, Odamaki *et al.* 2011). Yakın zamanda laktokok grubuna çamur içerisindeki hava kabarcıklarından izole edilen *Lactococcus chungangensis* (Cho *et al.* 2008) ve Çin lahanası olarak bilinen *Brassica rapa* L. var. *galabra*' dan izole edilen *Lactococcus fujiensis* (Cai *et al.* 2010) adında yeni iki türün daha ilavesiyle günümüzde *Lactococcus* cinsi 7 türe yükselmiştir (Matamoros *et al.* 2009a, 2009b, Fall *et al.* 2010, Odamaki *et al.* 2011, Rahkila *et al.* 2012). Yine alabalığın intestinal sisteminden alınan mukustan izole edilerek tanımlanan ve *L. lactis* subsp. *tractae* olarak adlandırılan bakteri, *L. lactis* grubunun yeni bir alt türünü teşkil etmektedir (Perez *et al.* 2010, Odamaki *et al.* 2011) (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2.** *Lactococcus* cinsinin sınıflandırılması (Odamaki *et al.* 2011)

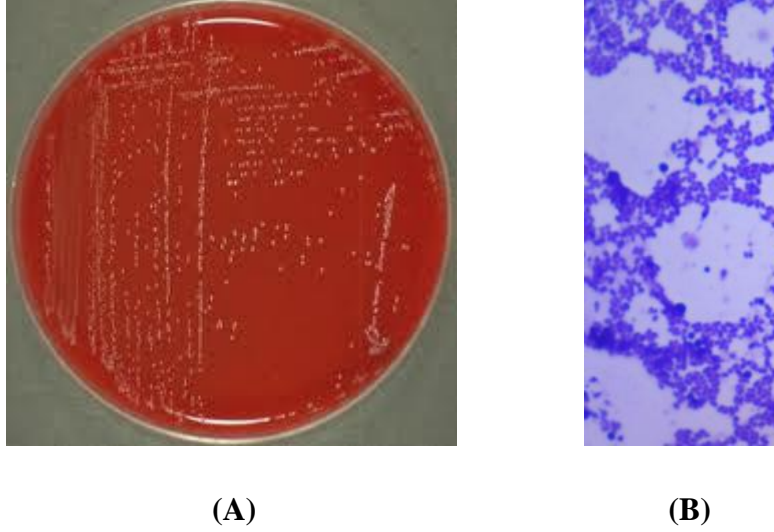
Türler	Alt türler
<i>Lactococcus garvieae</i>	-
<i>Lactococcus piscium</i>	-
<i>Lactococcus plantarum</i>	-
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	-
<i>Lactococcus chungangensis</i>	-
<i>Lactococcus fujiensis</i>	-
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>tructae</i>

Laktokoklar genellikle bitkilerde ve hayvanların derilerinde bulunmaktadır. *L. garvieae* en çok balıklardan, hayvanlardan ve süttten, *L. piscium* somon balığından, *L. plantarum* çoğunlukla bitkilerden izole edilmektedir (Williams *et al.* 1990). *L. raffinolactis* ise nadiren de olsa çiğ sütte ve peynirlerde bulunmaktadır (Perez Elortondo *et al.* 1999, Lopez-Diaz *et al.* 2002). *L. lactis* türüne ait *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* alt türlerine çoğunlukla çiğ süt, yumuşak ve sert peynirler, ekşi kremalar ve bu gibi mandıra ürünlerinde rastlanmaktadır (Ward *et al.* 2002, Casalta and Montel 2008).

### 2.2.2. Genel özellikleri

*Lactococcus* cinsi bakteriler kok morfolojisinde olup, gelişme ortamlarında tek (0.5–1.5 µm), kok çiftleri ya da kısa zincirler halinde bulunabilmektedir (Şekil 2.3). Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C olan laktokoklar, 10 °C ve 45 °C arasında gelişme gösterebilmektedir. Türleri arasında 40 °C üzerinde ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (>% 4 sodyum klorür) gelişebilme ve farklı şekerlerden (laktoz, mannitol ve rafinoz) asit oluşturma özellikleri bakımından farklılıklar görülmektedir (Schleifer 1985, Schlegel 1997, Furet *et al.* 2002). % 6.5 NaCl varlığında ve ortam pH'sının 9.6 olması durumunda gelişme göstermezler (Büyükyörük *et al.* 2010). Laktozu fermente etme yeteneği, özellikle süt endüstrisinde starter olarak kullanılan laktokoklar için kritik bir önem taşımaktadır.

Şekerleri homofermentatif yolla laktik aside dönüştürmek sureti ile enerji elde etmektedirler. Laktokoklar bu özellikleri ile streptokoklardan ve enterokoklardan ayrılırlar (Schleifer *et al.* 1985, Schleifer and Kilpper-Bälz 1987, Stiles and Holzapfel 1997).



**Şekil 2.3.** *Lactococcus lactis* kolonilerinin, kanlı agardaki (A) ve Gram boyama yapıldıktan sonra ışık mikroskobu altındaki (B) görüntüsü. (<http://www.connecticutvalleybiological.com/lactococcus-lactis-slide-p-14829.html>)

Hareketsiz ve Lancelfield serolojik grup N üyesi olan *Lactococcus* cinsine ait bakterilerde fonksiyonel sitrik asit döngüsü ve solunum enzimleri bulunmamaktadır. Ancak bu bakteriler flavin tip NADH oksidaz, NADH peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerine sahip olduğundan, oksijeni düşük oranlarda da olsa kullanabilmektedir. Katalaz enzim sistemine sahip olmadıklarından, aerobik koşullarda hidrojen peroksit ortamda birikebilmekte ve hücresel yapıların bozulmasına yol açarak bakteriyel gelişimi engelleyebilmektedir. Genom büyüklükleri ortalama 2.5 Megabaz (Mb) olan laktokoklarda, G+C oranı % 34–42 arasında değişim gösterebilmektedir (Teixeria *et al.* 1996, Schlegel 1997, van Niel *et al.* 2002).



### 2.3. *Lactococcus lactis* Türü

#### 2.3.1. *L. lactis*' in alt grupları

*Lactococcus* cinsini oluşturan bakteriler içerisinde *L. lactis* türü, çiğ sütte ve fermente süt ürünlerinde genellikle en baskın bulunan laktik asit bakterisidir. *L. lactis* suşlarının süt fermentasyonları için temel starter kültür bileşenleri olarak kullanılmaları bu nedenle şaşırtıcı değildir (Kimoto-Nira *et al.* 2010, Yonezawa *et al.* 2010, Odamaki *et al.* 2011). Dünya çapında yüz milyon tondan daha fazla miktarda süt, her yıl *L. lactis* starterlerinin kullanımıyla fermente süt ürünlerine dönüştürülmektedir. Bu durum söz konusu mikroorganizmaların endüstriyel ve dolayısıyla ekonomik önemini yansıtmakta yeterli olmaktadır (Parente and Cogan 2004, Fernandez *et al.* 2011).

Odun ile beslenen termitlerin sindirim kanalının arka kısmından izole edilebilen ve laktoz fermentasyon yeteneği içermeyen *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L. lactis* türünün gıda fermentasyonlarında kullanılmayan tek üyesidir (Klijn *et al.* 1995, Nomura *et al.* 1999). *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* alt türlerinin yanı sıra *L. lactis* türüne ait tek biyovaryete olan *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, laktozu fermente ederek laktik asit oluşturma, kazein hidrolizi (proteolitik aktivite) ve bakteriyosin üretimi başta olmak üzere, üretim teknolojisi ve ürün tipine bağlı diğer biyokimyasal özellikleri de saptanmak suretiyle, starter kültür suşları olarak tanımlanmakta ve fermente süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tanskanen *et al.* 1990, Teuber 1990, Gauthier *et al.* 1991, Renault 1996, Hellinck *et al.* 1997, Akçelik *vd.* 2001). Laktoz fermentasyonunun ana ürünü olan laktik asit, fermente süt ürünlerinin yapısal ve aromatik özelliklerinin oluşturulmasının yanı sıra patojenik ve bozulma etmeni mikroorganizmalara karşı da koruyucu rol oynamaktadır (De Vos 1987, Tükel ve Akçelik 2000).

#### 2.3.2. *L. lactis*'in starter suşları arasındaki fenotipik farklar

*L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* alt türleri sadece birkaç fenotipik özellik farklarıyla birbirlerinden ayrılırlar (Kelly and Ward 2002); *lactis* alt türü arjinini metabolize edebilmekte olup 40 °C sıcaklık ve % 4 NaCl içeren ortamlara karşı toleranslı

olmasına rağmen 45 °C sıcaklık ve % 6.5 NaCl konsantrasyonlarına duyarlılık göstermektedir. Bu özelliklerin aksine *cremoris* alt türüne dahil olan bireyler 40 °C sıcaklık ve % 4 NaCl koşullarına karşı duyarlı olup bu suşların çoğu arjinini parçalama yeteneğine sahip değildir (Daly 1983, Drici *et al.* 2010). Mundt 1986 yılında yaptığı çalışmalar sonucunda *lactis* alt türüne dahil olan suşların ortam pH'sı 9.2 iken gelişim gösterebildiğini, *cremoris*' lerin ise gelişemediğini gözlemlemiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* dekarboksilat glutamatı  $\gamma$ -aminobütirik aside (GABA) çevirebilirken, *L. lactis* subsp. *cremoris* bu aktiviteyi gösterememektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* ise sadece sitratı fermente ederek diasetil oluşturma yeteneği ile *L. lactis* subsp. *lactis*' den ayrılmaktadır (Çizelge 2.3) (Nomura *et al.* 1999, 2006, Fernandez *et al.* 2011).

Sitratı fermente etme yeteneğinin tüm *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşlarında plazmid kodlu oluşu ve söz konusu plazmidlerin konakçı bakteriden kendiliğinden kaybının sıklıkla gerçekleşmesi, bu biyovaryetenin klasik fenotipik testler ile *L. lactis* subsp. *lactis* alt türünden kesin hatlarla ayrılmasını imkansız hale getirmektedir. Özellikle moleküler analiz tekniklerinin geliştirilmesi starter kültür suşlarının kendi aralarında doğru şekilde tanımlanmasını sağlamakla beraber, patojen ya da gıda bozulma etmeni bakterilerden farklılaşma süreçlerinin de evrimsel ilişkilerle açıklanmasını olanaklı hale getirmiştir (Schleifer and Kilpper-Bälz 1987, Stiles and Holzappel 1997, Corroler *et al.* 1998, Corroler *et al.* 1999, Mannu *et al.* 2000, Ayad *et al.* 2001, Nomura *et al.* 2002, Delgado and Mayo 2004, Liu *et al.* 2005).

*L. lactis* türünün taksonomisi geçmişten günümüze dek çok kez değişmiş olmasına rağmen hala fenotipik temelden uzaklaşmamıştır (Schleifer *et al.* 1985, van Hylckama Vlieg *et al.* 2006, Rademaker *et al.* 2007). DNA-DNA hibridizasyonu, 16S rDNA gen bölgesi ve toplam genom dizi analizlerini içeren çok sayıdaki kromozom temelli moleküler çalışmalar sonucunda *L. lactis* türünü oluşturan başlıca iki temel genotipin varlığı tespit edilmiştir. Bu genotipik gruplar *lactis* ve *cremoris* olarak adlandırılmaktadır. *L. lactis* için yapılan fenotipik ve genetik analizlerin sonuçları karşılaştırıldığında, düşük düzeyde uyuma belirlenmiştir. Bu durum *Lactococcus lactis* türünün taksonomisini daha da karmaşık hale getirmektedir (Taillien *et al.* 1998, Kelly *et al.* 2010).

**Çizelge 2.3.** *L. lactis* türünün starter kültür olarak kullanılan alt gruplarını ayırıcı özellikler (Fernandez *et al.* 2011)

Özellik	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
Katalaz aktivitesi	-	-	-
Laktik asit oluşturma	+	+	+
Arjinin hidrolizi	+	-	+
40 °C’de gelişim	+	-	+
pH 9.2 de gelişim	+	-	+
% 4 NaCl içeren ortamlara dayanıklılık	+	-	+
Sitrat fermentasyonu	-	-	+
γ-dekarboksilat glutamat aktivitesi	+	-	-

Fenotipik olarak laktokokların doğal izolatlarının çoğunun *lactis* alt türüne ait olduğu yapılan birçok çalışmada doğrulanmıştır (Klijin *et al.* 1995, Cogan *et al.* 1997, Corroler *et al.* 1998, Desmaures *et al.* 1998, Gaya *et al.* 1999). *Cremoris* alt türü çok nadir olarak izole edilebilmektedir (Salama *et al.* 1993, 1995, Urbach *et al.* 1997, Delgado and Mayo 2004). Psoni ve arkadaşları (2003) Yunanistan’ın kökeni koruma altına alınmış olan (PDO) Batzos peynirinden izole ettikleri 40 adet laktokok suşunun tamamını fenotipik çalışmalarla *L. lactis* subsp. *lactis* olarak tanımlamışlardır (Psoni *et al.* 2007). Ancak *L. lactis*’in bazı suşlarının *cremoris* genotipinde olduğu bilinmesine rağmen, klasik ayırma kriterlerine göre *L. lactis* subsp. *lactis* fenotipinde görüldüğü de bilinmektedir (Jarvis and Jarvis 1981). Bununla beraber son zamanlarda fenotipik olarak *L. lactis* subsp. *cremoris* olduğu tespit edilen bazı bakteri gruplarının *lactis* genotipinde olduğu da saptanmıştır (Kelly *et al.* 2010, Tanigawa *et al.* 2010, Fernandez *et al.* 2011).

*L. lactis* türüne ait bu taksonomik sorunun aşılması amacıyla uygulanan yeni yaklaşımlarda genellikle kromozomal kimliklendirme ve çoklu lokus analizleri esas alınmaktadır. Özellikle çoklu lokus analizleri ve genom düzeyinde hibridizasyon sonuçları farklı orijinlere sahip *lactis* ve *cremoris* suşlarının aynı alt grupları oluşturabildiğini açıkça göstermiştir (Bayjanov *et al.* 2009, Taibi *et al.* 2010). Bu nedenle *L. lactis* subsp. *lactis*, *L.*

*Lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* suşlarının güvenilir tanısında genotipik analiz verileri daha çok dikkate alınmaktadır (Kelly *et al.* 2010).

### 2.3.3. *L. lactis* suşlarının endüstriyel açıdan önemi

*L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* suşları başta peynir imalatında olmak üzere birçok mandıra ürününün kültüre edilmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. İçerisinde bulunduğumuz yüzyılda bu amaca yönelik yeni laktokok suşlarının geliştirilmesi ve mevcut suşların tercih edilen özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu suşlar, ürettikleri asit miktarı ve üretim sıklığı, bakteri ve faj enfeksiyonlarına karşı gösterdikleri dirençlilik, raf ömrünün ve gıda güvenilirliğinin artırılması, sütün temel proteini sayılan kazeini parçalayabilme yetenekleri, imal edilen ürüne aroma, lezzet, kıvam özelliklerinin kazandırılması gibi endüstriyel açıdan sahip oldukları önemli birçok ayrıcalıkları sayesinde diğer bakteri suşlarından ayrılmaktadır. Bu ayrıcalıklarından ve yüksek kalitedeki peynir üretiminin devamlılığını sağlamak açısından starter suşların korunması ve ürün niteliğine göre dikkatli şekilde seçim yapılması gerekmektedir (Tanskanen *et al.* 1990).

Laktokoklar, otoliz yetenekleri ve peynir matriksi içerisine gönderdikleri intraselüler peptidazları sayesinde peynirin olgunlaşma sürecinde önemli bir role sahiptir. Peynir olgunlaşma sürecinin erken evrelerinde (1. gün) *Lactococcus* suşlarının mikrobiyel çeşitlilik içerisinde en çok rastlanan bakteri grubu olduğu saptanmıştır (Vernile *et al.* 2008). Özellikle geleneksel peynirler ve kökeni koruma altına alınmış (Protected Designation of Origin-PDO) olan mandıra ürünlerinin mikrobiyel zenginliklerinin tanımlanması son zamanlarda oldukça ilgi gören araştırma konuları arasındadır (Manu *et al.* 2000, Manu and Paba 2002, Aleksandra *et al.* 2005, Psoni *et al.* 2007, Vernile *et al.* 2008, Uchida *et al.* 2009, Büyükyörük *et al.* 2010).

*L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarının süt içerisindeki gelişim yanıtının *lactis* suşlarına kıyasla daha iyi olduğu ve kendilerine özgü tipik aroma profillerinin mevcudiyeti ile bağlantılı olarak kaşar peynirinin üretim süreçlerinde özellikle tercih edildikleri bilinmektedir (Salama *et al.* 1993, Urbach *et al.* 1997, Fernandez *et al.* 2011). *L. lactis* subsp. *lactis*, inek

sütü içerisindeki LAB' lar arasında sıklıkla baskın tür olarak gözlenirken biovar *diacetylactis*' e oldukça seyrek rastlanmaktadır (Sandine *et al.* 1972, Desmaures *et al.* 1998, Kelly and Ward 2002, Franciosi *et al.* 2009, Drici *et al.* 2010). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* suşları tereyağı ve krem peynirlerin tipik aroma bileşeni olan diasetilin sentezinden sorumludur (Nomura *et al.* 1999, Kimoto *et al.* 2004, Göncü and Alpkent 2005, Jivadipur and Tunçtürk 2006).

Ürüne yönelik starter kültür suşlarının kullanılması amacıyla morfolojik ve biyokimyasal yöntemler ile tanımlama yapılması zaman alıcı, güvenilirliği az ve çevresel koşullara bağlı olarak değişkenlik gösteren, bununla beraber kültüre olmayan mikroorganizmalar için imkansız sayılan tekniklerdir. Bu nedenle günümüzde klasik fenotipik yöntemlerin yerini alacak kromozom temelli daha güvenilir ve kolay değerlendirilebilir veriler sağlayan yeni birçok moleküler yöntemin geliştirilmesi, suş tanımlamasında bu yöntemlerin tercih edilmesini sağlamaktadır (Rantsiou and Cocolin 2006, Singh *et al.* 2009, Tran *et al.* 2011).

#### **2.4. Kromozom Temelli Moleküler Tanımlama Yöntemleri**

Günümüzde toplam genom analizlerinin yaygın şekilde gerçekleştirilmesi ve korunmuş gen bölgelerinin tespitinden sonra mikroorganizmaların tanımlanması ve karakterizasyonunda gelişmiş yöntem ve tekniklerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Birçok farklı genotiplenme teknikleri uygulamalı olarak; ya türlerin tanımlanması ya da özellikle endüstriyel alanda LAB suşlarının klonal düzeyde ayrımının yapılması için kullanılmaktadır. Bu DNA-temelli tiplendirme yöntemlerinin temel avantajı ayırım gücüne ve evrensel olarak uygulanabilir olmasına dayalıdır. Birbiri ile hemen hemen aynı fenotipik özelliklere sahip akraba suşlar günümüzde plazmid profillemesi, 16S-23S ribozomal DNA analizleri, moleküler ribotiplendirme, rRNA oligonükleotidlerinin kullanılması, çoklu lokus dizi analizleri (MLSA), DNA-DNA hibridizasyonu, darbeli alan jel elektroforezi (PFGE), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), denatürasyon gradiyent jel elektroforezi (DGGE), amplifiye edilmiş parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), karşılaştırmalı genom hibridizasyonu (CGH), çoğaltılmış ribozomal DNA'nın restriksiyon analizi (ARDRA) gibi kromozom temelli

teknikler sayesinde güvenilir şekilde ayırt edilebilmektedir (Farber 1996, Mohania *et al.* 2008).

Moleküler tanı yöntemlerinin bir kısmı sadece tür düzeyinde tanımlama yapabilecek uygulama yeterliliğine sahip iken, bir kısmı ise alt türlerin evrimsel süreçte genomlarında meydana gelen genetik olaylar ve meydana getirdikleri varyasyonların saptanmasında da kullanılmaktadır. 16S rRNA genleri evrimsel süreçte çok iyi korunmuş, değişmez ve sınırlandırıcı fonksiyonlara sahip, erken safhada gelişimi belirlenmiş ve diğer genlere nazaran çevresel baskılardan etkilenmemiş evrensel belirteçler olmalarına rağmen, tanımlama çalışmaları için tek başına kullanımlarında karşılaşılan bazı olumsuzluklar bulunmaktadır. Bu olumsuzluklardan ilki 16S rRNA genlerinin genomda çok iyi korunmuş olarak bulunmasının bakteri analizi için sınırlandırıcı bir etki oluşturmasıdır (Achenbach *et al.* 2001). İkinci olarak, 16S rRNA genleri çeşitli bakteri türlerinde evrensel belirteçler olarak kullanılsalar bile genlerin kopya sayısı farklılık göstermektedir. Bu durum 16S rRNA genleri hedef olarak kullanıldığında bazı bakteri türlerinin çok iyi ayırt edilebilmesine bazılarının ayırımının ise daha güç olmasına yol açmaktadır (Mohania *et al.* 2008).

ARDRA yöntemi, *L. lactis* izolatlarının alt tür düzeyinde ayırt edilebilmesi amacıyla başarılı şekilde uygulanmıştır (Delgado and Mayo 2004). Psoni ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan *L. lactis* izolatlarının alt türlerinin tanımlanması çalışmalarında RAPD ve PFGE teknikleri kullanılmış, PFGE tekniğinin ayırım gücünün daha yüksek olduğu, RAPD yönteminin bakteri tanımlaması için uygun olmadığı saptanmıştır (Pogacic *et al.* 2011). *L. lactis* izolatlarının endüstriyel açıdan önemli olan özellikleri genellikle plazmid kodlu olduğundan plazmid profillerinin saptanması suretiyle karşılaştırma yapılması önem taşımaktadır (Tükel ve Akçelik 2000, Drici *et al.* 2010). Bunun yanı sıra genom dizisine ihtiyaç duyulmaksızın laktokokal suşların kromozomal düzeyde karşılaştırılması için en uygun yöntemin PFGE olduğu birçok araştırmacının ortak görüşüdür (Mata *et al.* 1989, Tanskanen *et al.* 1990, Le Bourgeois *et al.* 2000, Mannu and Paba 2002, Vernile *et al.* 2008, Uchida *et al.* 2009).

## 2.5. Plazmid Profillemesi

Bakteriyel karakterizasyon için kullanılan moleküler biyoloji tekniklerinden ilki plazmid parmak izi yöntemi olup aynı tür içerisinde dahil edilen alt türlerin tanımlanması amacıyla kullanılmıştır. *Lactococcus* cinsine ait üyelerin plazmid DNA dizilerinin suşa spesifik olduğu ve oldukça kararlılık gösterdiği bilinmektedir (O'Sullivan and Daly 1982). Laktokok plazmidleri, tür içi ve türler arası konjugatif özellikleri ile genom elastisitesi sağlamakta ve bu grubun evrimsel süreçteki değişimlerinde büyük rol oynamaktadır. Laktokokların laktoz ve diğer şekerleri fermente etme yetenekleri, antimikrobiyel ve proteolitik aktiviteleri, bakteriyofaj dirençlikleri, antagonistik aktiviteleri, aroma oluşturabilmeleri gibi sahip oldukları en önemli ticari özellikler plazmidler tarafından belirlenmektedir (MacKay 1983, Botina *et al.* 2006).

Plazmidler stabil yapılar olmadıklarından, mikroorganizma içerisinde replikasyon fonksiyonları ile kopya sayılarının artırılması ve kromozoma entegrasyon stratejilerinin geliştirilmesi mümkün olmaktadır. Bu vektörler her iki durumda da bilimsel ve endüstriyel çalışmalarda kullanım alanı bulmaktadır (Barriaut and Sylvestre 1999, Perez-Arellano *et al.* 2001). *L. lactis* izolatlarının sayıları 2 ile 11 arasında moleküler ağırlıkları ise 3 ile 130 kilobaz (kb) arasında değişim gösteren plazmidlere sahip oldukları saptanmıştır (Fujita *et al.* 1984). Genellikle plazmid büyüklüğü arttıkça kopya sayısı azalmakta ve buna bağlı olarak özellikle laktoz plazmidlerinde plazmid stabilitesinin azalmasını sağlamaktadır (Tükel ve Akelik 2000). Laktokok plazmidlerinin genomlarındaki % 36-38' lik G+C içeriinden farklı olarak % 30-40 G+C içeriğine sahip oluşları plazmidlerin yatay gen transferi yolu ile kazanıldıklarına işaret etmektedir (Mills *et al.* 2006).

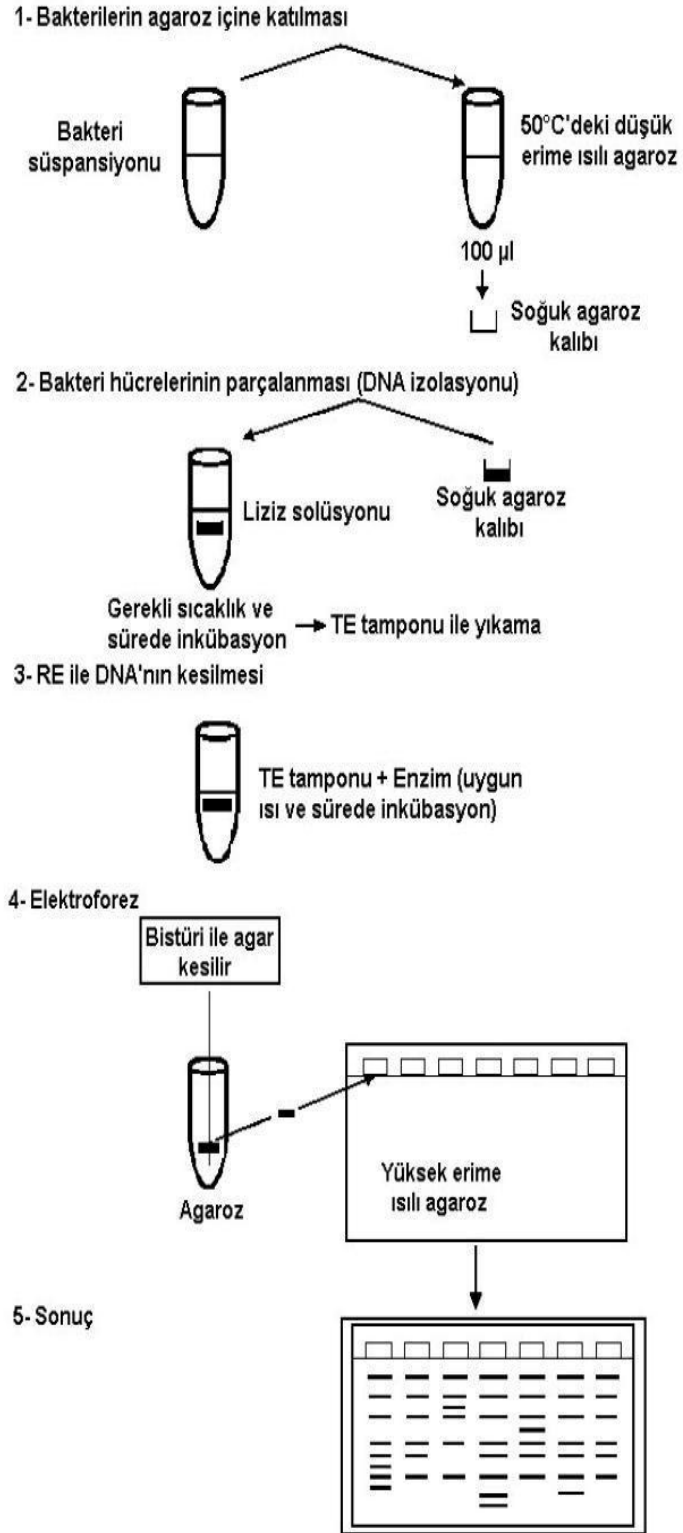
Konjugatif etmenler ve diğer çevresel faktörler nedeniyle ekstrakromozomal DNA yapısında meydana gelen değişiklikler, bakteri tanımlamasında kromozomal DNA' yı temel alan moleküler yöntemlerin plazmid profillemesinden daha başarılı şekilde ve daha yaygın olarak kullanılmalarını sağlamıştır. Plazmid profillemesinin tanımlama yöntemi olarak kullanılmasındaki bir dezavantaj da plazmid içermeyen bakterilerin bu yolla karakterize edilememesidir (Duffner and O'Connell 1995, Holzapfel *et al.* 2001).

## 2.6. Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)

PFGE, bakteriyel suşların ayırt edilmesinde kullanılabilir en iyi yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemin ilk aşamasında sıvı veya katı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürleri düşük erime ısıyla agaroz gömüldükten sonra bakteri hücreleri deterjan veya enzimler yardımıyla parçalanmakta (*in situ lysis*), sonuç olarak genomik DNA saf olarak elde edilmektedir. PFGE’ de yüksek kalitede bozulmamış DNA’ nın elde edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle DNA’ da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyon uygulamaları bu yöntem için uygun görülmemektedir. Lizis işlemini takiben agaroz kalıpları protein, karbonhidrat ve hücre içeriklerinden arındırılmak amacıyla iyice yıkanmaktadır. Agaroz içerisine gömülü olan kromozomal DNA, nadir kesim yapan bir restriksiyon enzimi (RE) ile muamele edilmektedir. Restriksiyon bant profillerinin görüntülenmesi amacıyla elektroforez jeline yüklenen kalıplar belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına maruz bırakılmaktadır. Elektroforezden sonra jel etidyum bromürle boyanarak suşların bant profilleri karşılaştırılmaktadır (Şekil 2.4) (Durmaz ve Durmaz 2001). Bakteriyel suşların nadir kesim yapan restriksiyon endonükleaz enzimlerinin tanıma bölgelerinin genom üzerindeki dağılımında gözlenen varyasyonlar suşlar arasındaki genomik farkların ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır (Aleksandra *et al.* 2005).

Laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan agaroz jel elektroforezi tekniğinde 50 kilobazdan (kb) daha büyük DNA molekülleri, yüksek hareket yeteneğine sahip olmadıklarından sanki elenmişçesine jel üzerinde gözlenemezler. Aynı şekilde 750 kb’ dan büyük olan parçalar son derece kırılabilir olmakla beraber jel üzerindeki göçleri birçok uygulamada kullanımlarına imkan vermemektedir (Gardiner 1991). İlk olarak Schwartz ve arkadaşları (1982) iki alternatif elektriksel alanın kullanımı ile büyüklüğü 10 megabazaya kadar arttırılabilen 50 kb’ dan daha küçük DNA moleküllerinin rahatlıkla birbirlerinden ayrılabilirdiğini ortaya koymuş ve darbeli alan jel elektroforezi uygulamalarını başlatmışlardır. Bu tarihten sonra aynı prensiple çalışan cihazların sayısı gün geçtikçe artmaya başlamıştır (Hacıoğlu ve Basım 2001).

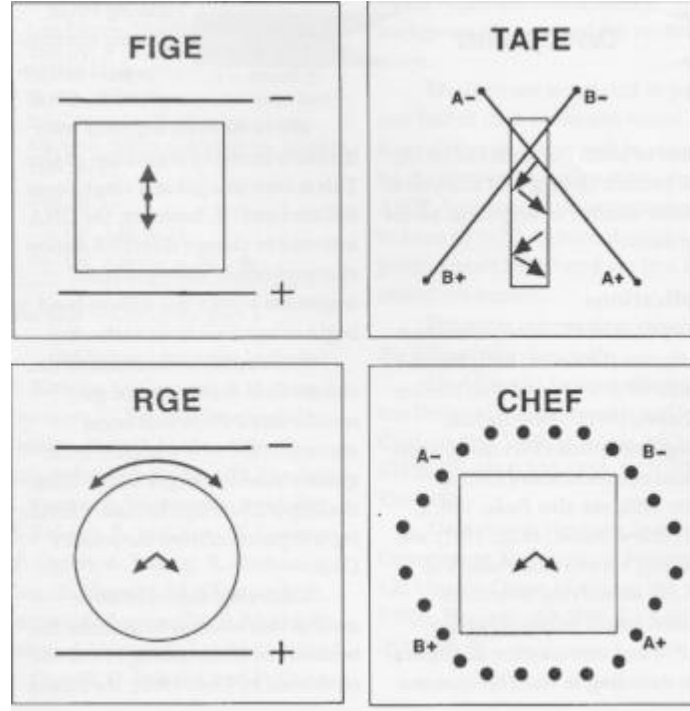




Şekil 2.4. PFGE Aşamaları (Durmaz ve Durmaz 2001).

PFGE, çok farklı amaçlar için çok farklı şekillerde kullanıma uygundur (Birren and Lai 1990, Gemmill 1991, van Daelen and Zabel 1991, Birren and Lai 1993). İlk çalışmalar olarak büyük bitki DNA' sının maya yapay kromozomları (YAC) ve P1 klonlama vektörleriyle klonlanması (Ecker 1990, Butler *et al.* 1992), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmlerinin (RFLP) tanımlanması, fiziksel haritalama, in vivo kromozom kırık ve degradasyonlarının saptanması (Elia *et al.* 1991), mayalar gibi birçok fungusun ve *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Leishmania* gibi parazitlerin kromozom sayı ve büyüklüklerinin (elektroforetik karyotip) belirlenmesinde kullanılmıştır (Gallagher *et al.* 1992). Ayrıca PFGE bakteriyel grupların kromozomal düzeyde tanımlanması ve önemli suşların genetiksel geçmişleri hakkında bilgi edinmek amacıyla da hizmet etmektedir (Le Bourgeois *et al.* 1991, 1992).

PFGE çok çeşitli cihazlarla uygulanabilmektedir. En basit ekipmanı ters alan jel elektroforezi (field inversion gel electrophoresis, FIGE) için tasarlanmıştır. FIGE genomu 180° lik açılarla yönlendirmekte olup periyodik olarak elektrodların değişmesi prensibiyle çalışır (Carle *et al.* 1986). Çapraz değişen alan elektroforezi (Transverse alternating field electrophoresis, TAFE) çapraz konumlanmış dört elektrodta gelen elektrik akımıyla dikey şekilde konumlanmış jel üzerindeki büyük DNA parçalarının göçünü sağlamaktadır (Steward *et al.* 1988). Rotasyonlu jel elektroforezi (Rotating gel electrophoresis, RGE) birbiri ile homojen olan iki elektrodta her yöne eşit akım gönderilen bir elektriksel alanda ayarlanmış iki açı arasında jelin hareketinin sağlanması prensibine dayanmaktadır (Southern *et al.* 1987). 120° lik açılar ile konumlanmış, altıgen şekilde agaroz jelin etrafını saran elektrodlardan homojen olarak verilen çapraz elektrik akımıyla çok büyük ve çok küçük DNA parçalarını sorunsuzca göç ettirebilen CHEF (Contour-clamped homogenous electric field) günümüzde en çok kullanılan PFGE cihazıdır ( Şekil 2.5) (Gallagher *et al.* 1992, Hacıoğlu ve Basım 2001). Kullanılan tüm cihazlarda prensip hiç değişmemekte, PFGE bant profilleri karşılaştırılarak genetiksel olaylar ile ilişkilendirilmiş yorumlar yapılmaktadır.



**Şekil 2.5.** PFGE' nin yaygın olarak kullanılan elektrod konfigürasyonları (Gallagher *et al.* 1992).

Tenover ve arkadaşları (1995); PFGE' yi emidemiyolojik hastalıklarda salgın suşları tanımlayabilmek amacıyla kullanmış ve PFGE sonucunda oluşan makrorestriksiyon örneklerinin genetik olaylar ile ilişkilendirilerek yorumlanmasına yardımcı olan bazı kriterler geliştirmiştir (Çizelge 2.4). PFGE bant profilleri aynı olan bakterilerin aynı izolatlar oldukları kabul edilirken, bant sayısındaki farklılık yediden büyük görüldüğünde izolatların birbirleri ile ilişkisiz suşlar oldukları söylenebilmektedir. Aynı türün ya da yakın akraba türlerin PFGE bant profillerindeki farklılığın enzimin tanıma bölgesinde meydana gelen bir nokta mutasyonlardan kaynaklanabileceği, kromozom üzerinde delesyon, insersiyon ya da inversiyonların gerçekleşebileceği ve yeni düzenlemelerin meydana gelebileceği ihtimali her zaman vardır. Bu yeniden düzenlemeler hareketli IS elementleri, evrimsel süreçlerde kromozoma entegre olmuş lineer plazmidler, ve profajlar ile de desteklenmektedir (Aleksandra *et al.* 2005).

**Çizelge 2.4.** PFGE profillerini yorumlama kriterleri (Tenover *et al.* 1995)

<b>Kategori</b>	<b>Salgın suş ile arasındaki genetik fark sayısı</b>	<b>Salgın suş ile fark gösteren bant sayısı</b>	<b>Epidemiyolojik yorum</b>
Aynı	0	0	İzolot, salgının bir parçası
Yakın İlişkili	1	1-3/ 2-3	İzolot salgınla yakın ilişkili
Olası İlişkili	2	4-6	İzolot salgınla olası ilişkili
Farklı	≥ 3	≥ 7	İzolot salgınla ilişkisiz

Genetik olayların bant profillerine nasıl yansıdığını şematize eden Tenover *et al.* (1995) meydana gelebilecek moleküler değişikliği örnekler ile açıklamıştır (Çizelge 2.5) (Şekil 2.6).

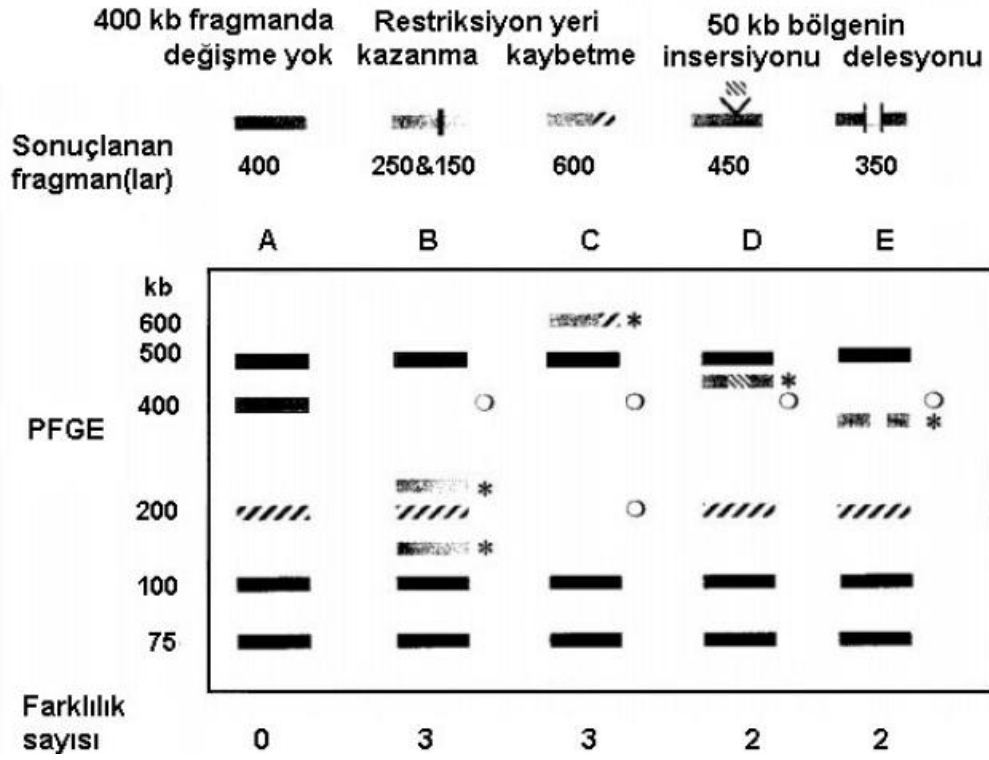
**Çizelge 2.5.** Genetik olayların PFGE profilleri üzerindeki etkisi (Tenover *et al.* 1995)

***DNA’da oluşan bir nokta mutasyon ile yeni bir restriksiyon bölgesinin oluşması*** → Yeni profilde, salgın profilinde bulunan bir bant kaybolarak yerini salgın profilinde olmayan iki yeni ve daha küçük banda bırakacaktır. İki küçük bandın boyutlarının toplamı, yaklaşık olarak büyük bandın boyutu kadar olacaktır. Bu değişim, üç bant profilinin farklı olması ile açıklanmaktadır (Şekil 2.6B)

***Bir restriksiyon kesim bölgesinde meydana gelen nokta mutasyon*** → Yeni profilde, salgın suşta olmayan, iki küçük bandın birleşmesiyle daha büyük bir bant meydana gelecektir. Bu değişim, üç farklı bant profilinin oluşmasına sebep olmaktadır (Şekil 2.6C)

***Genoma yeni bir DNA parçasının eklenmesi*** → Yeni profilde, salgın profiliyle aynı sayıda bant görülmektedir ancak bir bant daha büyük görülecektir (Şekil 2.6D).

***Genomdan bir DNA parçasının delesyonu*** → Yeni profilde, salgın profiliyle aynı sayıda bant görülmektedir ancak bir bant daha küçük görülecektir (Şekil 2.6E).



**Şekil 2.6.** Genetik olayların PFGE bant profillerine yansması A: Salgın suş profili B: Yeni bir restriksiyon bölgesinin oluşması C: Bir restriksiyon bölgesinin kaybolması D: DNA parçasının insersiyonu E: DNA parçasının delesyonunu ( o, kaybedilen bandı; \* , kazanılan bandı ifade eder) (Tenover *et al.* 1995, Durmaz ve Durmaz 2001).

Daha sonraki çalışmalarda PFGE, restriksiyon haritalarının çıkarılması, fonksiyonel gen haritalarının oluşturulması, aynı türe ait farklı alt gruplar arasındaki yakınlık derecelerinin saptanması amacıyla da kullanılmıştır. PFGE' nin uygun restriksiyon enzimleri seçildiği takdirde moleküler yöntemler arasında suş tanımlama amacıyla kullanılabilecek bir yöntem olduğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bakteriler

Özkalp (2006) tarafından Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan çiğ süt ve boza örneklerinden izole edilen, morfolojik ve fizyolojik analizlerle on tanesi *L. lactis* subsp. *lactis*, altı tanesi *L. lactis* subsp. *cremoris* ve on dört tanesi *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* olarak tanımlanmış toplam 30 adet laktokok suşu ile *Lactococcus lactis* ATCC 7962 standart suşu, plazmidden yoksun *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1614 ve *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 suşları Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Prokaryot Genetiği Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiş ve bu çalışma kapsamında kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Bakterilerin üretiminde kullanılan besiyeri ve saklama koşulları

Laktokok suşları M17 broth besiyeri ortamlarında 30 °C sıcaklıkta 18 saat süre ile geliştirilmiştir. Bakteriler, belirtilen gelişme ortamlarına % 30 oranında steril gliserol ilave edilerek -20 °C' de saklanmıştır.

M17 Broth (Merck)		
Soya peptonu	5	g
Et peptonu	2.5	g
Kazein peptonu	2.5	g
Maya ekstraktı	2.5	g
Et ekstraktı	5	g
D (+) Laktoz	5	g
Askorbik asit	0.5	g
Na-β-gliserofosfat	19	g
Magnezyum sülfat	0.25	g
Destile su	1000	ml

Hazırlanan besiyerinin pH' sı 7.2 ±0.2 olup 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Plazmid içeriklerinin belirlenmesi

#### 3.2.1.1. Plazmid izolasyonu

M17 broth besiyerinde 30 °C’de 18 saat geliştirilen *L. lactis* suşları, 10 ml’lik M17 broth ortamlarına % 10’luk inokülasyonlar yapılarak, 30 °C’ de 3–3.5 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre bitiminde mikrosantrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri, 6000 rpm’ de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Hücre çökeltisi kurutulduktan sonra, 380 µl sakkaroz tamponunda çözülmüş ve steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Mikrosantrifüj tüpleri 37 °C sıcaklığa ayarlanan ısı bloğu üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra 96.5 µl lizozim çözeltisi ilave edilerek 37 °C’ de 5 dakika daha bekletilmiştir. 48.2 µl Tris-EDTA–I uygulamasından sonra mikrosantrifüj tüplerine % 20’ lik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 28 µl aktararak karıştırılmıştır. Bu aşamada ortamdaki viskozitenin artışı lizozin başladığını göstermektedir. Lizozin tamamlanması için mikrosantrifüj tüpleri 37 °C’ de ısı bloğu üzerinde 10 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler mekanik karıştırıcıda ve yüksek devirde 45 saniye karıştırılarak kromozomal DNA’nın kırılması sağlanmıştır. Ortama yeni hazırlanmış 3 N NaOH çözeltisinden 28 µl ilave edilmiş ve tüpler düz bir zemin üzerinde 15 dakika süre ile yavaş bir şekilde çevrilerek kromozomal DNA’nın alkali denatürasyon koşulları oluşturulmuştur. Ortam pH’sının uygulama sırasında 12.1 – 12.3 arasında olup olmadığı kontrol edilmiştir. Denatürasyon aşamasının sonunda mikrosantrifüj tüplerine 50 µl 2 M Tris-HCl çözeltisi aktararak 5 dakika süre ile yine düz bir zeminde karıştırılmıştır. Ortam pH’sının 8.5–9.0 arasına düşüşü ile nötralizasyonun sağlandığı belirlenmiştir. Mikrosantrifüj tüplerine, +4 °C’ de saklanan 5 M NaCl çözeltisinden 72 µl ve % 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 µl ilave edilerek +4 °C’de 12500 rpm’ de 20 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüplerde oluşan üst faz, mikropipet ile yeni steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve deproteinasyonun sağlanması için kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisinden 700 µl ilave edilmiştir. Tüpler +4 °C’ de 12500 rpm’ de 15 dakika daha santrifüj edilerek üst faz alınmış ve eşdeğer hacimde etanol uygulanmıştır.

Ekstraktlar - 20 °C' de 1 gece bekletilmiştir ve plazmid DNA'nın yoğunlaşması sağlanmıştır. Sonraki gün plazmid DNA 12500 rpm' de 20 dakika santrifüj edilmek suretiyle çöktürülmüştür. Son aşamada sıvı faz akıtılarak DNA çökeltisi kurutulmuştur. Çökeltiler, 20 µl Tris-EDTA-II tamponu içerisinde çözülmüş ve elektroforez uygulamasından önce RNaz A stok çözeltisinden 2 µl ilave edilerek 37 °C' de ısı bloğunda 45 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

---

Sterilizasyondan önce pH 8.0  $\pm$ 0.02' ye ayarlanmış ve 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

---

**Lizozim Çözeltisi**

---

Tris	0.3	g
Lizozim	0.1	g
Destile su	10	ml

---

Sterilizasyondan önce pH 8.0  $\pm$ 0.02' ye ayarlanmış ve 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.



---

**Tris-EDTA-I Çözeltisi**

---

Tris	0.6	g
EDTA	9.31	g
Destile su	100	ml

---

Sterilizasyondan önce pH 8.0  $\pm$ 0.02' ye ayarlanmış ve 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

---

**Tris-HCl Çözeltisi**

---

Tris-HCl	31.52	g
Destile su	100	ml

---

Sterilizasyondan önce pH 7.0  $\pm$ 0.02' ye ayarlanmış ve 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

---

**SDS Çözeltisi**

---

Tris	0.6	g
EDTA	0.74	g
SDS	20	g
Destile su	100	ml

---

Sterilizasyondan önce pH 8.0  $\pm$ 0.02' ye ayarlanmış ve 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

---

**Tris-EDTA-II Çözeltisi**

---

Tris	0.121	g
EDTA	0.037	g
Destile su	100	ml

---

Sterilizasyondan önce pH 7.5  $\pm$ 0.02' ye ayarlanmış ve 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

**%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 ve karıştırılarak oda sıcaklığında tutulmuştur.

**RNaz A çözeltisinin hazırlanışı:**

5 ml steril destile su içinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat çözeltisinin pH' sı, asetik asit ile 5'e ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A ilave edilmiştir. Kaynar su içerisinde 5 dakika tutulduktan sonra ortam -20 °C' de saklanmıştır.

**3.2.1.2. Elektroforez**

DNA örneklerinin elektroforezi, % 0.7 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Meyers *et al.* 1976). Yatay ve dikey jel sistemleri için agaroz, 100 ml tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde mikrodalgada ısıtılarak çözülmüştür. 45 °C' ye kadar soğutulan ortam elektroforez plakalarına 30-50 ml olacak şekilde aktarıldıktan sonra jel tarakları yerleştirilerek 30 dakika polimerizasyonun gerçekleşmesi için beklenmiştir. Bu süre sonunda tampon çözelti jeli kapatacak şekilde elektroforez tanklarına dökülmüş ve jellerin zedelenmemesine dikkat edilerek taraklar çıkarılmıştır. 37 °C' de 45 dakika inkübe edilen DNA örnekleri ısı bloğu üzerinden alınarak, 2  $\mu$ l marker boya çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra mikropipet yardımı ile jel kuyucuklarına aktarılmıştır. Elektroforez, 100 voltta 3-3.5 saat süreyle yapılmıştır. Marker boyanın jel sistemlerini terk etmesinden sonra, elektrik

akımı kesilmiş ve ortamdan alınan jeller, kullanılan elektroforez tamponları ile hazırlanmış olan 0.2 µg/ml etidyum bromid içeren çözelti içerisinde 1 saat bekletilmiştir. Boyama işlemi bitiminde jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışık altında görüntülenmiş ve *Kodak Gel Logic 200 Imaging System* kullanılarak fotoğrafları alınmıştır (Macrina *et al.* 1982).

---

**Tris-Asetat Tampon**

---

Tris	4.84	g
Sodyum asetat	4.08	g
EDTA	0.37	g
Destile su	1000	ml

---

Sterilizasyondan önce pH 8.0  $\pm$ 0.02' ye ayarlanmış ve 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

---

**Marker Boya**

---

Bromfenol blue	0.25	g
Sakkaroz	40	g
Destile su	100	ml

---

### 3.2.1.3. Plazmid büyüklüklerinin hesaplanması

*L. lactis* suşlarından izole edilen plazmidlerin büyüklüklerinin belirlenmesinde; moleküler büyüklükleri bilinen covalently closed circular DNA (ccc DNA) marker' larının elektroforetik hareketlilikleri ile büyüklüklerinin logaritmaları arasında tanımlanan doğrusal ilişkidenden yararlanılmıştır (Macrina *et al.* 1978, Southern 1979, Schaffer and Sederof 1981). ccc DNA Marker (Sigma Aldrich) 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 *et al.* 1983, Elder and Southern 1983).

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

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

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

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

Y = Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

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

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

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

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

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

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

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

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

Suşlar arasındaki filogenetik ilişkileri belirleyebilmek amacıyla çok değişkenli analiz yöntemi olan Kümeleme (Cluster) analizi NTSYS pc 2.2 (Rohlf 1993) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) dendogramı çizilmiştir.

### 3.2.2. Darbeli alan (Pulsed Field) jel elektroforezi

#### 3.2.2.1. Suşların hazırlanması

M17 broth besiyerine %1' lik inokülasyon yapılarak 30 °C' de 18 saat geliştirilen *L. lactis* suşlarının optik yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda yaklaşık 0.5 olarak ayarlanmıştır. Yoğunluk ayarı yapılan kültürlerden birer ml steril mikrosantrifüj tüpleri içerisine aktararak + 4 °C' de 10.000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz atılmış ve hücre çökeltisi 500 µl hücre süspansiyon tamponu (HST) ile çözülmüştür. Çökeltinin besiyerinden arındırılması amacıyla + 4 °C' de 10.000 rpm' de 5 dk santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Böylece hücre bütünlüğü korunmuş olan bakteri çökeltisi yıkanmış olur. Santrifüj sonrasında üst faz atılmış ve çökelti yeniden 100 µl HST içerisinde pipetleme yapılarak çözülmüştür. Bakteri süspansiyonu agaroz gömülme üzere +4 °C' de yaklaşık 10 dk bekletilmiştir (CHEF-DR III Applications Guide, Cat: 170-3690).

---

#### Hücre Süspansiyon Tamponu (HST)

---

10 mM Tris	(pH:7.0)
50 mM EDTA	(pH:8.0)
20 mM NaCl	

---

Hazırlanan çözelti 121 °C' de 15 dk süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

#### 3.2.2.2. İzolatların agaroz gömülmesi

Bakterileri süspansiyon etmek amacıyla kullanılan HST çözeltisi ile % 2' lik düşük erime ısılı agaroz (Low melt grade agarose - Bioshop) hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında çok çabuk polimerize olan bu agarozun katılaşmasını engellemek amacıyla 50 °C' ye ayarlanan ısı bloğu üzerinde çalışılmıştır. 5 ml HST içerisinde 0.1 gr düşük erime ısılı agaroz çözülmüş mikropipet yardımıyla ısı bloğu üzerine yerleştirilen 1.5 ml' lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Çalışılan örnek sayısı kadar 500 µl' lik steril mikrosantrifüj tüpü ısı

bloğu üzerine dizilmiş ve her mikrosantrifüj tüpü içerisinde 100 µl düşük erime ısılı agaroz dağıtılmıştır. 100 µl HST içerisinde çözülen ve +4 °C' de bekletilen bakteri süspansiyonları içerisinde agaroz bulunan tüplere sıra ile aktarılmış ve mikropipet yardımıyla agaroz içerisine homojen dağılmaları sağlanmıştır. Hücre-agaroz karışımından hızlı bir şekilde ve hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek 100 µl çekilmiş ve tek kullanımlık pluglar (10 mm x 5 mm x 1.5 mm, Bio Rad Laboratories) içerisine dağıtılarak izolatların agaroz gömülmesi sağlanmıştır. Pluglar, agaroz kalıplarının polimerize olması için oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir (CHEF-DR III Applications Guide, Cat: 170-3690).

### 3.2.2.3. Agaroz gömülü hücrelerin lizizi

Polimerize olan agaroz kalıpları pluglardan 1.5 ml' lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Her kalıp üzerine hazırlanan liziz solüsyonundan birer ml dağıtılarak 37 °C' de 4 saat, çalkalama yapılmadan su banyosunda inkübe edilmiş ve bakterilerin hücre duvarları parçalanmıştır. Bu işlemin ardından agaroz kalıpları üzerindeki liziz solüsyonu alınmış ve kalıplar üzerine birer ml 1x yıkama tamponu (TE) dağıtılarak oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 45 dk çalkalanmıştır. Agaroz kalıpları liziz solüsyonundan arındırıldıktan sonra 1.5 ml' lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 1 ml proteinaz K çözeltisi içerisinde 50 °C' de çalkalama yapılmadan su banyosunda 1 gece inkübasyona bırakılmıştır (CHEF-DR III Applications Guide, Cat: 170-3690).

---

#### Liziz Solüsyonu

---

30 mM Tris (pH:8.0)

5 mM EDTA (pH:8.0)

50 mM NaCl

10 mg/ml Lizozim

---

Çözelti, 121 °C' de 15 dk süre ile sterilize edilmiştir. Lizozim, çalışma sırasında ihtiyaç duyulan miktara göre sonradan ilave edilmektedir.

---

**Proteinaz K Çözeltisi**

---

100 mM EDTA (pH:8.0)

% 0.2 sodyum deoksikolat

% 1 sodyum N-lauril sarkozinat

1 mg/ml Proteinaz K

---

Çözelti, 121 °C' de 15 dk süre ile sterilize edilmiştir. Proteinaz K, çalışma sırasında ihtiyaç duyulan miktara göre sonradan ilave edilmektedir.

---

**1x Yıkama Tamponu**

---

50 mM EDTA (pH:8.0)

20 mM Tris (pH:8.0)

---

Hazırlanan çözelti 121 °C' de 15 dk süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

**3.2.2.4. Hücre lizizinden sonra agaroz kalıplarının yıkanması**

Proteinaz K çözeltisi ile muamele edilen kalıplar tamamen şeffaflaşmıştır. Mikrosantrifüj tüpleri içerisindeki Proteinaz K çözeltisi agaroz kalıplarına zarar vermeyecek şekilde dikkatlice döküldükten sonra, kalıplar öze yardımı ile steril cam tüplere aktarılmıştır. Ardından agaroz kalıpları 50 °C sıcaklıkta çalkalamalı olarak en az 30 dk süresince 5 ml yıkama tamponu (TE) ile muamele edilmiş ve genomik DNA hücre kalıntılarında arındırılmıştır. İlk 4 yıkamada 1x TE tampon içerisine 1 mM NaCl ilave edilmiştir. 5. ve 6. yıkamalar için 1x TE ile 1 mM PMSF (fenil metil sülfanil florid) kullanılmıştır. 7. ve 8. yıkamalar 1x TE, 9. ve 10. yıkamalar ise 0.1x TE ile gerçekleştirilmiştir. Yıkamalar sonrasında içerisinde saflaştırılmış genomik DNA bulunan agaroz kalıpları restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesime hazır hale gelmiştir (CHEF-DR III Applications Guide, Cat: 170-3690).

### 3.2.2.5. DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi

Agaroz kalıpları içerisindeki saflaştırılmış DNA uygun koşullarda farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamele edilebilmekte ve 4 defa elektroforeze tabi tutulabilmektedir. TE tampon çözeltisi ile yıkanan agaroz kalıpları bir lam üzerinde veya steril cam petri içerisinde bistüri yardımıyla 4 eşit parçaya ayrılmıştır. Parçaların bir tanesi 1.5 ml' lik steril mikrosantrifüj tüpleri içerisine aktarılmış ve üzerine enzim karışımı ilave edildikten sonra uygun sıcaklıklarda inkübe edilerek kesime bırakılmıştır. Geriye kalan üç parça ise sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 0.1x TE tampon içerisinde +4 °C' de saklanmıştır.

Çalışma sürecinde *SmaI* (SibEnzyme, Russia), *ApaI* (SibEnzyme, Russia) ve *I-CeuI* (New England BioLabs) enzimleri kullanılmıştır. Her örnek için *SmaI* enziminden 30U, *I-CeuI* enziminden 10U, *ApaI* enziminden ise 25U kullanılarak son reaksiyon hacmi 100 µl olacak şekilde enzim karışımları hazırlanmıştır. *ApaI* ve *SmaI* restriksiyon endonükleazları için 16 saat, *I-CeuI* için ise 3 saat inkübasyon sürelerinde su banyosunda enzim kesimi gerçekleştirilmiştir.

---

#### ***SmaI* Enzim Karışımı (1 örnek için)**

---

1.5 µl	<i>SmaI</i> enzimi (20000 U/ml)
10 µl	1x SE-Buffer Y
88.5 µl	ddH <sub>2</sub> O

---

Her kalıp üzerine 100 µl enzim karışımı dağıtıldıktan sonra 30 °C' de 16 saat inkübe edilmiştir.

***SmaI* - Tanıma Bölgesi:** 5'...CCC↓GGG...3'  
3'...GGG↑CCC...5'



---

***ApaI* Enzim Karışımı (1 örnek için)**

---

2.5 µl *ApaI* enzimi (10000 U/ml)  
10 µl 1x SE-Buffer Y  
87.5 µl ddH<sub>2</sub>O

---

Her kalıp üzerine 100 µl enzim karışımı dağıtıldıktan sonra 37 °C' de 16 saat inkübe edilmiştir.

***ApaI* - Tanıma Bölgesi:** 5'...GGGCC↓C...3'  
3'...C↑CCGGG...5'

---

***I-CeuI* Enzim Karışımı (1 örnek için)**

---

2 µl *I-CeuI* enzimi (5000 U/ml)  
1 µl 100x BSA  
10 µl 10x NEBuffer 4  
87 µl ddH<sub>2</sub>O

---

Her kalıp üzerine 100 µl enzim karışımı dağıtıldıktan sonra 37 °C' de 3 saat inkübe edilmiştir.

**Tanıma Bölgesi:** 5'...CGTAACTATAACGGTCCTAA↓GGTAGCGAA...3'  
3'....GCATTGATATTGCCAG↑GATTCCATCGCTT.....5'

Enzim kesimi yapıldıktan sonra kalıplar üzerindeki enzim karışımı alınmış, enzim aktivitesini durdurmak ve elektroforeze hazırlamak amacıyla agaroz kalıpları 1 ml 0.5x TBE tampon içerisinde oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda yaklaşık bir saat çalkalanmıştır (CHEF-DR III Applications Guide, Cat: 170-3690).

### 3.2.2.6. Kalıpların elektroforez jeline yüklenmesi

Elektroforez, hazırlanan %1' lik PFGE agaroz jeli ile gerçekleştirilmiştir. 1 gr agaroz (pulsed-field certified agarose, Bioshop) 100 ml 0.5x TBE tampon içerisine ilave edilmiş ve mikrodalga fırında eritildikten sonra oda sıcaklığında soğuması için beklenmiştir. CHEF DRIII (BioRad) ekipmanının bir parçası olan agaroz kasedi hazırlanmış, ardından 15 kuyucuklu tarak agaroz kasedi üzerine yatay düzlem boyunca yerleştirilmiştir. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının etrafındaki tampon kurutma kağıdı ile alındıktan sonra kuyucukların ucuna yerleştirilmiştir. Baştaki, ortadaki ve sondaki kuyucuklar marker için boş bırakılmıştır. Tarak, agaroz kasedi üzerine dikey şekilde yerleştirildikten sonra oda sıcaklığında soğutulmuş PFGE agaroz hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat edilerek kaset içerisine dökülmüştür. Oda sıcaklığında yaklaşık yarım saat agarozun polimerizasyonu beklenmiştir. Bu sırada 2 lt kadar 0.5x TBE tamponu, stok olarak kullanılan 10x TBE' den hazırlanmış ve içerisine % 10' luk tiyoüre çözeltisinden 3 ml ilave edilerek elektroforez tankı içerisine aktarılmış, koşturma tamponu olarak kullanılmıştır.

---

#### 10x TBE Tampon (1 litre)

---

108 g	Trizma base
55 g	Borik asit
7.5 g	EDTA

---

Bir miktar su içerisinde kimyasallar çözüldükten sonra, son hacmi 1 lt' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH' sı 8.0-9.0 arasında olmalıdır. Çözelti 121 °C' de 15 dk süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

Polimerize olmuş agaroz jel içerisine ticari olarak satın alınan Lambda Ladder PFG Marker' dan (New England Biolabs-5µg/ml) bistüri yardımıyla 1' er mm kalınlığında parçalar halinde kesilerek boş bırakılan kuyucuklara dikkatlice aktarılmıştır. Agaroz jel, kaset içerisinden tablası ile beraber çıkarılmış ve elektroforez tankı içerisindeki hazneye yerleştirilmiştir.

### 3.2.2.7. Elektroforez

Elektroforez CHEF DRIII (Bio-Rad) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her elektroforez için darbe açısı (pulse angle) 120°, tampon sıcaklığı ise 14 °C olarak ayarlanmıştır. Her restriksiyon enziminin kesimden sonra oluşturduğu bantların büyüklükleri dikkate alınarak elektroforez koşulları optimize edilmiştir. *SmaI* enzim kesimi sonucunda oluşan restriksiyon parçaları 6 volt/cm akım hızıyla, *ApaI* ve *I-CeuI* enzim kesimi sonucunda oluşan restriksiyon parçaları ise 5 volt/cm akım hızıyla elektroforeze tabi tutularak parçaların birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır.

---

#### ***SmaI* enzimi ile kesilen kalıplar için elektroforez koşulları**

---

##### **Darbe süreleri (Pulse time):**

1. Blok: Başlangıç süresi: 0.5 sn - Bitiş süresi: 3 sn (5 saat süre ile)

2. Blok: Başlangıç süresi: 5 sn - Bitiş süresi: 25 sn (6 saat süre ile)

3. Blok: Başlangıç süresi: 40 sn - Bitiş süresi: 125 sn (8 saat süre ile)

**Toplam koşturma süresi: 19 saat**

**Akım hızı: 6 volt/cm**

---

---

#### ***ApaI* enzimi ile kesilen kalıplar için elektroforez koşulları**

---

##### **Darbe süreleri (Pulse time):**

1. Blok: Başlangıç süresi: 0.1 sn - Bitiş süresi: 5 sn (7 saat süre ile)

2. Blok: Başlangıç süresi: 5 sn - Bitiş süresi: 35 sn (10 saat süre ile)

3. Blok: Başlangıç süresi: 40 sn - Bitiş süresi : 125 sn (5 saat süre ile)

**Toplam koşturma süresi: 22 saat**

**Akım hızı: 5 volt/cm**

---

---

### ***I-CeuI* enzimi ile kesilen kalıplar için elektroforez koşulları**

---

**Darbe süreleri (Pulse time):** Başlangıç süresi: 5 sn - Bitiş süresi: 125 sn

**Toplam koşturma süresi:** 22 saat

**Akım hızı:** 5 volt/cm

---

### **3.2.2.8. PFGE jelinin görüntülenmesi ve analizi**

Elektroforez sonlandıktan sonra PFGE jeli 10 µg/ml etidyum bromid (Sigma Chem. Co., USA) içeren 800 ml ultra saf su içerisine alınmış ve jelin boyanması için yaklaşık 45 dk beklenmiştir. Ardından yarım saat saf suda bekletildikten sonra jel UV ışığı altında görüntülenmiştir. *Gel logic 200 imaging system* (Kodak company) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilmiş ve resimler TIFF formatında kaydedildikten sonra bant profilleri analiz edilmiştir. Öncelikle her jel görüntüsünde bulunan üç adet standart yardımı ile jel görüntüleri arasında normalizasyon sağlanmıştır. Daha sonra bu standartlar aracılığıyla restriksiyon parçalarının büyüklükleri hesaplanmıştır. Bant büyüklüklerinin belirlenmesinde, 3.2.1.3' de tanımlanan yöntem kullanılmıştır.

Suşlar arasındaki filogenetik ilişkileri belirleyebilmek amacıyla çok değişkenli analiz yöntemi olan Kümeleme (Cluster) analizi NTSYS pc 2.2 (Rohlf 1993) paket programı kullanılmış ve UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) dendogramı çizilmiştir.

### **3.2.3. 16S rDNA dizi analizi**

#### **3.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu**

M17 broth besiyerinde 37 °C' de 18 saat geliştirilen laktokok suşları, 10 ml' lik steril santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 6000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre çökeltisi 500 µl TE (Tris-EDTA) tampon içerisinde çözülmüş ve 14000 g' de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından hücre çökeltisi SET

(Sakkaroz-EDTA-Tris HCl) tampon içerisinde çözüldükten sonra 20 mg/ml konsantrasyondaki lizozimden 50 µl ilave edilerek 37 °C' de 30 dk süre ile inkübe edilmiştir. Ardından bu içerik üzerine 200 µl TE tampon ve 30 µl % 20' lik SDS eklenmiş ve mikrosantrifüj tüpleri yatay zeminde birkaç kez ters düz edilerek karıştırılmıştır. Karışım üzerine 5 M konsantrasyondaki NaCl' den 100 µl ilave edilmiş ve mikrosantrifüj tüpleri birkaç kez daha karıştırılmıştır. Daha sonra ortama eşit hacimde (~500 µl) fenol aktarılmış ve emülsiyon oluşana kadar karıştırıldıktan sonra 14000 g' de 15 dk +4 °C' de santrifüj edilerek fazların ayrılması sağlanmıştır. Üst faz mikropipet aracılığı ile yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine eşit hacimde (~500 µl) kloroform/izoamil alkol (24:1) eklenerek karıştırılmıştır. Karışım, 14000 g' de 15 dk oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra oluşan üst fazlar yeniden steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra % 100' lük etanolden tüpte bulunan üst fazın iki katı kadar hacimde ilave edilmiş ve DNA'nın yoğunlaşması sağlanmıştır. Bu karışım, 12000 rpm' de +4 °C' de 15 dk santrifüj edilmiş ve çökeltinin kuruması sağlanmıştır.

Çökelti kurutulduktan sonra 100 µl TE tampon ile çözülmüş ve 2 µl RNaz A eklenerek 37 °C' de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. DNA' ların saflığı nanodropta  $A_{260}/A_{280}$  oranına bakılarak ölçüldükten sonra, polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

---

**TE (Tris-EDTA) Tampon**

---

Tris	1,21	g
EDTA	0.37	g
Distile su	1000	ml

---

Çözeltilinin pH' sı  $7.4 \pm 0.02$ ' e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dk süre ile sterilize edilmiştir.

---

**SET (Sakkaroz-EDTA-TrisHCl) Tampon**

---

Tris HCl	0,788 g
EDTA	1,86 g
Sakkaroz	20 g
Distile su	100 ml

---

Çözeltisinin pH' sı 8.0  $\pm$ 0.02' e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dk süre ile sterilize edilmiştir.

**% 20'lik SDS Çözeltisi**

SDS	20 g
Steril distile su	100 ml

**Kloroform/İzoamil Alkol Çözeltisi**

Kloroform	24 ml
İzoamil Alkol	1 ml

**3.2.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile 16S rDNA bölgelerinin çoğaltılması**

Genomik DNA izolasyonunun ardından 16S rDNA bölgeleri 16S ileri ve 16S geri primerleri kullanılarak thermo cycler (Techne-TC-512, England)' da çoğaltılmıştır (Beasley and Saris 2004).

**16 S ileri primer dizisi:** 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT -3'

**16 S geri primer dizisi:** 3'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-5'

PZR işlemini gerçekleştirmek için ilk basamak PZR karışımının hazırlanmasıdır. Bu amaçla aşağıda belirtilen sıra ile reaksiyon için gerekli maddeler bir mikrosantrifüj tüpü içerisinde karıştırılmıştır.

<b>PZR Karışımı</b>	<b>Reaksiyon Hacmi</b>
Steril dH <sub>2</sub> O	29.75 µl
10x PZR tamponu	10 µl
dNTP (2 mM)*	1 µl
İleri primer (20 pmol)	1 µl
Geri primer (20 pmol)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)*	4 µl
Taq DNA polimeraz (5u/µl)*	0,25 µl
DNA	3 µl

\*Promega, USA

Primerlerin bağlanma sıcaklığı  $T_a = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$  formülü kullanılarak 54 °C olarak hesaplanmış ve PZR koşulları cihaza aşağıda belirtilen şekilde girilmiştir.

#### **PZR Koşulları**

94 °C..... 5 dk	
94°C..... 1 dk (çift zincir açılması)	} 30 döngü
54 °C..... 15 sn (primer bağlanması)	
72 °C..... 1 dk (zincir uzaması)	
72 °C..... 10 dk	
+4 °C..... ∞	

PZR amplifikasyonu sonrasında, elde edilen ürünlerden 5 µl alınarak 2 µl 6x yükleme boyası ile karıştırılmış ve % 1 oranında agaroz içeren TAE (Tris-Asetat-EDTA) (BioShop) tampon ile hazırlanan jelde 100 volt elektrik akımı altında 45 dakika koşturulmuştur. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla 1 kb DNA Marker' dan (Solis BioDyne) yararlanılmıştır.

Elektroforez sonrasında jeller, 0.2 µg/ml etidyum bromid (Sigma Chem. Co., USA) çözültisinde 20 dakika süre ile boyandıktan sonra 366 nm dalga boyunda UV ışık altında görüntülenmiş (*Gel logic 200 imaging system* - Kodak company) ve fotoğrafları çekilmiştir. 16S rDNA gen bölgesinin yaklaşık 940 baz çiftine sahip olduğu saptanmıştır.

DNA dizi analizinden önce PZR ürünlerinin saflaştırılması için, ticari olarak temin edilen PZR Saflaştırma kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) kullanılmıştır.

### **3.2.3.3. PZR ürününün baz dizilerinin belirlenmesi**

PZR ürünlerinin dizi analizleri Refgen Biyoteknoloji (ODTÜ Teknokent/Ankara) tarafından yapılmıştır. Dizi analiz sonuçları, NCBI-BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmış, tarama sonucu aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği benzerlik yüzdesiyle belirlenmiştir.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Suşların Plazmid İçeriklerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında kullanılan bakteri suşları Burcu Özkalp (2006) tarafından Türkiye' nin farklı bölgelerinden izole edilmiş ve Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetik laboratuvarında Huggins' in (1984) önerdiği fenotipik testlerin uygulanmasıyla alt tür ve biyovaryete düzeyinde tanımlanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* olarak tanımlanan bu bakteri suşlarının moleküler yöntemlerle doğrulanması amacıyla plazmid içerikleri saptanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* genotipinde olduğu bilinen ATCC 7962 standart suşu çalışılan örneklerin plazmid profillerinin karşılaştırılması amacıyla kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca plazmiden yoksun *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1614 standart suşları, kromozomal düzeyde karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla tez çalışmasına dahil edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan suşların listesi Çizelge 4.1' de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.1.** Çalışmada kullanılan suşların listesi

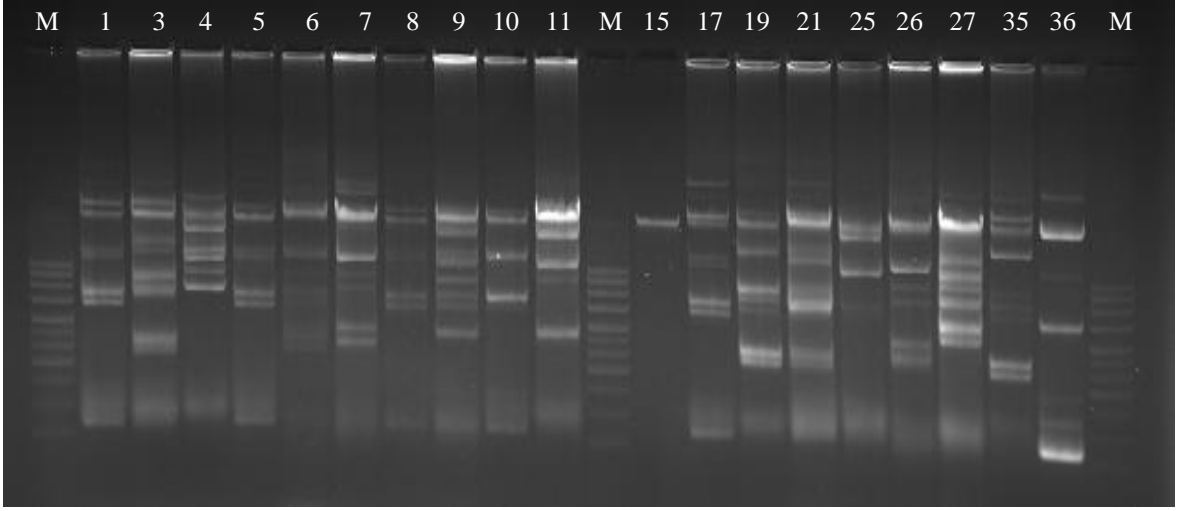
Suş Numarası	Suş Kodu	Suşun Adı
1	MBLL 1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
3	MBLL 3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
4	MBLD 4	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
5	MBLD 5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
6	MBLL 6	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
7	MBLD 7	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
8	MBLL 8	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
9	MBLL 9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
10	MBLD 10	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
11	MBLL 11	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
15	MBLC 15	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
17	MBLD 17	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>

**Çizelge 4.1.** Çalışmada kullanılan suşların listesi (devam)

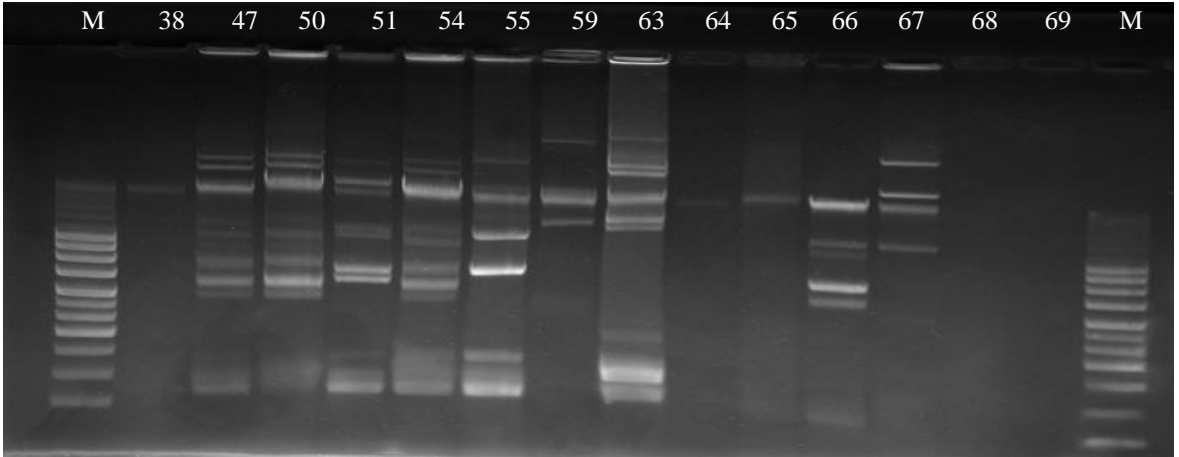
Suş Numarası	Suş Kodu	Suşun Adı
19	MBLD 19	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
21	MBLD 21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
25	MBLL 25	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
26	MBLL 26	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
27	MBLL 27	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
35	MBLD 35	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
36	MBLD 36	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
38	MBLC 38	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
47	MBLC 47	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
50	MBLC 50	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
51	MBLD 51	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
54	MBLD 54	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
55	MBLD 55	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
59	MBLD 59	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
63	MBLD 63	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
64	BLC 21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
65	LL171	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
66	M10	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
67	ATCC 7962	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
68	IL1403	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
69	MG1614	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>

Yapılan plazmid izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi çalışmaları sonucunda Türkiye kökenli *L. lactis* suşların büyüklükleri 1.5 ile 41.5 kilobaz, sayıları ise 1 ile 10 arasında değişen plazmid içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). İzolatlar arasında MBLC 15, MBLC 38, BLC 21 ve LL 171 bir adet plazmid içermekle birlikte, yalnızca MBLC 38 ve LL171' in içerdiği plazmidlerin moleküler büyüklükleri birbiriyle aynı olarak tespit

edilmiştir. MBLC 47 ve MBLD 54 suşları ise benzer plazmid profili göstermektedir. Bu suşlar 10 adet plazmid ile en fazla plazmid DNA'ya sahip izolatlar olarak değerlendirilmiştir. Suşların bütününde büyüklükleri birbirinden farklı olan 25 çeşit plazmide rastlanmıştır (Çizelge 4.2).



**Şekil 4.1.** *Lactococcus lactis* türüne ait suşların plazmid profilleri ( M: Süper sarmal DNA ladder)

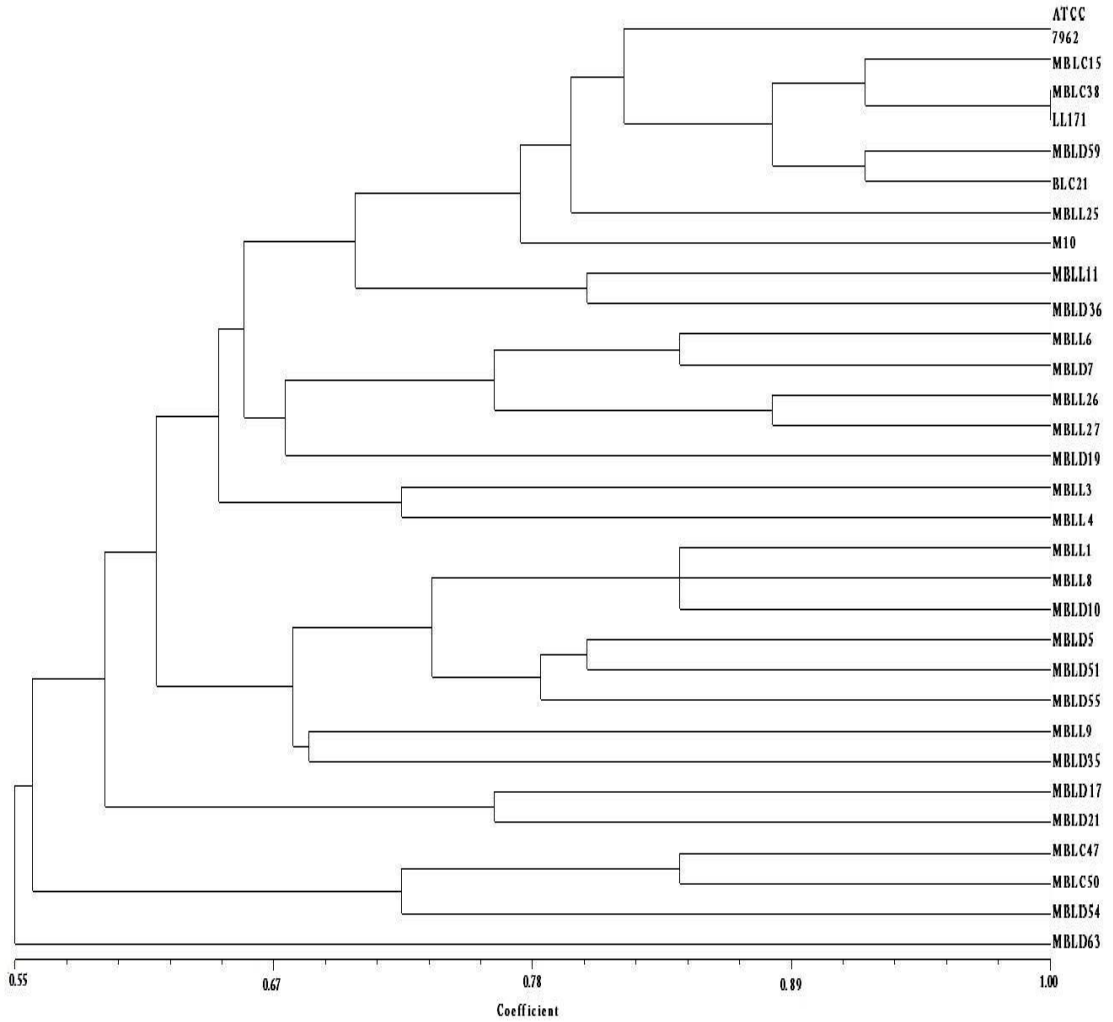


**Şekil 4.1.** *Lactococcus lactis* türüne ait suşların plazmid profilleri (Devamı)

**Çizelge 4.2.** Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının plazmid içerikleri

Suş Numarası	Suş Kodu	Plazmid Sayısı	Plazmid Büyüklükleri (kb)
1	MBLL 1	7	33.1, 29.3, 27.2, 20.3, 12.3, 10.7, 3.2
3	MBLL 3	9	33.1, 29.3, 27.2, 21.7, 20.3, 15.2, 13.4, 7, 3.2
4	MBLD 4	8	30.7, 27.2, 23.4, 20.3, 18.6, 15.2, 13.4, 3.2
5	MBLD 5	8	36.2, 29.3, 27.2, 18.6, 17.4, 12.3, 10.7, 2.5
6	MBLL 6	8	36.2, 27.2, 20.3, 15.2, 13.4, 10.7, 8, 7
7	MBLD 7	8	36.2, 30.7, 27.2, 18.6, 15.2, 13.4, 8, 7
8	MBLL 8	9	33.1, 30.7, 29.3, 27.2, 20.3, 18.6, 12.3, 10.7, 2.5
9	MBLL 9	9	27.2, 23.4, 20.3, 17.4, 15.2, 12.3, 10.7, 8, 2.5
10	MBLD 10	5	29.3, 27.2, 20.3, 12.3, 2.5
11	MBLL 11	6	29.3, 23.4, 17.4, 15.2, 12.3, 8, 3.2
15	MBLC 15	1	25.7
17	MBLD 17	9	33.1, 30.7, 27.2, 25.7, 18.6, 17.4, 10.7, 9.2, 2.5
19	MBLD 19	8	27.2, 25.7, 21.7, 13.4, 12.3, 10.7, 7, 5.5
21	MBLD 21	9	33.1, 30.7, 25.7, 21.7, 18.6, 10.7, 7, 5.5, 2.5
25	MBLL 25	4	25.7, 23.4, 15.2, 10.7
26	MBLL 26	7	30.7, 25.7, 15.2, 13.4, 10.7, 8, 5.5
27	MBLL 27	8	30.7, 25.7, 18.6, 15.2, 13.4, 10.7, 8, 7
35	MBLD 35	9	30.7, 27.2, 23.4, 20.3, 12.3, 10.7, 9.2, 5.5, 4.6
36	MBLD 36	7	30.7, 23.4, 15.2, 8, 3.2, 2.5, 1.5
38	MBLC 38	1	29.3
47	MBLC 47	10	36.2, 33.1, 29.3, 21.7, 18.6, 15.2, 12.3, 9.2, 8, 2.5
50	MBLC 50	8	36.2, 33.1, 30.7, 21.7, 18.6, 12.3, 9.2, 8
51	MBLD 51	9	36.2, 30.7, 29.3, 20.3, 18.6, 12.3, 10.7, 4.6, 2.5
54	MBLD 54	10	36.2, 33.1, 29.3, 20.3, 17.4, 12.3, 9.2, 8, 4.6, 2.5
55	MBLD 55	8	36.2, 30.7, 27.2, 23.4, 18.6, 12.3, 4.6, 2.5
59	MBLD 59	3	41.5, 27.2, 23.4
63	MBLD 63	9	41.5, 36.2, 33.1, 27.2, 23.4, 21.7, 5.5, 3.2, 2.5
64	BLC 21	1	27.2
65	LL171	1	29.3
66	M10	5	27.2, 18.6, 17.4, 10.7, 8
67	ATCC 7962	4	38, 30.7, 27.2, 18.6
68	IL 1403	0	yok
69	MG 1614	0	yok

Tüm suşların plazmid içerikleri açısından birbirleriyle en az %55 oranında benzerlik gösterdiği kümeleme analizi UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ile çizilen dendogramla saptanmıştır. Suşların birbirleri ile yakınlık derecelerini tespit etmek amacıyla sahip oldukları plazmidler için ‘var’ anlamına gelen ve pozitif kod olan “1”, ‘yok’ için ise negatif kod olan “0” değerleri verilerek kalitatif verileri içeren veri dosyası oluşturulmuştur. Ardından veri dosyasındaki değişkenlerden faydalanılarak suşlar arasındaki korelasyona göre benzerlik (similarity) matrisi oluşturulmuştur. Son aşamada ise benzerlik matrisi kullanılarak suşlar arasındaki uzaklıklara göre akrabalık ilişkilerini gösteren UPGMA dendogramı çizilmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Türkiye kökenli *Lactococcus lactis* suşlarının plazmid içeriklerinin karşılaştırılmasıyla kümeleme analizi sonucunda oluşturulan dendogram.

Dendogramdan elde edilen veriler analiz edildiğinde, MBLD 63 dışında kalan bütün suşların büyük tek bir grup içerisine dahil olduğu ve plazmid içerikleri açısından birbirleriyle en az % 55 oranında benzerlik gösterdikleri ortaya çıkmaktadır. Bu büyük grup kendi aralarında daha yakın bakteri örneklerinin bulunduğu 4 alt dala ayrılmaktadır. İlk dal MBLC 47, MBLC 50, MBLD 54 suşlarını kapsamakta ve suşlar arasında % 72 oranında benzerlik görülmektedir. İkinci dal ise sadece MBLD 17 ve MBLD 21 suşlarını kapsamakta olup benzerlik oranı % 76 olarak saptanmıştır. Çalışılan 31 suşun 26'sı birbirleriyle en az % 67 oranında benzerlik gösteren iki büyük grup oluşturmuştur.

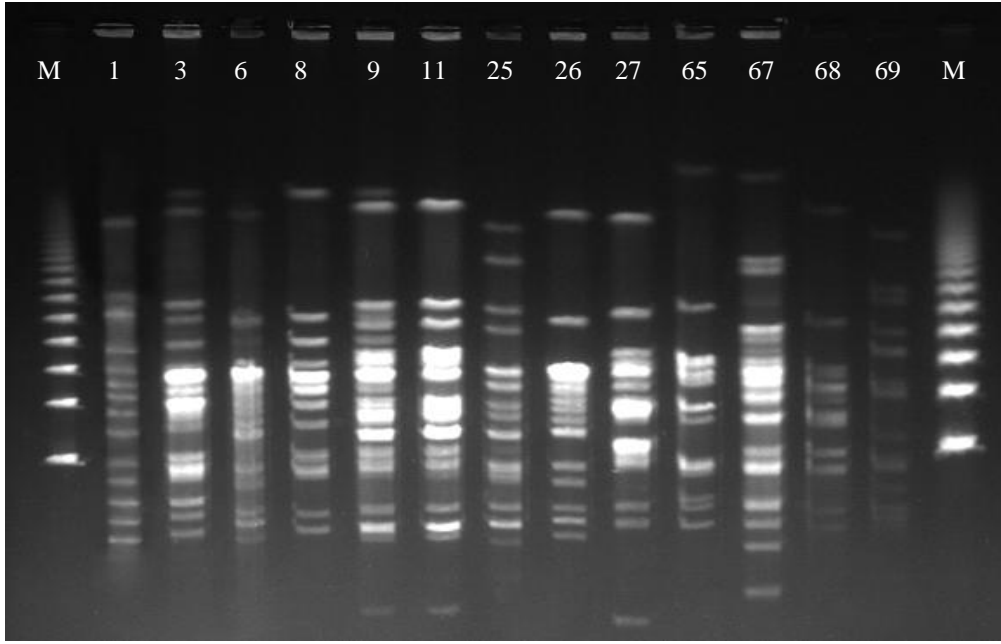
MBLC 15, MBLC 38, LL171, BLC 21 ve MBLD 59 suşları, çalışmada kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962 standart suşuna plazmid içeriği açısından en çok benzeyen grup olarak tanımlanmıştır. Yine çalışma süresince kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1614 standart suşları plazmid içermediklerinden dolayı karşılaştırmaya dahil edilmemiştir.

Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalar sonucunda laktokokların 1-11 adet plazmide sahip olduğu ve bu plazmidlerin faj, antibiyotik dirençlilik, bakteriyosin ve asit üretimi, laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite gibi bazı metabolik olaylardan sorumlu genleri taşıdığı belirtilmiştir (Ruiz-Barba *et al.* 1991, Delgado and Mayo 2003). Tür içi ve türler arası genetik madde aktarımından sorumlu olan plazmidler, bakterilere çevresel uyumu kolaylaştıracak genetik esneklik sağlamaktadırlar. Starter kültür geliştirme çalışmalarında, suşların plazmid içeriklerinin ve kodladıkları özelliklerin tanımlanması endüstriyel öneme sahip özelliklerin moleküler düzeyde belirlenmesi bakımından önem taşımaktadır (Foschino *et al.* 2001, Delgado and Mayo 2004, Mourad 2007). Bu literatür verileri ışığında plazmid profil analizi yapılan Türkiye kökenli suşlarda, tamamlama testleri ile plazmid kökenli karakteristiklerin belirlenmesi çalışmalarının başlatılması hedeflenmektedir. Bu çalışmalar hem Türkiye kökenli laktokok suşlarının starter kültür potansiyellerinin belirlenmesine hem de evrimsel kökenlerinin tanımlanmasına önemli katkılarda bulunacaktır.

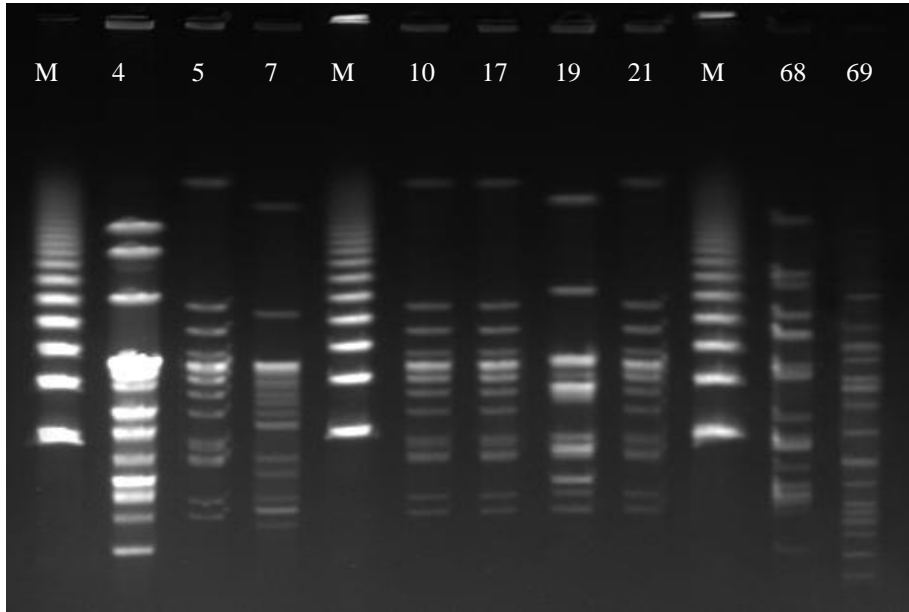
## 4.2. Suşların Restriksiyon Bant Profillerinin PFGE ile Belirlenmesi

Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının kromozomal farklarının tanımlanması amacıyla *SmaI*, *ApaI* ve *I-CeuI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak bakteri kromozomları enzime spesifik tanıma bölgelerinden kesilmiş ve oluşturdukları bant profilleri darbeli alan jel elektroforezi tekniğinin kullanımıyla karşılaştırılmıştır. Enzim seçimi yapılırken *L. lactis* genomunun düşük G+C içeriğine sahip olduğu dikkate alınmış ve tanıma bölgesinde G+C içeriği fazla olan enzimler kullanılmıştır. Güvenilir sonuçların ve kolay değerlendirilebilir verilerin elde edilebilmesi amacıyla bütün genomu sayıca 45' ten daha az parçaya ayırabilecek enzimlerin seçilmesi gerekmektedir. Bu kriterler açısından *SmaI* (CCCGGG) ve *ApaI* (GGGCCC) enzimleri çalışma için uygun bulunmuştur (Mata *et al.* 1989). Sözü edilen *SmaI* ve *ApaI* enzimlerinin tanıma bölgeleri; evrimsel süreçte kromozoma entegre olmuş lineer plazmid bölgelerini de tanıyabileceğinden, sadece 23S rDNA operon bölgelerinden kesim yapabilen ve kromozomal farklılığı belirgin şekilde ortaya koyan *I-CeuI* restriksiyon endonükleazının kullanımıyla, elde edilen verilerin doğrulanması amaçlanmıştır (Kelly *et al.* 2010).

*L. lactis* suşlarının kromozomal DNA' sının *SmaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan makrorestriksiyon örnekleri PFGE ile analiz edilmiştir. Fenotipik olarak *L. lactis* subsp. *lactis* (Şekil 4.3a), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Şekil 4.3b) ve *L. lactis* subsp. *cremoris* (Şekil 4.3c) olduğu bilinen suşların bant profillerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla aynı jel üzerinde koşturulmuşlardır. Genotipik olarak *L. lactis* subsp. *lactis* olduğu bilinen IL1403 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* olduğu bilinen MG1614 standart suşları genotipik tanımlamanın doğru yapılabilmesi amacıyla her jelin son iki kuyusuna yüklenmiş ve kontrol olarak kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 suşunun restriksiyon parça büyüklükleri Le Bourgeois ve arkadaşlarının (1992) yaptığı çalışmada elde ettiği veriler ile aynı bulunurken benzer şekilde *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1614 suşunun restriksiyon parça büyüklükleri aynı araştırmacının 2000 yılında gerçekleştirdiği bir başka çalışmada kullanılan *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 suşunun restriksiyon parça büyüklükleri ile özdeş bulunmuştur. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 suşu, bu tez çalışmasında kullanılan plazmidten yoksun MG1614 suşunun atası olarak kabul edilmektedir (Kelly *et al.* 2000). Makrorestriksiyon bant profilleri bu nedenle aynı görülmektedir.

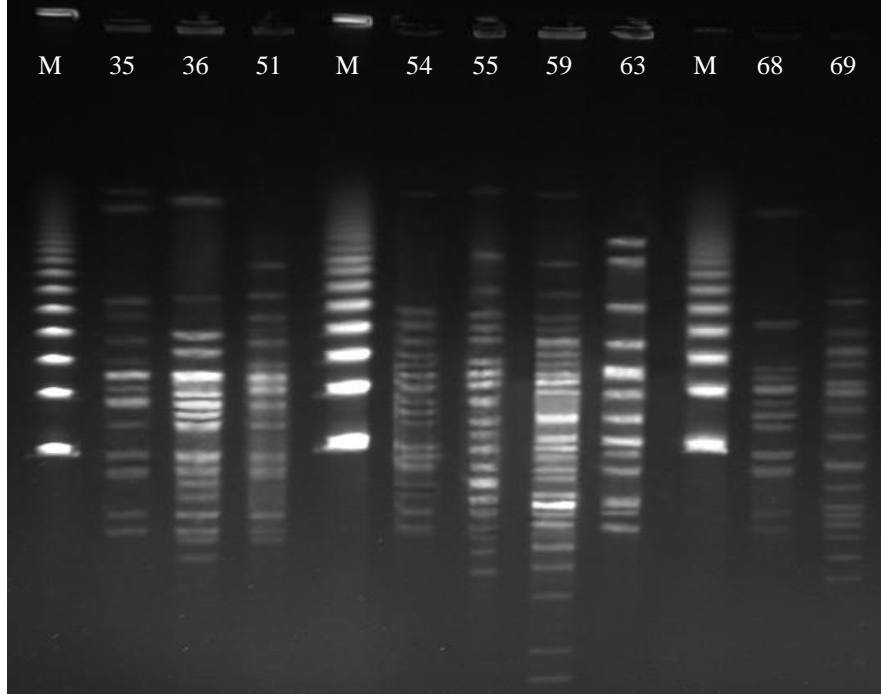


**Şekil 4.3a.** *L. lactis* subsp. *lactis* örneklerinin *SmaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri

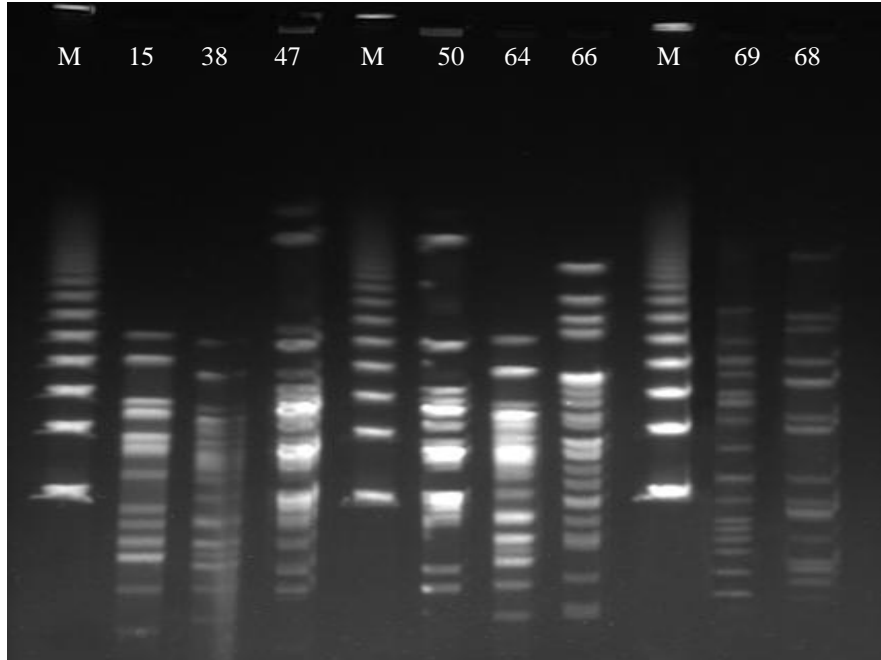


**Şekil 4.3b.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* örneklerinin *SmaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri





**Şekil 4.3b.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* örneklerinin *SmaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri (devam)

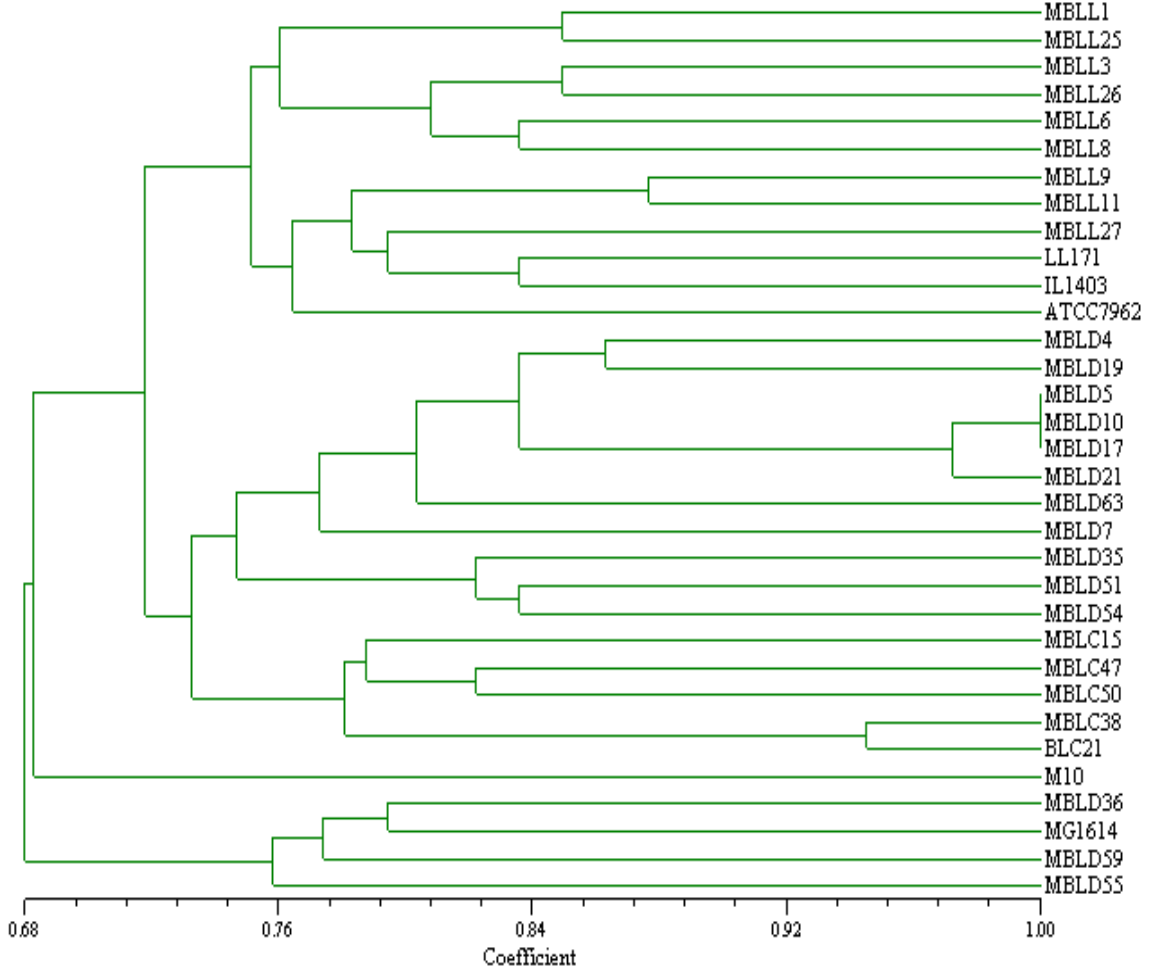


**Şekil 4.3c.** *L. lactis* subsp. *cremoris* örneklerinin *SmaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri

Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının *SmaI* bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılarak evrimsel süreçte kromozomlarında meydana gelen değişiklikler genel hatlarıyla tanımlanmaya çalışılmıştır. Bunun yanı sıra her suş, genotipik olarak dahil oldukları alt grupları bilindiğinden dolayı çalışmada standart olarak kullanılan MG1614 ve IL1403 suşlarıyla karşılaştırılmıştır. Elektroforez sonucunda büyüklükleri 950 ile 3 kilobaz, sayıları ise 10 ile 24 arasında değişen makrorestriksiyon parçalarının olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3). BLC 21, MBLC 15 ve MBLC 38 suşları *SmaI* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra diğer suşlar ile tamamen farklılık gösteren, birbirleriyle ise aynı olan bant profilleri sergilemiştir. MBLD 5, MBLD 10, MBLD 17 suşlarının birbirleri ile tamamen aynı olan ve MBLD 21 suşu ile % 98 oranında benzerlik gösteren bant profillerine sahip olduğu tespit edilmiştir. MBLD 4 suşu ise MBLD 63 suşu ile aynı makrorestriksiyon örneklerine sahip bulunmuştur. Diğer yandan, *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının birbirleri ile tamamen aynı olmayan ancak benzer bant profilleri içerdikleri tespit edilmiştir. Suşların hiçbirinin MG1614 ya da IL1403 suşları ile aynı bant profilini göstermediği belirlenmiştir. Bu suşların, Tenover *et al.* (1995) kriterlerine göre değerlendirildiğinde; 1 ile 5 arasındaki bant sayısı farklılıklarına sahip olduklarından, birbirleriyle yakın veya olası ilişkili ancak evrimsel süreçlerde kromozomları üzerinde meydana gelen delesyon ve insersiyonlardan dolayı kromozomal farklılıkların ortaya çıktığı ve ayrıştıkları söylenebilir. *SmaI* restriksiyon enzim kesimi sonucunda suşların oluşturdukları bant profillerinin PFGE analizleri, 'Dice' benzerlik katsayısı kullanılarak UPGMA kümeleme yöntemiyle tamamlanmış ve benzer suşların gruplandırılması sağlanmıştır (Şekil 4.4). Dendogramdan elde edilen verilere göre fenotipik testlerle *L. lactis* subsp. *lactis* olarak tanımlanan LL171, MBLL1, MBLL3, MBLL6, MBLL 8, MBLL 9, MBLL11, MBLL 25, MBLL 26, MBLL 27 suşları *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962 ve IL1403 standart suşları ile % 75 oranında benzerlik gösteren bir küme oluşturmuş ve tanıları doğrulanmıştır. MBLD 36, MBLD 55 ve MBLD 59 suşları, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1614 suşu ile aynı oranlarda benzerlik gösteren bir grup oluşturduklarından, genotipik olarak *cremoris* alt türüne dahil oldukları yorumu yapılmıştır. MBLD 4, MBLD5, MBLD7, MBLD10, MBLD17, MBLD19, MBLD21, MBLD35, MBLD51, MBLD54 ve MBLD63 suşları ise birbirleri ile % 75 benzerlik gösteren bir grup oluşturmuş ve genotipik olarak *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* oldukları doğrulanmıştır.

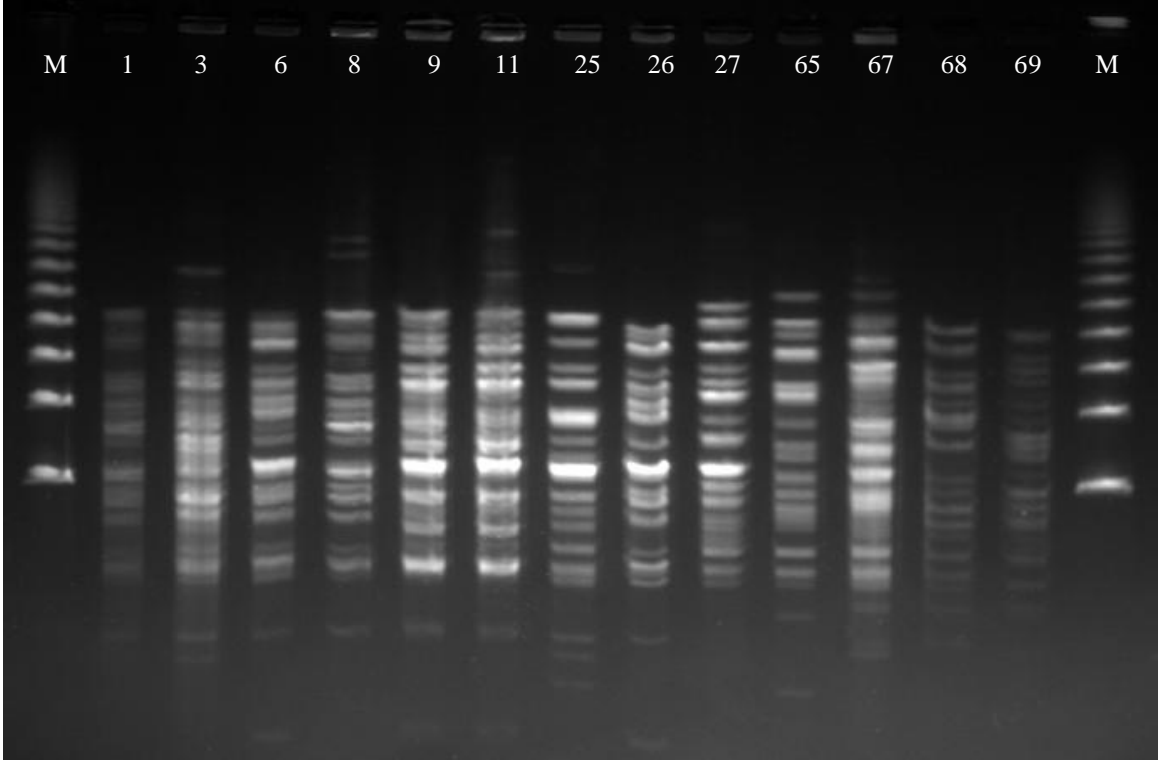
**Çizelge 4.3.** *L. lactis* suşlarının *SmaI* restriksiyon parça büyüklükleri

Suş Numarası	Suş Kodu	<i>Sma I</i> restriksiyon örnek büyüklükleri (kb)
1	MBLL 1	685, 325, 250, 180, 145, 112, 104, 82, 68, 58, 42, 22, 9, 3
3	MBLL 3	840, 765, 305, 245, 200, 155, 145, 112, 104, 77, 49, 42, 31, 22, 16, 5
4	MBLD 4	575, 455, 360, 275, 150, 120, 104, 68, 48, 38, 22, 18, 11, 3
5	MBLD 5	800, 235, 190, 150, 135, 120, 95, 68, 42, 38, 18, 11
6	MBLL 6	765, 245, 200, 155, 135, 112, 95, 77, 68, 42, 31, 18, 9, 3
7	MBLD 7	675, 210, 135, 112, 90, 77, 58, 42, 38, 31, 18, 11, 8
8	MBLL 8	840, 250, 200, 155, 145, 112, 95, 77, 49, 42, 18, 7
9	MBLL 9	860, 765, 290, 235, 210, 180, 170, 145, 112, 95, 82, 68, 49, 18, 7, 3, <3
10	MBLD 10	800, 235, 190, 150, 135, 120, 95, 68, 42, 38, 18, 11
11	MBLL 11	765, 305, 235, 180, 170, 145, 95, 82, 68, 49, 42, 38, 22, 7, 3, <3
15	MBLC 15	290, 235, 150, 140, 104, 95, 77, 42, 38, 28, 25, 16, 5
17	MBLD 17	800, 235, 190, 150, 135, 120, 95, 68, 42, 38, 18, 11
19	MBLD 19	720, 275, 135, 120, 104, 42, 38, 22, 18, 11
21	MBLD 21	800, 245, 190, 150, 135, 120, 95, 68, 42, 38, 18, 11
25	MBLL 25	500, 275, 220, 145, 112, 104, 82, 68, 49, 42, 31, 22, 9, 3, <3
26	MBLL 26	765, 245, 155, 112, 104, 95, 82, 68, 49, 31, 22, 11, 5
27	MBLL 27	765, 280, 180, 155, 135, 95, 58, 49, 22, 9, <3
35	MBLD 35	860, 765, 290, 250, 200, 135, 120, 112, 77, 68, 52, 42, 38, 22, 14
36	MBLD 36	800, 305, 220, 180, 125, 104, 77, 58, 52, 42, 38, 31, 28, 18, 14, 11, 8
38	MBLC 38	275, 200, 135, 112, 104, 95, 82, 68, 58, 48, 38, 28, 25, 22, 16, 7
47	MBLC 47	840, 685, 290, 275, 200, 165, 150, 140, 135, 104, 95, 90, 82, 74, 48, 42, 38, 31, 28, 18, 16
50	MBLC 50	685, 375, 275, 165, 150, 140, 112, 95, 82, 77, 48, 42, 38, 35, 18, 16
51	MBLD 51	455, 305, 250, 200, 135, 125, 112, 68, 52, 42, 38, 28, 16, 14, 11
54	MBLD 54	250, 220, 200, 150, 135, 125, 112, 77, 58, 52, 48, 42, 38, 31, 28, 20, 14
55	MBLD 55	850, 480, 305, 250, 220, 200, 150, 130, 125, 82, 52, 49, 42, 38, 31, 22, 18, 16, 11, 8, 5
59	MBLD 59	840, 455, 305, 250, 220, 200, 180, 140, 130, 125, 104, 58, 49, 42, 40, 38, 31, 28, 22, 18, 16, 9, 7, <3
63	MBLD 63	575, 480, 290, 190, 135, 105, 52, 48, 42, 38, 22, 18, 14
64	BLC 21	275, 200, 150, 135, 112, 104, 95, 82, 68, 48, 38, 31, 28, 25, 16, 7
65	LL171	950, 290, 170, 145, 135, 95, 77, 49, 38, 22, 18, 9
66	M10	560, 410, 325, 290, 190, 165, 150, 125, 112, 95, 82, 68, 58, 42, 35, 31, 18, 9, 8
67	ATCC 7962	920, 500, 455, 305, 235, 210, 180, 170, 145, 135, 112, 77, 58, 49, 18, 9, 3, <3
68	IL 1403	765, 235, 145, 135, 112, 104, 95, 82, 77, 74, 68, 48, 38, 22, 18, 5
69	MG1614	610, 325, 290, 220, 180, 130, 125, 105, 58, 49, 42, 38, 31, 22, 18, 16, 11, 4

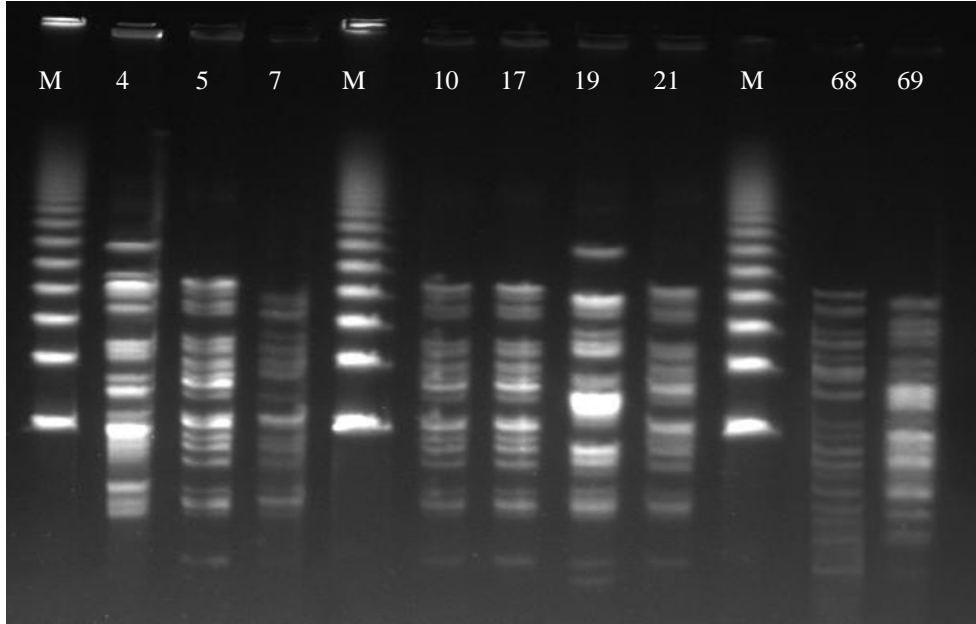


**Şekil 4.4.** Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının *SmaI* makrorestriksiyon örneklerinin PFGE analizi

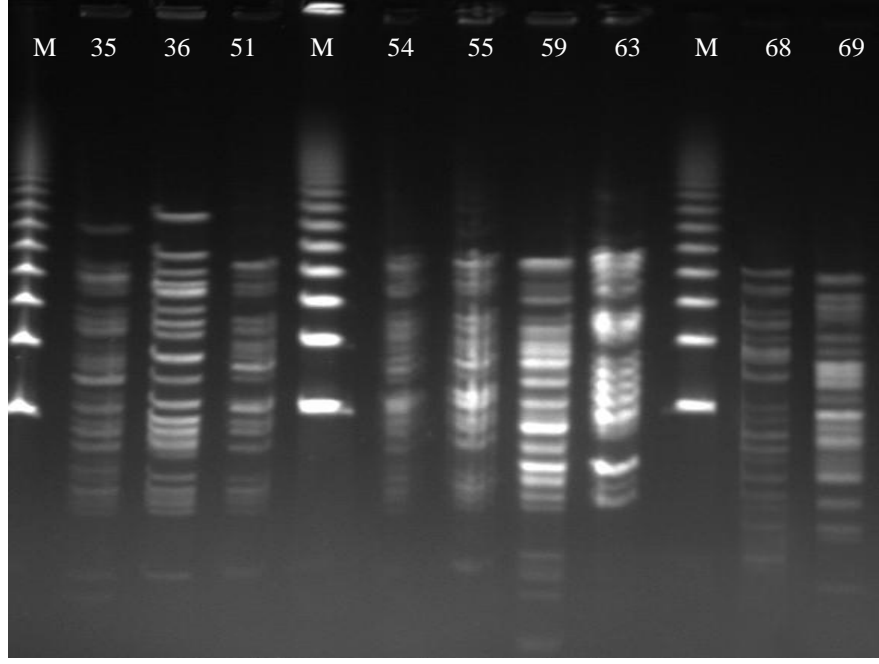
*L. lactis* suşlarının kromozomal DNA' sının *ApaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan makrorestriksiyon örnekleri PFGE ile analiz edilirken de fenotipik olarak *L. lactis* subsp. *lactis* (Şekil 4.5a), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Şekil 4.5b) ve *L. lactis* subsp. *cremoris* (Şekil 4.5c) olduğu bilinen suşlar aynı jel üzerinde koşturulmuşlardır. Genotipik olarak *L. lactis* subsp. *lactis* olduğu bilinen IL1403 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* olduğu bilinen MG1614 standart suşları genotipik tanımlamanın doğru yapılabilmesi amacıyla aynı şekilde her jelin son iki kuyusuna yüklenmiş ve kontrol olarak kullanılmıştır.



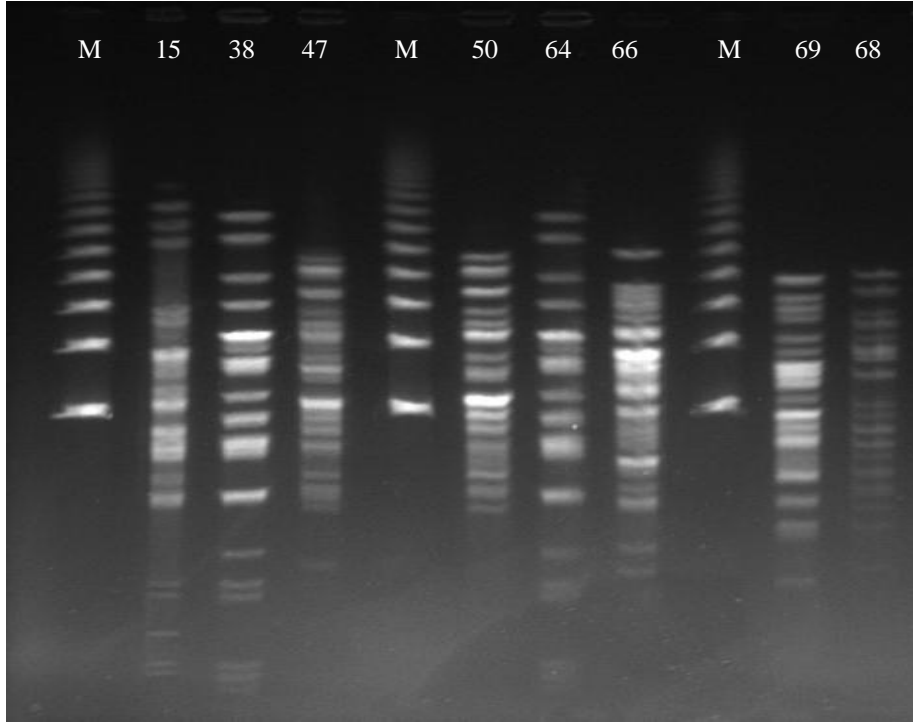
Şekil 4.5a *L. lactis* subsp. *lactis* örneklerinin *ApaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri



Şekil 4.5b. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylatis* örneklerinin *ApaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri



**Şekil 4.5b.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylatis* örneklerinin *Apal* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri (devam)



**Şekil 4.5c.** *L. lactis* subsp. *cremoris* örneklerinin *Apal* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri

Suşların *ApaI* restriksiyon enzim kesimi sonucunda oluşturdukları bant profillerinin yorumlanması *SmaI* makrorestriksiyon örneklerinin karşılaştırılmasına oranla daha zor olmuştur. Bunun nedeni restriksiyon tanıma bölgesinin genom üzerinde daha çok komplementer bölgeye bağlanması ve birbirine çok yakın büyüklüklerde bantlar oluşturması olarak tahmin edilmiştir. Aynı suşun restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ile oluşturduğu makrorestriksiyon örnekleri büyüklük açısından birbirine ne kadar yakın ise suşların kromozomal farklarının, genom büyüklüklerinin ve filogenetik ilişkilerinin irdelenmesi o kadar güç olmaktadır. Bu durum kromozom büyüklüğünün saptanması ve suşların benzerlik ilişkilerine göre gruplandırılmasında hataların oluşabileceğine işaret etmektedir.

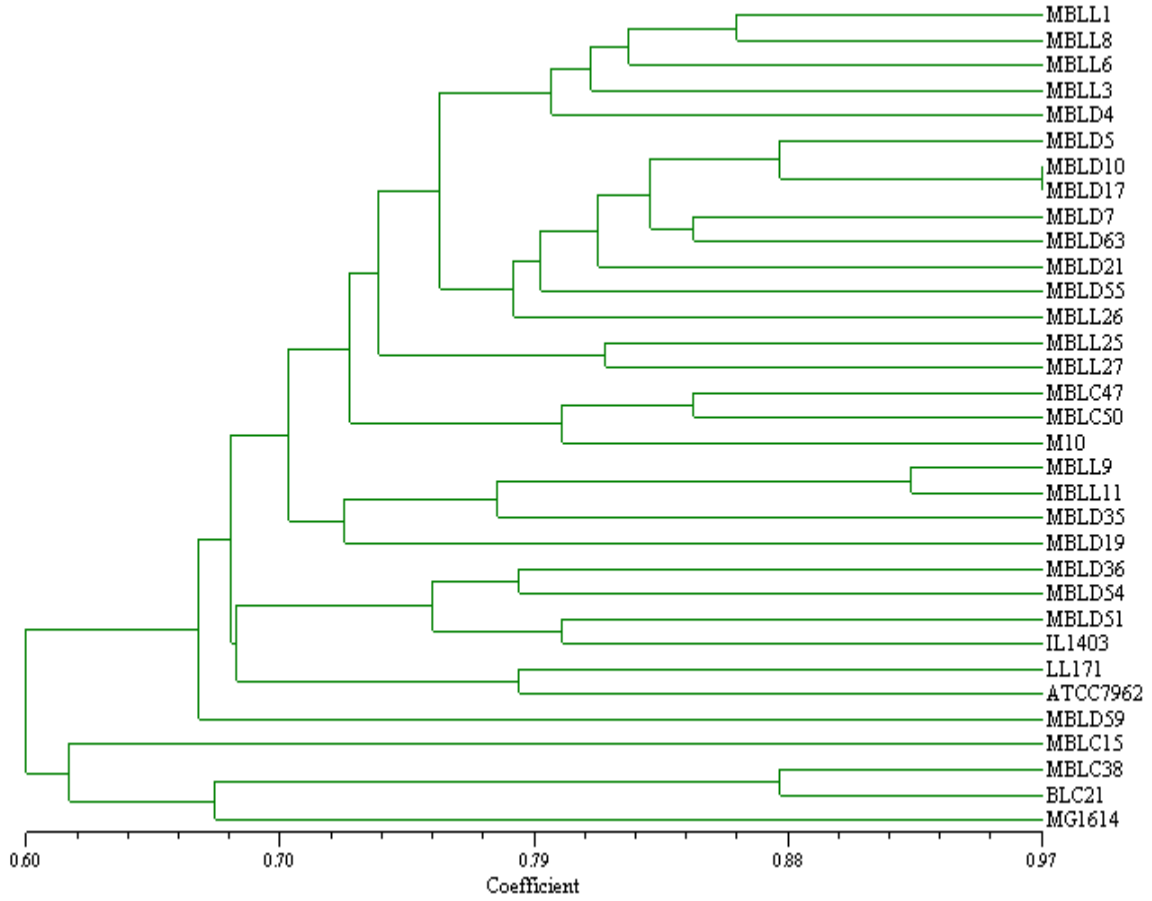
*ApaI* enzim kesimi sonucu oluşturulan makrorestriksiyon örneklerinin elektroforezi sonucunda büyüklükleri 305 kilobaz ile 700 baz çifti, sayıları ise 15 ile 24 arasında değişen bantların olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Suşların *SmaI* enzim kesimi sonucunda oluşturdukları bant profilleri, *ApaI* enzim kesimi sonucunda oluşan makrorestriksiyon örnekleri ile büyük benzerlik göstermiştir. Genel olarak tüm suşların *ApaI* bant profilleri birbirleri ile % 60 oranında benzerlik gösteren ve kendi aralarında benzerlik oranı daha fazla olan küçük gruplar oluşturmaktadır (Şekil 4.6). IL1403 ve MG1614 standart suşları dahil, oluşturdukları *ApaI* restriksiyon bant büyüklükleri birbirine yakın bulunmuş aynı şekilde literatür ile de uyum gösterdiği saptanmıştır (Le Bourgeois *et al.* 1992, 2000).

*ApaI* restriksiyon enzim kesimi sonucunda suşların oluşturdukları bant profilleri UPGMA kümeleme analizi incelendiğinde; BLC 21, MBLC 15 ve MBLC 38 dışında kalan bütün suşlar birbirleri ile % 72 oranında benzerlik gösteren bir grup oluşturmuştur. Bununla beraber *SmaI* restriksiyon örneklerinin UPGMA analiziyle oluşturulan kümelerde yer alan suşların, *ApaI* restriksiyon enzim kesimi sonucunda kendi aralarında daha yakın olan küçük gruplar oluşturdukları saptanmıştır. Bu nedenle iki enzim kesiminden de elde edilen verilerin birbirleri ile uyum içerisinde olduğu söylenebilir.

**Çizelge 4.4. *L. lactis* suşlarının *ApaI* restriksiyon parça büyüklükleri**

Suş Numarası	Suş Kodu	<i>Apa I</i> restriksiyon örnek büyüklükleri (kb)
1	MBLL 1	235, 200, 140, 135, 130,105, 83, 78, 59, 50, 45, 38, 23, 20, 4.5
3	MBLL 3	295, 235, 215, 200, 160, 140, 130, 110, 100, 92, 78, 72, 59, 49, 38, 23, 20, 18, 4.5, 2
4	MBLD 4	295, 260, 235, 225, 200, 150, 140, 130, 100, 83, 59, 50, 38, 28, 23, 20, 18
5	MBLD 5	245, 235, 200, 190, 150, 140, 115, 92, 83, 78, 55, 50, 43, 28, 23, 20, 16, 9
6	MBLL 6	235, 215, 200, 150, 130, 115, 100, 88, 78, 59, 55, 49, 38, 23, 20, 18, 4.5, <0.7
7	MBLD 7	215, 190, 160, 140, 115, 105, 78, 59, 49, 38, 28, 23, 20, 16, 9
8	MBLL 8	330, 320, 235, 200, 175, 140, 130, 105, 92, 88, 78, 59, 53, 49, 38, 23, 20, 18, 4.5
9	MBLL 9	235, 205, 190, 150, 130, 120, 92, 72, 59, 49, 38, 33, 23, 20, 4.5
10	MBLD 10	235, 215, 200, 190, 140, 130, 110, 92, 78, 55, 50, 38, 28, 23, 20, 16, 9
11	MBLL 11	350, 285, 235, 225, 205, 190, 150, 130, 92, 72, 59, 50, 33, 23, 20, 4.5
15	MBLC 15	350, 320, 295, 285, 250, 160, 140, 115, 100, 78, 72, 65, 55, 38, 28, 23, 20, 18, 16, 10.5, 8, 6, 2, 0.7
17	MBLD 17	235, 215, 200, 190, 150, 140, 110, 92, 78, 55, 50, 38, 28, 23, 20, 16, 9
19	MBLD 19	285, 215, 190, 160, 150, 140, 100, 83, 72, 59, 38, 28, 26, 23, 20, 16, 9, 7
21	MBLD 21	235, 215, 200, 190, 140, 130, 105, 100, 88, 78, 55, 38, 28, 23, 18, 16, 9
25	MBLL 25	295, 235, 200, 150, 130, 92, 78, 69, 59, 49, 43, 33, 23, 20, 18, 3, 2, 1
26	MBLL 26	215, 190, 140, 130, 105, 92, 72, 59, 50, 43, 38, 23, 20, 16, 3, <0.7
27	MBLL 27	245, 225, 200, 150, 130, 120, 92, 78, 59, 50, 43, 38, 33, 23, 18, 16
35	MBLD 35	285,225, 205, 190, 160, 135, 120, 92, 83, 72, 59, 49, 38, 33, 26, 23, 20, 16, 13, 8, 7
36	MBLD 36	295, 245, 215, 200, 190, 160, 135, 115, 92, 72, 55, 43, 33, 28, 23, 20, 16, 13, 8
38	MBLC 38	305, 270, 205, 160, 115, 105, 92, 80, 59, 49, 33, 26, 18, 10.5, 8, 6, 2, 0.7
47	MBLC 47	245, 215, 190, 160, 130, 115, 92, 83, 72, 55, 49, 38, 28, 23, 18, 16, 9
50	MBLC 50	245, 225, 190, 160, 130, 115, 92, 78, 59, 49, 38, 28, 23, 18, 6
51	MBLD 51	225, 215, 200, 190, 140, 130, 105, 100, 80, 72, 55, 43, 33, 26, 23, 20, 16, 13, 9
54	MBLD 54	225, 190, 150, 135, 120, 105, 92, 80, 72, 55, 43, 33, 28, 23, 20
55	MBLD 55	225, 200, 190, 140, 130, 110, 88, 78, 65, 59, 49, 38, 23, 20, 16, 10
59	MBLD 59	225, 190, 175, 140, 130, 110, 105, 88, 69, 55, 38, 28, 23, 20, 18, 16, 12, 10, 7, 4.5
63	MBLD 63	235, 225, 215, 190, 140, 92, 78, 69, 59, 49, 23, 20, 16
64	BLC 21	305, 270, 205, 160, 115, 105, 83, 59, 43, 33, 28, 18, 10.5, 8, 6, 2
65	LL171	260, 225, 215, 190, 130, 120, 88, 72, 69, 59, 50, 43, 33, 23, 18, 7, 0.7
66	M10	245, 190, 175, 160, 140, 115, 92, 80, 65, 49, 38, 23, 18, 16, 10.5, 8.5
67	ATCC 7962	285, 260, 225, 200, 160, 140, 120, 100, 88, 80, 72, 59, 49, 43, 28, 23, 18, 16, 9, 2
68	IL 1403	215, 190, 150, 140, 130, 110, 105, 92, 88, 80, 72, 55, 50, 43, 33, 28, 23, 18, 16, 13, 9, 2
69	MG1614	205, 175, 160, 145, 115, 100, 83, 78, 69, 59, 49, 38, 28, 20, 16, 12, 8



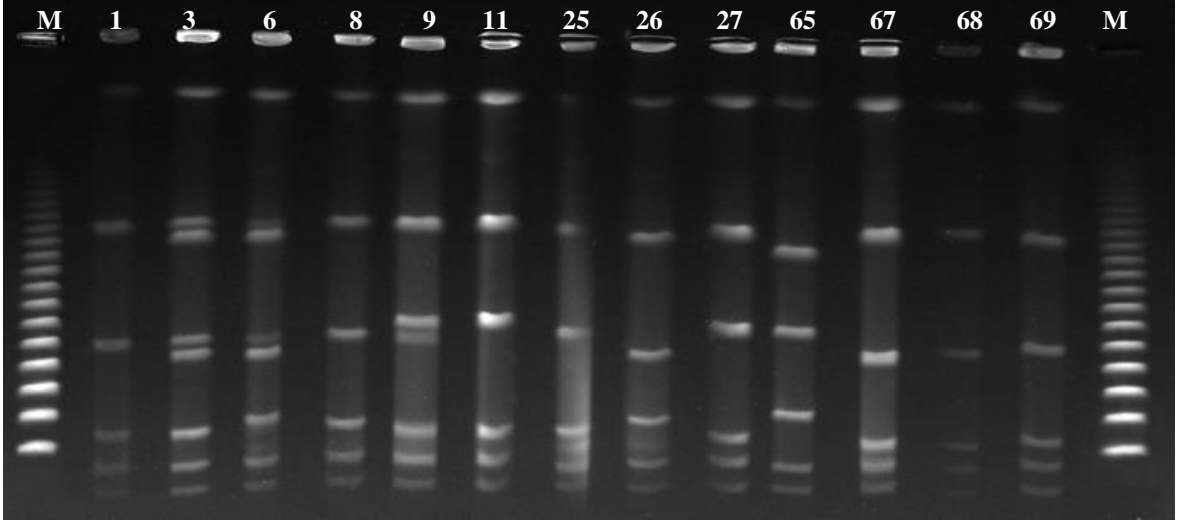


**Şekil 4.6.** Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının *Apal* makrorestriksiyon örneklerinin PFGE analizi

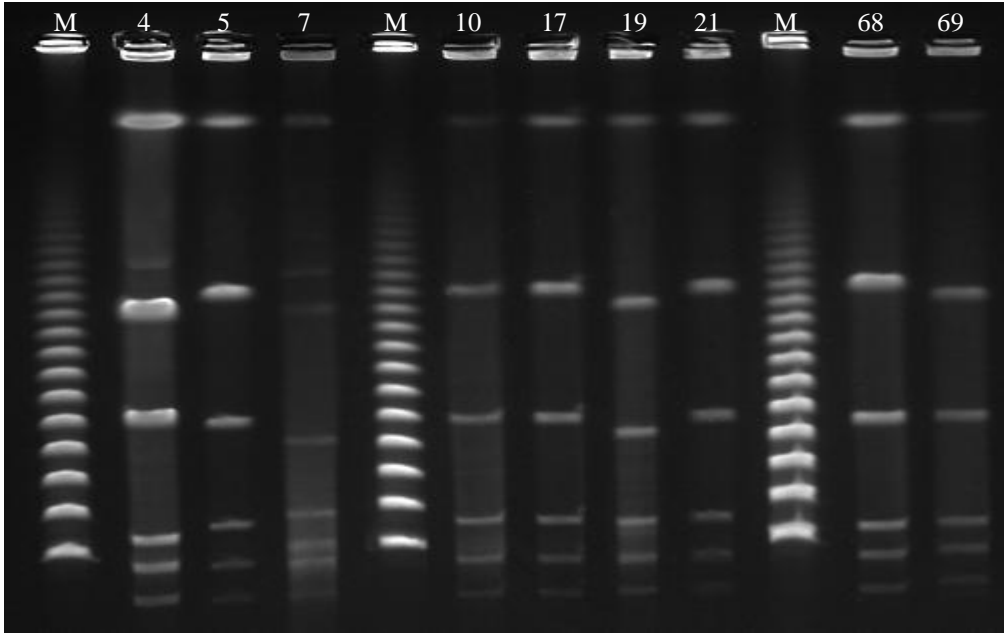
*Apal* ve *SmaI* restriksiyon bant büyüklükleri suşların kromozomal organizasyonu hakkında genel bir düşünce oluştursa da genom büyüklükleri ile ilgili kesin veriler sunmamakta, sadece fikir vermektedir. Bunun nedeni jel üzerinde birbirine yakın, büyüklükleri benzer olan makrorestriksiyon örneklerinin elektroforez koşullarından kaynaklı olarak birbirlerinden ayrılamaması ve tek bir bantmış gibi görülebilmesidir. Aynı büyüklüğe sahip iki bant jel üzerinde bir defa sayılabileceğinden yanlış ya da eksik hesaplamalara neden olabilmektedir. *SmaI* ve *Apal* enzimlerinin tüm makrorestriksiyon örneklerinin eksiksiz olarak belirlenebilmesi ve kromozom büyüklüğünün tam olarak hesaplanması amacıyla Le Bourgeois ve arkadaşlarının (1992) da uyguladığı bir yöntem olan hibridizasyon problemlerinin kullanımı tercih edilmelidir.

*L. lactis*' in kromozomal replikasyon orijininin farklı bölgelerden kopyalanan altı adet ribozomal operona sahip olduğu bilinmekte olup bu operon bölgelerinin sirküler kromozom yapılarındaki konumları IL1403 (Le Bourgeois *et al.* 1992, Davidson *et al.* 1996, Kelly *et al.* 2010) ve MG1363 (Le Bourgeois *et al.* 1995) standart suşları için belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan *I-CeuI* restriksiyon endonükleaz enziminin 29 baz çifti büyüklüğündeki tanıma bölgesi, sadece evrimsel süreçte oldukça korunmuş olan 23S rDNA bölgelerinden kesim yapmaktadır (Liu *et al.* 1999, Kelly *et al.* 2010). Bu enzimin kullanılmasıyla, RNA operonları arasında kalan kromozom parçalarının büyüklükleri hesaplanabilmekle birlikte, *L. lactis* suşlarının yalnızca kromozomal DNA'dan kökenlenen makrorestriksiyon örneklerinin karşılaştırılması imkanı da doğar. Aynı zamanda bu enzim kullanılarak oluşturulan restriksiyon parça sayısı direkt olarak genom üzerinde bulunan ribozomal operon sayısını da verdiğinden tür düzeyinde tanımlama yapılması amacına da hizmet edebilmektedir.

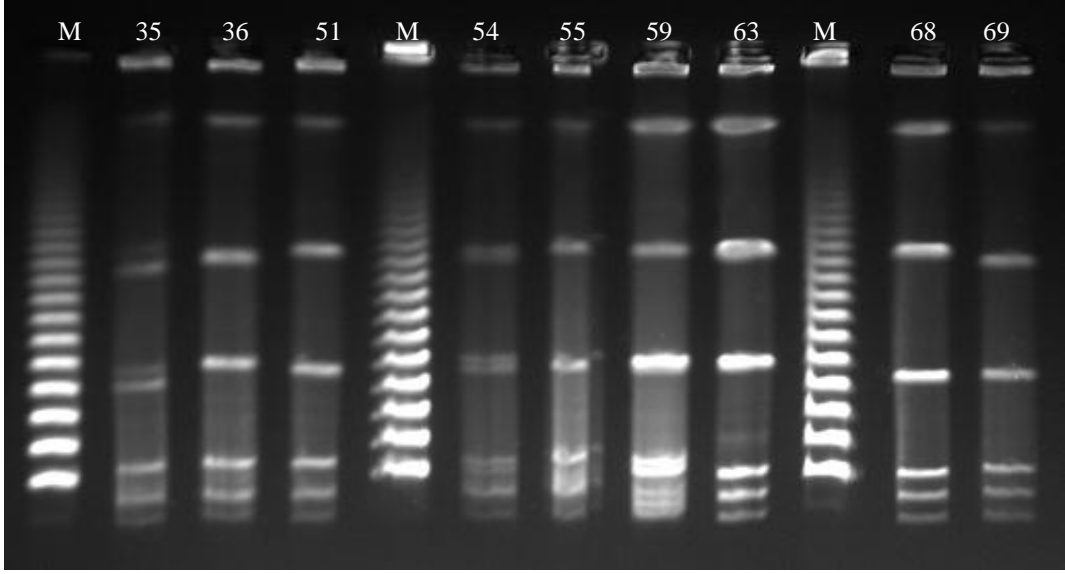
Çalışmada kullanılan Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının *I-CeuI* enzimi ile kesiminden oluşan makrorestriksiyon örneklerinin elektroforez sonuçları Şekil 4.7' de görülmektedir. *L. lactis* için altı adet rRNA operonu tanımlanmasına rağmen neredeyse izolatların yarısında tespit edilen operon sayısı literatür verileri ile uyum göstermemektedir (Le Bourgeois *et al.* 1992, 1995, Ward *et al.* 2004, Kelly *et al.* 2010). *I-CeuI* restriksiyon enzim kesimi ile kromozomun MBLC 15, MBLC 38 ve BLC 21 suşlarında 4; M10 suşunda 5; MBLD 4, MBLD 7, MBLL 9, MBLL 25, MBLL 26 ve MBLD 59 suşlarında 7; MBLL 3, MBLD 35 ve MBLD 54 suşlarında 8, MBLL 6 ve MBLC 47 suşlarında ise 9 parçaya ayrıldığı gözlenmektedir.



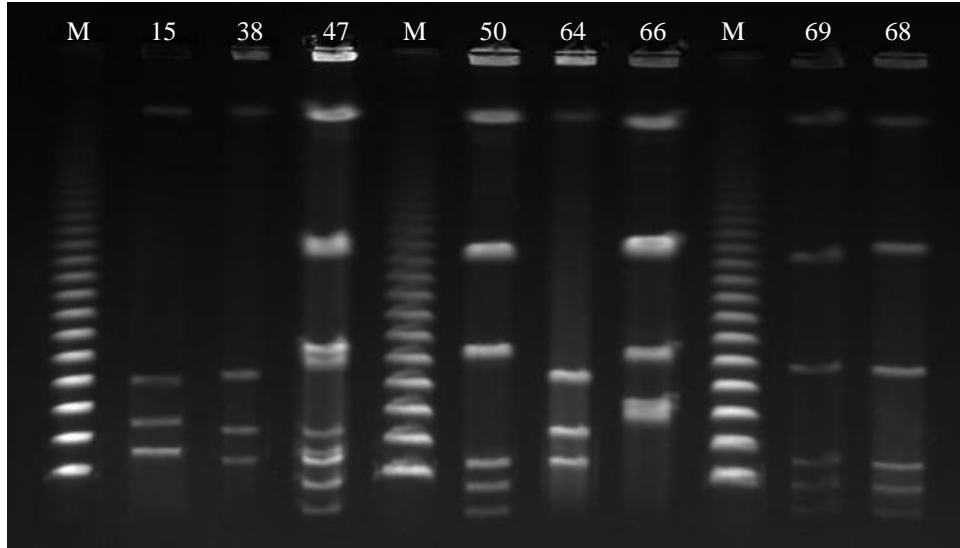
**Şekil 4.7a.** *L. lactis* subsp. *lactis* örneklerinin *I-CeuI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri



**Şekil 4.7b.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* örneklerinin *I-CeuI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri



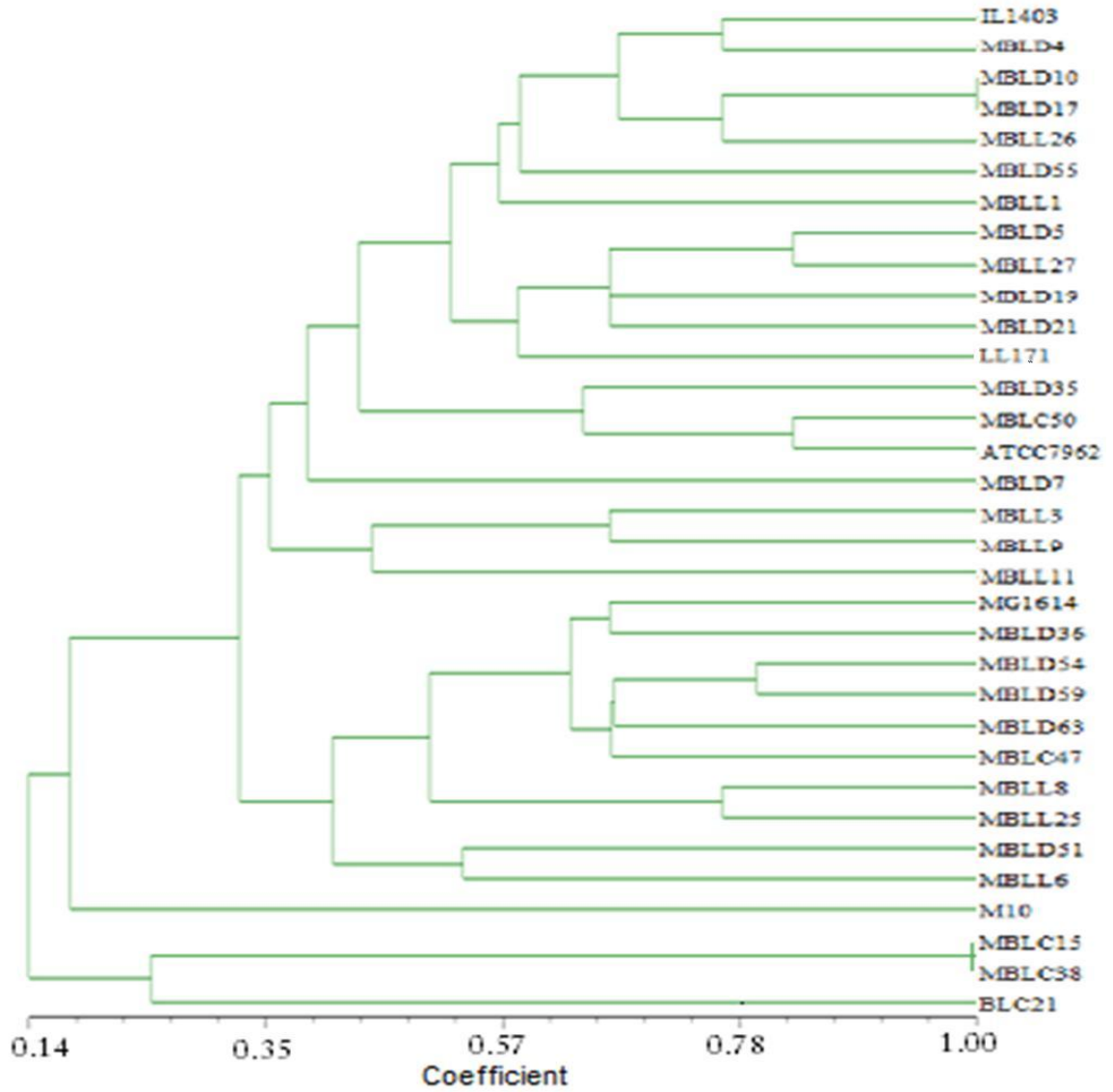
**Şekil 4.7b.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* örneklerinin *I-CeuI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri (devam)



**Şekil 4.7c.** *L. lactis* subsp. *cremoris* örneklerinin *I-CeuI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profilleri

*I-CeuI* ile oluşturulan makrorestriksiyon örneklerinin analizi; kromozom büyüklüğünün belirlenmesi, rRNA operonlarının sayısı ve genom üzerindeki konumları, kromozom üzerinde meydana gelen delesyon ve insersiyonları kapsayan genetik düzenlemeler ile ilgili kesin veriler elde etmek amacıyla kullanılabilirliği ispatlanmıştır (Kelly *et al.* 2010).

Çalışmada kullanılan Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının *I-CeuI* makrorestriksiyon örnek büyüklükleri toplandığında izolatların toplam kromozom büyüklüklerinin 1980 ile 3300 kb arasında değişim gösterdiği saptanmıştır. *L. lactis* suşlarının genom büyüklüklerinin yaklaşık 2.5 Megabaz olduğu bilinmesine rağmen çalışılan çoğu örnekten elde edilen verilerin bu bilgi ile örtüşmediği de aşıkardır (Çizelge 4.5). *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1614 ve *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 standart suşları referans olarak alındığında *cremoris* ve *lactis* genotipindeki suşların genom büyüklüklerinin hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak suşlar arasındaki yakınlık derecesinin belirlenmesi amacıyla kümeleme analizi yapılmıştır (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının *I-CeuI* makrorestriksiyon örneklerinin PFGE analizi

**Çizelge 4.5.** *L. lactis* suşlarının *I-CeuI* restriksiyon bant büyüklükleri ve toplam kromozom büyüklüklerinin hesaplanması

Suş Numarası	Suş Kodu	<i>I-CeuI</i> restriksiyon örnek büyüklükleri (kb)	Kromozom Büyüklüğü
1	MBLL 1	1550, 580, 240, 80, 45, 18	2513 kb
3	MBLL 3	1550, 580, 530, 260, 230, 87, 45, 18	3300 kb
4	MBLD 4	1480, 630, 480, 240, 80, 45, 18	2973 kb
5	MBLD 5	1480, 560, 230, 87, 45, 18	2420 kb
6	MBLL 6	1530, 550, 530, 260, 230, 95, 60, 45, 22	3322 kb
7	MBLD 7	1480, 600, 480, 205, 95, 60, 45	2965 kb
8	MBLL 8	1530, 560, 280, 95, 45, 22	2532 kb
9	MBLL 9	1520, 580, 295, 260, 87, 45, 18	2805 kb
10	MBLD 10	1480, 540, 240, 87, 45, 18	2410 kb
11	MBLL 11	1520, 600, 295, 87, 45, 22	2569 kb
15	MBLC 15	1550, 215, 135, 87	1987 kb
17	MBLD 17	1480, 540, 240, 87, 45, 18	2410 kb
19	MBLD 19	1480, 510, 215, 87, 45, 18	2355 kb
21	MBLD 21	1480, 550, 260, 87, 45, 18	2440 kb
25	MBLL 25	1520, 560, 280, 95, 80, 45, 22	2602 kb
26	MBLL 26	1480, 540, 240, 105, 80, 45, 18	2508 kb
27	MBLL 27	1480, 560, 280, 87, 45, 18	2470 kb
35	MBLD 35	1520, 540, 480, 230, 215, 80, 45, 18	3128 kb
36	MBLD 36	1520, 540, 240, 80, 45, 22	2447 kb
38	MBLC 38	1550, 215, 135, 87	1987 kb
47	MBLC 47	1530, 560, 280, 240, 135, 87, 80, 45, 22	2979 kb
50	MBLC 50	1520, 560, 280, 80, 45, 18	2508 kb
51	MBLD 51	1480, 550, 230, 80, 45, 22	2407 kb
54	MBLD 54	1550, 540, 240, 230, 87, 80, 45, 22	2794 kb
55	MBLD 55	1570, 560, 240, 87, 45, 18	2520 kb
59	MBLD 59	1550, 560, 240, 87, 80, 45, 22	2584 kb
63	MBLD 63	1500, 560, 240, 80, 45, 22	2447 kb
64	BLC 21	1530, 230, 135, 80	1957 kb
65	LL171	1480, 510, 280, 105, 45, 18	2438 kb
66	M10	1480, 560, 280, 180, 160	2660 kb
67	ATCC 7962	1520, 560, 215, 80, 45, 18	2438 kb
68	IL 1403	1480, 560, 240, 80, 45, 18	2423 kb
69	MG1614	1530, 530, 240, 80, 45, 22	2447 kb

Dendogramdan elde edilen veriler, MBLC 15 ve MBLC 38 suşları ile MBLD 10 ve MBLD 17 suşlarının aynı izolatlar olduğunu kanıtlamaktadır. M10, BLC 21, MBLC 15 ve MBLC 38 suşları dışındaki suşlar kendi aralarında tek bir grup oluşturmaktadır. Ancak bütün suşlar dikkate alındığında, suşlar arasındaki benzerliğin % 14 oranında olduğu ve büyük

oranda heterojenite gözleendiği dikkat çekmektedir. Gerek dendogramdan elde edilen veriler gerekse *I-CeuI* restriksiyon endonükleaz muamelesi sonucunda oluşturulan parça sayısı dikkate alındığında, fenotipik testlerle *L. lactis* olarak tanımlanan Türkiye kökenli çiğ süt izolatlarının başka bakteri gruplarına ait olabilecekleri düşünülmüştür. Bu nedenle 16S rDNA bölgelerinin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir.

#### 4.3. 16S rDNA Dizi Analizi Sonuçları

Kromozomları *I-CeuI* restriksiyon enzim kesimine tabi tutulan ve PFGE sonuçlarına bakılarak *L. lactis* olduğundan şüphe duyulan Türkiye kökenli suşların 15 tanesi, evrimsel süreçte korunmuş bölgeler olan 16S rDNA bölgelerine spesifik primerlerin kullanımıyla polimeraz zincir reaksiyonları (PZR) gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan 940 baz çiftine sahip bu bölgenin dizi analizinden elde edilen sonuçlar, NCBI BLAST veri tabanındaki veriler ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır (Ek 1). *I-CeuI* makrorestriksiyon örnek sayısı 4 olarak saptanan ve fenotipik testler sonucunda *L. lactis* subsp. *cremoris* olduğu belirlenen MBLC 15, MBLC 38 ve BLC 21 suşlarının karşılaştırmalı 16S rDNA analizleri sonucunda doğal florası inek memesi olan *Streptococcus bovis* türüne ait oldukları kesin olarak saptanmıştır. Makrorestriksiyon örnek sayısı 5 olan ve fenotipik testlerle *cremoris* alt türüne ait olduğu belirlenen M10 suşunun *Enterococcus durans* türünün bir üyesi olduğu belirlenmiştir. MBLD 4, MBLD 7, MBLL 9, MBLL 25, MBLL 26 ve MBLD 59 suşları 7; MBLL 3, MBLD 35, MBLD 54 suşları 8; MBLL 6, MBLC 47 suşları ise 9 tane *I-CeuI* bant örneği oluşturmasına rağmen, 16S rDNA dizi analizleri sonucunda sözü edilen tüm suşların genotipik olarak *L. lactis* subsp. *lactis* olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, evrimsel süreçlerde doğal ortamlarından izole edilen Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarının 23S rDNA bölgelerine, *I-CeuI* restriksiyon enziminin tanıma bölgesini de içeren baz dizilerinin insersiyonu ile açıklanabilir. Aynı ortamı paylaşan suşlar arasında yatay gen transferleri ile kromozoma entegre olabilen lineer plazmidlerin, ılımlı profajların ve tekrar bölgelerinin kazanımı söz konusu olabilmektedir. Bu durum aynı türün alt grupları arasında kromozomal farklılıklara neden olmaktadır. Morfolojik ve biyokimyasal testler ile yapılan tanımlamalar, tamamen güvenilir sonuçlar verememekte olup elde edilen sonuçların kesinleştirilmesi amacıyla moleküler tanımlama yöntemleri ile doğrulama yapılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, 16S rDNA dizi analizinden elde edilen veriler ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

*L. lactis* üyeleri farklı kaynaklardan izole edilebilmekle birlikte ana kaynağı fermente süt ürünleri ve çiğ süttür. Fermente sütler, acı krema, yumuşak ve sert peynirler gibi çok sayıda fermente süt ürününün temel starter bileşenini oluşturan bu bakterilerin doğru tanımlanması, ticari kullanımları açısından büyük önem taşımaktadır. Zira bu türe ait alt türler ve bir biyovaryete farklı fizyolojik özellikleri nedeniyle değişik fermente süt ürünlerinin üretilmesinde kullanılan starter kültürler için farklı kombinasyonlarda hazırlanmaktadır (Limsowtin *et al.* 1996, Ward *et al.* 2002).

Halen fenotipik taksonomik çalışmaların hakim olduğu *L. lactis* tanısı ve hatta 16S rDNA genlerine dayalı dizi analizleri çoğu kez *L. lactis* alt türlerinin tanımlanmasına olanak tanımamakta ve yakın akraba cinsleri de kapsayan yanlış sınıflandırmalara yol açmaktadır (Schleifer *et al.* 1985, van Hyckama Vlieg *et al.* 2006, Rademaker *et al.* 2006). Bu temel gereksinim doğrultusunda dizayn edilen tez çalışmamızda, hızlı ve güvenilir bir kromozomal teknik ile kültür koleksiyonumuzda bulunan ve *L. lactis* alt türleri ile *diacetyllactis* biyovaryetesi düzeyinde fenotipik tanısı yapılan bakteriler esas alınarak doğrulama testleri yapılmıştır. Araştırma sonuçlarından da anlaşılacağı üzere fenotipik düzeyde tanısı yapılan suşların 4 tanesinin PFGE analizleri sonucunda laktokok cinsi üyesi olmadığı belirlenmiştir. Özellikle *I-CeuI* enziminin 23S rDNA operon bölgelerinden kesim yaparak oluşturduğu bant profilleri, PFGE analizlerinin kesin tanıda çok etkin bir yöntem olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Moleküler genetik analizler esas alındığında; 16S rDNA dizilerinin yakın bakteri gruplarında büyük oranda korunmuş olması, RAPD, AFLP ve bunları esas alan türev teknolojilerin yüksek düzeyde spesifik olmayan sonuçlar vermesi, hızlı moleküler tanı yöntemleri içerisinde PFGE tekniğini öne çıkarmaktadır.

Tez çalışmasında da kontrol suşlarla yürütülen denemelerde kanıtlandığı gibi, PFGE tekniğinde seçilen endonükleaz enzimleri büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda kullanılan *SmaI*, *ApaI* ve *I-CeuI* restriksiyon endonükleaz enzimlerinin PFGE bant profilleri esas alındığında, tüm enzimlerin sınıflandırma açısından yakın sonuçlar verdiği saptanmıştır. *ApaI* restriksiyon endonükleaz enzim kesimi sonucunda birbirine çok yakın büyüklüklerdeki bantların oluşması stabil bant oluşumunu engellemektedir. Bu durum standardizasyonda temel sorun olarak saptanmıştır. Araştırma sonuçlarına bakılarak *SmaI*



enziminin *Apal* enzimine kıyasla suşlar arasındaki kromozomal farkların tanımlanması ve benzerliklere bakılarak sınıflandırma yapılması amaçları için daha uygun olduğu söylenebilir. Sonuç olarak *I-CeuI* restriksiyon enziminin kullanılmasıyla yapılan PFGE analizlerinin tür düzeyinde, *L. lactis* suşları için *SmaI* enzim kesimi ile oluşturulan bant profillerinin karşılaştırılmasıyla ise alt tür düzeyinde tanımlamanın en iyi şekilde yapılabileceği düşünülmektedir. Kromozomun restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi ve oluşan bant profillerinin suş spesifik varyasyonları tanımlamak amacıyla kullanılması, PFGE yönteminin güçlü bir moleküler ayırım sunduğunu kanıtlamaktadır. Ancak çalışmamızda da tespit edildiği gibi 23S rDNA operonlarında da meydana gelen mutasyonlar yanlış bant profili yorumlarına yol açabilmektedir. Bu nedenle PFGE sonuçları mutlaka 16S rDNA dizi analizleri ile desteklenmelidir.

PFGE analizleri ve 16S rDNA dizi verileri beraber değerlendirildiğinde ortaya çıkan sınıflandırma, plazmid profilleri esas alınarak oluşturulan sınıflandırma ile hiçbir uyum göstermemektedir. Bu durum plazmid profillerinin laktokok sınıflandırılmasında bir kriter olarak kullanılamayacağını kanıtlamaktadır. Plazmid profilleri, ancak bu kromozom dışı DNA yapılarının kodladıkları karakterlerin tespitinde ve stabilitesinde referans alınabilir.

## KAYNAKLAR

- Achenbach, L. A., Carey, A. J., Madigan, M. T. 2001. Photosynthesis and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, (67); 2922–2926.
- Akçelik, M., Şanlıbaba, P., Tükel, Ç., Tuncer, Y. 2001. Laktokoklarda endüstriyel açıdan önem taşıyan özelliklerin genetik determinantları. *Turk Journal of Biology*, (25); 615-621.
- Aleksandra, M., Zorica, R., Anette, W., Janzen, T., Obradovic, D. 2005. Isolation and characterization of bacterial flora from farmhouse fermented milk products of Serbia and Montenegro. *Acta Veterinaria*, 4 (55); 307-318.
- Anderson, D. G., McKay, L. L. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, (46); 549-552.
- Anonim 2002. FAO/WHO. Food and agriculture organization of United Nation and world health organization working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: FAO.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In Salminen S, Von Wright A, eds. *Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, (2); 1–72. Marcel Dekker Inc; New York.
- Ayad, E. H. E., Verheul, A., Wouters, J. T. M., and Smit, G. 2001. Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for gouda-type cheese. *International Dairy Journal*, (11); 51-61.
- Babalola, O. O. 2003. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12); 710-713.
- Barriaut, D., Sylvestre, M. 1999. A coleE1-compatible expression vector for the production of his-tagged fusion proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, (75); 293-297.
- Bayjanov, J. R., Wels, M., Starrenburg, M., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Siezen, R. J., Molenaar, D. 2009. PanCGH: a genotype-calling algorithm for pangenome CGH data. *Bioinformatics*, (25); 309-314.
- Beasley, S., Saris, S., Per, E. J. 2004. Nisin producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 8 (70); 5051-5053.
- Beijerinck, M. W. 1901. Sur les ferments de lactique de l'industrie (Lactic acid bacteria of the industry) *Arch Néerland des Sciences Extractes et Naturelles*, (6); 212–243, in French.

- Birren, B., Lai, E. 1990. Methods: A companion to methods of enzymology. Pulsed-Field Electrophoresis, 1 (2); Academic Press, San Diego.
- Birren, B., Lai, E. 1993. Pulsed field electrophoresis: a practical guide. Academic Press, San Diego.
- Botina, S. G., Tsygankov, Y. D. and Sukhodolets, V. V. 2006. Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing. Russian Journal of Genetics, 12 (42); 1367-1379.
- Butler, R., Ogilvie, D. J., Elvin, P., Riley, J. H., Finniear, R. S., Slynn, G., Morten, J. E. N., Markham, A. F., Anand, R. 1992. Walking, cloning and mapping with yeast artificial chromosomes: a contig encompassing D21S13 and D21S16. Probe, (1); 3/4.
- Büyükyörük, S., Cibik, R., Çetinkaya, F., Soyutemiz, G. E., Göksoy, E. Ö., Kirkan, Ş. 2010. Isolation, phenotypic and molecular identification of *Lactococcus lactis* isolates from traditionally produced village cheeses. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9 (16); 2154-2158.
- Campbell, R. C. 1974. Statistics for biologists. Cambridge University Press, Second Edition, 385 page.
- Cai, Y., Yang, J., Pang, H. and Kitahara, M. 2010. *Lactococcus fujiensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, (61); 1590-1594.
- Carle, G. F., Frank, F., Olson, M. V. 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecule by periodic inversion of electric field. Science, (232): 65-68.
- Carr, F. J., Chill, D. and Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology, (28); 281-370.
- Casalta, E. and Montel, M. C. 2008. Safety assesment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. International Journal of Food Microbiology, (126); 271-273.
- CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis Systems. Instruction Manual and Applications Guide, Cat no: 170-3690. 1-800-4, BIO-RAD.
- Cho, L. S., Nam, S. W., Yoon, J. H., Lee, J. S., Sukhoom, A. and Kim, W. 2008. *Lactococcus chungangensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, (58); 1844-1849.
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A. and Kandler, O. 1984. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. Journal and Genetics Microbiology, (129); 3427-3431.

- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Lleda, A., Medina, M., Rea, M. C., Rodriguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy product. *Journal of Dairy Research*, (64); 409-421.
- Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N. and Gueguen, M. 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and Environmental Microbiology*, 12 (64); 4729-4735.
- Corroler, D., Desmasures, N. and Gueguen, M. 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (51); 91-99.
- Çakır, İ., Çakmakçı, M. L. 2004. Probiyotikler: Tanımı, etki mekanizması, seçim ve güvenilirlik kriterleri. *Gıda*, 6 (29); 427-434.
- Daly, C. 1983. The use of mesophilic cultures in the dairy industry. *Antonie Van Leeuwenhoek*, (49); 297-312.
- Davey, G. P. 1984. Plasmid associated with diplococcal production in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, (48); 895-896.
- Davidson, B. E., Kodias, N., Dobos, M., Hillier, A. J. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, (70); 161-183.
- De Martins, E. C. P., Alves, V. F., Franco, B. D. G. M. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriosins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, 2 (18); 191-208.
- De Vos, W. M. 1987. Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiology*, (46); 281-295.
- Decallone, J., Delmee, M., Wauthoz, P., Ellioul, M., Lambert, R. 1991. A rapid procedure for the identification of lactic acid bacteria based on the gas chromatographic analysis of cellular fatty acids. *Journal of Food Protection*, (54); 217-224.
- Delgado, S. and Mayo, B. 2003. Development of *Lactobacillus plantarum* LL441 and its plasmid-cured derivatives in cheese. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, (30); 216-219.
- Delgado, S. and Mayo, B. 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, (90); 309-319.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin Nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, (69); 193-202.

- Desmaures, N., Mangin, I., Corroler, D., Gueguen, M. 1998. Characterization of lactococci isolated from milk produced in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology*, (85); 999-1005.
- Döderlein, A. 1892. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. (The vaginal transsudate and its significance for childbed fever.) *Centralblatt für Bacteriologie*, (11); 699–700, in German.
- Drici, H., Gilbert, C., Kihal, M. and Atlan, D. 2010. Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *Journal of Applied Microbiology*, (108); 647-657.
- Duffner, F., O'Connell, M. 1995. Comparative evaluation of plasmid profiling and ribotyping in the analysis of *Lactobacillus plantarum* strain heterogeneity in silage. *Journal of Applied Bacteriology*, (78); 20–27.
- Durmaz, B., Durmaz, R. Pulsed-field gel electrophoresis. 2001. Durmaz R. (editör). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Baskı, 161-168, İstanbul.
- Ecker, J. 1990. PFGR and YAC analysis of the *Arabidopsis* genome. In *Methods: A companion to methods of enzymology*. Pulsed Field Electrophoresis (Birren B. And Lai E. eds), 1(2); 186-194.
- Elder, J. K., Amos, A., Southern, E. M. and Shippey, G. A. 1983. Measurement of DNA length by electrophoresis (I). *Analytical Biochemistry*, (128); 223–226.
- Elder, J. K. and Southern, E. M. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis (II): Comparison of methods for planting mobility of fragment length. *Analytical Biochemistry*, (170); 38–44.
- Elia, M. C., DeLuca, J. G., Bradley, M. O. 1991. Significance and measurement of DNA double strand breaks in mammalian cells. *Pharmacology And Therapeutics*, (51); 291-327.
- Endo, A. and Okada, S. 2005. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during schochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (99); 216-221.
- Euzeby, J. P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder available on the internet. *International Journal and Systematic Bacteriology*, (47); 90-592.
- Fall, P. A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F., Pilet, M. F. 2010. Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Letters in Applied Microbiology*, (50); 357–361.
- Farber, J. M. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*, (59); 1091–1101.

- Fernandez, E., Alegria, A., Delgado, S., Martin, M. C. and Mayo, B. 2011. Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 15 (77); 5324-5335.
- Foschino, R., Arrigani, C., Picozzi, C., Mora, D. and Gali, A. 2001. Phenotypic and genotypic aspects of *Lactobacillus sanfranciscensis* starians isolated from sourdough in Italy. *Food Microbiology*, (18); 277-285.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A. and Poznanski, E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *International Dairy Journal*, (19); 3-11.
- Fujita, Y., Okamoto, T. and Irie, R. 1984. Plasmid distribution in lactic streptococci. *Agriculture Biology and Chemistry*, 7 (48); 1885-1898.
- Furet, J. P., Queene, P. and Talliez, P. 2002. Quantification de bacteries lactiques par PCR quantitative. *Science of Aliments*, (22); 33-44.
- Gallagher, S., Cole, S., Li, S. and Joppa, B. 1992. Pulsed field gel electrophoresis for separation large DNA. *HSI Laboratories, Probe*, 2 (3). San Francisco.
- Gardiner, K. 1991. Pulsed-field gel electrophoresis. *Analytic Chemistry*, (63); 658-665.
- Garvie, E. I. 1984. Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. In: Davies, F. L. Law, B. A. (Eds.) *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Elsevier, 35-66, London.
- Gatti, M., Fornasari, E. and Neviani, E. 1997. Cell-wall protein profiles of dairy thermophilic lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology*, (25); 345-348.
- Gauthier, K. G., Gratadoux, J. J. and Richard, J. 1991. Conjugal plasmid transfer between lactococci on solid surface matings and during cheese making. *FEMS Microbiology and Ecology*, (85); 133-140.
- Gaya, P., Babin, M., Medina, M. and Nunez, M. 1999. Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *Journal and Applied Microbiology*, (87); 849-855.
- Gemmell, R. M. 1991. Pulsed field gel electrophoresis. In *Advancas of Electrophoresis*, (4); 1-48, Weinheim-Germany.
- Göncü, A., Alpkent, Z. 2005. Sensory chemical properties of white pickled cheese produced using Kefir, Yogurth or a commercial cheese culture as a starter. *International Dairy Journal*, (15); 771-776.

- Hacıoğlu, E., Basım, H. 2001. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. *Turk Journal of Biology*, (25); 405-418.
- Hellinck, S., Richard, J. and Julliard, F. 1997. The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* in milk depend on type of enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, (63); 2124-2130.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Society for Clinical Nutrition*, (73); 365-373.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. 2007. *The American Society for Nutrition*, (137); 838S-846S.
- Huggins, R. A. 1984. Progress in dairy starter culture technology. *Food Technology*, (38); 41-50.
- <http://www.agacler.net/forum/temel-konular-toprak-gubre-tohumsulama/201715.htm>.
- <http://www.bacterio.net>.
- <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/beasley/isolatio.pdf>.
- <http://www.connecticutvalleybiological.com/lactococcus-lactis-slide-p-14829.html>.
- <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/340320001.pdf>.
- İşlereroğlu, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. 2008. Yöresel peynirlerden antimikrobiyel aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanısı. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1 (25); 1-6.
- Jarvis, A. W. and Jarvis, B. D. W. 1981. DNA homology among lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, (41); 77-83.
- Jivadipur, I. and Tunçtürk, Y. 2006. Effect of using interesterified and non-interesterified corn and palm oil blends on quality and fatty acid composition of Turkish white cheese. *International Journal of Food Science and Technologic*, (2); 1–10.
- Kandler, O. 1983. *Antonie van Leeuwenhoek*, (49); 209–224.
- Kelly, W. J., Davey, G. P. and Ward, L. J. H. 2000. Novel sucrose transposons from plant strains of *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, (190); 237-240.
- Kelly, W. and Ward, L. 2002. Genotypic vs. phenotypic biodiversity in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, (148); 3332-3333.
- Kelly, W. J., Ward, L. J. H. and Leahy, S. C. 2010. Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biology and Evolutionary*, (2); 729-744.

- Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, M., Okamoto, T. and Ohmomo, S. 2004. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. *Japan Agricultural Research Quarterly*, (38); 111–117.
- Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M. and Mizumachi, K. 2010. Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, (143); 226-229.
- Klijn, N., Weerkamp, A. H. and de Vos, W. M. 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 2 (61); 788–792.
- Kuipers, O. P., Buist, G. and Kok, J. 2000. Current strategies for improving food bacteria. *Research Microbiology*, (151); 815–822.
- Kurt, Ş. ve Zorba, Ö. 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1 (16); 77-83.
- Latorre-Guzmann, B. A., Kado, C. I. and Kunkee, R. E. 1977. *Lactobacillus hordniae*, a new species from the leafhopper (*Hordnia circellata*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 4 (27); 362-370.
- Le Bourgeois, P., Mata, M. and Ritzenthaler, P. 1991. Pulsed-field gel electrophoresis as a tool for studying the phylogeny and genetic history of lactococcal strains. *American Society for Microbiology*, 140-145.
- Le Bourgeois, P., Lautier, M., Mata, M. and Ritzenthaler, P. 1992. Physical and genetic map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Journal of Bacteriology*, 21 (174); 6752-6762.
- Le Bourgeois, P., Lautier, M., van den Berghe, L., Gasson, M. J. and Ritzenthaler, P. 1995. Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 reveals a large genome inversion. *Journal of Bacteriology*, 10 (177); 2840-2850.
- Le Bourgeois, P., Daveran-Mingot, M. L. and Ritzenthaler, P. 2000. Genome plasticity among related *Lactococcus* strains: Identification of genetic events associated with macrorestriction polymorphisms. *Journal of Bacteriology*, 9 (182); 2481-2491.
- Limsowtin, G. K. Y., Powell, I. B. and Parente, E. 1996. Types of starters. In: Cogan, T. M. Accolas, J. P. editors. *Dairy starter cultures*. VCH Publishers, 101–129, New York.
- Lister, J. 1873. A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quart. Microbiology of Science*, (13); 380-408.



- Liu, S. L., Schryvers, A. B., Sanderson, K. E. and Johnston, R. N. 1999. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. *Journal of Bacteriology*, (181); 6747-6754.
- Liu, C.Q., Su, P., Khunajakr, N., Deng, Y. M., Sumual, S., Kim, W. S., Tandianus, J. E. and Dunn, N. W. 2005. Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, (98); 127-135.
- Lopez-Diaz, T. M., Alonso, C., Roman, C., Garcia-Lopez, M. L. and Moreno, B. 2002. Lactic acid bacteria isolated from a hand made blue cheese. *Food Microbiology*, (17); 23-32.
- MacKay, L. L. 1983. Functional Properties of plasmids in lactic streptococci, *Antonie van Leeuwenhoek*, (49); 259-274.
- 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.
- Makarova, K., Slesaver, A., Wolf, Y., Sokorin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Googstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. H., Diaz-Müniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. and Mills, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS*, 42 (103); 15611-15616.
- Makarova, K. S. and Koonin, E. V. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 4 (189); 1199-1208.
- Mannu, L., Paba, A., Pes, M. and Scintu, M. F. 2000. Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *Journal of Applied Microbiology*, (89); 191-197.
- Mannu, L. and Paba, A. 2002. Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, (92); 55-62.
- Martinez, B., Fernandez, M., Suarez, J. E. and Rodriguez, A. 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.

- Mata, M., Le Bourgeois, P. and Ritzenthaler, P. 1989. Genome comparison of *Lactococcus* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, (59); 65-70.
- Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Chadli, F. K., Cornet, J., Prévost, H. and Pilett, M. F. 2009a. Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection*, (72); 365–374.
- Matamoros, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Prévost, H. and Leroi, F. 2009b. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*, (26); 638–644.
- Meisel, J., Wolf, G. and Hammes, W. P. 1994. Heme-dependent cytochrome formation in *Lactobacillus maltaromicus*. *Systematic and Applied Microbiology*, (17); 20–23.
- Metchnikoff, E. 1908. *Prolongation of life*. New York: Putnam.
- 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. *Journal of Bacteriology*, (127); 1529-1537.
- Miller, N. and Wetterstrom, W. 2000. *The Cambridge World History of Food*. Cambridge Univ. Press. Kiple, K. Ornelas, K. editors, (2); 1123–1139, Cambridge, United Kingdom.
- Mills, S., McAuliffe, O. E., Coffey, A., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. 2006. Plasmids of lactococci-genetic accessories or genetic necesseries? *FEMS Microbiology*, (30); 243-273.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. and Yadav, H. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases*, (9); 190-198.
- Moro, E. 1900. Über den *Bacillus acidophilus* n. spec. Ein Beitrag zur Kenntnis der normalen Darmbakterien des Säuglings (*Bacillus acidophilus* n. spec. A contribution to the knowledge of the normal intestinal bacteria of infants.) *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, (52); 38–55, in German.
- Mourad, K. 2007. Plasmid DNA studies in *Lactobacillus plantarum* strain isolated from olive fermentations: production of and immunity to plantaricin OL15 is associated to a 9.6 kb plasmid (pOL15). *Grasas aceites*, 2 (58); 136-141.
- Mundt, J. O. 1986. Lactic acid streptococci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, P. H. A. eds, (2); 1065-1066, MD: The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y. and Suzuki, I. 1999. Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, (49); 163–166.
- Nomura, M., Kobayashi, M. and Okamoto, T. 2002. Rapid PCR-based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* subspecies. *Applied and Environmental Microbiology*, 5 (68); 2209-2213.
- Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H. and Okamoto, T. 2006. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied Microbiology*, (101); 396-405.
- Odamaki, T., Yonezawa, S., Kitahara, M., Sugahara, Y., Xiao, J. Z., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. and Ohkuma, M. 2011. Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species. *Letters in Applied Microbiology*, (52); 491-496.
- Orla-Jensen, S. 1919. *The lactic acid bacteria*. Fred Host and Son. Copenhagen, Copenhagen.
- Orla-Jensen, A. D. and Hansen, P. A. 1932. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parazitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II*, (86); 6-29.
- O’Sullivan, T. and Daly, C. 1982. Plasmid DNA in *Leuconostoc* species. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 2 (6); 206.
- Parente, E. and Cogan, T. M. 2004. Starter cultures: General aspect. In P.O. Fox (ed.), *Cheese chemistry, physics and microbiology*, Elsevier, (3); 123-147, Oxford, United Kingdom.
- Özkalp, B. 2006. Doğal tip *Lactococcus lactis* suşlarının endüstriyel starter kültür potansiyellerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 101 sf.
- Perez-Arellano, I., Zuniga, M. and Perez-Martinez, G. 2001. Construction of compatible wide-host-range shuttle vectors for lactic acid bacteria and *E. coli*. *Plasmid*, (6); 106-116.
- Perez Elortondo, F. J., Aldamiz Echobarria, P., Alsubi, M. and Barcina, Y. 1999. Indigenous lactic acid bacteria in Idiazabal ewes’ milk cheese. *International Dairy Journal*, (8); 725-732.
- Perez, T., Balcazar, J. L., Peix, A., Valverde, A., Velazquez, E., de Blas, I. and Ruiz-Zarzuela, I. 2010. *Lactococcus lactis* subsp. *truttae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (61); 1894-1898.
- Pfeiler, E. A. and Klaenhammer, T. R. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, (15); 546-553.

- Pogacic, T., Kagkli, D. M., Sikora, S., Kalit, S., Havranek, J. and Samarzija, D. 2011. Experimental approaches for identification of indigenous lactococci isolated from traditional dairy products. *Mljekarstvo*, 1 (61); 3-14.
- Psoni, L., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology*, (20); 575-582.
- Psoni, L., Kotzamanidis, C., Yiangou, M., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. 2007. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, (114); 211-220.
- Rademaker, M. T., Cameron, V. A., Charles, C. J. and Richards, A. M. 2006. Urocortin 3: hemodynamic, hormonal and renal effects in experimental heart failure. *European Heart Journal*, (27); 2088–2098.
- Rademaker, J. L. W., Herbet, H., Starrenburg, M. J., Naser, S. M., Gevers, D., Kelly, W. J., Hugenholtz, J., Swings, J. and van Hylckama Vlieg, J. E. T. 2007. Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 22 (73); 7128-7137.
- Rahkila, R., Nieminen, T., Johansson, P., Säde, E. and Björkroth, J. 2012. Characterization and evaluation of the spoilage potential of *Lactococcus piscium* isolates from modified atmosphere packaged meat. *International Journal of Food Microbiology*, (156); 50-59.
- Rantsiou, K. and Cocolin, L. 2006. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, (108); 255-267.
- Renault, P. 1996. Progress in genetic research of lactic acid bacteria. *Current Advances in Genetic*, (10); 15-37.
- Riley, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetic*, (32); 255-278.
- Riley, M. A. and Wertz, J. E. 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology*, (56); 117-137.
- Rohlf, J. F. 1993. NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Exeter Publishing, Setauket, N.Y.
- Ruiz-Barba, J. L., Piard, J. C. and Jimenez-Diaz, R. 1991. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *Journal and Applied Bacteriology*, (71); 417-421.

- Salama, M., Sandine, W. E. and Giovannoni, S. 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, (57); 1313-1318.
- Salama, M., Sandine, W. E. and Giovannoni, S. J. 1993. Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* from nature by colony hybridization with rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, (59); 3941-3945.
- Salama, M. S., Mustafija-Jeknic, T., Sandine, W. E. and Giovannoni, S. J. 1995. An ecological study of lactic acid bacteria: Isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science*, (78); 1004-1017.
- Salminen, S., Deighton, M. A., Benno, Y. and Gorbach, S. L. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. In: Salminen, S. von Wright, A. (eds), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 211–254, New York: Marcel Dekker.
- Sanders, M. E. 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *American Society for Nutritional Sciences*, (130); 384.
- Sandine, W., Radich, P. and Elliker, P. 1972. Ecology of the lactic streptococci. *Journal of Milk and Food Technology*, (3); 175-185.
- Sandine, W. E. 1985. The streptococci. In: Gilliland, S. E. (Ed.), *Bacterial starter cultures for food*. CRC Press, 5-23, Boca Raton.
- Schaffer, H. E. and Sederof, R. R. 1981. Improvement estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, (115); 122–133.
- Schlegel, H. G. 1997. *General Microbiology*. Cambridge University Press, 673 p, New York, USA.
- Schleifer, K. H. and Kilpper-Bälz, R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: A review. *Systematic and Applied Microbiology*, (10); 1-19.
- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D. and Fisher, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, (6); 183-195.
- Schleifer, K. H. and Ludwig, W. 1995a. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic and Applied Microbiology*, (18); 461-467.
- Schleifer, K. H. and Ludwig, W. 1995b. Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria. In: Wood, B. J. B. Holzappel, W. H. (eds.) *The genera of lactic acid bacteria*. Chapman and Hall, 7-18, London.

- Schwartz, D. C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M. and Cantor, C. R. 1982. New Techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. XLVII; 189-195.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R. and Heller, K. J. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species. LWT Food Science and Technology, (42); 448-457.
- Southern, E. M. 1979. Measurement of DNA lengths by gel electrophoresis. Analytical Biochemistry, (100); 319–323.
- Southern, E. M., Anand, R., Brown, W. R. and Fletcher, D. S. 1987. A model for the separation of large DNA molecules by crossed-field gel electrophoresis. Nucleic Acids Research, (15); 5925-5943.
- Steward, G., Furst, A. and Avdalovic, N. 1988. Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE). Biotechniques, (6); 68-73.
- Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, (36); 1-29.
- Taillienz, P., Tremblay, J., Ehrlich, S. D. and Chopin, A. 1998. Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Systematic and Applied Microbiology, (21); 530-538.
- Taibi, A., Dabour, N., Lamoureux, M., Roy, D. and LaPointe, G. 2010. Evaluation of the genetic polymorphism among *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains using comparative genomic hybridization and multilocus sequence analysis. International Journal of Food Microbiology, (144); 20-28.
- Tanigawa, K., Kawabata, H. and Watanabe, K. 2010. Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry. Applied and Environmental Microbiology, (76); 4055-4062.
- Tanskanen, E. I., Tulloch, D. L., Hillier, A. J. and Davidson, B. E. 1990. Pulsed-field gel electrophoresis of *SmaI* digest of lactococcal genomic DNA, a novel method of strain identification. Applied and Environmental Microbiology, 10 (56); 3105-3111.
- Teixeira, L., Luica, V., Merquior, V. L., Vianni, M. C., Corvako, M. G. S., Fracalanza, S. E. L., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. and Facklam, R. R. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garreriae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garreriae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. International Journal of Systematic Bacteriology, 3 (46); 664–668.

- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 9 (33); 2233-2239.
- Teuber, M. 1990. Strategies for genetic modification in lactic acid bacteria. *Food Biotechnology*, (4); 537-546.
- Tok, E. ve Aslım, B. 2007. Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği*, 1 (37); 62-68.
- Tran, K. T. M., May, B. K., Smooker, P. M., Van, T. T. H. and Coloe, P. J. 2011. Distribution and genetic diversity of lactic acid bacteria from traditional fermented sausage. *Food Research International*, (44); 338-344.
- Tsakalidou, E., Manolopoulou, E. and Kabaraki, E. 1994. The combined use of whole-cell protein extracts for the identification SDS-PAGE and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, (17); 444-458.
- Tükel, Ç. ve Akçelik, M. 2000. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşlarında laktoz plazmidlerinin tanımlanması. *Turk Journal of Biology*, (24); 405-424.
- Uchida, K., Akashi, K., Motoshima, H., Urashima, T., Arai, I. and Saito, T. 2009. Microbiota analysis of Caspian Sea yoghurt, a ropy fermented milk circulaed in Japan. *Animal Science Journal*, (80); 187-192.
- Urbach, E., Daniels, B., Salama, M. S., Sandine, W. E. and Giovannoni, S. J. 1997. The *Idh* phylogeny for environmental isolates of *Lactococcus lactis* is consistent with rRNA genotypes but not with phenotypes. *Applied and Enviromental Microbiology*, (63); 694-702.
- van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N. and Abee, T. 1991. The Bacteriocin Lactococcin: A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent protein-mediated manner. *Journal of Bacteriology*, (173); 7934-7941.
- van Daelen, R. A. J. and Zabel, P. 1991. Preparation of high molecular weight plant DNA and analysis by pulsed-field gel electrophoresis. *Plant Molecular Biology Manual*, A (15); 1-25.
- van Hylckama Vlieg, J. E. T., Rademaker, J. L. W., Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W. J. and Siezen, R. J. 2006. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion in Biotechnology*, (17); 183-190.
- van Niel, E. W. J., Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. 2002. Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 9 (68); 4350-4356.

- Vernile, A., Giammanco, G., Spano, G., Beresford, T. P., Fox, P. F. and Massa, S. 2008. Genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Pecorino Siciliano Cheese. *Diary Science and Technology*, (88); 619-629.
- Ward, L. J. H., Davey, G. P., Heap, H. A. and Kelly, W. J. 2002. *Lactococcus lactis*. *Encyclopedia of Dairy Science*, Elsevier Science Ltd, 1511-1516, London.
- Ward, L. J. H., Heap, H. A. and Kelly, W. J. 2004. Characterization of closely related lactococcal starter strains which show differing patterns of bacteriophage sensitivity. *Journal of Applied Microbiology*, (96); 144-148.
- Williams, A. M., Fryer, J. L. and Collins, M. D. 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters*, (68); 109-114.
- Wolf, G., Strahl, A., Meisel, J. and Hammes, W. P. 1991. Heme-dependent catalase activity of lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*, (12); 133-140.
- Wood, B. J. B. and Holzappel, W. 1995. *The genera of lactic acid bacteria*. (1), Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom.
- Wood, B. 1998. *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie, London.
- Wood, B. J. B. and Warner, P. J. 2003. *Genetics of lactic acid bacteria*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Yonezawa, S., Xiao, J. Z., Odamaki, T., Ishida, T., Miyaji, K., Yamada, A., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K. 2010. Improved growth of bifidobacteria by co-cultivation with *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Journal of Dairy Science*, (93); 1815-1823.
- Yörük, G. N. ve Güner, A. 2011. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2 (6); 163-176.
- Yüksekdağ, Z. N. ve Beyatlı, Y. 2009. Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmid DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. *GIDA*, 2 (34); 91-98.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlem GÜNAY

Doğum Yeri : Antakya

Doğum Tarihi : 05.08.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : Almanca – İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Hatay Osman Ötken Anadolu Lisesi (2000-2003)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği (2003-2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2009-2012)

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl: Ankara Açı Dershanesi (2009-2011)

Dikmen Bil Dershanesi (2012)